

Eustoquio Martínez Molina

**ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE
CONDICIONAN LA PRODUCCION DE ANTI BIOTICOS
POR *PSEDOMONAS REPTILIVORA***

**TESIS DOCTORALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA 146**



Biblioteca Universitaria de Granada



01533663

Prou. T 9-43
(2)

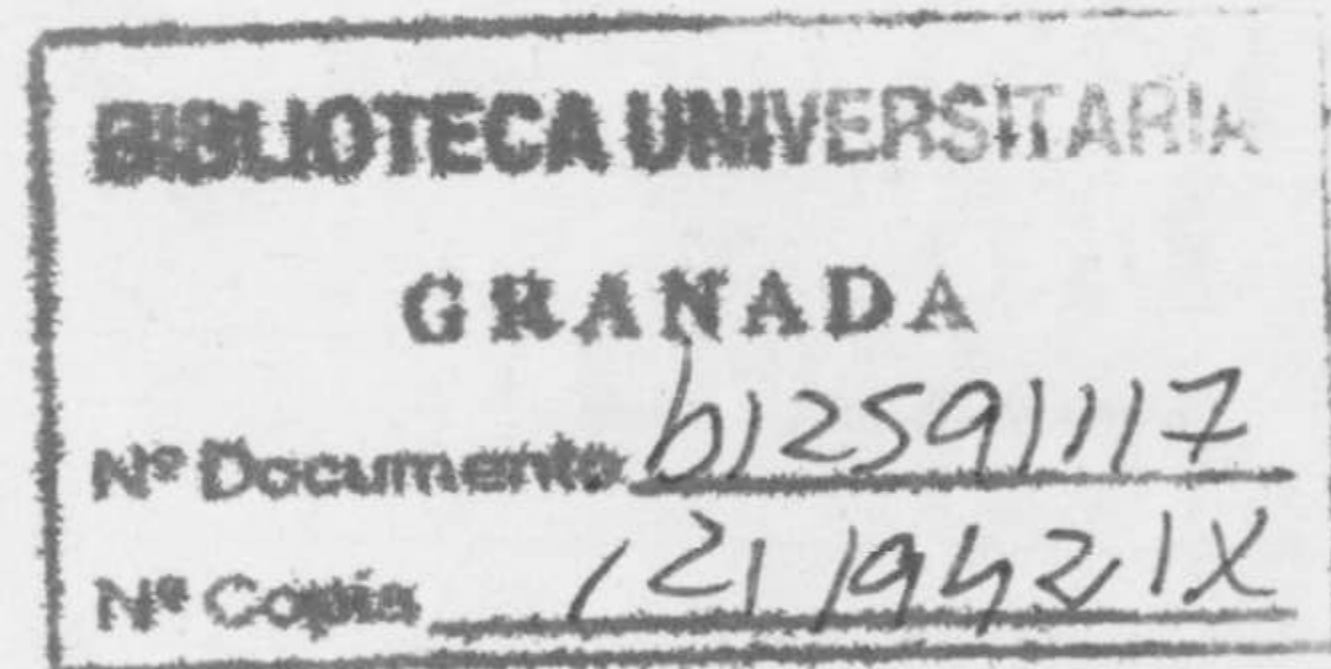
T
13
63

R-48.784
B-137-125

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE CONDICIONAN LA
PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS POR *Pseudomonas reptilivora*

EUSTOQUIO MARTINEZ MOLINA
Tesis Doctoral



UNIVERSIDAD DE GRANADA
1976



Tesis doctoral, dirigida por el Dr. D. José Olivares Pascual, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de la Estación Experimental del Zaidín. Fué leída el día 5 de Noviembre de 1976 ante el tribunal formado por los profesores: Mayor Zaragoza, Madrid; Montoya Gómez, Granada; Recalde Martínez, Granada; Olivares Pascual, Granada; Sánchez de Medina, Granada. Obtuvo la calificación de sobresaliente "cum laude".

ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE CONDICIONAN LA
PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS POR Pseudomonas rep-
tilivora.

Memoria que presenta el Li-
cenciado en Ciencias (Sec-
ción Biológicas) D. Eusto-
quio Martinez Molina, para
aspirar al grado de Doctor.

Fdo. Eustoquio Martinez Molina

Vº Bº

EL DIRECTOR

Fdo. Dr. José Olivares Pascual

Dr. En Farmacia

Prof. de Investigación del C.S.I.C.

El presente trabajo ha sido realizado en la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín del C.S.I.C. (Granada) durante los cursos académicos -- 1972-76.

La realización del trabajo - experimental ha sido sufragada por una Beca del Plan de Formación del Personal Docente e Investigador.

Mi agradecimiento al Dr. D. José Olivares Pascual, Profesor de Investigación del C.S.I.C. y Jefe del Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, director de ésta Tesis. Su dedicación y orientación constantes han hecho posible la realización de este trabajo. Su experiencia profesional y cualidades humanas han contribuido a mi formación y fortalecido mi vocación investigadora.

Al Prof. Dr. D. Federico Mayor Zaragoza por su apoyo y la favorable acogida dispensada para la realización del trabajo.

Al Prof. Dr. D. Luis Recalde Martínez, Director de la Estación Experimental del Zaidín, por haber puesto a mi disposición el material e instalaciones necesarias.

Igualmente quiero dar las gracias a las señoritas - M^a Teresa Martín-Vivaldi e Isabel López, así como a D. - Juan Rodríguez y D. Manuel Martínez por su ayuda prestada. A todos mis compañeros y al personal de la Estación Experimental del Zaidín que en alguna forma han contribuido a llevar a cabo esta Tesis.



A mis padres

INDICE

ANTECEDENTES Y OBJETO	8
INTRODUCCION	14
PLAN DE TRABAJO	33
MATERIAL Y METODOS	36
- Microorganismos utilizados	37
- Medios de cultivo	37
- Condiciones de cultivo	38
- Inoculación	39
- Medida del crecimiento microbiano	40
- Estudio del efecto de distintos factores sobre el nivel de producción de sustan- cias con actividad antimicrobiana	40
- Técnicas analíticas	46
- Separación y purificación	49
- Determinación del contenido de cobre e hierro en las sustancias activas parcial- mente purificadas	51
- Demostración de la inestabilidad del ca- rácter productor de antibióticos de <u>P.</u> - <u>reptilívor</u> a	52
- Estudio de la posible presencia de un -- plásmido responsable del caracter produc- tor de sustancias activas	52
- Tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitro- soguanidina (NTG)	57
- Determinación de requerimientos auxotró- ficos	57

- Estudio de la posible dependencia de la producción de sustancias con actividad antimicrobiana de una conversión por <u>fa</u> go	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	152
BIBLIOGRAFIA	155

ANTECEDENTES Y OBJETO DEL TRABAJO

En la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín fué aislada una bacteria que se observó era causante de una importante acción antimicrobiana. Los ensayos previos indicaron que se trataba de un antibiótico de amplio espectro de acuerdo con los resultados obtenidos frente a los microorganismos ensayados (del Rfo et al., 1972a).

Esta bacteria fué clasificada de acuerdo con la 7ª Edición del Manual de Bergey (Breed et al., 1957) como Pseudomonas reptilivora, clasificación que fué ratificada por el Centro de Identificación y Tipificación de Razas Microbianas de Lausana. Sin embargo, puede ser considerada más exactamente como perteneciente al biotipo G de P. fluorescens (Stanier et al. 1966); y así se recoge en la 8ª Edición del Manual Bergey (Buchanan & Gibbons, 1974).

Posteriormente se llegó a la conclusión, después del estudio de aislamiento y purificación realizado sobre los caldos activos, que la antibiosis inicialmente observada, no era debida a una sola sustancia, sino que podían separarse tres actividades claramente distintas, si bien con el mismo espectro antibacteriano.

Esta investigación fué realizada bajo dos aspectos bien definidos, producción, por una parte, (del Rfo et al., 1972a) y purificación por otra (del Rfo et al., - 1972b).

En cuanto a la producción, fueron estudiados una serie de factores que intervenían en la misma, determinando una mayor o menor actividad antimicrobiana en los medios de cultivo.

Tales factores fueron, grado de aireación, temperatura, presencia de glucosa y naturaleza de la fuente de nitrógeno orgánico utilizada.

Fuó encontrado un grado de oxigenación óptimo, de tres volúmenes de oxígeno por volumen de medio y minuto, una temperatura óptima de 28° C. y que la presencia de glucosa inhibía la formación de sustancias activas. En relación con los productos utilizados, como fuente de nitrógeno orgánico, y que fueron peptonas de diferentes procedencias, se encontró una variabilidad total, no sólo entre las diferentes marcas, sino incluso entre lotes de una misma marca. La investigación de este hecho llevó a la conclusión de que la presencia de cobre era requisito indispensable para la biosíntesis de las sustancias activas. Este elemento contaminaba en un grado variable los distintos preparados (Lluch, 1971), hallando

se en concentraciones que van desde 0,2 ppm a 121 ppm -- en los productos ensayados, aunque en un grado de asimililidad diferente, de acuerdo con los resultados analíticos (Lluch, et al., 1973) y los valores de actividad encontrados.

En cuanto a la purificación se refiere, la extracción con disolventes orgánicos, acetato de etilo y butanol, separaba dos fracciones activas, una de las cuales era desdoblada, a su vez, en otras dos por electroforesis en determinadas condiciones. Estas tres actividades han sido denominadas, A, la que se extrae en butanol -- cuando está en forma ácida y B₁ y B₂ las que son extraídas en acetato de etilo en medio básico y separadas entre sí por electroforesis. Alternativamente, la sustancia activa A, puede separarse de las dos B, por filtración en columna a través de Sephadex G-25, poniendo en evidencia esta técnica un peso molecular mayor para la primera y menor, pero igual entre las dos, para las segundas.

El estudio químico y físico realizado sobre la sustancia B₁, única que se ha obtenido cristalizada, indica una similitud grande con una sustancia activa aislada de cultivos de razas de P. fluorescens, llamada por unos autores YC 73 (Egawa et al., 1970) y por otros --

Fluopsina C (Itoh et al., 1970).

Sin embargo, las condiciones de producción son distintas en cada caso y hay algunas características en -- las que no coinciden exactamente (del Rfo et al., 1972b).

La existencia de dos sustancias activas nuevas, la escasa profundización en las condiciones de producción y la falta de reproducibilidad en los resultados que se daba aún bajo el más estricto control de los factores -- culturales y biológicos conocidos, han determinado la -- continuación del estudio sobre estas sustancias de poten -- cial utilización práctica, pero de real interés cientí -- fico, con el OBJETO de, por una parte, completar la in -- formación disponible sobre condiciones de producción y, por otra, conocer las causas que, a igualdad de condi -- ciones, determinan la variabilidad de los resultados y que parecen tener un origen genético.

Para cumplir el objeto de la investigación se han tenido en cuenta los datos aportados por la bibliogra -- ffa relacionada con el tema que se recoge en la intro -- ducción.

Se ha estimado oportuno hacer una revisión sobre -- los factores y condiciones que intervienen de una u --

otra manera sobre la producción de antibióticos en gene
ral y de otros hechos que pueden estar relacionados con
este caso en particular.



R. H. L.

INTRODUCCION

Es posible preguntarse con Zähler & Maas (1972) - ¿Ha sido alcanzado ya el punto donde la baja probabilidad de encontrar nuevos antibióticos no merece el esfuerzo de buscarlos? Se puede contestar taxativamente que no. Una serie de razones determina la necesidad del estudio e investigación en este campo.

La mayoría de los antibióticos son productos derivados del metabolismo secundario y este tipo de metabolismo, como el primario, está sometido a control genético. El aislamiento de mutantes con una incrementada capacidad productora de un antibiótico conocido o con una alteración metabólica que conduce a la formación de nuevas sustancias, de entre una población natural o previamente tratada con un agente mutagénico, es de posibilidades ilimitadas. La aplicación al metabolismo secundario de los conocimientos y técnicas bioquímicas y genéticas que tan alto grado de sofisticación han adquirido en el estudio del metabolismo primario, es una tarea de insospechados resultados.

El éxito de los antibióticos en la lucha contra las infecciones bacterianas y fúngicas, permite abrigar esperanzas y urge el estudio de sustancias activas para ser utilizadas en las infecciones virásicas, protozoarias y helmínticas y por supuesto, en la terapéu-

tica de las enfermedades neoplásicas. Muchos antibióticos han sido descritos con acción antitumoral, sin embargo, su efectividad y toxicidad no son nunca comparables a la de los antibióticos clásicos.

La importancia del estudio de nuevos antibióticos aumenta en proporción directa a la aparición de razas microbianas resistentes a las sustancias activas ya conocidas, y por otra parte, y especialmente en los antibióticos de amplio espectro, la frecuencia de consecuencias no deseables por eliminación de la flora normal del cuerpo limitan el empleo continuado de estos compuestos.

El área de la medicina no es la única reservada a la utilización de los antibióticos, en la nutrición animal, la conservación de alimentos perecederos y la protección de plantas se hace un amplio uso de las sustancias antimicrobianas. Por último, la investigación bioquímica utiliza los antibióticos como elementos de trabajo para producir alteraciones específicas a distintos niveles celulares y seguir etapas sucesivas en diferentes vías metabólicas.

El estudio de un nuevo antibiótico puede hacerse desde diferentes puntos de vista, una vez, por supuesto, que se haya llegado a la conclusión de que es realmente

nuevo y de que, por lo menos en potencia, puede ser -
útil en alguno de los campos de aplicación expuestos -
arriba.

La producción de una sustancia de este tipo depende
de de una serie de factores físicos, químicos y biologi
cos que deben ser conocidos en toda su amplitud para -
conseguir rendimientos que permitan el aislamiento, la
purificación y los ensayos de actividad "in vivo", --
toxicidad, etc., así como el conocimiento de su composici
ción química, biosíntesis y mecanismo de acción.

La mayoría de los antibióticos son producidos du-
rante la fase de estabilización del crecimiento microbio
mano, como resultado de un tipo de metabolismo, llamado
metabolismo secundario, diferente del que ocurre du-
rante el crecimiento y división celular. Aunque parece
que la actividad de estas sustancias es fortuita y que
no tiene significación alguna en el metabolismo secun-
dario, su formación está estrechamente relacionada con
la marcha de dicho metabolismo y por ello, con el cre-
cimiento del microorganismo productor en un medio de -
cultivo adecuado.

El medio de cultivo para la producción debe in---
cluir todos aquellos nutrientes, y de forma equilibra-
da, que requiera la biosíntesis de las sustancias activi

vas. No basta una fuente de carbono, otra de nitrógeno y sales minerales. Cada compuesto y elemento han de -- ser los adecuados, seleccionados por la experimenta--- ción previa, y deben encontrarse a una determinada con-- centración absoluta y relativa. A veces, la forma que podría parecer ideal para ser usada como materia prima no produce buenos rendimientos. En presencia de glucosa hay una menor producción de penicilina que cuando -- hay solo lactosa, (Hockenhull, 1956). El Streptomyces griseus produce cantidad significativa de estreptomici-- na si la fuente de nitrógeno es compleja (Waksman, 1945) y si la relación N/P se encuentra dentro de unos lími-- tes concretos (Hockenhull, 1960).

No solo el P, Mg, S, etc., son necesarios y en -- concentraciones óptimas, sino, los microelementos Cu, Zn, Fe, Mn, etc., juegan un papel importante en la sín-- tesis de la mayoría de los antibióticos.

Aunque los niveles óptimos se conocen perfecta-- mente, en muchos casos, su lugar y forma de actuación permanecen todavía sin aclararse. Así, Mc Daniel (1951) describe un medio óptimo para la producción de strepto-- micina que contiene Fe, Mg, Cu, Zn y Mo, Goodman et al., (1959) informan sobre la importancia del Cu en la clo-- ración de la molécula de tetraciclina, Brinberg (1959)

incluye el Co en los medios de producción de eritromicina y Gallichio & Gottlieb (1958) observaron la importancia de los iones Zn, Cu y Mn en la producción del cloranfenicol. Mas recientemente, Egawa et al., (1970) y Itoh et al., (1970), ven la necesidad de la presencia de Cu para la formación del antibiótico llamado YC 73 y del Cu y Fe para la Fluopsina C y F, respectivamente, - antibióticos producidos por razas de P. fluorescens.

Las sales minerales estan siempre presentes en los medios de cultivo preparados con ingredientes complejos (Sykes, 1956, Kempner, 1967), sin embargo, es conveniente suplementar la cantidad de algunos elementos, especialmente los macro, para mejorar el crecimiento de algunos microorganismos (Marshall & Kelsey, 1960). Powell & Errington (1963) preparan una mezcla de microelementos que contiene todos los descritos por Albert (1958) como esenciales para los seres vivos.

Cuando se requiere estudiar el efecto de estos elementos es imprescindible el empleo de medios de cultivo preparados a base de compuestos quimicos de pureza reconocida y evitar en lo posible la utilización la utilización de productos complejos, siempre contaminados, con elevadas cantidades algunas veces, de iones metálicos - (Lluch, et al., 1972), lo que dificulta la investiga---

ción en este sentido. Por otra parte, pueden formarse complejos órgano-metálicos en el medio por lo que la cantidad de elemento libre y utilizable es menor que la obtenida por las determinaciones analíticas correspondientes (Lluch et al., 1973).

Existe un pH óptimo para el crecimiento microbiano que algunas ocasiones no coincide con el correspondiente a una determinada actividad biosintética. Hehre (1946) y Koepsell & Tsuchiya (1952) encuentran que el pH óptimo para la síntesis del enzima dextranosacarasasa es 6.7, mientras que la actividad enzimática se manifiesta al máximo a un pH entre 5,0 y 5,2.

El pH del medio que se fija en el momento de su preparación varía, la mayoría de las veces, en uno u otro sentido por efecto del crecimiento microbiano, de tal forma que la variación del pH puede ser tomada en algunos casos como índice de la evolución del cultivo (Gale & Epps, 1942).

La degradación de los hidratos de carbono con producción de diferentes ácidos orgánicos, generalmente acético y láctico, es característica común en muchos microorganismos, por otra parte, la desaminación de los aminoácidos, la utilización de sales de ácidos orgánicos, etc., suben el pH del medio, a veces de forma

considerable, determinando la producción de determinados metabolitos, entre ellos los antibióticos, como en el caso particular de la producción de penicilina, (Singh & Jonhson, 1948; Brown & Peterson, 1950).

Los primeros microbiólogos observaron que el crecimiento microbiano era afectado considerablemente por la temperatura del medio ambiente. Abundantes estudios sobre el efecto de tal factor físico en cultivos puros fueron llevados a cabo a finales del XIX. Sin embargo, hasta más tarde no se puso en evidencia que, en numerosas ocasiones, la temperatura óptima de crecimiento no correspondía con la de la síntesis de determinado producto. La producción de pigmentos en muchos casos ocurre a temperatura más baja que la que corresponde al crecimiento máximo (Willian et al., 1965; Uffen & Canale-parola, 1966). En la formación de polisacáridos, algunos de interés en Microbiología Industrial, se da el mismo fenómeno (Neely, 1960); Brown & Rose, 1969a). En algunos casos se conocen las causas de este comportamiento, en otros el mecanismo implicado no ha sido todavía aclarado. La termorregulación de muchos procesos metabólicos no es conocida y por supuesto, la de la producción de los metabolitos secundarios, productos de complejos y a veces anormales reacciones bioquímicas, -

es todavía más complicada. La expresión de ciertos reguladores de la biosíntesis de algunas proteínas puede ser afectada por cambios de la temperatura ambiental, (Edgar & Lielausis, 1964).

El efecto del tamaño del inóculo en la evolución de los cultivos fué conocido desde antiguo. Lodge & Himschelwood (1943) describen un acortamiento de la fase de adaptación proporcional al volumen del inóculo utilizado. La reducción de la fase lag parece deberse al aporte de metabolitos intermediarios esenciales. Walker et al., (1962), encontraron acumulación de activadores de la división celular en los cultivos jóvenes de Bacillus megaterium. Sin embargo, el problema es distinto cuando la inoculación se realiza sobre un medio distinto del utilizado para la preparación del inóculo ó este está formado por una suspensión de células lavadas. Fredette and Forget (1962) demuestran que para un mismo tamaño de inóculo el efecto es distinto según el medio en el que se realiza la siembra.

Ha sido observado en ciertos microorganismos (Halmann et al., 1967) un claro efecto del volumen de inóculo que parece deberse a una sustancia de acción quelante. Halmann & Nager (1967) encontraron una sustancia iniciadora del crecimiento (G.I.S.) en los inóculos utilizados.

En la producción de antibióticos aparece frecuentemente el hecho de que los rendimientos se ven ampliamente afectados por la cantidad de inóculo que se utiliza. Por razones todavía no suficientemente aclaradas, algunas veces un incremento en la relación volumen de inóculo/volumen de medio da lugar a una disminución paralela de la producción.

La bibliografía sobre los aspectos genéticos implicados en la producción de antibióticos por microorganismos está casi siempre limitada al estudio de los mecanismos de superproducción, especialmente por la obtención de mutantes de biosíntesis derregulada, o a la manipulación genética de los microorganismos productores, realizando recombinaciones o intentando aumentar el número de los genes responsables, estudios todos realizados casi exclusivamente con un sentido práctico.

La naturaleza plasmidial de los genes que determinan la producción de antibióticos ha sido puesta de manifiesto para algunas bacteriocinas, consideradas como antibióticos por la mayoría de los autores, así como la relación entre la producción de otras bacteriocinas con bacteriófagos. Sin embargo, las referencias en este campo para los antibióticos clásicos son muy escasas.

En general, los actinomicetos reducen la formación de su micelio y la producción de antibióticos después de repetidos pases de cultivo, siendo un ejemplo la producción de kasugamicina por Streptomyces kasugaensis (Umezawa et al., 1965). Este fenómeno puede ser explicado si un factor episómico o plasmidial jugase un papel importante en la biosíntesis de la sustancia activa. Okanishy et al., (1970), estudian el efecto de la acriflavina y las altas temperaturas como causa de la pérdida de capacidad de formar micelio aéreo y de producir kasugamicina y aureothricina, concluyendo que es probable que tales hechos, así como la producción de melanina en S. scabies y S. venezuelae, pueden estar controladas por elementos genéticos extranucleares.

De otro lado, Kozak et al., (1974), han observado en algunas razas de Streptococcus lactis la pérdida del carácter productor de nisina, antibiótico polipeptídico, (Mattick & Hirsch, 1944) de forma temporal o permanente. La frecuencia de aparición de estas razas negativas para el carácter de producción de nisina (Nis) dependen de las razas. Sin embargo, la cantidad de razas Nis aumentaban considerablemente después de tratamientos con proflavina, bromuro de etidio o cultivo a altas temperaturas, llegando a obtenerse con una de las razas

utilizadas el 78% de células Nis⁻ después de tratamiento con proflavina. No fué observado por estos autores un posible efecto mutagénico de estos productos a las concentraciones utilizadas, ni fué posible obtener re--tromutantes para el carácter Nis después de tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-Nitrosoguanidina.

Fuschs, et al., (1975) demostraron la existencia de una fracción más densa de ADN que indica la presencia de un ADN covalente circular cerrado característico de los plásmidos en 6 de las 8 razas investigadas. La pérdida del carácter Nis está ligada a la pérdida del ADN C.C.C. en algunas razas, que indica que los genes responsables de la producción están localizados en un plásmido. El hecho de que dos de las razas no respondieron a los tratamientos con agentes eliminadores de plásmidos, es posible explicarlo teniendo en cuenta las diferentes sensibilidades de distintos plásmidos a estos agentes (Clowes, 1972) y a que a sido demostrada la existencia de un número variable de estos en S. lactis (Cords et al., 1974).

Bacteriocinas.

Muchas especies de bacterias, tanto entre las gram negativas, enterobacterias y vibrios, como entre las --

gram positivas, bacilos esporulados, sintetizan antibióticos selectivos que inhiben el crecimiento de razas relacionadas con ellas y entre ellas mismas. El Escherichia coli sintetiza colicinas activas frente a él y frente a otros coliformes; los vibrios, vibriocinas; el Bacillus megaterium, megacinas, el Streptococcus mutans, mutacina, etc. (Bradley, 1967; Ippen & Valentine, 1967; Kayser, 1969; Nomura, 1967; Reeves, 1965; Hamada & Ooshima, 1975). En muchos casos, pero no necesariamente, el determinante genético correspondiente está situado en plásmidos.

Inselburg (1971) llamó la atención sobre la posible relación entre colicinas y bacteriófagos.

Considerando las bacteriocinas en general, el criterio de tamaño las separa en dos grupos: las de bajo y las de alto peso molecular.

Bacteriocinas de bajo peso molecular.- En este gran grupo de bacteriocinas se incluye una colección heterogénea a juzgar por su estructura química y su diferente modo de acción. Un ejemplo bien conocido es el de la megacina A de B. megaterium, que es una proteína que actúa destruyendo la barrera osmótica de los organismos sensibles (Ivanovics, 1965). Bioquímicamente es una fosfolipasa (Ozaki et al., 1966), La naturaleza de su de-

terminante genético es desconocida, pero por la pérdida extremadamente frecuente del carácter, que caracteriza a las razas productoras (Ivanovics & Nagy, 1958) podría ser extracromosómico. Los miembros mejor conocidos de este grupo, las llamadas colicinas, tampoco son homogéneas (Nomura, 1967; Reeves, 1965).

Bacteriocinas de alto peso molecular.— Las bacteriocinas de P. aeruginosa, E. coli 15 y B. subtilis, están entre las identificables como componentes de fagos. Razas de P. aeruginosa forman una variedad de piocinas algunas de las cuales parecen colas de fago y son presumiblemente determinadas por fagos defectivos (Ishii et al., 1965). La raza P. 10, una de las primeras razas piocigénicas investigadas después del descubrimiento de la lisogenia y la inducción, no produce estructuras como colas, pero sin embargo, es inducible.

El E. coli 15, después de irradiación con luz ultravioleta, es eventualmente lisado y libera colicinas sólo activas frente a la raza 15. Los lisados muestran partículas de fago con gran número de cabezas sin cola y colas sin cabeza. La colicina de la raza 15 es la cola de un fago moderado defectivo (Houwink & Iterson, 1950; Sandoval et al., 1965).

Conversión por fagos. - La lisogenia permite la perpetuación de profagos como parte del sistema replicador bacteriano (Hershey, 1971; Iwott, 1953). La lisogenia puede producirse al incorporarse el genoma del bacteriofago dentro del cromosoma, como en los casos del colifago λ^+ (Hershey, 1971), P2⁺ (Bertani & Bertani, 1971) o del corinebacteriofago β^+ (Barksdale & Pappenheimer, 1954) o al asociarse a la maquinaria replicadora del sistema de la membrana de la bacteria, como el colifago λ^N (Lieb, 1970; Signer, 1969; Signer, 1970) o el P1 (Boice & Luria, 1963; Ikeda & Tomizawa, 1968).

Las bacterias adquieren en la transformación de no lisogénicas a lisogénicas, la capacidad de liberar fagos y de ser inmunes a los fagos liberados.

La transformación lisogénica implica integración en el sistema replicador bacteriano de un grupo de genes que, en los procesos de integración y de escisión, actúan como una unidad, y que constituye el genoma del virus (Bertani & Bertani, 1971; Hershey, 1971; Levine, 1972; Scott, 1968). La estabilidad de la lisogenia depende de la no expresión de muchos genes relacionados con la función viral, mientras que otros que no intervienen en dicha función pueden en cambio expresarse. Esto es, pueden producirse cambios en las propiedades ca-

racterísticas de la población bacteriana debido a la expresión de los genes del profago o a la inducción de genes bacterianos crípticos. Este fenómeno constituye la llamada conversión por fagos o, a veces, conversión lisogénica. Tal es el caso de la síntesis de productos de claro origen bacteriano tales como los lipopolisacáridos de Salmonella o productos de función desconocida como ciertas toxinas bacterianas. Barksdale and Arden (1974) incluyen en su trabajo sobre lisogenia y conversión por fago, una tabla con los efectos, provocados por la presencia de ciertos fagos en determinadas bacterias, citados por diferentes autores hasta la fecha. En relación con los antibióticos sólo hay referencias a cambios de sensibilidad a dichas sustancias (Jollick, 1972; Lawton & Molnar, 1972).

Lwoff et al., (1950), descubrieron que la exposición de Bacillus megaterium lisogénico a pequeñas dosis de radiación ultravioleta determinaba la producción de bacteriofagos por la mayoría de las células de la población (inducción y lisis de las células lisogénicas). Este descubrimiento ha servido para ayudar a conocer las bases moleculares de la lisogenia y caracterizar a las poblaciones lisogénicas. Otros factores que causan la inducción son los tratamientos con mitomicina C (Otsuji

et al., 1959), fluorpiridinas (Marcovich & Kaplan, 1963) y cambios de temperatura (Lieb, 1966).

Lederberg curó inadvertidamente la raza K-12 (λ) del profago (λ) cuando, en la búsqueda de mutantes - irradió las células con altas dosis de luz ultravioleta (Lederberg, 1951; Lederberg and Lederberg, 1953). - El fago λ es considerado actualmente el modelo de fago lisogénico.

Como se ha dicho anteriormente, genes adicionales a los del virus y que no sirven a su función, pueden expresarse en el estado lisogénico. Tal es el caso de la producción de toxina diphtérica por algunas razas de Corinebacterium diphteriae.

En 1950, en un laboratorio del Departamento de Salud Pública y Medicina Preventiva de la Universidad de Washington, Seattle, se realizó un programa de trabajo destinado a incrementar los rendimientos de toxina -- diphtérica, difusible en geles de agar, por la adición de un bacteriófago lítico al Corynebacterium en estudio. Como es usual en los test de toxigenicidad, se incluyeron en cada placa cultivos de bacterias toxigénicas y no toxigénicas. Se observó que al cabo de algún tiempo, algunos de los controles negativos se habían - transformado en positivos.

El descubrimiento de que la toxigenicidad en C. diptheriae está relacionada con la infección por ciertos fagos, debido a Freeman (1951), ha sido ampliamente confirmado (Barksdale & Pappenheimer, 1953; Barksdale & Pappenheimer, 1954) y la curación correspondiente la transforma en no toxigénica (Groman, 1955). Está fuera de toda duda la implicación de un gen estructural para la toxina diftérica que reside sobre el genoma del fago. La toxina es sintetizada en sistemas libres de células de Escherichia coli en presencia de ADN de corinfago portador del gen tox^{*} (Murphy et al., 1974; Lightfoot & Iglewski, 1974). Otros trabajos con mutantes del mismo fago también implican que el genoma del fago codifica la toxina (Uchida et al., 1971), siendo por ello una proteína fágica. Los experimentos recientes de transferencia de la información genética del gen Tox^{*} a otros sistemas han dado lugar junto con otros de la misma naturaleza, a una llamada de atención por distintas sociedades científicas sobre la peligrosidad de tales ensayos (Nota de la Academia Nacional de Ciencias de USA, 1974; Norman, 1974).

Un hecho curioso es que la expresión del gen tox^{*} se encuentra afectado por el medio. Hasta ahora no ha sido descrito nada similar para otras conversiones lisogénicas: el nivel de hierro en el medio de cultivo debe es

tar dentro de los límites adecuados (Pappenheimer & Johnson, 1936; Pope, 1932).

PLAN DE TRABAJO

Estudio del efecto de factores químicos y físicos que intervienen en la producción de las sustancias activas.

Fuentes de carbono.

Fuentes de nitrógeno.

- Orgánico.

- Mineral.

Factores de crecimiento.

Elementos minerales.

- P.S. Mg.

- Microelementos.

- pH.

- Temperatura.

Estudio genético.

Obtención de mutantes.

- Tratamiento con radiación ultravioleta.

- Utilización de sustancias químicas.

Investigación sobre la posible implicación de elementos genéticos extracromosómicos en la biosíntesis de las sustancias activas.

- Curación.

- Inducción.

Lisogenia (conversión por fago).

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos utilizados

Pseudomonas reptilivora (N-51968) aislado en la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del -- Zaidín y clasificado de acuerdo con la 7ª edición del Manual de Bergey (Breed et al., 1957). Aunque puede ser incluido en el biotipo G. de P. fluorescens (Stainer et al., 1966; Doudoroff and Palleroni, 1974), va a continuarse -- considerándolo aquí como P. reptilivora para seguir la -- línea de otros trabajos anteriores.

Medios de cultivo

Medios comunes

Caldo y agar nutritivos preparados según la descripción de Harrigan and McCance (1969) y caldo nutritivo -- Oxoid.

Medios específicos para el estudio de producción

Se han utilizado dos medios base (M-1 y M-2), que -- así serán conocidos a lo largo de la exposición, conteniendo nitrato amónico (M-1) o Peptona de Carne (M-2) co

mo fuente de nitrógeno. El medio M-1 tiene la siguiente composición: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.3g; --- NH_4NO_3 , 1.0g; Malato sódico (como fuente de carbono), 10g; y agua desionizada, 1000 ml. El medio M-2 contiene peptona de carne (Merck) 1.0 g. en lugar de nitrato amónico y malato sódico. Los medios fueron esterilizados por filtración previo ajuste del pH a 6,5 y repartidos después adecuadamente.

Medio de Egawa. - Medio preparado según la descripción de Egawa et al. (1970), contiene: Sacarosa, 1,2 g; Harina de semilla de soja, 30 g; Sulfato amónico, 0,2 g; Carbonato cálcico, 0,2 g Sulfato de cobre, 0,00075 g; - Agua destilada, C.S.P. 100 ml.

Medios para los test de actividad. - Ha sido usado Penassay Medium (Difco) para todas las determinaciones cuantitativas actividad antimicrobiana.

Condiciones de cultivo

Los cultivos en medio líquido se realizaron en agitador rotatorio de una pulgada de excentricidad (Gallem

kamp) , a 140 rpm. Dependiendo del volumen del cultivo se utilizaron matraces Erlenmeyer con blafes de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo o tubos de ensayo de 20 x 200 con cinco ml de medio dispuesto en gradillas fijadas a la plataforma del agitador con una inclinación de 30° respecto a la misma.

El periodo de incubación a 28° C fué inicialmente de 1 a 7 días para conocer el tiempo óptimo de producción por valoración de la actividad cada 24 horas. Después todos los cultivos, salvo en casos especiales se han incubado durante 48 horas, tiempo que corresponde al máximo de producción.

Inoculación

Salvo indicación en contra, se ha utilizado una suspensión de células (D.O. a 650 nm, 0,2) en solución salina a partir de un cultivo en medio sólido de 24 horas, y en la proporción de 0,2% (v/v). Cuando era requerido, las células eran lavadas por centrifugación para eliminar los restos del medio original. En los experimentos sobre el efecto de la cantidad de inóculo se utilizó este en diferentes proporciones que iban del 0,2 al 10 %.

Medida del crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano fué estimado siempre por me di da de la densidad óptica a 650 nm en un espectrofotometr o Perkin-Elmer (modelo 124), después de haber diluido las muestras cinco veces en agua destilada. A esta longitu d de onda no hay absorción, ni por los componentes del medio ni por los pigmentos eventualmente producidos.

Estudio del efecto de distintos factores para el nivel - de producción de sustancias con actividad antimicrobiana

Glucosa.

Para el estudio del efecto inhibidor de producción observado cuando se adiciona glucosa a los medios de culti vi vo, se ha utilizado como base medio M-2 al que se le ha añadido una solución de glucosa, esterilizada por filtr aci ón, en el volumen adecuado para obtener variantes de ambos medios con concentraciones finales que van del 0,1 al 1%. Los mismos ensayos se repitieron añadiendo a los medios carbonato cálcico al 0,5 %. El control de activi da d se realizó en ambas series a los 2 y 6 días de incu ba ci ón.

Otras fuentes de carbono.-

Para la determinación de las distintas fuentes de carbono en la producción de sustancias con actividad antibiótica, se ha utilizado M-1, exento de malato sódico, al que fueron adicionadas en cada caso, malato, acetato, succinato, citrato y gluconato sódico, fuentes elegidas de acuerdo con la bibliografía (Lluch, 1971), siendo sus concentraciones finales en el medio 75 y 150 mM. Se eligió como fuente de carbono óptima el malato, con el que se le realizaron una serie de ensayos para conocer su concentración óptima en el medio de producción.

pH.-

Se ha controlado el pH de los medios (M-1 y M-2) durante el periodo de incubación por la adición de ácido clorhídrico 0,1 N, ya que la evolución normal de los cultivos durante la fermentación se dirige a una alcalinización progresiva, alcanzando al final valores de pH entre 8, 5 y 9.

Oligoelementos.-

Se ha utilizado M-1 adicionado del elemento mineral que se ensaya a determinada concentración, aisladamente, o en conjunto con otros elementos. Se han escogido los elementos en la forma de las sales que se incluyen a continuación y a la concentración porcentual final indicada (tomada de Hewit, 1952).

SO_4K_2	0,0303
Cl_2Ca	0,1416
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0208
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0368
Citrato de hierro (a	
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0022
$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (a	
SO_4Zn	0,0003
BO_3H_3	0,00186
MoO_4Na_2	0,000035

(a. El efecto de los iones Cu y Fe han sido objeto de estudio especial.

Las concentraciones estudiadas han estado comprendidas entre la décima parte y 10 veces más de la indicada arriba.

Efecto de los iones hierro y cobre.-

Se ha utilizado como base el medio M-1, al que se adicionó el ión hierro (como citrato) y, M-1, M-2 e YC-73 a los que se añadió el ión cobre (como sulfato) en la cantidad adecuada para obtener variantes del medio original con concentraciones finales en los iones hierro y cobre entre 1 y 200 ppm y 0,125 y 50 ppm, respectivamente.

Efecto del ión sulfato.-

Se ha utilizado como base el medio M-1 adicionado de sulfato de magnesio y de potasio en la cantidad adecuada para conseguir una serie de concentraciones del anión $\text{SO}_4^{=}$ en el medio comprendidas entre 0,3 y 1 %.

Efecto de la relación C/N y P/N.

Se ha tomado como base el M-1 en el que, manteniendo constante la concentración de carbono, se modificó la de nitrógeno para conseguir valores de la relación carbono

no-nitrógeno iguales a 70, 20 y 7.

Para estos tres valores de la relación carbono-nitrógeno, se ensayaron variantes del medio en las que la relación fósforo/nitrógeno fueron 1/30, 1/20, 1/10, 1/15, 1/3, 1, 3, 5, 10, 20 y 30.

El nitrógeno fué siempre adicionado en forma NO_3NH_4 y el fósforo como PO_4HK_2 .

Efecto de distintos factores de crecimiento.-

Se han ensayado los compuestos que a continuación se relacionan a la concentración indicada por Lederberg (1950), siguiendo el esquema dado por Holliday (1956), que permite el conocimiento rápido de los factores responsables del -- efecto.

Pool	1	2	3	4	5	6
7	(b adenine	(c biotin (1)	(a phenil-alanine	(a alanine	(a arginine	(a leucine
8	(b hypoxanthine	(c folic acid (50)	(a serine	(a cysteine	(a orthithine	(a glycine
9	(b cytosine	(c pantothenic acid(50)	(a tryptophan	(a threonine	(a aspartic acid	(a isoleucine
10	(b guanine	(c pyridoxin(50)	(a tyrosine	(b sodium thiosulphate	(a proline	(a histidine
11	(b thymine	(c thiamin	(c paminobenzoic acid(50)	(a methionine	(a glutamic	(a lysine
12	(b uracil	(c riboflavin(250)	(c nicotinic acid(50)	(c choline (1000)	(c inositol (500)	(a valine

Cada uno de los pools resulta de la mezcla a volúmenes iguales de las soluciones madre de cada uno de los integrantes que están descritos en el cuadro adjunto. Las concentraciones de las soluciones madre son:

- a) 10 mg/ml en forma L o 20 mg/ml en forma DL.
- b) 5 mg/ml.
- c) El número de recuadro es la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

Una vez apreciado el efecto, positivo o negativo, en algunas de las combinaciones probadas, se realizaron los ensayos adecuados para determinar qué factores en concreto intervenían directamente en la producción.

Técnicas Analíticas

Controles biológicos de la actividad.-

Método de la placa y pocillos (Grove & Randall, -- 1955) y de los discos.

En la realización de este método, se han mantenido constantes la cantidad y calidad del medio de cultivo, -- el tiempo de predifusión, la temperatura de incubación, concentración del inóculo y técnicas de siembra y lectura. Todas estas son variables que influyen sobre el halo de inhibición y deben por tanto tenerse en cuenta.

Se han utilizado placas Kluener (Kluener, 1949) que son bandejas de 0,3 centímetros de largo por 11 de ancho y 2 de profundidad, construidas en una montura de barra de aluminio con fondo de vidrio transparente insertado -- en la montura metálica, y placas cuadradas de plástico -- Nunc-bio de 43 cm de lado. Las placas Kluener llevan una

tapa metálica, con agujeros para impedir la excesiva humedad interior que determina problemas en la lectura. -- Las placas de plástico originalmente sin agujeros en la tapa, hay que hacerselos o evitar que se haga un cierre hermético especialmente si se usan pocillos. Se ha utiliza o como microorganismo de prueba Bacillus subtilis -- ATCC 6633 en forma de una suspensión de esporas de densidad óptica 0,1 y a la concentración de 0,5 %.

Preparación de las placas.--

Se ha seguido la técnica de la doble capa. Se adicionó primero en cada placa, 70 ml de medio en el caso de las Kluener, o 110 ml para las Nunc-bio, que forman la capa base. Cuando ha solidificado y antes de que se enfríe, se añaden sobre ella 30 ml para las primeras y 50 para las segundas del mismo medio inoculado con la cantidad adecuada de la suspensión de esporas de B. subtilis.

Terminada la preparación de las placas, se colocan los pocillos sobre la superficie del medio. Estos pocillos son cilíndricos de acero inoxidable con un diámetro interior de 6 mm y 1 cm de altura. Las muestras se aplican a 5 o 6 gotas por pocillo mediante una pipeta Pasteur, después de que han sido separadas las células por centrifugación o mejor por filtración a través de membra

na esterilizante.

La técnica de los pocillos ha sido utilizada preferentemente para realizar valoraciones precisas pero rutinariamente se ha seguido la práctica de utilizar discos de papel de filtro impregnados del cultivo sin separación previa de las células bacterianas, aprovechando el hecho de que a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo de prueba, 37° C, no crece la cepa de P. reptilivora utilizada, no habiendo interferencias en la lectura del halo de inhibición que aparece alrededor de los correspondientes discos después del período de incubación de las placas, 16 horas.

La lectura de los resultados se hace midiendo los halos de inhibición con ayuda de una escala dividida en milímetros.

En todos los casos, ante la dificultad de utilizar las sustancias purificadas, se ha tomado la Penicilina G como patrón de referencia.

Bioautografía.-

Para la detección de los antibióticos separados por cromatografía o electroforesis se ha utilizado la técnica llamada bioautografía. Para su realización se deposi-

tan sobre la superficie de las placas preparadas de igual modo que para la técnica de los pocillos o discos, tiras de 0,5 a 1 cm de anchura cortadas en el sentido de la marcha de las sustancias, del cromatograma o electroforegrama, - previamente secado para eliminar por evaporación la fase movil o el tampón empleado durante el correspondiente desarrollo, que podría interferir en el crecimiento del microorganismo de prueba. Tanto el medio como las placas y el microorganismo de prueba utilizados en esta técnica -- son los mismos que han sido anteriormente descritos.

Separación y Purificación

Se ha seguido en esencia la técnica descrita por del Rio (1971) con ligeras modificaciones para la separación y purificación de las tres sustancias activas presentes y que originalmente fueron llamados A, B₁ y B₂, (del Rio, - 1971; del Rio et al., 1972a y b)

Extracción con disolventes orgánicos.-

Los caldos activos obtenidos se centrifugaron a --- 10.000 rpm (17.000 x g) durante 15 minutos para separar - las bacterias. El sobrenadante obtenido se concentra a va

cio a 30° C en rotavapor Buchii hasta un décimo del volumen original. Se alcaliniza con amoniaco hasta pH 9-10 y se extrae tres veces con un tercio del volumen de la muestra inicial con acetato de etilo saturado de agua.

La fracción orgánica abtenida se concentra a 30° C al menor volumen posible y se conserva en nevera. La fracción acuosa se acidifica con clorhídrico 2N hasta pH 3-4. Se extrae cinco veces con un tercio del volumen de la muestra inicial con n-butanol saturado de agua. Finalmente, se extrae de igual modo la fase orgánica obtenida anteriormente con amóniaco 1N. La fase acuosa así obtenida se concentra a vacio hasta un pequeño volumen y se conserva en nevera.

La separación de las fases se ve dificultada por la aparición durante la extracción de emulsiones muy difíciles de deshacer, por lo que hay que recurrir a la centrifugación para obtener una eficaz separación.

En el acetato de etilo se extrae las llamadas actividades B₁ y B₂ mientras que en el n-butanol se extrae la actividad A.

Fraccionamiento por Sephadex.-

Se ha utilizado Sephadex G-25 medium en columnas de 1 y 3,5 cm de diámetro en la separación analítica o pre-

parativa, respectivamente, y 30 de longitud.

Después del equilibrado con agua destilada se coloca la muestra de un volumen adecuado y se regula el flujo de salida con una bomba peristáltica (LKB) a 20 ml/hora recogiendo las fracciones del volumen deseado mediante un colector automático de fracciones (LKB).

Electroforesis.-

Se ha utilizado papel Schleicher-Schüll 2043B para los ensayos analíticos y Whatman 3MM para las separaciones preparáticas.

El tampón utilizado fué piridina-ácido acético-agua, (25:1:475) con pH final de 6,5, una tensión de 350 voltios y un tiempo de desarrollo de ánodo a cátodo de 3 horas y media.

Determinación del contenido de cobre e hierro en las sustancias activas parcialmente purificadas.

La mineralización de la muestra, se ha realizado por vía húmeda, que supone el empleo de ácido sulfúrico en caliente, aumentando el punto de ebullición por adición de sulfato potásico, y de selenio como catalizador.

La determinación del contenido de estos elementos en las muestras mineralizadas se ha efectuado por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer).

Demostración de la inestabilidad del carácter productor de antibióticos de *P. reptilivora*.

Los ensayos se realizaron con varias razas de *P. reptilivora* efectuando después de cada subcultivo las correspondientes pruebas de actividad mediante siembra e incubación en M-1. Trás la extracción y separación correspondientes se estudió la evolución de cada una de las actividades por separado. Los subcultivos con las correspondientes pruebas de actividad, fueron realizadas cada semana a lo largo de un periodo suficientemente largo.

Estudio de la posible presencia de un plásmido responsable del carácter productor de sustancias activas.

Tratamiento con radiación ultravioleta.-

Determinación de la curva de crecimiento.

Para realizar esta experiencia, las condiciones de cultivo fueron estandarizadas: caldo nutritivo (Oxoid), la incubación a 28° C en agitación, la relación volumen de medio/volumen del matraz se mantuvo siempre igual a un 1/5 (matraces con baffles de 250 ml), tamaño del inóculo de 0,2 % (v/v) de una suspensión de densidad óptica de 0,2 medidos a 650 nm.

La medida del crecimiento se realizó mediante la lectura de la densidad óptica del cultivo cada tres horas a 650 nm.

Tratamiento con L.U.V.-

El tratamiento se realizó sobre un cultivo de 16 horas, plena fase logarítmica de crecimiento, con una densidad óptica de 0,2 a 650 nm que corresponde aproximadamente 1×10^8 células viables por ml. Diez ml de este cultivo fueron depositados en una placa petri de fondo plano manteniéndolo en constante agitación durante los periodos de irradiación.

La irradiación fué llevada a cabo a temperatura ambiente, utilizando una lámpara de baja presión de vapor de mercurio de 20 W de potencia, productora de una longitud de onda de 2,660 Å. La distancia a la fuente luminosa fué en todos los casos de 40 cm.

Los tiempos de irradiación fueron en una primera serie de 2 a 18 minutos y en una segunda de 2 a 60 segundos. La muestra tomada a cada tiempo fué incubada en caldo nutritivo a 28° C en agitación durante dos horas para obtener células homogéneas desde el punto de vista de su constitución cromosómica. Finalmente se diseminó en placa para obtener colonias aisladas.

Al mismo tiempo fueron calculados los índices de supervivencia para cada una de las dosis de radiación ensayadas.

Tratamientos con naranja de acridina.-

Se han realizado por cultivo en caldo nutritivo (Oxoid) adicionado del colorante a una concentración subbacteriostática previamente determinada mediante cultivo de la bacteria en presencia de una serie de concentraciones de naranja de acridina (Fluka) que iban de 0,1 a 100 µg/ml midiendo a lo largo del periodo de incubación, 24 horas, la densidad óptica alcanzada. A 650 nm no hay interferencia del colorante en la lectura que se realiza.

Conocida la concentración subbacteriostática máxima, 25 µg/ml, se realizó el tratamiento definitivo.

El medio fué inoculado con una suspensión de células de P. reptilivora de densidad óptica 0,2 añadido en

la proporción de 0,2 % controlando el pH del medio a 7,6 durante el tiempo de cultivo por la adición de ClH diluido.

Después de incubar se disemina sobre agar común para aislar colonias y proceder a su posterior estudio.

Tratamiento con bromuro de etidio.-

Fuó realizado de modo similar al expuesto para la naranja de acridina. La concentración utilizada del bromuro de etidio (Sigma) fuó de 0,5, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$. Como en el caso anterior no hay interferencias del colorante en las lecturas de la densidad óptica realizada a 650 nm.

Tratamiento con laurilsulfatosódico (SDS).-

El SDS (Sigma) fuó utilizado a la concentración de 500 y 1.000 $\mu\text{g/ml}$ siguiendo siempre la pauta expuesta para las dos sustancias anteriores.

Crecimiento a alta temperatura.-

Se utilizó también con medio de cultivo caldo nutritivo (Oxoid) realizando la inoculación como siempre e incubando a 36° C, máxima temperatura de crecimiento para el P. reptilívora. Se diseminaron placas de donde se aislaron colonias para realizar las subsiguientes pruebas -



de actividad como en los casos anteriormente citados.

Tratamientos con Mitomicina C.

En estos experimentos fué necesario realizar, como en casos anteriores, una serie de ensayos destinados a -- conocer concentración y tiempo óptimo del tratamiento -- con esta sustancia al no tener información bibliográfica referente a Pseudomonas. Los tratamientos se realizaron añadiendo la mitomicina a una suspensión bacteriana en -- medio líquido, caldo nutritivo (Oxoid), cuando el crecimiento bacteriano era aproximadamente 1×10^8 células/ml.

Las concentraciones de mitomicina ensayadas iban de 0,06 a 1,0 $\mu\text{g/ml}$ y el tiempo de contacto de 5 a 60 minutos.

Transcurrido el tiempo adecuado, la muestra, lavada tres veces con agua destilada para eliminar los restos -- de mitomicina, fué resuspendida finalmente en medio de -- cultivo e incubada a 28°C durante 2 horas al objeto de obtener células homogéneas, desde el punto de vista de -- su constitución genética, y diseminada en placa para obtener colonias aisladas.

Tratamiento con N-metil-N'-nitrosoguanidina (NTG)

Las células cultivadas en caldo nutritivo (Oxoid) durante 18-24 horas (Fase log. de crecimiento en las -- condiciones empleadas) son lavadas tres veces por cen-- trifugación y suspensión en tampón tris-maleico 0,05 M pH 7.6 esterilizado por filtración. A la suspensión fi-- nal de células en el tampón se añade un volumen adecua-- do de una solución de NTG (Sigma) para conseguir una -- concentración final del producto en el medio de 80 $\mu\text{g/ml}$. El tratamiento se realiza en agitación durante 120 minu-- tos.

Transcurrido este tiempo, se lavan las células --- otras tres veces con el tampón tris-maleico para elimi-- nar el NTG presente y se resuspende finalmente en el mis-- mo medio de cultivo, llevandose a incubar a 28° C en -- agitador durante 2 horas (3 o 4 divisiones) para conse-- guir células mononucleadas.

Determinación de requerimientos auxotróficos

Durante los distintos tratamientos realizados, apa-- recieron una serie de mutantes auxótrofas que fueron de

tectados al ser cultivados en M-1 y con la común característica de no producir sustancias con actividad antimicrobiana cuando eran cultivadas en medio 2. Para determinar cuales eran sus requerimientos nutritivos, se realizó un estudio siguiendo la técnica de Holliday (1956) ya citada arriba.

Estudio de la posible dependencia de la producción de sustancias con actividad antimicrobiana de una conversión -- por fago

Aislamiento del fago implicado y de la cepa bacteriana sensible.

La parte turbia de las placas líticas típicas de lisogenia aparecidas espontáneamente fué tocada con asa de platino y la porción arrastrada diseminada sobre agar nutritivo para el aislamiento de posibles células sensibles al fago. De un elevado número de colonias se obtuvieron subcultivos con los que se prepararon cultivos en medio líquido que cuando llegaban a plena fase logarítmica de crecimiento eran inoculados a partir de la parte turbia de las placas líticas.. Algunos de los cultivos aparecían más claros, considerando a la cepa bacteriana original como -

sensible al fago. La diferencia de turbidez con los testigos era, sin embargo, tan poco patente a simple vista, -- por razones después conocidas, que hacía necesario el re-
cuento de células por las técnicas habituales.

Los cultivos más claros fueron centrifugados a 17.000 x g durante 10 minutos y los sobrenadantes tratados con -
cloroformo al 10 % o pasados por filtros de 0,45 μ de po-
ro. Los líquidos resultantes contenían los fagos que mez-
clados con células de placas líticas sensibles sobre me--
dio sólido daban lugar a la aparición en determinadas con
diciones de las correspondientes zonas de lisis.

Condiciones de cultivo para la visualización de la -
lisis bacteriana.

Del estudio de las condiciones bajo las que apare---
cían esporádicamente placas líticas características de li
sogenia, se dedujo que la temperatura podría jugar un pa-
pel importante.

Para la obtención de placas líticas se siguió la téc
nica de la doble capa. Se coloca primero una capa base de
agar nutritivo (20 ml/placa de 10 cm de diámetro) y cuan-
do esta sólido se vierte sobre el 3 ml de un medio de la
misma naturaleza, más blando (0,6 de agar por cien ml) --

mantenido en sobrefusión e inoculado con 0,1 ml de una --
suspensión de fago diluida convenientemente. La mezcla de
bacterias y fagos se realizó a distintas temperaturas com
prendidas entre 50-38° C para estudiar su efecto. La incu
bación se realizó a una serie de temperaturas que van de
18° a 28° C.

En un número significativo de razas sensibles fué es
tudiada la capacidad de producción de sustancias antimicrobianas.

Determinación de la curva de crecimiento de las re--
zas lisogénicas y sensibles.

Fuó realizada en M-1 inoculado con la raza correspon
diente (0,2 %) procedente de un cultivo de 24 horas en --
las mismas condiciones, tomando muestras a distintos tiem
pos y midiendo D.O. a 650 nm.

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de re
zas lisogénicas y sensibles.

La inoculación se realizó como en los experimentos
anteriores ensayando los medios de cultivo M-1 y M-2 e --
incubando un baño de agua termostatzadas a una serie de
temperaturas que van de 24° C a 46° C. Las lecturas se --
hicieron a las 24 horas midiendo D.O. a 650 nm. Se tuvo --

la precaución de inocular cuando el medio estaba a la -
temperatura adecuada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Dadas las dificultades que presenta el estudio de la serie de factores ensayados sobre la producción de estas sustancias con actividad antimicrobiana, se ha estimado oportuno reunir en un solo capítulo los resultados y discusión para facilitar la comprensión del trabajo y la deducción de las conclusiones.

Técnicas de cultivo y de ensayo de actividad.

De la raza original de P. reptilívora conservada por liofilización se aislaron una serie de cepas, que se estudiaron desde el punto de vista de la producción de sustancias antimicrobianas, con el objeto de seleccionar las más activas para los ensayos posteriores.

Los resultados obtenidos son expuestos en la Tabla I donde se aprecia la gran variabilidad del carácter de producción de sustancias activas.

TABLA I

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de las distintas razas bacterianas. La actividad se determinó por la técnica de los pocillos (A) y la de discos de papel (B). Los cultivos se han realizado en M-2 más 2,5 ppm de Cu utilizando matraces con baffles y tubos (A esta concentración de cobre se producen las tres sustancias activas).

Cepas	Matraces			Tubos		
	D.O. (a)	Act. (b)		D.O. (a)	Act. (b)	
		A	B		A	B
1	0,48	0,3	0,3	0,60	0,4	0,4
2	0,50	3,7	3,6	0,64	4,0	4,1
3	0,56	0,2	0,2	0,66	0,2	0,2
4	0,52	0,4	0,4	0,65	0,5	0,4
5	0,55	0,7	0,8	0,62	0,8	0,9
6	0,50	1,6	1,6	0,62	1,8	1,8
7	0,60	1,0	1,1	0,68	1,2	1,3
8	0,58	0,8	0,8	0,60	1,1	1,0
9	0,52	4,1	4,0	0,64	4,4	4,4
10	0,54	3,6	3,7	0,66	3,8	3,9

Resultados medios de cuatro repeticiones

a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.

b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.

En la relación con los ensayos de actividad a la vista de los resultados obtenidos, se han empleado en las --pruebas rutinarias la técnica de los papeles de filtro impregandos con el cultivo y sólo se utilizó la técnica de los pocillos para determinaciones más exactas.

De ~~esta~~ tabla se deduce también que, para un mismo medio, se dá un ligero incremento en el crecimiento micro--biano cuando el cultivo se lleva a cabo en tubos, debido a una mayor aieración, y como consecuencia una mayor actividad de los caldos aunque no en un grado tal que elimine la posibilidad de utilización de los matraces. El cultivo en tubos presenta la importante ventaja sobre aquellos de permitir en el mismo espacio un mayor número de ensayos --con un ahorro de material, el volumen de medio es diez veces menor en los tubos que en los matraces, y una mayor --comodidad en el manejo. Sin embargo, en los casos en los que el volumen de cultivo requerido, en función de la utilización posterior del mismo, era grande fué realizada la producción en matraces.

Tiempo óptimo de cultivo.

En la Tabla II y Figura 1, se exponen los resultados

obtenidos de las experiencias destinadas a determinar el tiempo óptimo de producción de sustancias activas. Se puede apreciar en la Tabla la existencia de dos máximos de producción correspondientes a 3 y 6 días de cultivo.

TABLA II

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de cultivos de P. reptilivora en M-2 con 3 ppm de Cu incubados durante distintos periodos de tiempo (A esta concentración de cobre se producen las tres sustancias activas).

Tiempo (días)	D.O. ^(a)	Actividad ^(b)
1	0,42	0,40
2	0,60	0,66 ^(c)
3	0,54	0,75 ^(c)
4	0,57	0,69 ^(c)
5	0,38	0,73 ^(c)
6	0,27	0,80 ^(c)
7	0,17	0,75

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medias se realizaron sobre los cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias significativas con los otros valores,
P \leq 0,05.

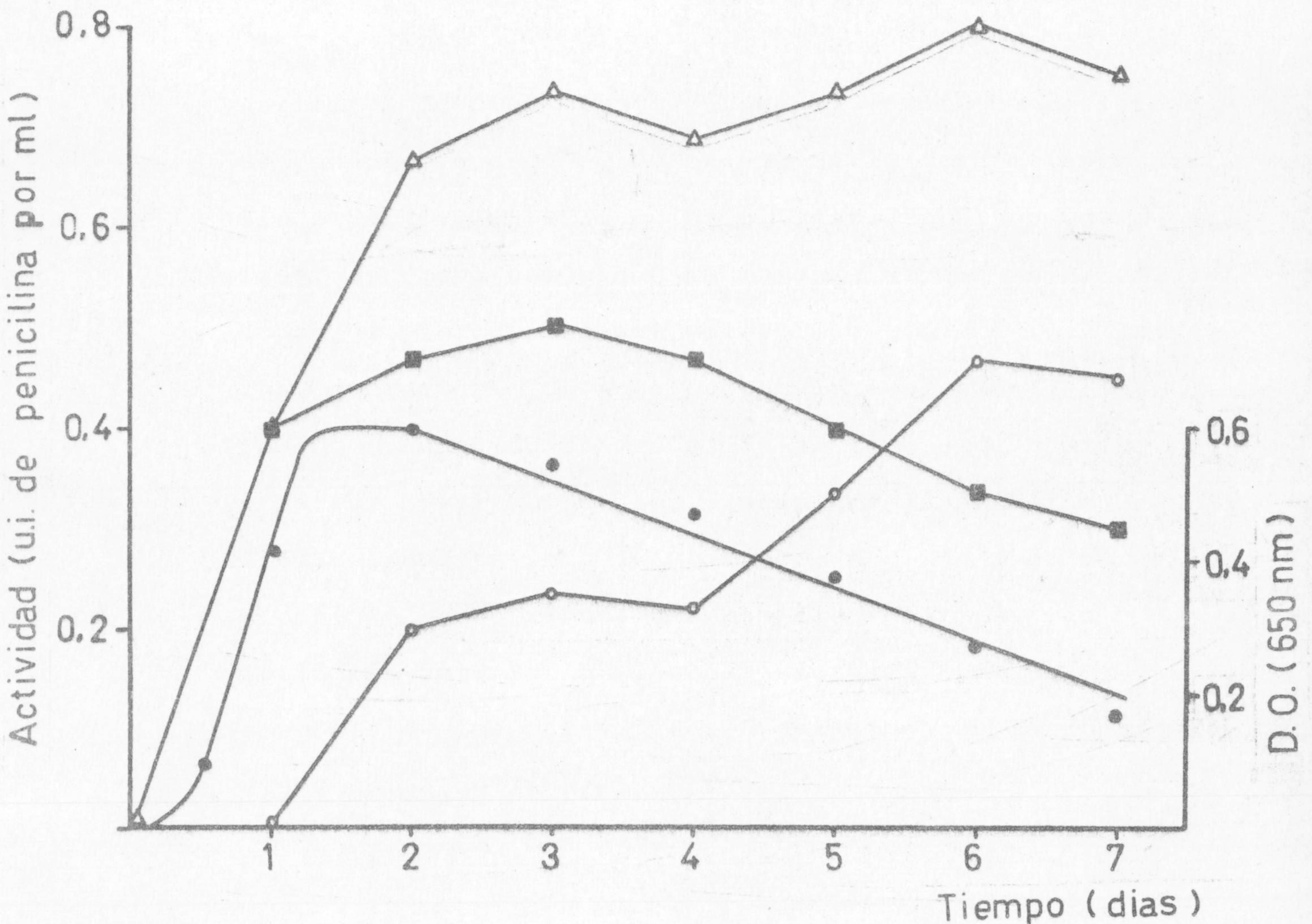


Fig. 1.- Actividades antibióticas A y B de cultivos de *P. reptilivora* en M-2 con 3 ppm de Cu, en función del periodo de incubación. Actividades A (■); B (○); total (Δ); crecimiento microbiano (●).

Aunque estos máximos, no son muy marcados, su significado se comprueba cuando se realiza la extracción de las sustancias activas con las técnicas expuestas determinándose que el primer pico corresponde al óptimo de producción para A. Las dos actividades la B₁ y la B₂ mantienen una relación constante a lo largo del tiempo.

En cuanto al orden de formación se observa que la actividad A aparece la primera y después las dos B, juntas.

La sustancia activa A se detecta durante la fase logarítmica de crecimiento aunque el máximo de actividad se consigue cuando se ha alcanzado la fase estacionaria. Sin embargo, las sustancias B, aparecen al comenzar esta fase, fenómeno común con la mayoría de los antibióticos conocidos, productos del metabolismo secundario. Este hecho, que estaría de acuerdo con la evolución de las curvas de producción con relación al tiempo de cultivo, podría ser interpretado suponiendo que la síntesis de antibióticos B estuviera relacionada de algún modo con el antibiótico A ocurriendo una posible reutilización o transformación durante la fase estacionaria, puesto que el incremento de las actividades B coincide con la progresiva disminución de la actividad A.

Fuentes de carbono.

Para llevar a cabo el estudio de los distintos componentes del medio se eligió como estudio base el M-1 (modificación del de Chodat & Gouda, 1961) ya que por su composición era el más adecuado para controlar las condiciones del medio y eliminar los errores debidos a las impurezas que suelen estar presentes en medios elaborados con ingredientes como peptona u otras sustancias complejas y de composición variable.

Los resultados obtenidos respecto al efecto de las distintas fuentes de carbono ensayadas en la producción de las sustancias activas son espuestas en la Tabla III.

TABLA III

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de cultivos de P. reptilivora en M-1 con 2,5 ppm de Cu y diferentes fuentes de carbono (A esta concentración de cobre se producen las tres sustancias activas).

Fuentes de carbono	Concentración F.C.			
	75 mM		150 mM	
	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
Glucosa	0,48	0,00	0,52	0,00
Gluconato Na	0,25	0,08	0,32	0,00
Acetato Na	0,00	0,00	0,00	0,00
Succinato Na	0,25	0,00	0,30	0,00
Oxalacetato Na	0,00	0,00	0,00	0,00
Citrato Na	0,15	0,80	0,17	2,40
Malato Na	0,20	2,40	0,19	3,90
Lactato Na	0,17	0,08	0,18	0,08

Valores medios de cuatro repeticiones.

a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.

b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.

En estas experiencias se ha utilizado medio M-1 exento de fuente de carbono, adicionada de cada una de las -- sustancias a ensayar. De acuerdo con los resultados expresados en la Tabla III se han obtenido las actividades más altas cuando se utilizó como fuente de carbono el malato sódico. Una vez seleccionada esta fuente de carbono, se -- determinó su concentración óptima cuyos resultados se exponen en la Tabla IV y Figura 2.

TABLA IV

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de cultivos de P. reptilivora en M-1 con 2,5 ppm de Cu y conteniendo malato como fuente de carbono a distintas concentraciones (La concentración de cobre utilizada da lugar a la producción de las tres sustancias activas).

Concentración Malato (%)	D.O. (a)	Act. (b)
0,5	0,20	0,6
1	0,21 ^(c)	2,4 ^(d)
2	0,19 ^(c)	3,9 ^(d)
3	0,19 ^(c)	1,8 ^(d)
4	0,16	0,8

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medias se realizaron sobre los cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias no significativas.
- d) Diferencias significativas con los otros valores, $P \leq 0,05$.

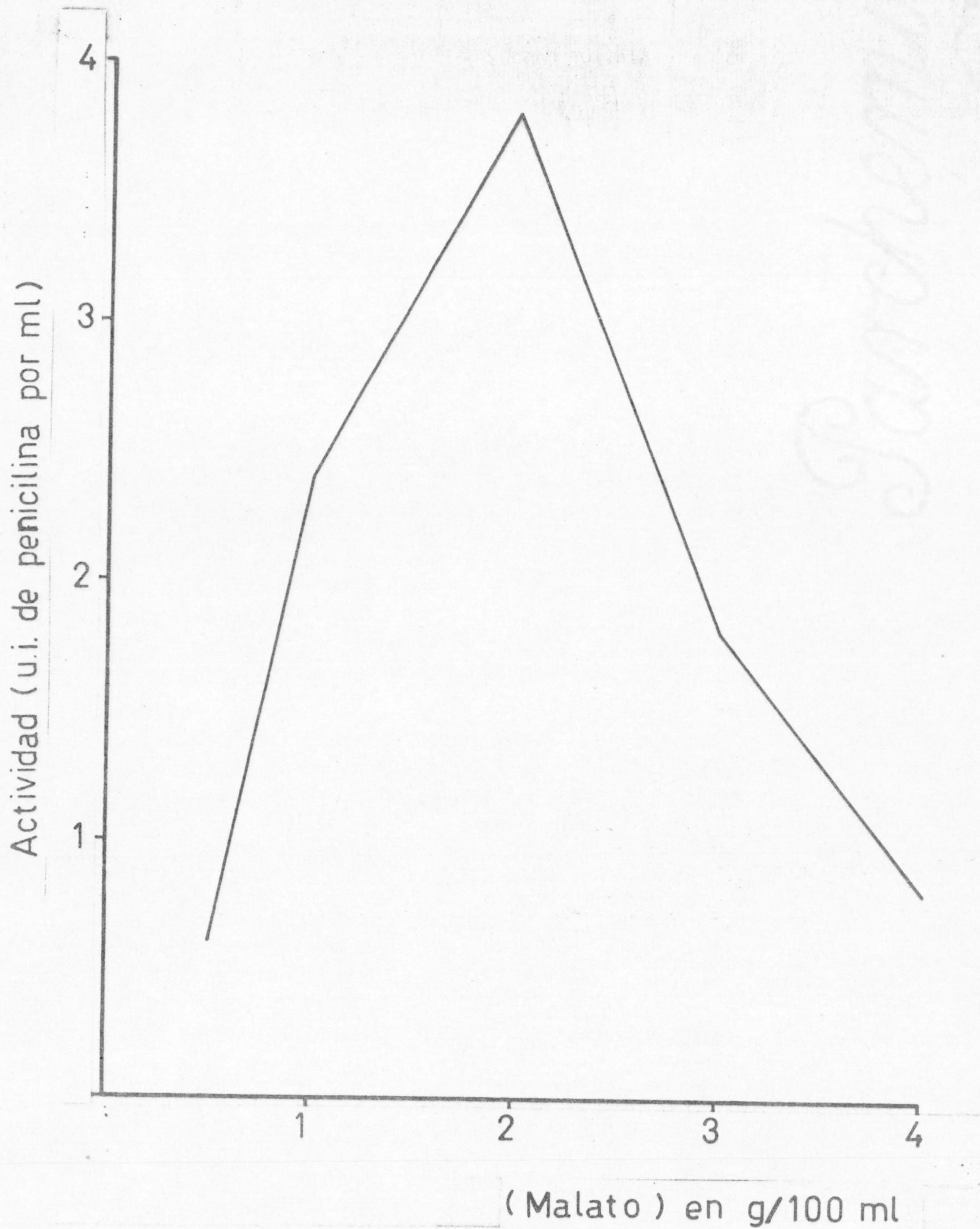


Fig. 2.- Actividad antimicrobiana de cultivos de P. reptilifera en M-1 adicionado de 2,5 ppm de Cu, distintas concentraciones de malato sódico.

De estos resultados se deduce que la concentración óptima de malato para la producción de antibióticos es el del 2 %, decreciendo rápidamente la actividad detectada en los caldos que contenían concentraciones más altas de esta fuente de carbono. En la mayoría de los experimentos, y siempre que no se indique nada en contra, se utilizará malato como fuente de carbono en la preparación del medio M-1.

Efecto Glucosa.

Del Río et al. (1972a) describen el hecho de que la adición de glucosa a los medios de cultivo al 1 % inhibía la síntesis de las sustancias con actividad antimicrobiana.

En este sentido, ya Hockenhull (1956) observa una disminución de penicilina sintetizada en presencia de glucosa respecto a cuando se utilizaban otras fuentes de carbono.

En el estudio realizado con el objeto de aclarar este efecto inhibitor de la glucosa, cuyos resultados se exponen en la Tabla V, se aprecia que en la lectura hecha a las 24 horas de incubación, aparece una cierta

inhibición de la producción de sustancias activas para la concentración de glucosa al 0,5 % y una inhibición total cuando la concentración es del 1 %.

Los resultados de la lectura realizada a los 6 días de incubación muestran una inhibición parcial de la cantidad de sustancias activas producidas en ambas concentraciones pero menor que la de la primera realizada.

Estos datos inducen a pensar que al agotarse la glucosa del medio cesa el efecto inhibidor. A consecuencia de la utilización de la glucosa por vía oxidativa se produce la acidificación del medio, el pH de este cuando contiene glucosa al 1 % es de 4, mientras que la tendencia normal de los medios exentos de este azúcar se dirige a una progresiva alcalinización con un pH final entre 8,5 y 9.

Para eliminar la posible influencia del pH, se realizaron otros experimentos en los que se tamponaba el medio con la adición de carbonato cálcico al 0,5 %. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.

TABLA V

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de cultivos de P. reptilivora realizados en M-2 con 3 ppm de Cu con distintas concentraciones de glucosa y adicionada de carbonato cálcico al 0,5 % (A esta concentración de cobre se producen las tres sustancias activas).

Glucosa (%)	CO ₃ Ca (%)	48 horas		6 días	
		D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
0	0	0,65	0,60	0,30	0,80
0,1	0	0,70	0,60	0,35	0,80
0,25	0	0,75	0,60	0,40	0,80
0,5	0	0,75	0,10	0,31	0,38
1	0	0,87	0,00	0,42	0,04
1	0,5	-	0,60	-	0,80

Valores medios de cuatro repeticiones.

a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medias se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.

b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.

En este estudio realizado para aclarar el efecto inhibidor que la glucosa tiene sobre la síntesis de sustancias con actividad antibiótica producida por P. reptilivo se concluyó que la inhibición es debida a la acidificación de los medios de cultivo que se produce como consecuencia de la utilización de la glucosa. Esta inhibición desaparece cuando se tamponan los medios de forma que el pH no baje.

Efecto del pH.

Los resultados anteriormente expuestos sugieren la posibilidad de que la tendencia de los cultivos hacia pH tal alcalino en las condiciones de ensayo normales afectara de algún modo la producción de sustancias activas.

El efecto del pH sobre diferentes aspectos relacionados con el metabolismo de las células ha sido estudiado por diferentes autores, Hehre (1946) y Koepsell & Tsuchiya (1952) estudiaron la influencia del pH en la síntesis del enzima dextranosacarasa y sobre su actividad. En relación con la síntesis de antibióticos, se pueden citar los trabajos de Singh & Jonhson (1948) y Brown & Peterson (1950) sobre la producción de penicilina cuando se

altera el pH. En la Tabla VI se exponen los resultados en contrados cuando se realizó el cultivo controlando el pH. Estos resultados indican que no hay diferencia entre la actividad de los cultivos con pH controlado y los testigos, concluyendo que en el rango de pH 7-9 la producción de antibióticos no se altera.

	pH = 7		pH = 9	
	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
Testigo	0,52	0,60	0,50	0,75
pH = 7	0,54	0,65	0,52	0,75

Valores medios de tres repeticiones.

a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos de 24 horas de edad.

b) Actividad expresada como densidad óptica a 260 nm.

TABLA VI

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de los cultivos P. reptilivora realizados en M-2 con 3 ppm de Cu con control de pH = 7 (A esta concentración de cobre se producen las tres sustancias activas).

Medio	48 horas		72 horas	
	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
Testigo	0,52	0,60	0,50	0,75
pH = 7	0,54	0,65	0,52	0,75

Valores medios de cuatro repeticiones.

a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.

b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.

Efecto de la fuente de nitrógeno.

En la Tabla VII se expresan los resultados obtenidos cuando se ensayan distintas fuentes de nitrógeno inorgánico. Se deduce como la fuente de nitrógeno más idónea para la producción de sustancias con actividad antibiótica, el sulfato amónico.

TABLA VII

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de los cultivos de P. reptilivora en M-1 con 1,25 ppm de Cu cuando se utilizan diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico a la misma concentración molar (A esta concentración de cobre se producen las tres sustancias activas).

Fuente de nitrógeno	D.O. (a)	Act. (b)
NO_3NH_4	0,16	1,0
$\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$	0,20	2,0
NO_3K	0,05	0,0
CLNH_4	0,17	1,0

Valores medios de cuatro repeticiones.

a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.

b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.

Teniendo en cuenta la importancia del azufre en la producción de sustancias activas de acuerdo con la composición química de una de las actividades (del Río et al. 1972b), se ha empleado como fuente de nitrógeno el nitrato amónico para poder controlar independientemente el efecto de la presencia y concentración de ambos elementos en los medios de cultivo.

Efecto de la relación C/N y P/N.

Para la biosíntesis de las sustancias activas no sólo es necesario elegir de forma adecuada el compuesto o compuestos que suministren los distintos componentes esenciales del medio sino que es importante la relación que guardan entre ellos. Hockenhuil (1960) demuestra que para que se produzca una cantidad significativa de streptomina por S. griseus la relación de P/N debe de estar entre unos límites concretos. La relación de C/N también presenta su importancia ya que determina la proporción entre crecimiento y producción de sustancias activas.

En las Tablas VIII y IX y en las Figuras 3, 4 y 5 se expresan los resultados obtenidos en los estudios rea

lizados sobre la importancia de la relación C/N y P/N - en la producción de sustancias con actividad antibiótica.

En la Tabla VIII se han expuesto los resultados -- correspondientes al crecimiento microbiano y producción de la sustancia activa A para distintos valores de las relaciones C/N y P/N. Las concentraciones de Cu y Fe en el medio de cultivo han sido ajustados para la forma--- ción de sólo tal primera actividad sin que haya interfe_rencia de las sustancia B. La relación C/N = 20 permite un mayor crecimiento y por ello una más alta producción de sustancias activas. Para cualquier valor de la relación C/N una relación P/N entre 3 y 5 proporciona - los mejores rendimientos. Los resultados son más fácilmente apreciables en la Figura 3.

TABLA VIII

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de los cultivos de P. reptilivora en M-1 con 0,5 ppm de Cu y 5 ppm de Fe para diferentes valores de la relación C/N y P/N -- (A esta concentración de cobre se produce sólo la sustancia activa A).

P/N	C/N = 70		C/N = 20		C/N = 7	
	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
1/30	0,16	0	0,30	0	0,30	0
1/20	0,25	0	0,42	0	0,40	0,14
1/10	0,30	0	0,48	0,38	0,48	0,65
1/5	0,40	0,38	0,80	1,20	0,60	0,80
1/3	0,38	0,45	0,95	1,50	0,58	0,95
1	0,42	0,45	0,95	1,50	0,60 ^(c)	1,20 ^(d)
3	0,38 ^(c)	0,55 ^(d)	1,15 ^(c)	1,60 ^(d)	0,66 ^(c)	1,20 ^(d)
5	0,40 ^(c)	0,70 ^(d)	0,95 ^(c)	1,60 ^(d)	0,65 ^(c)	0,55 ^(d)
10	0,38 ^(c)	0,45 ^(d)	0,88 ^(c)	1,00 ^(d)	0,55	0,50
20	0,36	0,26	0,80	0,80	0,40	0,18
30	0,36	0,26	0,75	0,38	0,42	0,12

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos no diluidos.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias no significativas.
- d) Diferencias significativas con los otros valores, $P \leq 0,05$.

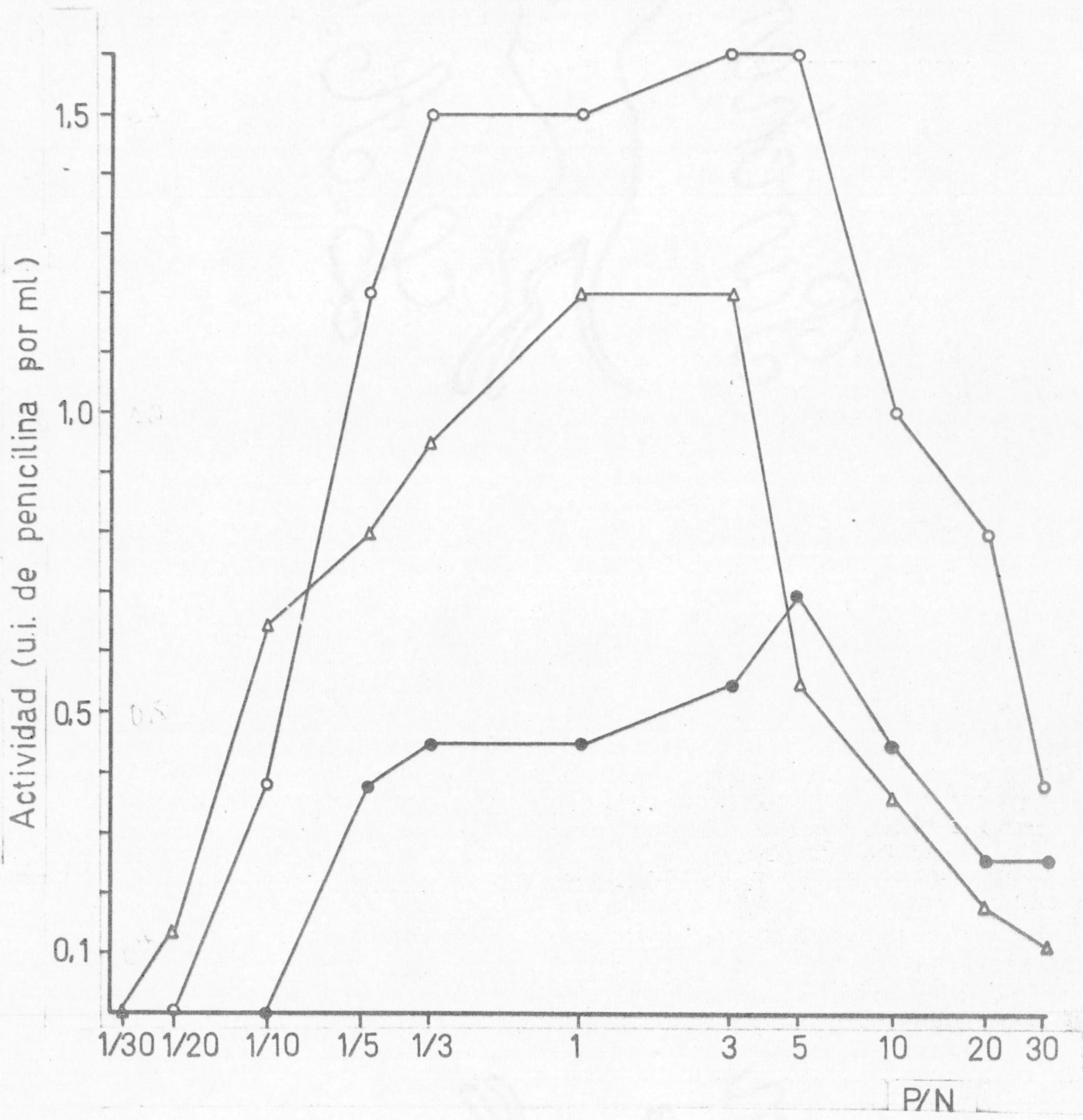


Fig. 3.- Actividad antimicrobiana A de cultivos de P. reptilifera en función de la relación P/N para distintos valores de la relación C/N. C/N = 70 (•), C/N = 20 (o), C/N = 7 (Δ).

En cuanto a las actividades B se refiere, los valores obtenidos se expresan en la Tabla IX y Figura 4. La relación $C/N = 20$ es igualmente en este caso, la óptima para un mayor crecimiento microbiano y una mayor producción de sustancias activas.

TABLA IX

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica B de los cultivos de P. reptilivora en M-1 con 25 ppm de Cu para diferentes valores de la relación C/N y P/N (A esta concentración de cobre sólo se producen las sustancias activas B).

P/N	C/N = 70		C/N = 20		C/N = 7	
	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
1/30	0,14	0	0,26	0	0,30	0
1/20	0,16	0	0,36	0	0,37	0
1/10	0,23	0,06	0,48	0,22	0,44	0
1/5	0,28 ^(c)	0,14 ^(d)	0,78	0,45	0,42	0,30
1/3	0,37 ^(c)	0,12 ^(d)	0,81 ^(c)	0,80 ^(d)	0,42 ^(c)	0,32 ^(d)
1	0,36	0,06	0,80 ^(c)	1,00 ^(d)	0,40 ^(c)	0,45 ^(d)
3	0,32	0	0,75	0,55	0,50	0,14
5	0,38	0,06	0,70	0,45	0,45	0,18
10	0,40 ^(c)	0,08 ^(d)	0,70 ^(c)	0,80 ^(d)	0,40 ^(c)	0,45 ^(d)
20	0,36	0,07	0,56 ^(c)	0,65 ^(d)	0,35 ^(c)	0,30 ^(d)
30	0,32	0,07	0,40	0,55	0,30	0,10

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos no diluidos.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias no significativas.
- d) Diferencias significativas con los otros valores,

$$P \leq 0,05.$$

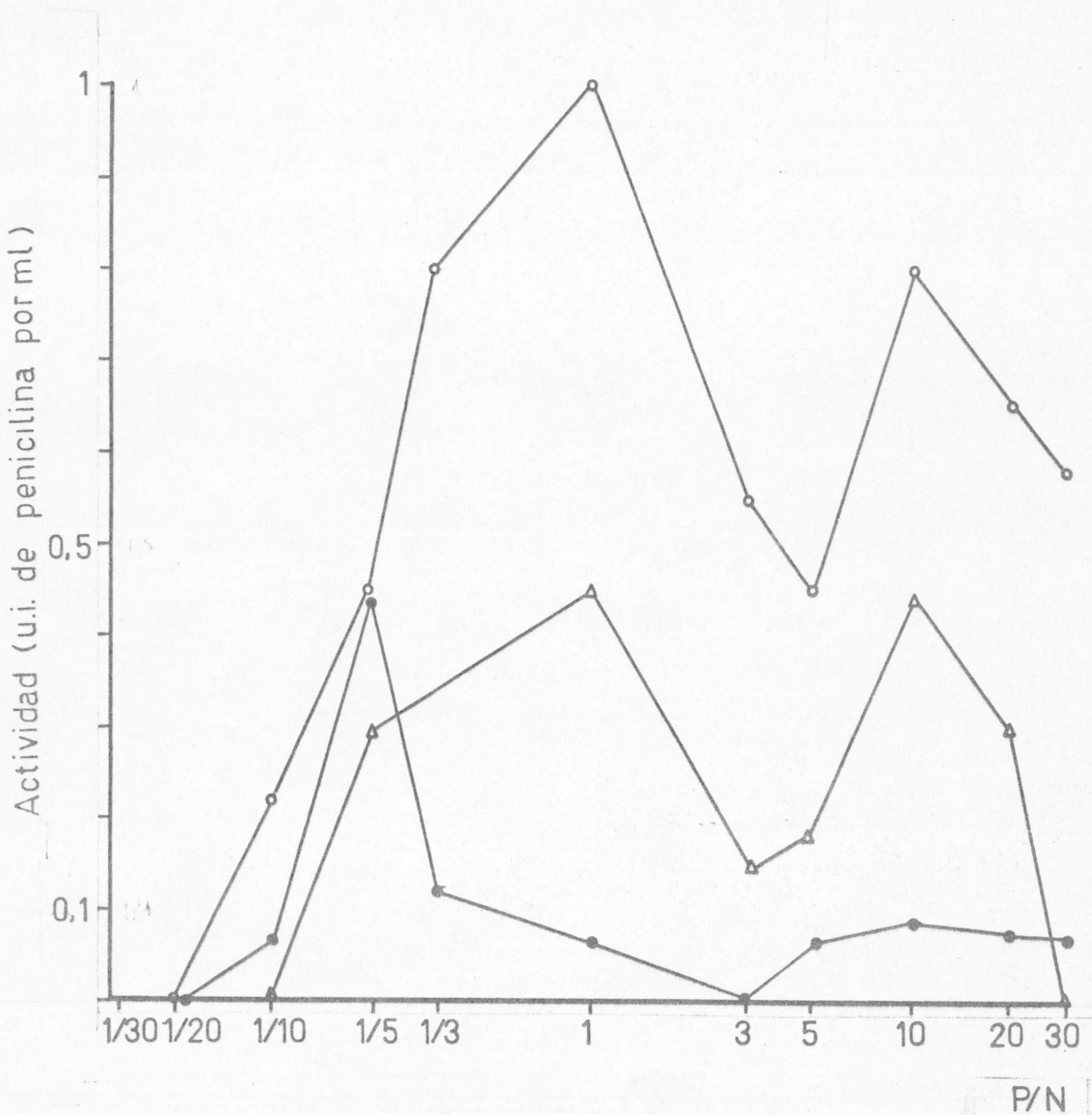


Fig. 4.- Actividades antimicrobianas B de cultivos de P. reptilivora en función de la relación P/N para distintos de la relación C/N. C/N = 70 (●), C/N = 20 (○), C/N = 7 (Δ).

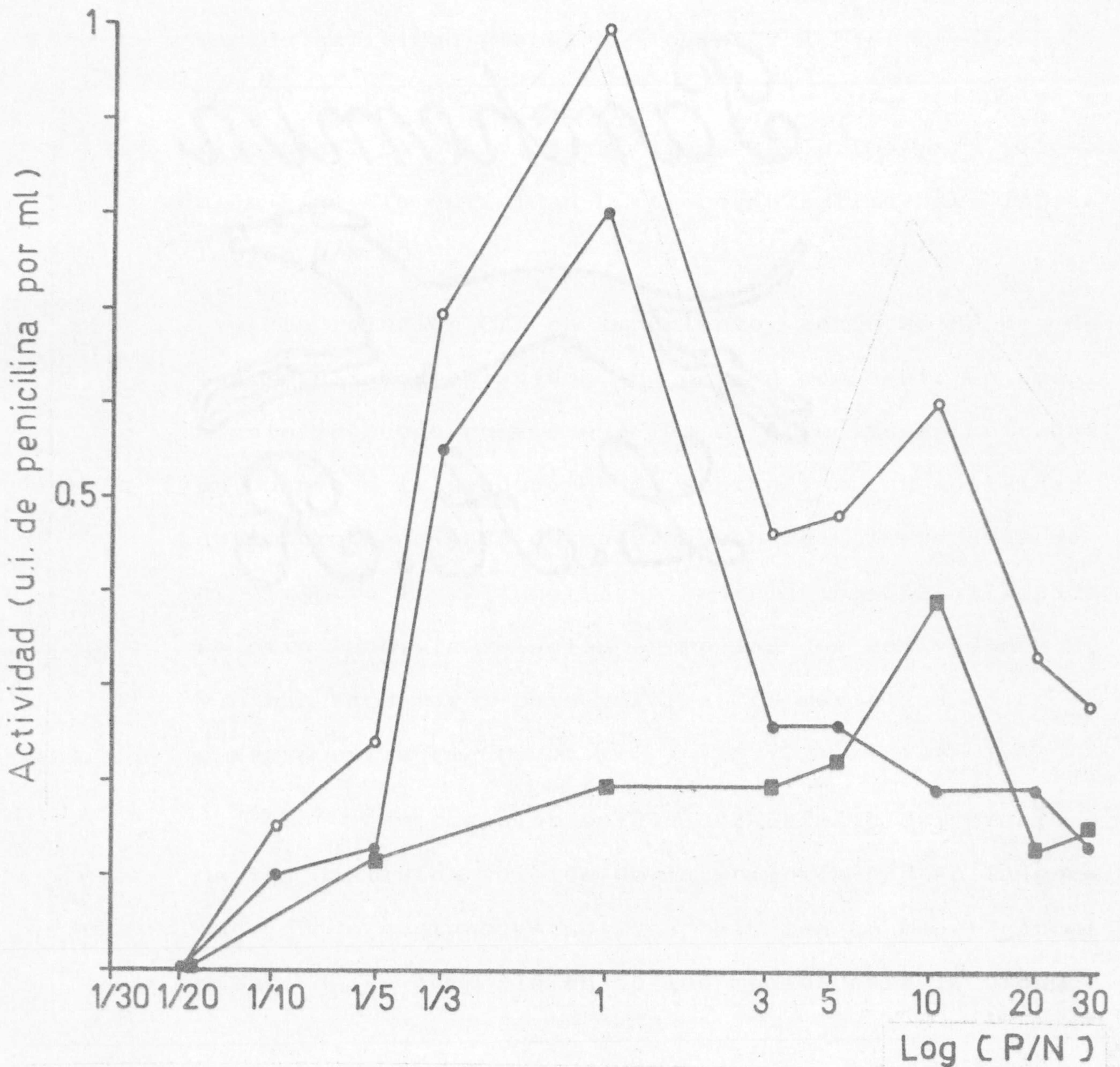


Fig. 5.- Actividades antimicrobianas, B₁ y B₂ (expresados en u.i. de penicilina G/ml) en cultivos de P. reptilifera en función de la relación P/N para una relación C/N igual a 20. Actividad B₁ (•), B₂ (■). total (o).

Para la relación P/N, los resultados muestran dos máximos de actividad para los valores de P/N 1 y 10. Trás la separación mediante electroforésis de las dos actividades B (B_1 y B_2) presentes, se obtuvieron los resultados que se exponen en la figura 5 y que muestran que cada uno de los picos que aparecían en las curvas de actividad global de los caldos, corresponden al máximo de producción para cada una de las sustancias presentes. La actividad B_1 tiene su óptimo para relación P/N y la actividad B_2 tiene su óptimo para la relación P/N 10.

La relación C/N es importante, según se deduce de los resultados obtenidos, de cara a conseguir un crecimiento adecuado puesto que las diferencias encontradas en cuanto a la producción de sustancias con actividad antimicrobiana está de acuerdo con las diferencias de crecimiento microbiano según la relación C/N utilizada. De otro lado, la relación entre las dos actividades B_1 y B_2 se hace mayor para valores C/N más altos como se observa en la Figura 4.

Los resultados obtenidos del estudio del efecto de los distintos valores de la relación P/N en la producción de sustancias activas permiten un mejor conocimiento de la composición de los medios para la produc-

ción de cada una de las sustancias por separado y en consecuencia para diseñar medios óptimos para la producción de cada una de estas sustancias, favorecidas por una relación óptima P/N.

Evidentemente la relación C/N se encuentra en los límites considerados óptimos para el crecimiento microbiano. La necesidad de un mayor valor de la relación P/N para la síntesis de la sustancia activa B₂ indica su posible derivación de una vía más consumidora de energía que la requerida por las otras dos actividades especialmente la B₁.

Efecto de la fuente de nitrógeno orgánico.

Waksman (1945) trabajando con S. griseus determina la necesidad de una fuente de nitrógeno compleja para una mayor producción de estreptomicina.

En la Tabla X se recogen los resultados obtenidos cuando se utilizaron distintas fuentes de nitrógeno orgánico. Se han utilizado peptonas de distintas marcas como única fuente de nitrógeno, encontrando diferencias significativas en cuanto a la producción de sustancias activas en los caldos de cultivo. Hay que tener en cuenta --

que estas fuentes de nitrógeno lo son a su vez de carbono.

Factores

Vite	0,75	0,50
De Carne	0,50	0,50
De Caseina	0,50	0,50
Orbana	0,50	0,50
Caseína Solida	0,50	0,50

Valores medios de cuatro repeticiones.

a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica

a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos de

24 horas de crecimiento en caldo.

b) Actividad expresada en U/ml de penicilina G/ml.



TABLA X

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de los caldos de cultivo preparados con distintas peptonas. Se ha utilizado como base M-2 con 2,5 ppm de Cu (concentraciones adecuadas para la producción de las tres sustancias activas).

Peptonas	D.O. (a)	Act. (b)
Witte	0,75	1,00
De Carne	0,58	0,45
De Caseina	0,56	0,50
Orthana	0,6	0,90
Casaaminoácidos	0,7	0,08

Valores medios de cuatro repeticiones.

a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.

b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.

La peptona Witte fue la que dejó mejores rendimientos de producción de sustancias activas. Las grandes diferencias encontradas, utilizando las distintas peptonas o similares manteniendo constantes el resto de las condiciones de cultivo, se deben en gran parte al variable contenido en cobre que contamina tales productos (Lluch et al., 1973), efecto que fué descrito por del Río et al. (1972a). Sin embargo, teniendo en cuenta que la peptona es fuente en determinados factores de crecimiento, se decidió completar el estudio del efecto de estos productos, determinando el crecimiento y producción de sustancias activas - en cultivos en medio mínimo adicionado de una serie de sustancias que podían actuar como tales factores.

Factores de crecimiento.

Este estudio se realizó utilizando el esquema propuesto por Holliday (1956) y usando como medio el M-1. En concreto, se estudian 36 compuestos, entre los que se encuentran aminoácidos y otros factores de crecimiento, bases, vitaminas, etc. Con este esquema, al estar repetida cada sustancia con una fila y una columna (ver esquema representado en Material y Métodos), se puede determinar di

rectamente cual de las sustancias empleadas es responsable del incremento en la producción de las sustancias activas.

TABLA XI

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica A de los cultivos de P. reptilivora en M-1 con 0,5 ppm de Cu y 5 ppm de Fe adicionado de cada uno de los "pools" según el esquema descrito por Holliday (1956) (Concentración de cobre adecuada para la producción de la sustancia activa A).

"pools"	D.O. (a)	Act. (b)
1	0,24	2,00
2	0,30	1,75
3	0,22	1,22
4	0,26	2,80 ^(c)
5	0,26	1,93
6	0,21	2,05
7	0,22	1,50
8	0,22	3,00 ^(c)
9	0,24	1,70
10	0,26	2,00
11	0,26	2,05
12	0,20	1,70
-	0,17	1,50

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias significativas con los otros valores, $P \leq 0,05$.

En la Tabla XI se observa que, para la actividad A, aunque hay un incremento en casi todos los grupos, este puede ser explicado debido al mayor crecimiento microbiano que se produce al añadir al medio los factores de crecimiento. Sin embargo, el aumento de la actividad detectada en los caldos es significativamente más alto para los "pools" 4 y 8 que tienen como componente común cisteína. Realizadas las pruebas correspondientes con esta sustancia se obtuvieron los resultados que se exponen en la Tabla XII.

TABLA XII

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica A de los cultivos de P. reptilivora en M-1 con 0,5 ppm de Cu y 5 ppm de Fe adicionado de diferentes concentraciones de cisteína (Esta concentración de cobre sólo permite la producción de la sustancia activa A).

Cisteína (mg/ml)	D.O. (a)	Act. (b)
0	0,16	1,50
0,01	0,18 ^(c)	2,40 ^(d)
0,025	0,20 ^(c)	3,42 ^(d)
0,05	0,18	1,80
0,1	0,19	1,25
0,2	0,21	0,85

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias no significativas.
- d) Diferencias significativas con los otros valores,
 $P \leq 0,05$.

En cuanto a las otras dos actividades, B_1 y B_2 , en la primera prueba realizada utilizando las concentraciones propuestas por Ledeborg (1950), no se obtuvieron incrementos significativos en las actividades como se observa en la Tabla XIII. Sin embargo, al incrementar cinco veces la concentración se obtuvieron buenos incrementos siendo los más significativos los que corresponden a los "pools" 1, 5, 10 y 11.

TABLA XIII

Crecimiento bacteriano y actividad antimicrobiana B de los cultivos de P. reptilivora en M-1 con 25 ppm de Cu al que se ha adicionado cada uno de los "pools" según el esquema descrito por Holladay (1956) (A esta concentración de cobre solo se producen las actividades B).

Pools	Concentración pools x 1		Concentración pools x 5	
	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
1	0,20	1,0	0,23	2,0 ^(c)
2	0,18	0,8	0,25	1,6
3	0,18	0,7	0,22	1,1
4	0,17	0,7	0,22	1,1
5	0,18	1,2	0,18	2,5 ^(c)
6	0,15	1,0	0,20	0,4
7	0,17	0,3	0,15	0,6
8	0,20	1,2	0,18	0,5
9	0,20	0,9	0,18	1,0
10	0,18	1,2	0,21	2,5 ^(c)
11	0,18	0,9	0,22	2,6 ^(c)
12	0,20	0,9	0,22	1,6
-	0,16	1,0	0,16	1,0

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias significativas con los otros valores, $P \leq 0,05$.

Realizados los tanteos previos con las sustancias componentes de los "pools" citados se determinó que las sustancias implicadas son Glutámico-Adenina y Prolina.

Después de la separación de las actividades presentes en los caldos mediante electroforésis, fué determinada a cual de ellas se debía el incremento encontrado. De los resultados obtenidos se deduce que la prolina favorece la producción de la actividad B_1 y el glutámico y adenina son responsables del incremento de B_1 y B_2 de forma paralela.

Después de determinar la importancia de estos elementos se calculó su concentración óptima en los caldos de cultivo. Los resultados obtenidos se recojen en la - Tabla XIV.

TABLA XIV

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de los cultivos de P. reptilivora en M-1 con 25 ppm de Cu adicionado de diferentes concentraciones de prolina (A esta concentración de cobre sólo se producen las sustancias B).

Prolina	D.O. (a)	Act. (b)
-	0,16	1
0,01	0,16	1,5
0,025	0,16	1,5
0,05	0,20	1,8
0,1	0,22	2,8 ^(c)
0,2	0,21	2,4 ^(c)

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias significativas con los otros valores, $P \leq 0,05$.

En la Tabla XIV se puede apreciar que la concentración óptima de prolina para la producción de la actividad B₁ es de 0,1 mg/ml.

En cuanto al incremento de la producción de la sustancia con actividad antibiótica B₂, intervienen dos sustancias, adenina y glutámico, que estudiadas por separado, o no produce incremento alguno en la actividad de los caldos preparados con ellas, como es el caso de la adenina, o produce un incremento relativamente pequeño, como en el caso del Glutámico. Estos resultados se han incluido en la Tabla XV.

TABLA XV

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica B de los cultivos de P. reptilivora en M-1 con 25 ppm de Cu (P/N = 10) al que se han añadido diferentes concentraciones de Adenina y Glutámico (A esta concentración de cobre y relación P/N se favorece la producción de B₂)

Glut. (mg/ml)	Aden. (mg/ml)	D.O. (a)	Act. (b)
-	-	0,14	0,6
-	0,025	0,12	0,5
0,05	-	0,16	0,8
0,05	0,01	0,16	1,0
0,05	0,025	0,18	1,8 ^(c)
0,05	0,05	0,16	0,6
0,025	0,025	0,18	1,2
0,1	0,025	0,22	0,8

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias significativas con los otros valores, $P \leq 0,05$.

En esta Tabla se muestran los óptimos calculados para las dos sustancias en los medios de cultivo que son para la adenina 0,025 mg/ml y para el glutámico 0,05 mg/ml. Sin embargo, en este caso el incremento observado en la actividad de los caldos no es específico para B-2 puesto que la actividad B-1 aumenta también de forma paralela a pesar de que en este medio se favorece la formación de B-2 por el valor de la relación P/N, 10.

La importancia demostrada de estos factores en la formación de sustancias activas es de gran interés desde los puntos de vista de producción y del conocimiento de su biosíntesis.

Efecto del inóculo.

El efecto de la relación inóculo/medio de cultivo sobre la evolución de distintos parámetros (tasa de crecimiento, actividad microbiana, etc) fué conocido y ha preocupado desde antiguo (Lodge & Hinshelwood, 1943) hasta hoy (Egoron et al., 1975). En la producción de antibióticos, los rendimientos aumentan generalmente con la utilización de grandes inóculos. Sin embargo, en este caso concreto, hay una relación inversa entre el ta-

maño del inóculo y la producción de sustancias activas.

En la Tabla XVI, se observa un efecto positivo para el incremento del volumen de inóculo cuando se utiliza M-1. Este medio está elaborado con productos muy puros, lo que hizo pensar que el incremento experimentado en -- la producción de sustancias activas se pudiera deber al aporte con el inóculo de microelementos. Para eliminar -- esta posibilidad se llevó a cabo la inoculación utilizando células lavadas.

TABLA XVI

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de los cultivos de P. reptilivora en M-1 e YC-73 a los que se ha -- adicionado diferente proporción de inóculo (Se ha adicionado en cada caso la cantidad de cobre necesaria para la - producción de las tres sustancias activas).

Medio	Inóculo (% v/v)					
	0,2		5		10	
	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
YC-73	-(c)	1,1 ^(d)	-(c)	0,34 ^(d)	-(c)	0,30
M-2	0,47	1,20 ^(d)	0,50	1,00 ^(d)	0,51	0,75 ^(d)
M-1	0,18	0,45 ^(d)	0,11	1,20 ^(d)	0,10	1,20 ^(d)
M-1 (Inoc. lavado)	0,14	0,40 ^(d)	0,12	0,25 ^(d)	0,12	0,12 ^(d)

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Medio originalmente muy turbio. No es posible medir densidad óptica.
- d) Diferencias significativas con los otros valores, $P \leq 0,05$.

Los resultados permiten concluir que la idea original puede ser cierta ya que es evidente en diferente nivel de producción cuando el inóculo es lavado previamente: cuando se inocula con mayor número de células hay una progresiva disminución de la cantidad de sustancias producidas a igualdad de crecimiento microbiano. Este fenómeno es general para los otros medios más complejos ensayados.

Este hecho es de difícil explicación, sin embargo, se ha encontrado una causa lógica, que será conocida en el transcurso de esta memoria, cuando se mencionen algunas características genéticas propias de la bacteria productora.

Efecto de los diferentes elementos minerales.

De los resultados expuestos anteriormente se desprende de la necesidad del aporte de ciertos nutrientes que pueden jugar un papel importante en la síntesis de la mayoría de los antibióticos.

Teniendo en cuenta los antecedentes (del Río et al., (1972b) se estimó oportuno estudiar en primer lugar la importancia del azufre que entra a formar parte de la molécula de la sustancia activa llamada B₁. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla XVII.

TABLA XVII

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de los cultivos de P. reptilivora en M-1 adicionado de diferentes - concentraciones de ión sulfato en forma de sulfato magnésico.

SO ₄ ⁼ (%)	M-1 para producción de la sustancia A (d)		M-1 para la producción de la sustancia B (e)	
	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
0,025	0,16	1,5	0,15	1,0
0,05	0,16	1,8 ^(c)	0,18	1,1
0,075	0,18	1,2	0,20	1,4
0,1	0,20	1,0	0,20	1,7 ^(c)
0,2	0,20	1,0	0,18	1,2

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias con otros valores, $P \leq 0,05$.
- d) Concentración de Cu, 0,5 ppm, concentración de Fe, 5 ppm.
- e) Concentración de Cu, 25 ppm.

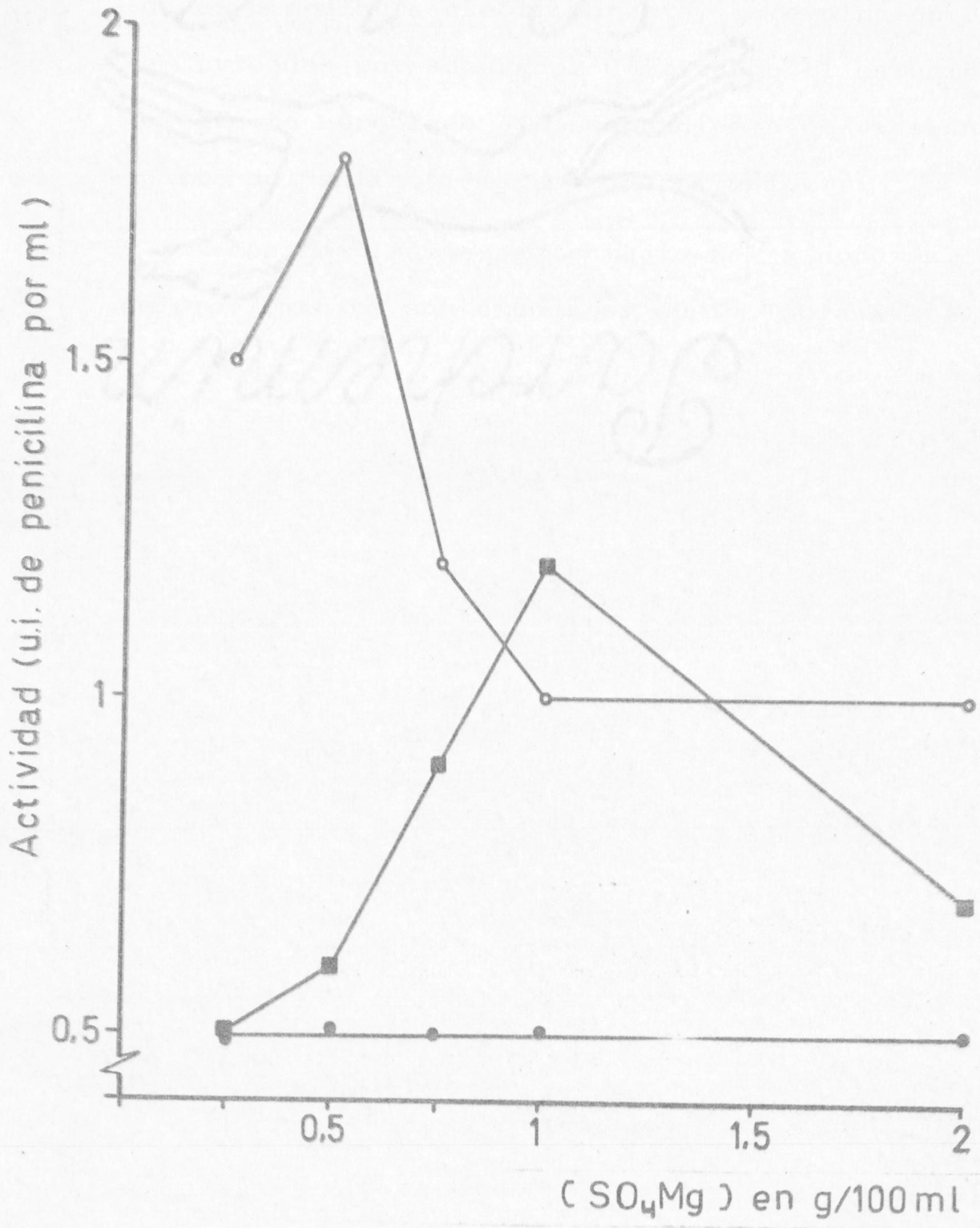


Fig. 6.- Actividades antibióticas A-B₁-B₂, de cultivos de P. reptilívora en medio M-1 adicionado de 1,25 ppm de Cu con distintas concentraciones SO₄⁼. Actividades A (o), B₁ (■), B₂ (●).

El óptimo para la producción de la actividad A está a una concentración de ión sulfato de 0,05 % y de 0,1 % - para la producción de las actividades B, En la Figura 6 - se representa, después de la separación de las dos actividades B mediante electroforesis, la evolución de las tres actividades por separado. Utilizando el estudio apropiado el efecto apreciado es independiente del catión que forma parte del sulfato, magnesio o potasio.

Los resultados del estudio del efecto de distintos - microelementos son expuestos en la Tabla XVIII.

TABLA XVIII

Actividad antibiótica^(a) de los cultivos de Pseudomonas reptilivora en M-1 adicionado de las sales minerales - (microelementos)^(b) componentes de la solución de Hewit (1956). (Actividad del testigo, sin adición alguna=1,0).

Sales	Conc. sol. Hewit				
	1:8	1:4	1	x 3	x 5
SO ₄ K ₂ ^(c)					
Cl ₂ Ca	0,8	0,8 ^(d)	0,5	0,5	0,4
PO ₄ H ₂ Na ^(c)					
SO ₄ Mg ^(c)		1,3			
SO ₄ Mn	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
SO ₄ Zn	1,1	1,3 ^(d)	1,3 ^(d)	0,8	0,8
BO ₃ H ₃	1	1,4 ^(d)	1,4 ^(d)	0,8	0,8
MoO ₇ (NH ₄) ₆ ^(c)	0,8	1,4 ^(d)	1,4 ^(d)	0,8	0,8
Cit. Fe ^(c)					
SO ₄ Cu ^(c)					
Todos	1,4	2,4 ^(d)	0,8	0,5	0,4

a) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.

b) No se incluye densidad óptica por la turbidez original de los medios.

c) Incluido en estudio aparte.

d) Diferencias significativas con otros valores, $P \leq 0,05$.

En la Tabla se observa cuales son los elementos responsables del incremento en la producción de sustancias activas, aunque el efecto parcial de cada uno de ellos es menor. En cuanto a la relación de las tres actividades presentes en los caldos no se vió afectada en ningún caso.

Efecto del ión Cu.

En la Tabla XIX se observan los máximos de actividad en cada uno de los medios empleados para distintas concentraciones del ión cobre ensayados. Estas medidas de la actividad global nos indica un desplazamiento de los picos de máxima reproducción hacia concentraciones de cobre más altas de acuerdo con la complejidad del medio en (M-1, M-2 e YC-73).

La formación de cada una de las tres actividades en relación con la concentración de cobre se representa en las figuras 7 y 8).

Estos resultados indican que existe un óptimo en la concentración de cobre para la aparición de la actividad A y otro para las actividades B, aunque la concentración óptima del ión es distinta según el medio que haya sido empleado. Para obtener la máxima actividad global es de

2,5 ppm de Cu^{++} para el medio M-1 y sin embargo, es de 25 ppm de Cu^{++} en medio M-2. Esta cantidad aumenta hasta 50-100 ppm en medios más complejos. En cuanto al crecimiento bacteriano se ve afectado por la presencia del ión cobre siendo progresivamente menor cuando aumenta su concentración que llega a niveles tóxicos con inhibición total del crecimiento.

El orden de aparición de las tres actividades en función de concentraciones crecientes de cobre es el siguiente. En primer lugar y a concentraciones de cobre más bajas aparece la actividad A y en segundo término aparece la actividad B-2 siendo la última la actividad de B-1, que aparece a niveles más altos de este catión.

TABLA XIX

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de los cultivos de P. reptilivora realizados en distintos medios -- cuando se utilizan diferentes concentraciones de cobre.

Cu ppm	M-1		M-2		YC-73 ^(c)
	D.O. ^(a)	Act. ^(b)	D.O. ^(a)	Act. ^(b)	Act. ^(b)
-	0,24	0	0,50	0	0,30
0,125	0,19	0,06	0,48	0,02	0,30
0,25	0,18	0,10	0,48	0,03	0,35
0,50	0,18	0,20	0,50	0,04	0,30
1,0	0,17	0,60	0,49	0,04	0,30
1,25	0,16	1,30 ^(c)	0,49	0,05	0,35
2,5	0,15	3,90 ^(c)	0,48	0,50	0,30
5	0,13	3,20 ^(c)	0,50	0,50	0,30
10	0,13	1,30 ^(c)	0,50	0,80 ^(c)	0,30
25	0,13	1,10	0,44	1,00 ^(c)	0,35
35	0,10	0,50	0,40	0,35 ^(c)	0,40 ^(d)
50	0	-	0	-	0,60 ^(d)
75					0,35 ^(d)
100					0,34
150					0,34
200					0,16

Valores medios de cinco repeticiones.

- Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, las medidas se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- Medio originalmente turbio. No se pudo medir la densidad óptica.
- Diferencias significativas con los otros valores, $P \leq 0,05$.

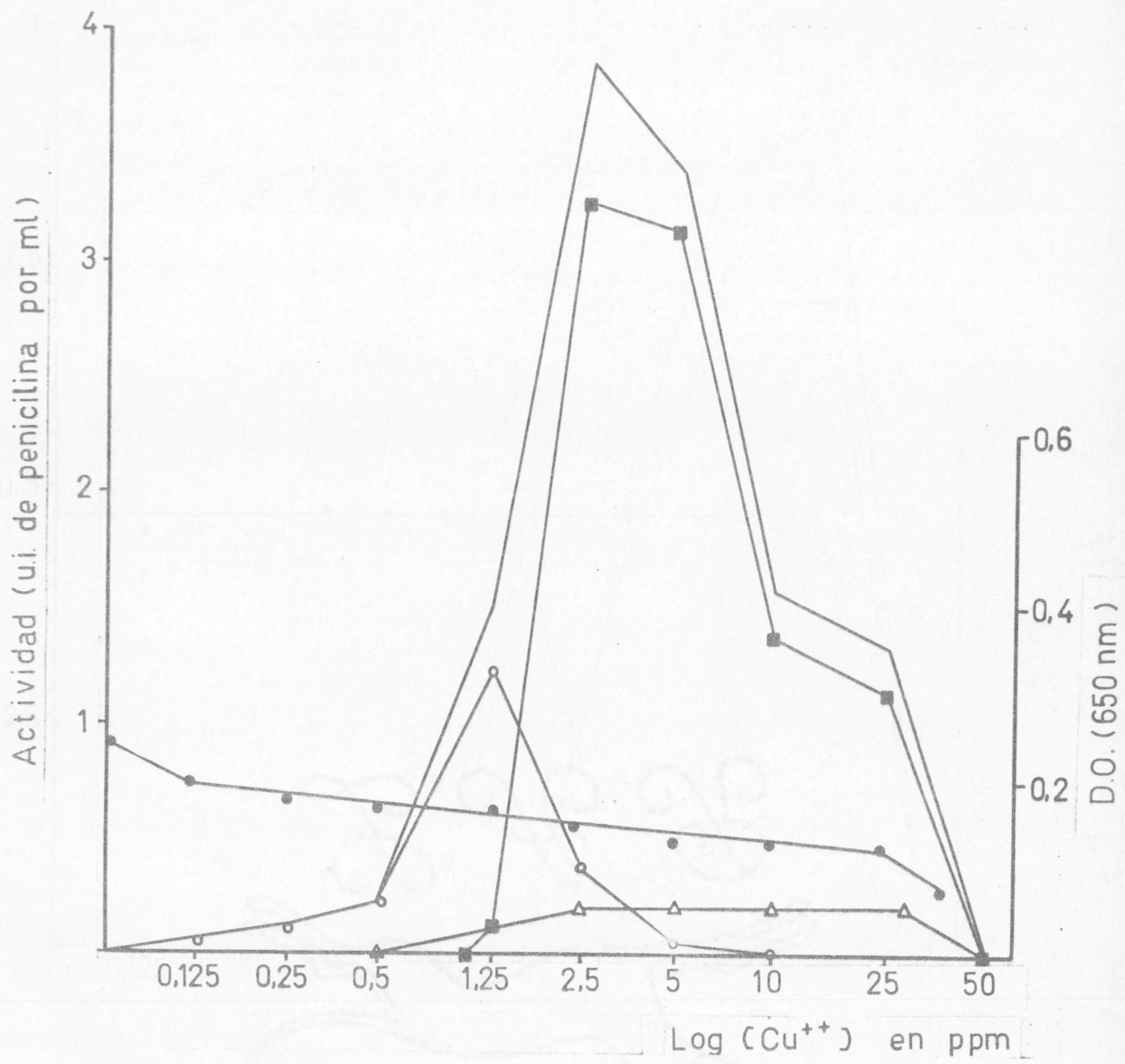


Fig. 7.- Producción de antibióticos A-B₁-B₂, por cultivos de *P. reptilivora* en M-1 conteniendo diferentes concentraciones de Cu. Actividades A (o), B₁ (■), B₂ (Δ), total (—), crecimiento microbiano (●).

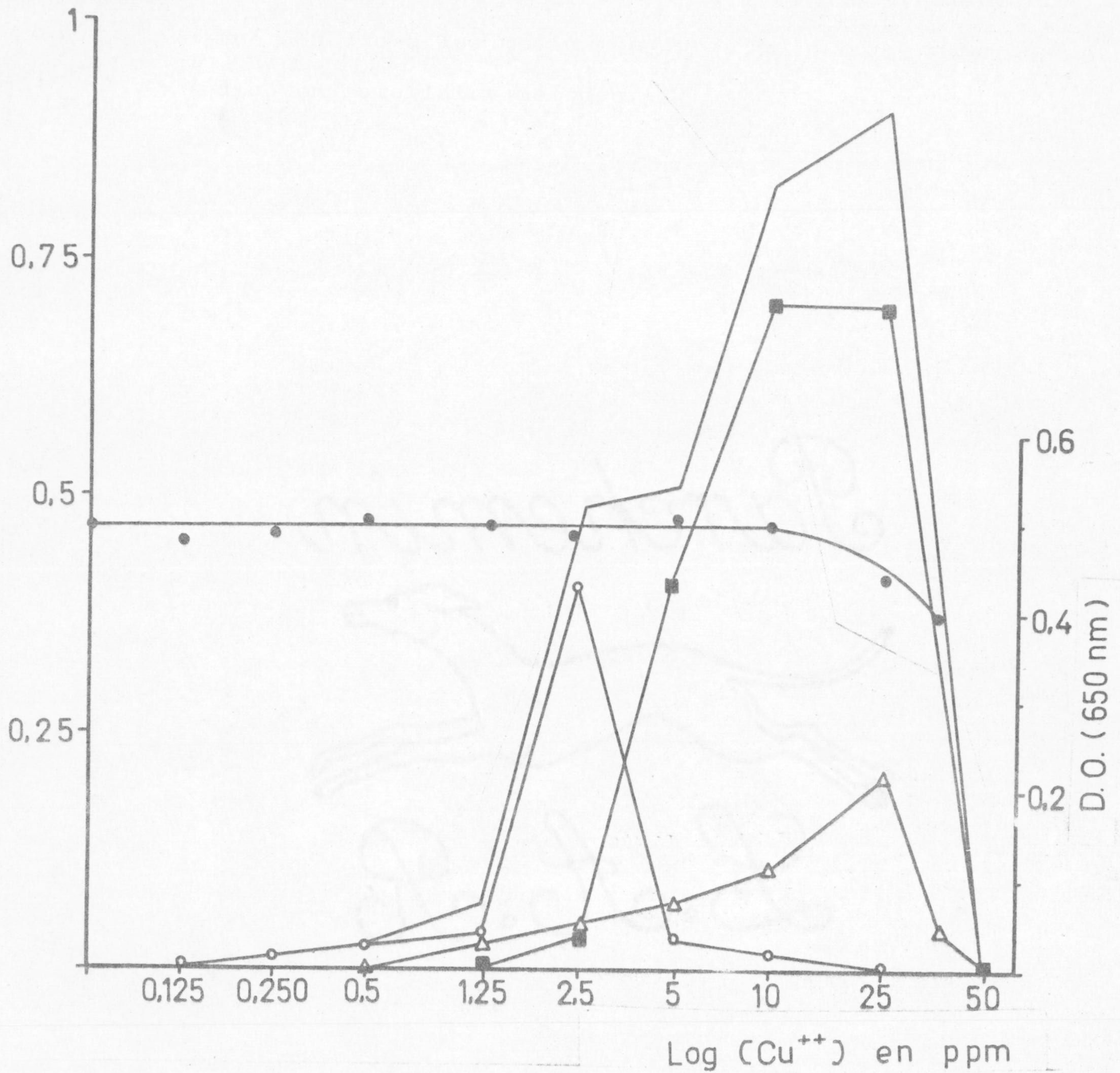


Fig. 8.- Producción de antibióticos A-B₁-B₂, por cultivos de *P. reptilivora* en M-2 conteniendo diferentes concentraciones de Cu. Actividades A (o), B₁ (■), B₂ (Δ), total (—), - crecimiento microbiano (●).

Efecto del ión Fe.

La relación entre la actividad total y la concentración de cobre e hierro en los cultivos de P. reptilivora en M-1 se muestra en la Tabla XX y Figura 9. El hierro - fué añadido a los medios en forma de citrato como se indicó en material y métodos.

TABLA XX

Crecimiento microbiano y actividad antibiótica de cultivos de P. reptilivora realizados en M-1 adicionados de distintas concentraciones hierro y cobre necesario para la producción de la sustancia A, de las B o de las tres juntas.

Fe adicionado (ppm)	Cu (ppm)							
	0		0,125 ^(e)		1,25 ^(e)		25,0 ^(e)	
	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)	D.O. (a)	Act. (b)
0	0,24	0	0,19	0,06 ^(c)	0,16	1,30 ^(c)	0,13	1,10 ^(d)
0,1	0,25	0	0,20	0,25 ^(c)	0,16	2,50 ^(c)	0,14	1,10 ^(d)
0,5	0,25	0	0,20	0,40 ^(c)	0,16	3,90 ^(c)	0,16	1,00 ^(d)
1	0,25	0	0,20	0,75 ^(c)	0,16	3,90 ^(c)	0,15	1,00 ^(d)
5,0	0,26	0	0,21	1,50 ^(c)	0,18	3,90 ^(c)	0,15	0,90 ^(d)
10	0,26	0	0,26	1,30 ^(c)	0,20	2,70 ^(c)	0,16	1,00 ^(d)
25	0,25	0	0,25	1,30 ^(c)	0,20	2,70 ^(c)	0,17	1,00 ^(d)
50	0,25	0	0,25	1,30 ^(c)	0,20	2,70 ^(c)	0,18	1,00 ^(d)

Valores medios de cinco repeticiones.

- a) Crecimiento microbiano expresado como densidad óptica a 650 nm, Las medidas de densidad óptica se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Actividad expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- c) Diferencias significativas con los otros valores, $P \leq 0,05$.
- d) Diferencias no significativas.
- e) 0,125 ppm de Cu para producción de A; 1,25 para producción de A y B y 25,0 para producción de las B.

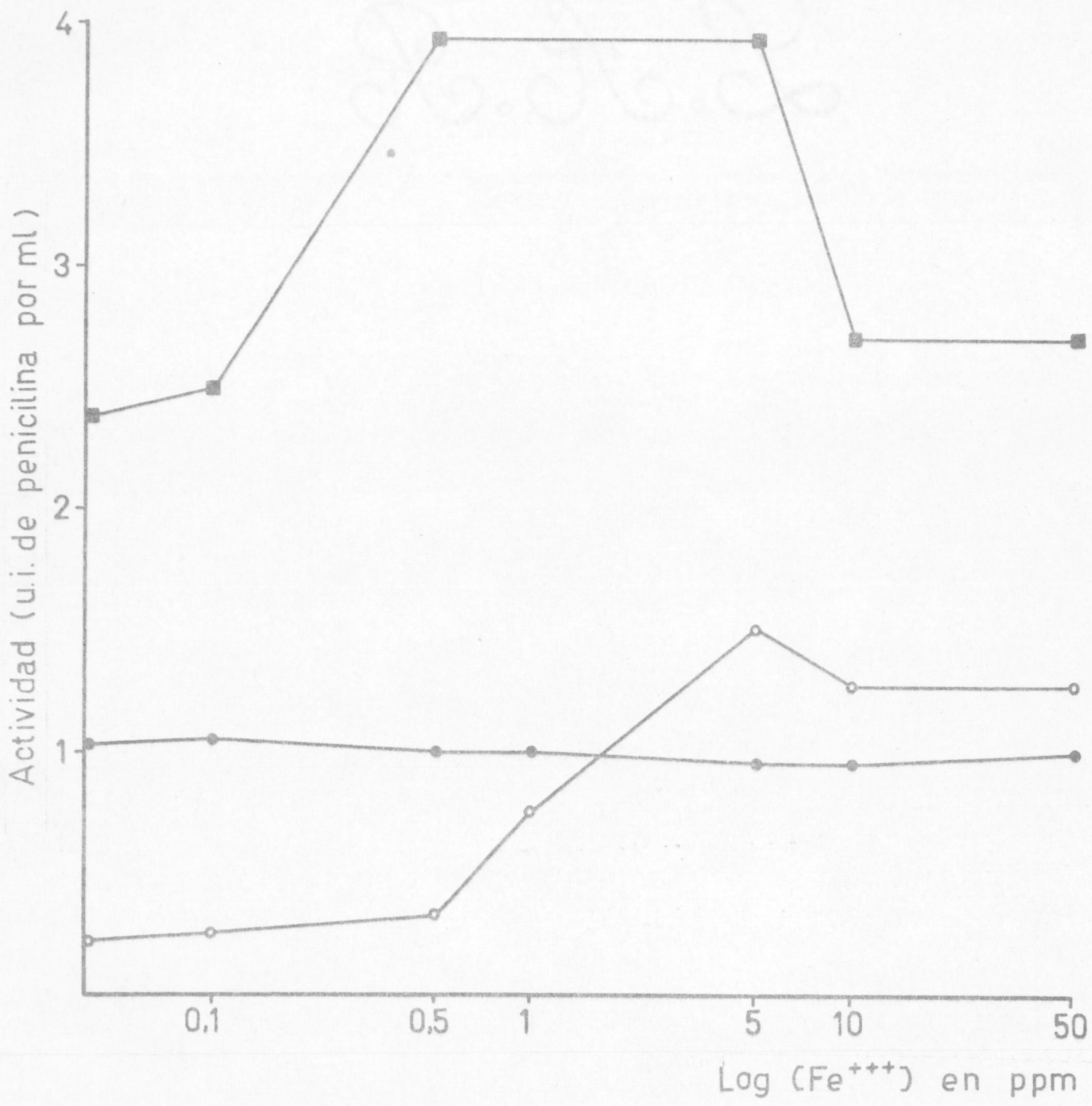


Fig. 9.- Producción de antibióticos por cultivos de *P. reptilífera* en M-1 conteniendo diferentes concentraciones de Fe para 3 niveles de Cu.
 Cu = 0,125 (o), Cu = 1,25 (■), Cu = 25 (●).

El efecto de distintas concentraciones de hierro en presencia de cobre (Tabla XX) muestra la dependencia de la actividad A de la existencia de este ión en el medio mientras que las actividades B no se ven afectadas por él. La presencia de hierro es efectiva para concentraciones de cobre bajas en las que se producen las tres actividades, siendo sin embargo, no efectiva para la concentración cobre más alta (25 ppm de Cu) donde únicamente se producen las actividades B según se ha visto en las Figuras 7 y 8,

Cuando las sustancias parcialmente purificadas, A y B₂, y la B₁ cristalizada, fueron analizadas para determinar su contenido en estos metales, los resultados muestran la presencia de cobre en las tres y de hierro únicamente en la actividad A. Estos resultados explican la dependencia en la producción del antibiótico A respecto del hierro y la independencia del antibiótico B₁ y B₂ que únicamente requieren cobre para su producción. Los resultados se exponen a continuación refiriendo la cantidad de elemento en relación con el nitrógeno. De la relación de estos iones con el contenido de nitrógeno de las muestras puede deducirse que el cobre en la B₁ y B₂ y posiblemente el hierro en la A puede entrar, de una u otra manera a formar parte de las correspondientes moléculas,

mientras que el Cu en la A puede ser sólo contaminación dada la baja concentración a la que se encuentra.

Actividad A: 0,004 μM Cu/ μM N.

B₁: 0,3 μM Cu/ μM N.

B₂: no se ha encontrado nitrógeno, contiene la misma cantidad de cobre que la B₁.

En cuanto a hierro no se ha encontrado en las dos actividades B, sí en la A: 0,13 μM Fe/ μM N.

De los tres antibióticos producidos por P. reptilivora, la actividad B-1 es la misma que YC-73 o fluopsina C (del Río et al., 1972b). La actividad A sin embargo, es diferente del antibiótico fluopsina F descrito por Itoh et al (1970) puesto que además de contener solamente hierro en su molécula, existen diferencias en cuanto a las solubilidades de ambas en disolventes orgánicos. Nunca ha sido descrita una sustancia activa semejante a la B₂ por sus características.

ESTUDIO GENETICO

El amplio estudio de los factores físicos y químicos implicados en la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por P. reptilivora ha demostrado que, en algunos casos, los resultados anormales encontrados se debían a la presencia en los medios de impurezas incontroladas en los ingredientes que entraban en su composición, referencias de las cuales fueron dadas en algunas publicaciones (Lluch, 1971; Lluch et al., 1973).

La variabilidad del carácter productor de antibióticos de las cepas aisladas del cultivo original que continuó manifestandose después de controlados estrictamente los factores culturales, determinó la puesta a punto de una serie de técnicas encaminadas por un lado a la obtención de cepas estables y por otro lado, a la determinación de las causas de tal variabilidad.

Se comenzó para ello por el tratamiento con diversos agentes mutagénicos, una vez conocida la curva de crecimiento de la bacteria en unas condiciones preestablecidas para elegir el momento de su realización.

En la Figura 10 representa la evolución del crecimiento durante las primeras 33 horas de un medio de cultivo concreto y bajo condiciones determinadas. La fase -

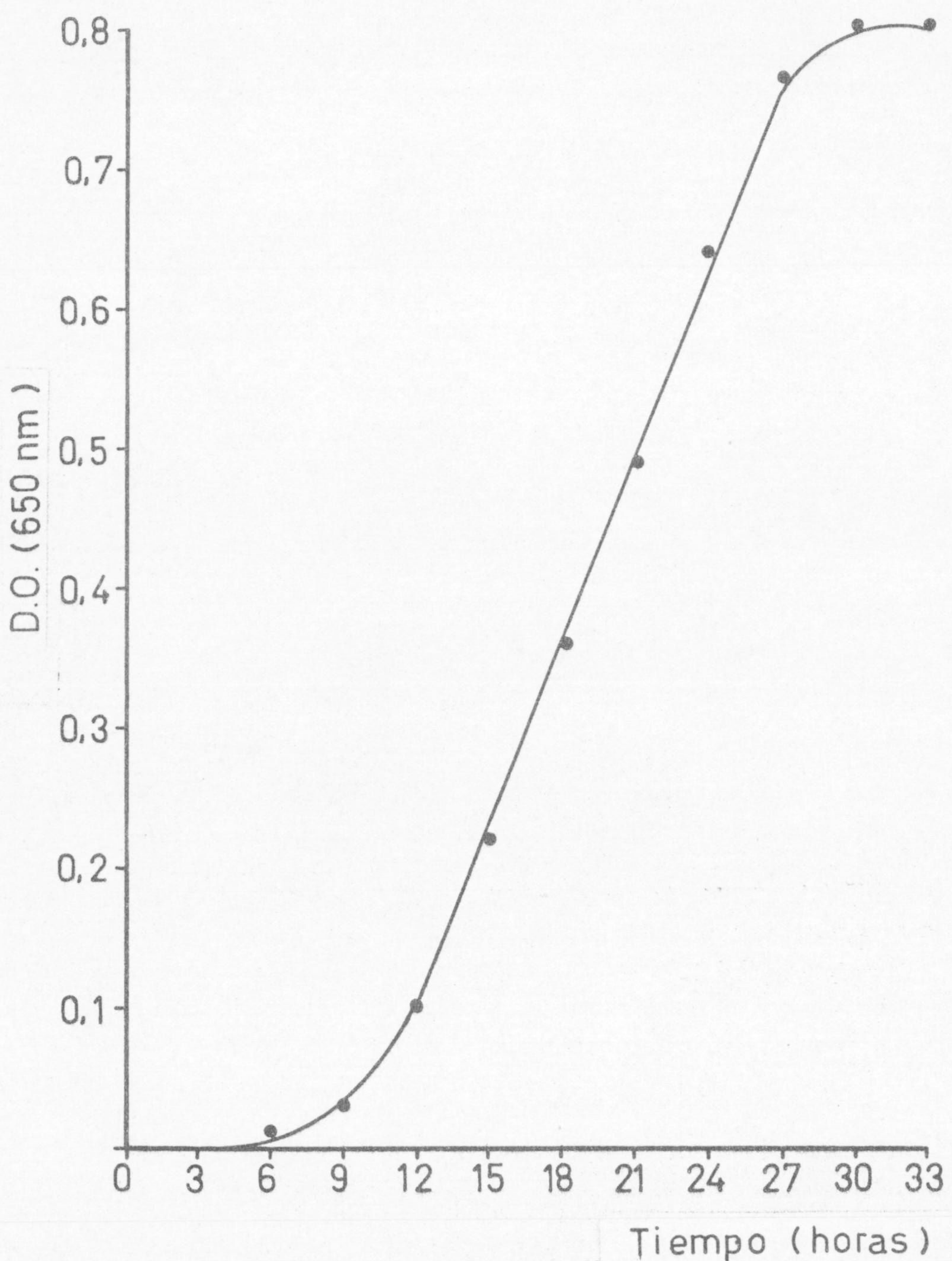


Fig. 10.- Curva de crecimiento de P. reptilivora en caldo nutritivo a 28° C.

logarítmica de crecimiento comienza a las 6 horas y concluye hacia las 30 horas.

Entre los diferentes agentes mutagénicos se han utilizado la irradiación con luz ultravioleta y la exposi-ción a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), eli-giéndose un tiempo de cultivo de 15-18 horas que corres-ponde a plena fase logarítmica de crecimiento.

Tratamiento con luz ultravioleta.

Las dosis empleadas en una primera fase de trata-miento fueron altas, de dos a 10 minutos de exposición. Los resultados encontrados en estas condiciones fueron negativos, en el sentido de que todos los mutantes aislados presentaban la caracterífstica común de no producir sustancia antibiótica alguna.

En una segunda fase, utilizando dosis pequeñas de irradiación, de un segundo a un minuto, no se obtuvieron tampoco resultados positivos desde el punto de vista en que había sido planteada la experiencia, es decir de cara a un incremento en la producción de sustancias con actividad antibiótica y una estabilización de las rezas para este carácter. Sin embargo, aparecen mutantes auxotro

fos con la característica común de ser no productores de sustancias antibióticas. En la Tabla XXI se expone la viabilidad para cada uno de los tiempos ensayados y el % de razas negativas obtenidas.

TABLA XXI

Tanto por ciento de supervivencia de P. reptilívora después de ser irradiado con luz ultravioleta por diferentes periodos de exposición.

Tiempo de exposición (segundos)	% de viabilidad	% cepas negativas
0	100	0
1	94	0
2	87	0
3	73	1
4	61	3
5	44	0

Las mutantes auxótrofos aislados se sometieron a una serie de pruebas destinadas a determinar el factor nutricional para el que eran auxotrofos siguiendo el esquema de Holliday (1956). No obtuvo éxito en establecer cual era el factor responsable.

Tratamientos con NTG.

Los tratamientos con NTG fueron efectuados también en cultivos de la bacteria en fase logarítmica de crecimiento, 15 a 16 horas de incubación en las condiciones que se determinó la curva de crecimiento.

Los resultados de estos tratamientos en relación con la obtención de mutantes con mayor capacidad de producción fueron negativos, sucediendo lo mismo que cuando se utilizó luz ultravioleta a altas dosis.

La utilización de radiación ultravioleta y de la NTG como mutágenos, es una práctica común de en la mejora de razas cuyas especiales características hacen que tengan interés industrial como es el caso de las productoras de antibióticos.

En ambos tratamientos los resultados obtenidos en este caso particular han sido negativos.

En cuanto a la aparición de mutantes auxotrofas -- después del tratamiento con algunas dosis de luz ultravioleta, por la característica común que presentaban de no producir sustancias activas, pareció interesante por poder representar un arma eficaz para el estudio de la biosíntesis de estas sustancias activas.

Pérdida de la capacidad de producción de sustancias activas con el tiempo de conservación.

Todas las cepas empleadas en los cultivos destinados a la producción de sustancias activas sufren una pérdida progresiva de la capacidad de producción de sustancias antibióticas en el transcurso de varios subcultivos sucesivos. En la Figura 11 se ha representado gráficamente la pérdida de la capacidad de producir sustancias antibióticas en tres cepas de P. reptilivora en medio M-1, aislados del cultivo original conservado por liofilización.

La pérdida de actividad total se debe a una pérdida conjunta de la capacidad de producción de cada una de las tres actividades como se muestra en la gráfica 12.

Este hecho llevó a pensar en la posible existencia de un plásmido, al que directa o indirectamente estuviera ligada la síntesis de antibióticos por esta cepa microbiana, y que podía ser gradualmente reprimido a lo largo del tiempo o eliminado espontáneamente en los sucesivos llevados a cabo para su conservación.

En la bibliografía, las referencias que existen en relación con estos aspectos genéticos en la síntesis de antibióticos son escasas, habiéndose descrito aparte de

la posible localización extracromosómica de los genes responsables de la producción de algunas bacteriocinas de bajo peso molecular, la de algún antibiótico propiamente dicho como la nisina producida por cepas de S. lactis (Fusch et al., 1974), y los kasugamicina y aureothricina producidas por S. kasugaensis (Okanishy et al., 1970).

Para investigar esta posible base genética de la biosíntesis de los antibióticos por P. reptilivora, se realizaron tratamientos de conocido efecto sobre los plásmidos como eliminadoras o inductoras de los mismos. Se ensayaron pues, naranja de acridina (AO); bromuro de etidio (EtBr), lauril sulfato sódico (SDS), crecimiento a temperaturas superiores a la óptima y mitomicina C.

Tratamiento con naranja de acridina.

Antes de realizar los tratamientos definitivos con este colorante se llevó a cabo un experimento destinado a determinar la máxima concentración subbacteriostática de naranja de acridina, cuyos resultados correspondientes a un cultivo de 24 horas, se exponen en la Tabla XXII.

Al mismo tiempo se realizaron las correspondientes pruebas de actividad para conocer cual podía ser el tratamiento adecuado en M-2 3,5 ppm de Cu.

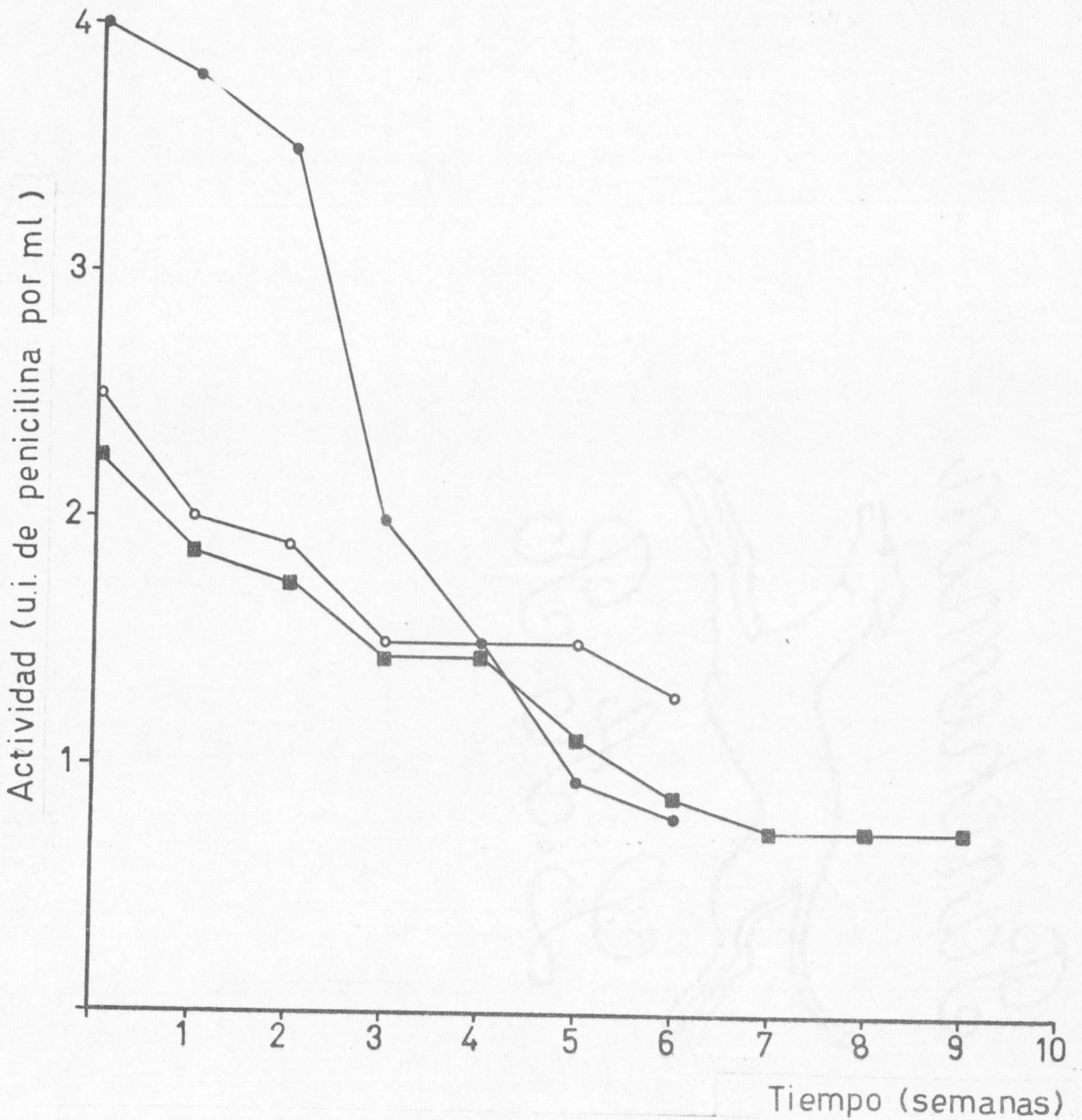


Fig. 11.- Pérdida de actividad antibiótica de 3 cepas de *P. reptilivora* después de una serie de subcultivos semanales.

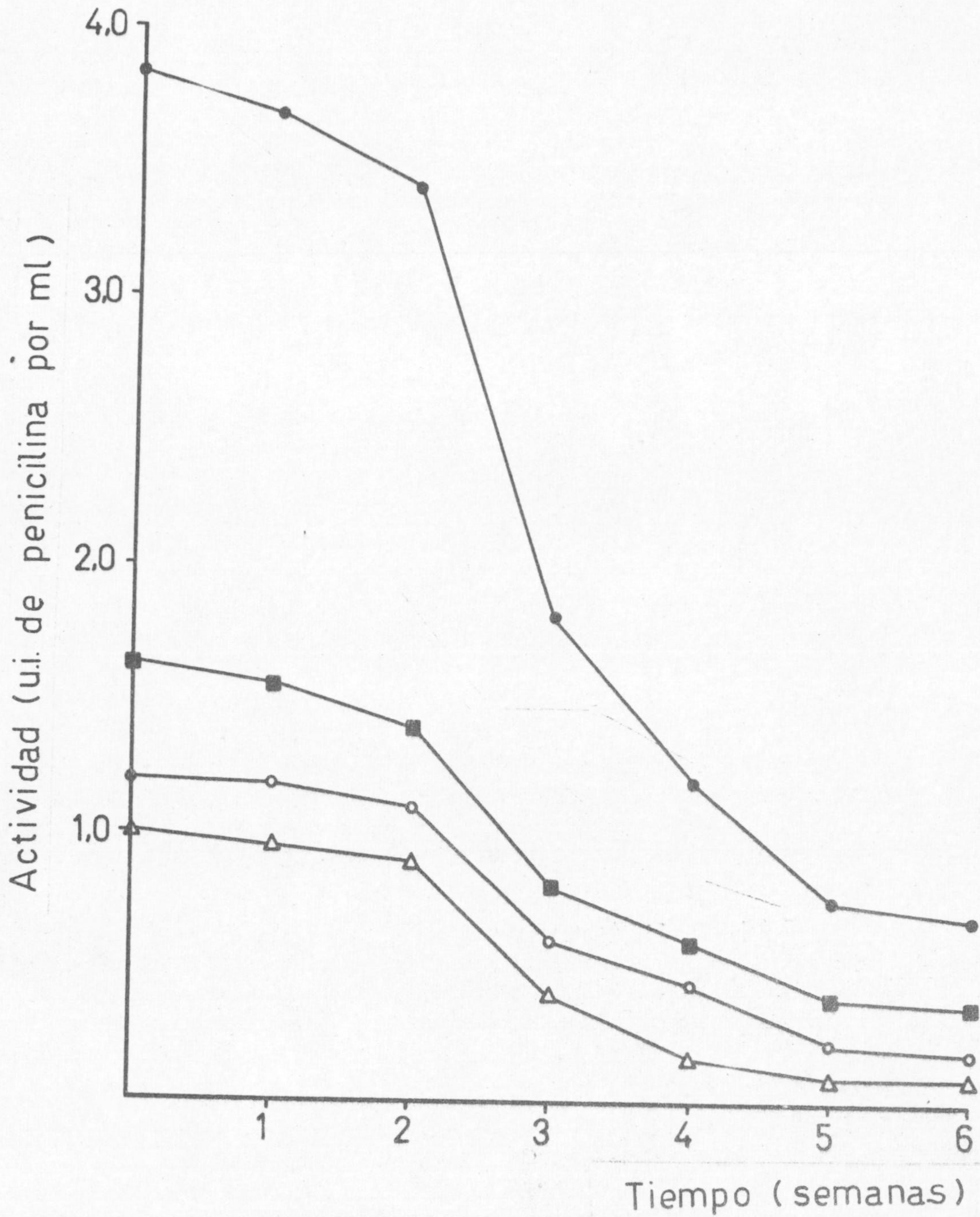


Fig. 12.- Actividades antimicrobianas A-B₁-B₂, en cultivos de cepas de P. reptilífera después de una serie de subcultivos semanales.

Actividades A (■), B₁ (○), B₂ (△), total (•).

TABLA XXII

Crecimiento de P. reptilífera incubado en presencia de las distintas concentraciones de naranja de acridina - durante 24 horas (medio M-2).

Naranja de acridina ($\mu\text{g/ml}$)	D.O. ^(a)
0	0,50
0,05	0,48
0,1	0,45
0,5	0,47
1	0,44
5	0,46
10	0,46
25	0,46
50	0,36 ^(b)

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Las medidas de densidad óptica se realizaron sobre cultivos diluidos 5 veces con solución salina.
- b) Diferencia significativa con los valores anteriores, $P \leq 0,05$.

De estos resultados se deduce que la máxima concen--tración subbacteriostática de las ensayados es la de 25 - $\mu\text{g/ml}$, siendo ésta la escogida para las pruebas correspondientes.

Los resultados del estudio sobre la población resultante del tratamiento con naranja de acridina en relación con la aparición de clones carentes del carácter de producción de antibióticos se exponen en la Tabla XXIII.

TABLA XXIII

Resultados del estudio de población referido a la capacidad de producción de sustancias activas realizado sobre el cultivo de una cepa productora de antibióticos crecida en presencia de naranja de acridina.

Naranja de acridina ($\mu\text{g/ml}$)	Número de colonias estudiadas	Número de subcultivos negativos ^(a)
0	150	0
10	150	0
25	150	0

a) Ausencia de la capacidad de producir sustancias activas.

Tratamientos con lauril sulfato sódico (SDS).

Los resultados obtenidos de los tratamientos con SDS se exponen en la Tabla XIV. Estos tratamientos se han realizado utilizando de la misma cepa de P. reptilivora que

la empleada para los tratamientos con naranja de acridina.

TABLA XXIV

Resultados del estudio de población sobre la capacidad de producción de sustancias activas realizado sobre cultivo de una cepa productora de antibióticos crecido en presencia de lauril sulfato sódico (SDS).

SDS µg/ml	Número de colonias estudiadas	Número de sulculti- vos negativos (a)
0	150	0
500	150	0
1000	150	0

a) Ausencia de la capacidad de producir sustancias activas.

Tratamientos con bromuro de Etidio.

Los resultados obtenidos de los tratamientos realizados con bromuro de etidio como agente eliminador de plásmidos, se expresan en la Tabla XXV.

TABLA XXV

Resultados del estudio de población sobre la capacidad de producción de sustancias activas realizado sobre un cultivo de una cepa productora de antibióticos crecido en presencia de bromuro de etidio.

Bromuro de etidio ($\mu\text{g/ml}$)	nº de colonias estudiadas	nº de subcultivos negativos ^(a)
0	150	0
0,5	150	0
1,0	150	0
2,0	150	0

a) Ausencia de capacidad de producción de sustancias activas.

Incubación a altas temperaturas.

Antes de estudiar el efecto de las altas temperaturas sobre la producción de sustancias activas se realizaron experimentos para conocer la temperatura máxima de crecimiento.

En la Tabla XXVI se han presentado los resultados correspondientes pudiendo ser observado que la temperatura óptima de crecimiento es la de 28° C y la máxima 36° C.

TABLA XXVI

Crecimiento, expresado en densidad óptica a 650 nm, obtenido al crecer una cepa de P. reptilivora a distintas temperaturas durante 24 horas en medio M-2.

Temp. ° C.	D, O. (a)
25	0,35 ^(b)
28	0,55 ^(b)
30	0,34 ^(b)
32	0,29 ^(b)
34	0,17 ^(b)
36	0,10 ^(b)
37	0

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Las medidas de densidad óptica se realizaron sobre cultivos sin diluir.
- b) Diferencias significativas con los demás valores, $P \leq 0,05$.

Los resultados en relación con la producción de sustancias activas obtenidas cuando se hacía crecer la cepa escogida de P. reptilivora a la temperatura máxima de crecimiento, 36° C como se deduce de la Tabla XXVI, son expuestos en la Tabla XXVII.

TABLA XXVII

Efecto de la incubación a 36° C de una raza de P. repti-
lívora productora de sustancias con actividad antimicro-
biana sobre el carácter de producción.

Cultivo	Nº de colonias estudiadas	Nº de colonias negativas (a)
Incubado a 36°	150	15 ^(b)
" " 28°	150	0

- a) Ausencia de capacidad de producción de sustancias ac-
tivas.
- b) El 50 % de las colonias no productoras eran nutricio-
nalmente deficientes para una sustancia no detectada.

Tratamientos con Mitomicina C, agente inductor de -
plásmidos.

Antes de realizar los tratamientos definitivos con
mitomicina C, se realizó una experiencias para determi-
nar cual era la concentración óptima y el tiempo de con-
tacto adecuados. Los resultados obtenidos se muestran en
la Tabla XXVIII.

TABLA XXVIII

Actividad antibiótica^(a) producida por una cepa de P. reptilivora tras ser sometida a distintos tratamientos con mitomicina C.

Concentración Mit. C. µg/ml	Tiempo de contacto (min.)						
	5	10	15	20	25	30	60
-	0,50	0,51	0,50	0,45	0,50	0,48	0,52
0,06	0,52	0,55	0,65	0,70	0,50	0,52	0,50
0,125	0,60	1,00 ^(b)	0,65	0,70	0,52	0,55	0,53
0,25	0,51	1,20 ^(b)	1,10 ^(b)	0,65	0,55	0,50	0,65
0,5	0,38	0,82	0,85	0,65	0,50	0,50	0,55
1	0,45	0,70	0,70	0,45	0,45	0,50	0,55

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Actividad antibiótica expresada en u.i. de penicilina G/ml.
- b) Diferencia significativa con los otros valores, $P \leq 0,05$.

De estos resultados se deduce que la concentración y tiempo óptimos son 0,25 µg/ml y 10 minutos.

En la Tabla XXIX se recogen los resultados obtenidos utilizando las condiciones óptimas previamente determinadas para el tratamiento.

TABLA XXIX

Incremento de la actividad antibiótica producida por P. reptilivora tras el tratamiento con Mitomicina C. a 0,25 µg/ml durante 10 minutos.

Bacteria	Tratamiento con Mitomicina C.	Act. (a)
P. reptilivora (147) ^(b)	-	0,5
P. reptilivora (147) ^(b)	+	1,2 ^(c)

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Actividad antibiótica expresada en u.i. de penicilina G µ/ml.
- b) Cepa naturalmente con baja capacidad productora.
- c) Diferencia significativa, $P \leq 0,05$.

Los resultados obtenidos con la utilización de la mitomicina C, parecen indicar una inducción del carácter de producción cuando se realizó el tratamiento en las condiciones más favorables, como se puede observar en la Tabla XXIX. Sin embargo, de los resultados de los tratamientos con naranja de acridina (Tabla XXIII), SDS (Tabla XXIV) y bromuro de etidio (Tabla XXV) no es posible deducir la presencia de un plásmido que determine la biosíntesis de las sustancias con actividad antibiótica de

P. reptilivora. La realización de los tratamientos con distintos agentes eliminadores de plásmidos se ha debido a la diferente sensibilidad de los elementos genéticos extracromosómicos a estos agentes (Clowes, 1972).

El cultivo de la bacteria a temperatura más alta de la óptima de crecimiento (Tabla XXVII) da lugar a la aparición de células no productoras, así como a mutantes auxótrofos con la característica de no producir sustancias activas igual que ocurría cuando se irradiaba con luz ultravioleta.

Los resultados obtenidos de los tratamientos con agentes químicos y físicos realizados para el estudio de la posible implicación de ADN extracromosómico en la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por ésta bacteria no son concluyentes en tal sentido, no permitiendo la deducción de una consecuencia al respecto. Un hallazgo casual, que en principio complicaba la situación, cuidadosamente investigado, ha contribuido al esclarecimiento de las bases genéticas de la biosíntesis de las sustancias activas: En algunos cultivos en superficie y muy ocasionalmente, aparecían placas líticas de pequeño tamaño con las características propias de lisogenia.

Conversión por fagos.

De un cultivo de una cepa no productora de antibióticos se realizó un aislamiento sobre medio sólido y se picaron una serie de colonias que fueron ensayadas para conocer su capacidad de producción de sustancias activas y su sensibilidad al fago aislado de las placas líticas aparecidas según se indica en el capítulo de Material y Métodos. Los resultados son expuestos en la Tabla XXX.

TABLA XXX

Sensibilidad al fago y actividad antibiótica de 150 clones aislados de un cultivo de P. reptilivora.

Sensibilidad al fago ^(a) nº de clones	Clonos activos
75 +	0
75 -	75

a) (+) sensible, (-) resistentes.

Efecto de la temperatura.

Durante las pruebas realizadas para poner en evidencia la actividad del fago, se observó una clara influencia de la temperatura sobre la visualización de la lisis. En la Tabla XXXI se puede observar el efecto de la temperatura de incubación sobre el número de placas de lisis aparecidas cuando se ponen en contacto una cepa bacteriana sensible y la suspensión del fago, así como sobre el tamaño de las mismas.

TABLA XXXI

Número de placas de lisis y tamaño relativo de las mismas cuando la incubación de la mezcla bacteria-fago se realiza a distintas temperaturas.

Temperatura de incubación	Número de placas de lisis	Tamaño de las placas de lisis
18° C.	8×10^8	+ + +
20° C.	8×10^8	+ + +
22° C.	8×10^8	+ +
24° C.	5×10^8	+
26° C.	0	-
28° C.	0	-

En la Tabla XXXII se observa el efecto de la temperatura a que se mantiene en sobrefusión el agar destinado a extender la segunda capa, en la que se inocula la bacteria y el virus conjuntamente, sobre el número de placas de lisis aparecidas.

TABLA XXXII

Número de fagos detectados cuando la inoculación se realiza sobre agar blando mantenido en sobrefusión a distintas temperaturas^(a).

Temperatura de sobrefusión	Número de fagos detectados
45-50	0
40-45	6×10^7
38-40	8×10^8

a) La temperatura de incubación fué en todos los casos de 20° C.

En la Tabla XXXIII se muestran las diferencias de crecimiento encontradas sobre las razas sensibles al fago y las no sensibles sobre los medios M-1 y M-2 a la temperatura óptima de crecimiento. Los resultados muestran una gran diferencia entre ambas razas que explica parte de los hechos observados como después será comentado.

TABLA XXXIII

Valores medios del crecimiento microbiano expresados en densidad óptica a 650 nm, de las cepas sensibles y resistentes al fago de P. reptilivora cultivadas durante 24 horas en los medios M-1 y M-2.

Medio	cepas sensibles	cepas resistentes
M-1	0,03	0,01
M-2	0,28	0,19

Valores medios de cuatro repeticiones.

- a) Las medidas de densidad óptica se han realizado sobre cultivos diluidos 5 veces.

En la Tabla XXXIV se expone el crecimiento microbiano medio de razas sensibles y no sensibles al fago cuando se cultivaron durante 24 horas en M-1 a distintas temperaturas. Las diferencias de crecimiento entre ambas cepas que se observan en la Tabla anterior se acentúan en M-1 cuando las temperaturas son muy altas. Sin embargo, el óptimo de crecimiento es de 28° C para ambos.

TABLA XXXIV

Crecimiento microbiano medio, expresado en densidad óptica a 650 nm, de las cepas sensibles y no sensibles al fago de P. reptilivora cultivadas en M-1 a distintas temperaturas.

Temperatura (° C)	Cepas sensibles ^(a)	Cepas resistentes ^(a)
25°	0,17 ^(b)	0,15 ^(b)
28°	0,30 ^(b)	0,18 ^(b)
30°	0,27 ^(b)	0,12 ^(b)
32°	0,24 ^(b)	0,04 ^(b)
34°	0,08 ^(b)	0,01 ^(b)
36°	0,03 ^(b)	0,005 ^(b)
37°	0	0

Valores medios de cinco repeticiones.

- a) Las medidas de densidad óptica se han realizado sobre cultivos de 24 horas sin diluir.
- b) Diferencias significativas con los demás valores,
 $P \leq 0,05$.

Como se puede observar en la Tabla XXX, todas las cepas aisladas que eran sensibles al fago resultaron ser no productoras de sustancias con actividad antimicrobiana, mientras que las razas no sensibles resultaron ser -

buenas productoras de antibióticos, con una actividad alta y homogénea.

En el caso de los antibióticos, únicamente es encontrado en la bibliografía una cierta relación con bacterioφfagos, en la síntesis de las bacteriocinas de alto peso molecular (Houwink & Iterson, 1950; Inselburg, 1971; - Ishii et al., 1965; Sandoval et al., 1965).

La producción de sustancias con actividad antimicroφbiana por P. reptilívora parece deberse a un típico fenómeno de conversión, originado por un fago lisogénico. -- Las cepas lisogénicas presentan en relación con la bio-- síntesis de los antibióticos dos características: a) la influencia del medio sobre la producción y b) la falta - de estabilidad del carácter y como consecuencia la pérdi- da progresiva de la capacidad productora de las sustan-- cias activas durante los sucesivos cultivos realizados.

En relación con la primera característica, la in--- fluencia del medio en la síntesis de antibióticos, en la bibliografía sólo ha sido citado un modelo de conversión por fago en el que este factor tiene su importancia, la expresión del gen tox (Barksdale, 1955) dependiente de la presencia de hierro en el medio de cultivo (Pappenheimer & Johnson, 1936; Pope, 1932). Sin embargo, no parece que ambos casos sean similares. La necesidad de cobre

e hierro para la síntesis de sustancias activas P. reptilivora parece derivarse, también, de su entrada a formar parte de la molécula de dichos compuestos, al menos en algún caso concreto.

En cuanto a la falta de estabilidad de las razas lisogénicas (Figura 11) hay que decir que es un hecho aparentemente anormal, puesto que una característica común en la lisogenia es la estabilidad. Este comportamiento anormal - podría indicar que se trataba de un caso de pseudolisogenia, sin embargo, se puede dar una explicación a este hecho, -- manteniendo la hipótesis de que se trate de auténtica lisogenia, basados en la relación encontrada entre temperatura y visualización del fago. La aparición de las placas típicas de lisis a temperatura baja, implica que el fago a la temperatura normal de cultivo no es capaz de multiplicarse, esto es, que se trata de un fago sensible a la temperatura. Este hecho significaría que en caso de producirse una inducción del fago de forma espontánea, a temperatura óptima del crecimiento microbiano, no sería capaz de reproducirse, apareciendo en el proceso de división normal de la célula originaria, células hijas curadas del fago y por tanto sensibles.

De otro lado, una característica diferencial entre las cepas lisogénicas aisladas y las no lisogénicas, es -

la diferencia de crecimiento a distintas temperaturas. Se ha observado que las cepas no lisogénicas, que son a su vez no productoras de antibióticos, presentan un crecimiento mucho más rápido que las cepas lisogénicas. Este comportamiento, unido al hecho expuesto anteriormente, es decir, la aparición de células curadas a la temperatura óptima de crecimiento, daría lugar al cabo de algunos pases a un claro predominio de las cepas no lisogénicas que se manifiesta, en definitiva, en el hecho detectado de la pérdida de la capacidad de las cepas para producir sustancias activas.

Este modelo de conversión fágica explica todos los fenómenos encontrados a lo largo de la investigación realizada sobre producción. De un lado, la aparición de mutantes no productoras de sustancias activas cuando las cepas fueron tratadas con altas dosis de luz ultravioleta, hecho que se puede explicar como una curación similar a la descrita para otros casos (Lederberg, 1951; Lederberg & Lederberg, 1953). Por otro lado, los resultados del efecto de la incubación a alta temperatura que lleva como consecuencia el aislamiento de gran número de cepas no productoras de sustancias activas, quedará explicado, por el crecimiento prácticamente nulo de la cepa lisogénica, mientras que, la no lisogénica presenta un crecimiento apreciable. En

una población natural donde hay una mezcla de ambas cepas, siempre terminará por predominar la cepa no lisogénica pero a esta temperatura el proceso se acentúa. Del mismo modo, fácilmente queda explicado el efecto negativo sobre la producción de sustancias activas de la utilización de grandes inóculos en los que aún con ser la proporción de células productoras y no productoras independiente del volumen utilizado se logra un claro predominio de las cepas que -- crecen rápidamente y por tanto una paralela disminución -- del nivel de sustancias activas producidas. Dicho predominio se manifiesta desde el momento de la inoculación al -- existir en las cepas productoras una fase de adaptación -- más larga derivada de su mayor tiempo de generación.

CONCLUSIONES

1.- Derivada del estudio de producción.

La producción de sustancias con actividad antimicrobiana por Pseudomonas reptilivora se encuentra afectada por factores físicos y químicos (temperatura, agitación, aireación, pH, fuentes de carbono y nitrógeno, factores de crecimiento, macro y microelementos) que actúan de distinta forma sobre la biosíntesis de cada uno de los antibióticos. El control de dichos factores permite seleccionar unas condiciones adecuadas para la producción mayoritaria o única de una sustancia activa, facilitándose el aislamiento y posterior estudio de la misma.

2.- Derivada del estudio genético.

La biosíntesis por Pseudomonas reptilivora de sustancias con actividad antimicrobiana es el resultado de un fenómeno de conversión originado por un fago lisogénico termosensible inactivo a temperaturas superiores a 24° C.

Estos hechos explican el extraño comportamiento manifestado por esta bacteria en cuanto a la producción de sustancias activas se refiere: inestabilidad del carácter de producción, sensibilidad a la temperatura (no hay acti-

vidad apreciable de los medios por encima de los 30° C),
efecto negativo de la utilización de grandes inóculos, -
etc.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERT, A., 1958.- The Strategy of Chemotherapy (Ed. S.T. Cowan & E. Rowatt) C.U.P. Cambridge, England.
- ANDERSON, E.S., 1965.- Nature Lond. 208, 1016.
- BARKSDALE, L., 1955.- C.R. Acad. Sci., 240, 1831.
- BARKSDALE, L. & ARDEN, S.B., 1974.- Annu. Rev. Microbiol., 28, 265.
- BARKSDALE, W.L. & PAPPENHEIMER, A.M. Jr., 1953.- Proc Fed. Soc. Biol. Med. 12, 435.
- BARKSDALE, W.L. & PAPPENHEIMER, A.M. Jr., 1953.- Int. Congre. Microbiol. 6th, Roma 3:457.
- BARKSDALE, W.L. & PAPPENHEIMER, A.M. Jr., 1954.- J. Bacteriol., 67, 220.
- BERTANI, L.E. & BERTANI, G., 1971.- Advan. Genet., 16, 199.
- BOICE, L.B. & LURIA, S.E., 1963.- Virology 20, 147.
- BOYER, H., 1966.- J. Bacteriol., 91, 1767.
- BRADLEY, D.E., 1967.- Bact. Rev., 31, 230.
- BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. & SMITH, N.R., 1957.- The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- BRINBERG, S.L., 1959.- Antibiotiki, 4, 13.
- BROWN, C.M. & ROSE, A.H., 1969a.- J. Bacteriol., 97, 1261.



- BROWN, W.E. & PETERSON, W.H., 1950.- *Industr. Eng. Chem.* 42, 1769.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E., 1974.- *The Williams & Wilkins Co. Baltimore.*
- CORDS, B.R., MCKAY, L.L. & GUERRY, P., 1974.- *Journal of Bacteriology*, 117, 1149.
- CLOWES, R.C., 1972.- *Bacteriological Reviews*, 36, 361.
- CHODAT, F. & GOUDA, S., 1961.- *Path. Microbiol.*, 24, -- 340.
- DEL RIO, L.A., 1971.- *Memoria de la Tesis Doctoral, Universidad de Granada.*
- DEL RIO, L.A., OLIVARES, J., BLESA, M.C., MAYOR, F., -- 1972a.- *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2, 186.
- DEL RIO, L.A., LOPEZ-GORGE, J., OLIVARES, J, & MAYOR, F. 1972b.- *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2, 189.
- EDGAR, P. & LIELAUSIS, I., 1964.- *Genetics*, 49, 649.
- EGAWA, Y., UMINO, K., AWATAGUCHI, S., KAWANO, Y. & OKUDA, T., 1970.- *J. Antibiotics.*, 23(6), 267.
- EGAWA, Y., UMINO, K., ITO, Y, & OKUDA, T., 1970.- *J. Antibiotics (Tokio)*, 24, 124.
- EGOROV, N.S., KOZLOVA, Y.I. & GRUSHINA, V.A., 1975.- *Microbiologiya*, 44, 571.

- FREDETTE, V. & FORGET, A., 1962.- Can. J. Microbiol. 8, 315.
- FREEMAN, V.J., 1951.- J. Bacteriol., 61, 675.
- FREEMAN, V.J. & MOSSE, I.V. 1952,- J. Bacteriol. 63, - 407.
- FUCHS, P.G., ZAJDEL, J. & DOBRZANSKI, W.T., 1975.- J. of General Microbiology, 88, 189.
- GALE, E.F. & EPPS, H.M.R., 1942.- Biochem. J., 36, 600.
- GALLICCHIO, U & GOTTLIES, D., 1958.- Mycologia, 50, 490.
- GOODMAN, J.J., MATRISHIN, M., YOUNG, R.W. & McCORMICK., 1959.- J. Bacteriol., 78, 492.
- GROMAN, N.B., 1953.- J. Bacteriol., 66, 184.
- GROMAN, N.B., 1955.- J. Bacteriol., 69, 9.
- GROMAN, N.B. & EATON, M., 1955.- J. Bacteriol., 70, - 639.
- GROVE, D.C. & RANDALL, W.A., 1955.- Medical Enciclopedia, Inc. New York.
- HALMANN, M. & MAGER, J., 1967.- J. Gen. Microbiol., 49, 461.
- HALMANN, N., BENEDICT, M. & MAGER, J., 1967.- J. Gen. Microbiol., 49, 451.

- HAMADA, S. & OOSHIMA, T., 1975.- Arch. Oral. Biol., 20, 641.
- HARRIGAN, W.F., & McCANCE, M.C., 1969.- Academic Press, Inc. London.
- HEHRE, E.J., 1946.- J. Biol. Chem., 163, 221.
- HERSHEY, A.D.Ed., 1971.- The Bacteriophage Lambda. New York: Cold Spring Harbor Lab. 792 pp.
- HEWITT, E.J., 1952.- Tech. Comm. 22. Farnham, Royal -- Brahs: Commonwealth Agricultural Bureau.
- HOCKENHULL, D.J.D., 1956.- Giorn. Microbiol., 2, 258.
- HOCKENHULL, D.J.D., 1960.- Progr. Industr. Microbiol., 2, 131.
- HOCKENHULL, D.J.D., 1963.- Biochemistry of Industrial Microorganisms (Ed. C. Rainbrow & A.H. Rose) 227-99, Academic Press.
- HOLLIDAY, R., 1956.- Nature Lond., 178, 987.
- HOUWINK, A.L. & VAN ITERSON, W., 1950.- Biochim. Bio--phys. Acta, 5, 10.
- IKEDA, N., & TOMIZAWA, J., 1968.- Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 791.
- INSELBURG, J., 1971.- Bacteriol., 105, 620.

- IPPEN, K.A. & VALENTINE, R.C., 1967.- Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 674.
- ISHII, S.I., NISHIY, & EGAMI, F., 1965.- Molec. Biol. - 13, 428.
- ITOH, S., INUZUKA, K. & SUZUKI, T., 1970.- J. Antibio-- tics., 23(11), 542.
- IVANOVICS, G., 1965.- Zentbl. Bakt. Parasitkde, Abt. -- Orig., 196, 318.
- IVANOVICS, G. & NAGY, E., 1958.- J. Gen. Microbiol., 19, 407.
- JOLLIICK, J.D., 1972.- Microbios, 6, 97.
- KAYSER, A., 1969.- Bull. Inst. Pasteur, 67, 919.
- KOZAK, W., RAJCHERT-TRZPIL, M. & DOBRZANSKI, W.T., 1974.- Journal of General Microbiology, 83, 295.
- KEMPNER, E.S., 1967.- Appl. Microbiol., 15, 1525.
- KLUENER, R.G., 1949.- J. Bacteriol., 57, 101.
- KOEPSSELL, H.J. & TSUCHIYA, M.M., 1952.- J. Bacteriol., 63, 293.
- LAWRON, W.D. & MOLNAR, D.M., 1972.- J. Virol., 9, 708.
- LEDERBERG, L., 1950.- Meth. Med. Res., 3, 5.
- LEDERBERG, E.M., 1951.- Genetics, 36, 560.

- LEDERBERG, E.M. & LEDERBERG, J., 1953.- Genetics, 38,
51.
- LEVINE, M., 1972.- Cun. Top. Microbiol. Immunol., 58,
135.
- LIEB, M., 1970.- J. Virol., 6, 218.
- LIEB, M., 1966.- J. Mol. Biol., 16, 149.
- LIGHTFOOT, H.N. & IGLEWSKY, B.N., 1974.- Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 351.
- LODGE, R.M. & HINSHELWOOD, C.N., 1943.- J. Chem. Soc.,
213.
- LWOFF, A., 1953.- Bacteriol. Rev., 17, 269.
- LWOFF, A., SIMINOVITCH, L. & KJELD GAARD, A., 1950.-
Ann. Inst. Pasteur, 29, 815.
- LYNCH, W.H., McLEOD, J. & FRANKLIN, M., 1975.- Can. J.
Microbiol., 21, 1560.
- LYNCH, W.H., McLEOD, J. & FRANKLIN, M., 1975.- Can. J.
Microbiol., 21, 1553.
- LLUCH, M.C., 1971.- Memoria de Licenciatura. Fac. de Farmacia, (Granada).
- LLUCH, M.C., CALLAO, V. & OLIVARES, J., 1972.- Cuad. C.
Biol., 2, 15.
- LLUCH, M.C., CALLAO, V. & OLIVARES, J., 1973.- Arch. -
Microbiol., 93, 239.

- MARSHALL, J.H. & KELSEY, J.C., 1960.- J. Hyg. Cam., 58, 367.
- MARCOVICH, H. & KAPLAN, M.S., 1963.- Nature, 200, 487.
- MATTICK, A.T.R. & HIRSCH, A., 1944.- Nature London, - 154, 551.
- McDANIEL, L.E., 1951.- U.S. Patent, 2- 538.
- MOEHRING, I.J. & MOEHRING, J.P., 1968.- J. Exp. Med. - 127, 541.
- MURPHY, J.R., PAPPENHEIMER, A.H. Jr. & DE BORMS, S.T., 1974.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 11.
- NOTA DE LA ACADEMIA U.S.A., 1974.- Nature, 250, 175.
- NEELY, W.B., 1960.- Adv. Carboyd. Chem., 15, 341.
- NOMURA, M., 1967.- A. Rev. Microbiol., 21- 257.
- NORMAN, C., 1974.- Nature, 250, 278.
- OKANISHI, M., OHTA, T. & UMEZAWA, H., 1970.- The Journal of Antibiotics, 23, 45.
- OTSUJI, N., SEKIGUCHI, M., IIJIMA, T. & TAKAGI, Y., -- 1959.- Nature, 184, 1079.
- OZAKI, M., HIGASHI, Y., SAITO, H., AN, T. & AMANO, T., 1966.- A. Bikem. J., 9, 201.
- PAPPENHEIMER, A.M. Jr. & JOHNSON, S.J., 1936.- Brit. J. Exp. Pathol., 17, 335.

- PERKIN-ELMER: ANALYTICAL METHODS FOR ATOMIC ABSORPTION-
-SPECTROPHOTOMETRY.
- PERRY, J.T.Jr. & EDWARDS, V.H., 1970.- Appl. Microbiol.
20, 710.
- POPE, C.G., 1932.- Brit. J. Exp. Pathol., 13, 218.
- POWELL, E.O. & ERRINGTON, F.P., 1963.- J. Gen. Micro--
biol., 31, 315.
- REEVES, P., 1965.- Bact. Rev. 29, 24.
- SANDOVAL, H.K., REILLY, H.C. & TANDLER, B., 1965.- Na-
ture London, 205, 522.
- SCOTT, J.R., 1968.- Virology, 36, 564.
- SHIRAHATA, K, DEGUCHI, T., HAYASHI, T., MATSUHARA, I. &
SUZUKI, T., 1970.- J. Antibiotics, 23, 546.
- SIGNER, E.R., 1969.- Nature, 223, 158.
- SIGNER, E.R., 1970.- Virology, 40, 624.
- SINGH, K. & JONHSON, M.J., 1948.- J. Bacteriol., 56, --
339.
- STAINER, R.Y., PALLERONI, N.J. & DUDOROFF, M., 1966.-
J. Gen. Microbiol., 43, 159.
- SYKES, G.A., 1956.- Soc. Microbiol. Special. Report. P. 3.
- UCHIDA, T., GILL, D.M., & PAPPENHEIMER, A.M.Jr., 1971.-
Nature N. Biol., 223, 8.

- UFFEN, R.L. & CANALE-PAROLA, E., 1966.- Can. J. Microbiol., 12, 590.
- UMEZAWA, H., OKAMI, Y., HASHIMOTO, T., SUHARA, Y., HAMA-DA, H. & TAKEUCHI, T., 1965.- J. Antibiotics., 18, 101.
- WALKER, J.R., LANKFORT, L.E. & REEVES, J.B., 1962.- - Bact. Proc., 62.- 37.
- WASKMAN, S.A., 1945.- The Commonwealth Fund. New York.
- WILLIAMS, R.P., GOLDSCHMIDT, M.E. & GOTT, C.T., 1965.- Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 177.
- ZAHNER, H., & MAAS, W.K., 1972.- Springer-Verlag. New York Inc.



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS