

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**Purificación, Caracterización y Actividad Biológica de una
sustancia antibacteriana de amplio espectro producida por
Streptococcus faecalis subsp. *liquefaciens* S-48**

Antonio M. Gálvez Postigo Ruiz

Tesis Doctoral

1987

17/56

BIBLIOTECA	
FACULTAD DE CIENCIAS	
GRANADA	
Estante	17
Tabla	
Núm.	56

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	25741
Nº Copia	25749

PURIFICACION, CARACTERIZACION Y ACTIVIDAD BIOLOGICA
DE UNA SUSTANCIA ANTIBACTERIANA DE AMPLIO ESPECTRO PRODUCIDA
POR *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48

Antonio M. Gálvez del Postigo Ruiz

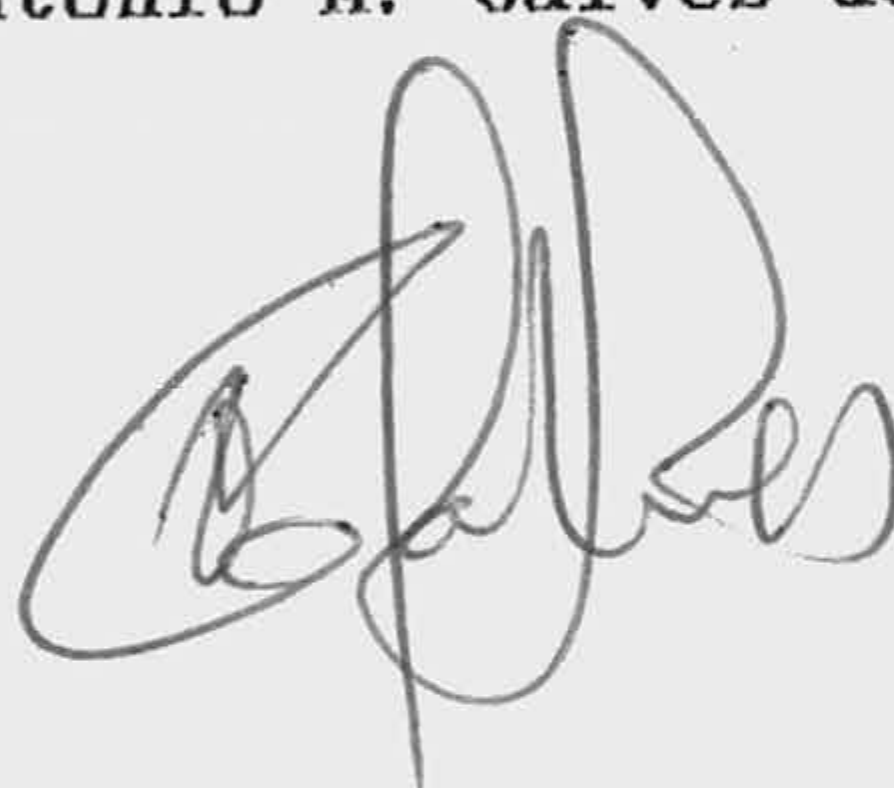
UNIVERSIDAD DE GRANADA

1987

PURIFICACION, CARACTERIZACION Y ACTIVIDAD BIOLOGICA
DE UNA SUSTANCIA ANTIBACTERIANA DE AMPLIO ESPECTRO PRODUCIDA
POR *Streptococcus faecalis* subsp *liquefaciens* S-48

Memoria presentada para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Fdo: Antonio M. Gálvez del Postigo Ruiz



Las Directoras del trabajo



Fdo. Dra. Eva Valdivia Martínez

Dra. Mercedes Maqueda Abreu

Profs. Titulares en Microbiología.

Facultad de Ciencias. Granada

Granada, Julio de 1987

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Granada durante el periodo 1984-1987, habiendo disfrutado a tal fin de una Beca de Formación del Personal Investigador.

Parte de estos resultados fueron presentados en la Reunión Nacional de Biotecnología (León, 1986)

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha **7 MAR. 1989**
SALIDA NUM. 300

Esta Memoria fué defendida ante el Tribunal formado por D. Enrique Montoya Gómez, D. Felipe Moreno Herrero, D. Alberto Vargas Morales, D. Pedro Luis Mateo Alarcón y D. José Olivares Pascual el día 25 de Septiembre de 1987, obteniendo la calificación de Apto "Cum laudem"

Fdo. Antonio M. Gálvez del Postigo Ruiz. Doctor.

Las Directoras del Trabajo


Dra. Mercedes Maqueda Abreu


Dra. Eva Valdivia Martínez



En el momento de acabar el presente trabajo, quisiera expresar mi gratitud a todas aquellas personas que con su ayuda, estímulo y compañía hicieron más grata su realización, y en especial...

A las profesoras y amigas Mercedes y Eva, por su sabia dirección, ayuda incondicional y apoyo en todo momento, así como por su profundo espíritu científico y lúdico.

A todos los profesores del Departamento, por su amistad, interés y colaboración en los momentos necesarios.

A Isabel, la malagueña más salerosa y exquisita, precisamente por eso.

A Alicia, por dejar el país de las maravillas para trabajar con amebas.

A "Pirri", por las historias fantásticas sobre las gambusias vivíparas y los camaleones marinos, así como por su especial habilidad para con los plásmidos-"hula hoop".

Así mismo, a todos/as los compañeros/as del Departamento, por los buenos momentos compartidos.

A los compañeros varios Javier, Pepe, Emilio y Jose Luis, así como a los Profesores Pedro L. Mateo, Alberto Vargas y Guillermo Giménez, por su ayuda y amistad.

Finalmente a mis padres, a pesar del miedo que de pequeño me infundieron a los microbios.

"To error is human,
but it takes a computer to really mess things up"

A Nastassia Kinsky
y a "Flora"

INDICE

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.....	7
INTRODUCCION.....	8
CONSIDERACIONES GENERALES.....	9
ENTEROBACTERIAS.....	13
Microcinas.....	13
Antibióticos.....	16
Colicinas.....	17
GEN. <i>Bacillus</i>	20
GEN. <i>Staphylococcus</i>	23
GEN. <i>Lactobacillus</i>	24
Otros géneros menos representados.....	26
GEN. <i>Streptococcus</i>	27
Grupo A.....	28
Grupo B.....	29
Grupos F y G.....	30
Grupo viridans.....	31
Grupo láctico (N).....	36
Grupo D.....	40
OBJETO DEL TRABAJO.....	48

MATERIAL Y METODOS.....	51
1.- MICROORGANISMOS.....	52
2.- MEDIOS DE CULTIVO.....	52
2.1.- Medios de crecimiento.....	52
2.2.- Medios para regeneración de protoplastos.....	56
2.3.- Medios de producción.....	57
3.- CONDICIONES CULTURALES.....	60
3.1.- Curvas de crecimiento y producción de antibiótico..	60
4.- ENSAYO Y VALORACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	61
4.1.- Ensayo y valoración.....	61
4.2.- Determinación de proteínas.....	62
5.- PURIFICACION.....	63
5.1.- Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de concentración iónica.....	63
5.2.- Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de pH.....	64
5.3.- Cromatografía de exclusión molecular.....	64
5.4.- Cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC)....	65
5.5.- Electroforesis.....	66
5.5.1.- Determinación de la carga neta a pH neutro....	66
5.5.2.- Determinación del punto isoeléctrico.....	66
5.5.3.- Electroforesis en geles de Poliacrilamida.....	67
Procedimiento a.....	67
Procedimiento b.....	68

6.- CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA.....	69
6.1.- Sensibilidad a diferentes valores de pH.....	69
6.2.- Sensibilidad a la temperatura.....	69
6.3.- Análisis térmico diferencial.....	70
6.4.- Tratamientos enzimáticos y sensibilidad a otros compuestos.....	70
6.5.- Espectro de absorción.....	71
6.6.- Composición en aminoácidos.....	71
7.- PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA.....	72
7.1.- Curvas de supervivencia.....	72
7.2.- Acción de diferentes agentes físicos y químicos sobre la actividad bacteriolítica y bactericida de AS-48....	73
7.3.- Adsorción del antibiótico sobre células y fracciones subcelulares.....	74
7.3.1.- Sobre células enteras.....	74
7.3.2.- Adsorción sobre paredes y membranas.....	74
7.4.- Ensayo sobre protoplastos.....	76
7.4.1.- Protoplastos de <i>S. faecalis</i> S-47.....	76
7.4.2.- Protoplastos de <i>E. coli</i> K-12.....	72
7.4.3.- Protoplastos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
7.5.- Incorporación de precursores marcados a macromoléculas.....	78
7.5.1.- Experiencias en <i>S. faecalis</i> S-47.....	78
7.5.2.- Experiencias en <i>E. coli</i> K-12.....	80
7.6.- Efecto del antibiótico AS-48 sobre otros parámetros celulares.....	81
7.6.1.- Medida del consumo celular de O ₂	81
7.6.2.- Medida del contenido celular en Na ⁺ y K ⁺	82
7.7.- Observación de las células tratadas a microscopía electrónica.....	82



RESULTADOS.....	84
1.- ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE EL ANTIBIOTICO AS-48.....	85
1.1.- Titulación de la actividad antibiótica.....	85
1.2.- Medios de producción.....	85
1.3.- Cinética de producción.....	89
2.- PURIFICACION.....	91
2.1.- Condiciones de crecimiento de la bacteria productora.....	91
2.2.- Determinación de la carga neta a pH neutro.....	91
2.3.- Cromatografía de intercambio iónico.....	93
2.4.- Cromatografía de exclusión molecular.....	96
2.5.- Intercambio iónico con gradiente de pH.....	101
2.6.- Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC).....	102
2.7.- Electroforesis.....	104
3.- CARACTERIZACION DEL ANTIBIOTICO AS-48.....	106
3.1.- Composición en aminoácidos.....	106
3.2.- Espectro de absorción.....	108
3.3.- Aproximación al tamaño molecular.....	109
3.3.1.- Mediante cromatografía de exclusión molecular.	109
3.3.2.- Mediante electroforesis.....	111
3.4.- Aproximación al punto isoeléctrico.....	111
3.5.- Sensibilidad a enzimas y otros agentes químicos....	115
3.6.- Sensibilidad al calor y al pH.....	117
3.7.- Calorimetría diferencial de barrido.....	117
4.- ACTIVIDAD BIOLOGICA Y MECANISMO DE ACCION.....	122
4.1.- Espectro heterólogo.....	122
4.2.- Efecto sobre cultivos en medio líquido.....	129
4.3.- Curvas de supervivencia de las estirpes sensibles..	139

4.4.- Cinética de acción.....	144
4.5.- Adsorción sobre células enteras y estructuras subcelulares.....	147
4.6.- Acción sobre protoplastos.....	151
4.7.- Factores que influyen en la lisis de <i>S. faecalis</i> S-47 por AS-48.....	154
4.7.1.- Influencia del medio de cultivo.....	154
4.7.2.- Influencia de la temperatura.....	155
4.7.3.- Influencia de los cationes mono y divalentes..	157
4.7.4.- Influencia de los agentes ionóforos.....	159
4.7.5.- Influencia del inhibidor de ATPasa DCCD.....	161
4.8.- Rescate de las células tratadas con AS-48.....	164
4.8.1.- Rescate mediante proteasas.....	164
4.8.2.- Rescate por SDS.....	168
4.8.3.- Rescate por cardiolipina.....	170
4.9.- Efecto sobre la incorporación de precursores de macromoléculas marcados con elementos radiactivos.....	172
4.9.1.- Experiencias en <i>S. faecalis</i> S-47.....	172
4.9.2.- Experiencias en <i>E. coli</i> K-12.....	175
4.10.- Efecto de AS-48 sobre el consumo de O ₂	178
4.11.- Efecto de AS-48 sobre la permeabilidad de la membrana celular.....	180
4.12.- Observación a microscopía electrónica de las células tratadas.....	182
DISCUSION.....	184
CONCLUSIONES.....	209
BIBLIOGRAFIA.....	212

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

BSA:	Albúmina bovina sérica
DCCD:	N, N'-Diciclohexil-carbodiimida
DTT:	Ditiotreitol
DNP:	2, 4-Dinitrofenol
DO:	Densidad óptica
EDTA:	Acido etiléndiaminotetraacético
HEPES:	Acido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
MES:	Acido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico
PITC:	Fenilisotiocianato
PMSF:	Fenilmetilsulfonilfluoruro
POPOP:	2, 2'-Fenilen-bis(5-feniloxazol)
PPO:	2,-Difeniloxazol
RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
SDS:	Dodecil sulfato sódico
TCA:	Acido tricloroacético
TEMED:	N,N,N',N',Tetrametil etilén diamina
TFA:	Acido trifluoracético
TMPP:	Trimetilfenilfosfonio
Tris:	Tris(hidroximetilaminoetano)

INTRODUCCION

CONSIDERACIONES GENERALES

La aparición del fenómeno de antagonismo inter o intraespecífico en todas sus facetas a lo largo de la evolución de los organismos vivos introduce un fuerte componente vectorial en el marco interactivo de la competencia por la colonización y el mantenimiento de los hábitats posibles.

En este sentido la evolución ha optado por aquellas alternativas utilitaristas que comportan al organismo un mayor peso específico en el delicado equilibrio establecido en la lucha por la supervivencia y la perpetuación.

No es de extrañar, por tanto, que la mayoría de las sustancias capaces de interferir en los procesos vitales del organismo competidor hayan superado las barreras selectivas de la evolución, perdurando de ese modo hasta nuestros días.

Aunque el descubrimiento de formas moleculares naturales con actividad antibiótica aportó al hombre una idea revolucionaria en cuanto a la posibilidad de utilizar una amplia gama de compuestos (orgánicos o inorgánicos) capaces de impedir el crecimiento de uno de sus mayores antagonistas naturales, los microorganismos, y a pesar de que el número de sustancias antibacterianas artificiales supere con creces a aquellas aisladas de la naturaleza, la búsqueda de sustancias naturales con carácter antibiótico sigue teniendo gran

importancia en nuestros días, en lo que podría llamarse un acercamiento "ecológico" a la antibioterapia, bajo la suposición de que muchas de estas sustancias antibacterianas, sobre todo aquellas producidas por microorganismos que forman parte de la flora natural del organismo humano, tendrían un carácter menos tóxico para el mismo.

A lo largo de la historia del descubrimiento de sustancias antagonistas de origen microbiano por el hombre han ido surgiendo términos tales como antibióticos, bacteriocinas, sustancias de tipo bacteriocina y microcinas para designar, en grado creciente de especificidad, a los distintos tipos de sustancias, excluyendo aquellos desechos metabólicos como el agua oxigenada, el amonio y los ácidos orgánicos, que también muestran poder antibacteriano.

Así, por ejemplo, el término "antibiótico" surgió para designar a ciertas sustancias de origen biológico y naturaleza química variada generalmente con un bajo peso molecular, que ejercían un potente efecto antibacteriano sobre una amplia gama de microorganismos.

En su definición original, el término "bacteriocina" (Jacob *et al*, 1953) encuadraba a aquellas proteínas del tipo de las colicinas caracterizadas, principalmente, por su biosíntesis letal, actividad antibacteriana intraespecífica y adsorción a receptores específicos. Como puntos clave para esta definición se tomaron: 1) un espectro de inhibición reducido, limitado exclusivamente a especies homólogas; 2) la presencia de una parte de naturaleza proteica en la molécula esencial para su actividad biológica; 3) un mecanismo de acción de tipo bactericida; 4) unión a receptores específicos; 5) codificación a nivel plasmídico tanto del carácter productor como de la inmunidad por parte de la bacteria productora y 6) producción mediante biosíntesis letal.

Sin embargo, a la hora de aplicar estos criterios a aquellas sustancias producidas por bacterias Gram-positivas se encontraron discrepancias notables, principalmente en lo referente al espectro de acción, más amplio en las bacterias Gram-positivas, y a los fenómenos de inmunidad, no ya tan bien definidos, de forma que hoy día solo los criterios 1 y 3 antes expuestos serían aplicables de modo general. Surge, además, un nuevo problema en el sentido de que muchas de estas sustancias o bien no han sido completamente caracterizadas hasta el punto de determinar si cumplen o no los criterios anteriores, o no encuadran perfectamente en ellos. Es por esto que muchos autores prefieren hablar de "sustancias de tipo bacteriocina" para designar a todo este conjunto de moléculas con actividad antibacteriana no del todo caracterizadas.

Como alternativa, Konisky (1982) propone el uso del término bacteriocina para designar a todas aquellas "proteínas o complejos de proteína con actividad antibacteriana, no activas frente a la estirpe productora", definición que permite un cierto margen de solapamiento entre las bacteriocinas propiamente dichas y ciertas sustancias de naturaleza proteica caracterizadas por algunos autores como antibióticos peptídicos.

En esta línea vuelve a surgir un nuevo término, el de "microcina" (Asensio y Pérez-Díaz, 1976) para designar a aquellas sustancias de carácter antibiótico producidas por Enterobacterias; estas sustancias se caracterizarían por su naturaleza proteica, bajo peso molecular (serían formas dializables) y su espectro de acción reducido a Enterobacterias. Dichas sustancias se diferenciarían de las verdaderas bacteriocinas en que no son inducibles por el tratamiento con agentes que dañan el ADN bacteriano, y tendrían en común el que tanto el carácter productor como la inmunidad irían codificados por plásmidos. Además, serían capaces de ejercer su acción antibiótica bajo condiciones que no permiten ni la producción

ni la actividad de la mayoría de las colicinas descritas (de Lorenzo y Aguilar, 1984).

La mayoría de los 5000 antibióticos conocidos actualmente, de los cuales menos de 100 presentan utilidad terapéutica, son producidos por hongos filamentosos (*Penicillium*, *Aspergillus* y *Cephalosporium*) y actinomicetes, principalmente *Streptomyces*. Entre las eubacterias, el único género hasta ahora considerado importante en la producción de antibióticos es el género *Bacillus*. Si bien hongos y actinomicetes son los principales productores de antibióticos, también es cierto que, dado que los primeros antibióticos importantes descubiertos fueron la penicilina y la estreptomicina, la búsqueda de nuevos compuestos se ha centrado principalmente en este grupo.

En los últimos años, se ha descubierto un número importante de antibióticos en bacterias Gram-negativas, y quizá inferior en bacterias Gram-positivas. Aparte del interés intrínseco que supone en sí el descubrimiento de nuevos antibióticos, ello proporciona nueva información sobre la distribución de su producción entre los microorganismos y sobre su función en ecosistemas microbianos particulares. Esta función ha sido ampliamente debatida en base al carácter de metabolitos secundarios asignado a muchos de estos antibióticos por una parte, y por otra, a que dicha producción sólo había sido establecida en grupos muy reducidos y concretos de microorganismos. No obstante, si la producción de antibióticos está, como parece, generalmente extendida, su función como factores de competencia en la adaptación y colonización de los ecosistemas varios debería ser reconsiderada.

Dicha función ha sido puesta de manifiesto en Enterobacterias. Sin embargo, el estudio de la producción de antibióticos en microorganismos que forman parte de otros ecosistemas no tan bien

definidos como el tracto intestinal humano, supone unas dificultades técnicas mayores, de aquí posiblemente que no haya sido abordado de forma sistemática. Además, muchas de estas sustancias no se producen en medio líquido, lo que dificulta notablemente su caracterización.

No obstante, la literatura recoge ejemplos suficientes sobre la producción de sustancias de tipo antibiótico y otras sustancias que estarían a caballo entre bacteriocinas y antibióticos, que harían extensibles los puntos anteriores en cuanto a la generalidad en la producción de sustancias antibióticas y su papel en los ecosistemas naturales.

ENTEROBACTERIAS

Microcinas.-

Una de las investigaciones más extensas llevadas a cabo sobre este tipo de sustancias se centró en el grupo de Enterobacterias como aproximación al estudio de las interacciones entre las diversas comunidades de microorganismos en el tracto intestinal humano, tomando como tema prioritario la producción de microcinas y sustancias relacionadas.

En este grupo, el mayor número de microcinas ha sido descrito en *E.coli* (82%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (12%) y *Proteus mirabilis* (3%) (Baquero y Asensio, 1979). Como norma, dichas sustancias serían activas frente a *Proteus*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*; ciertas bacterias Gram-positivas (*Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus*) serían en general susceptibles, aunque requerirían una concentración mínima inhibitoria mayor.

INTRODUCCION

De entre las microcinas producidas por Enterobacterias cabe destacar la Microcina 15m, con un peso molecular de 240, que aparentemente sería un análogo de la metionina, ya que su acción bactericida es contrarrestada por la presencia de este aminoácido o por los precursores de su biosíntesis. Este antibiótico actúa inhibiendo la homoserina-O-transsuccinasa, un enzima clave en la regulación del metabolismo en *E.coli* (Aguilar *et al*, 1982). La Microcina A509, pequeño péptido de 500-1.000 de tamaño molecular, sería un antimetabolito de la β -alanina (Candela, 1980).

La Microcina D140 es un péptido con un peso molecular inferior a 1000, cuya acción bactericida se asemeja a la de la Colicina E1, puesto que disipa el gradiente electroquímico de protones y elimina el ATP endógeno (Duro *et al*, 1979). Así mismo, la Microcina 15n, de tamaño molecular próximo a 500, también tiene una estructura peptídica y actúa sobre el sistema generador de energía (Aguilar *et al*, 1983).

La Microcina B17 es un péptido con un peso molecular próximo a 4.000, y actúa sobre la síntesis de ADN (Herrero *et al*, 1986). Esta microcina tiene un tamaño molecular similar al de la Colicina V (4.000); de hecho, se propone que la Colicina V, junto con la Microcina B17 y otras microcinas de mayor tamaño como la Microcina E492, pudieran formar un grupo de inhibidores bacterianos de tamaño medio que unirían a las microcinas con las verdaderas colicinas, ya que sus propiedades serían en cierto modo intermedias entre ambos tipos de moléculas.

La microcina E492 sería un péptido básico de naturaleza hidrófoba, con un peso molecular próximo a 5.000, resistente al calor y al pH ácido, producida por *Klebsiella pneumoniae* (de Lorenzo *et al*, 1984). Esta sustancia sería activa principalmente frente a bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*,

Citrobacter, *Enterobacter* o *Erwinia*, bacterias todas ellas que compiten por la ocupación del mismo nicho ecológico, pero no frente a *Shigella*, *Proteus*, *Serratia* o *Pseudomonas*. Esta sustancia actuaría disipando el gradiente de protones.

Otra de ellas, la microcina D93, es un péptido básico hidrófilo, con un peso molecular cercano a 500, que presenta actividad antibacteriana frente a *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P.maltophilia* y *E.coli*. Esta microcina actúa sobre el metabolismo del ADN bacteriano (Martínez, 1985).

La microcina C7 sería un heptapéptido de peso molecular próximo a 1.000, producido por ciertas estirpes de *E.coli* portadoras del plásmido pRYC7, el cual además codifica la resistencia a dicho antibacteriano (García-Bustos *et al*, 1984). Esta sustancia actuaría inhibiendo la síntesis proteica (García-Bustos *et al*, 1985).

En lo referente a su papel ecológico, existen ciertas pruebas sobre la colonización del tracto intestinal de recién nacidos por razas de *E.coli* microcinogénicas que desplazarían a las no productoras inicialmente implantadas. Así mismo se ha demostrado la producción de estas sustancias en medios mínimos, y se ha llegado a detectar su presencia en heces de las que posteriormente fueron aisladas bacterias productoras (Baquero y Asensio, 1979).

Aparte ya de las microcinas, se conocen otras sustancias de características similares producidas por bacterias entéricas, tales como la tifimuricina, producida por *Salmonella typhimurium* LT2, con un peso molecular inferior a 500, y cuya actividad antibiótica es también antagonizada por metionina, al igual que la Microcina M (Ben-Gurion y Flashner, 1982).

Así mismo se han descrito sustancias con propiedades intermedias, como el inhibidor gonocócico producido por varias estirpes de *E.coli*, con un peso molecular comprendido entre 1.200 y 2.000 (Simpson y Davis, 1979). Esta sustancia ejerce una acción bacteriolítica frente a diversas estirpes de *Neisseria gonorrhoeae*, y es estable al calor así como a cambios de pH, a los enzimas proteolíticos, y a la lisozima, lipasa, DNAasa y RNAasa.

Otras son potentes mutágenos, como las producidas por especies de *Bacteroides*, cuya posible implicación en la aparición de cáncer de colon ha sido discutida (van Tassel *et al*, 1982), así como la bacteriocina producida por *Bacteroides uniformis* (Austin-Prather y Booth, 1984); esta sería una sustancia de naturaleza peptídica con un tamaño comprendido entre 5.000 y 6.200, a la que también se ha atribuido un significado ecológico en la flora intestinal del colon, en donde esta bacteria es especialmente abundante (Booth *et al*, 1977).

También cabría citar a las sustancias de naturaleza similar a la anterior descritas en *B. fragilis* (Mossie *et al*, 1979; Hayes *et al*, 1983). Esta última sería un complejo de proteína, lípidos y carbohidratos, con un peso molecular próximo a 5.000. Su espectro de acción sería bastante reducido.

Antibióticos.-

Otro tipo de sustancias antibacterianas descritas tanto en Enterobacterias como en otras bacterias Gram-negativas son los antibióticos β -lactámicos, con estructuras moleculares muy distintas de las clásicas producidas por hongos. Entre estos cabe destacar a los Monobactámicos, Carbapenemos, Cefalosporinas y β -Lactonas.



Los Monobactámicos son antibióticos β -lactámicos monocíclicos producidos por razas Gram-negativas aisladas de diversos ambientes, principalmente de suelos. Estos antibióticos presentan la notable característica de ser resistentes a las β -lactamasas. El antibiótico SP26.189, producido por *Chromobacterium violaceus* fue uno de los primeros aislados, y presenta un espectro de acción no muy amplio. Sin embargo, otros monobactámicos como el SQ46.4454, fueron aislados posteriormente a partir de *Gluconobacter*, *Acetobacter* y *Pseudomonas*, resultando ser muy activos frente a bacterias Gram-negativas.

Los Carbapenemos son antibióticos β -lactámicos bicíclicos, inicialmente aislados a partir de *Streptomyces*, pero que recientemente han sido descritos en especies de *Serratia* y *Erwinia*, y presentan un amplio espectro de acción, tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas.

También se han encontrado algunas β -Lactonas en las bacterias; estos antibióticos tienen un anillo monocíclico en el cual el oxígeno sustituye al nitrógeno de los β -lactámicos. Estos antibióticos han sido aislados a partir de ciertas especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y algunos corineformes.

Finalmente, las cefalosporinas fueron aisladas en *Flavobacterium* y *Xanthomonas* procedentes de muestras de suelo.

Colicinas.-

Existe así mismo una extensa bibliografía sobre la producción de bacteriocinas en Enterobacterias, incluyendo al grupo principal, las colicinas (Nomura, 1967). En este grupo se han llevado a cabo quizá los estudios más extensos en cuanto a caracterización y mecanismo

INTRODUCCION

de acción (Holland, 1975). Se trata en general de sustancias proteicas de gran tamaño (desde 27.000 hasta 90.000) con un espectro de acción muy restringido, afectando solo a estirpes relacionadas. Otros caracteres incluyen la codificación por plásmidos; la regulación de su síntesis está ligada al sistema SOS, lo que hace que sean inducibles por tratamientos que dañan el ADN bacteriano.

En su mecanismo de acción se distinguen claramente dos etapas: la primera de ellas consiste en la adsorción a receptores de la superficie celular específicos; en este estado, las moléculas de colicina son detectables mediante anticuerpos específicos y son susceptibles a la tripsina.

La segunda etapa se caracteriza porque ya no se pueden poner de manifiesto mediante anticuerpos ni son sensibles a la tripsina. El paso a esta segunda etapa requiere energía metabólica, proporcionada por el potencial de la membrana citoplásmica (Pugsley, 1984a). Su acción letal sigue una cinética de impacto único, en el sentido de que una sola molécula es en teoría suficiente para matar a una célula sensible, si bien no todas las interacciones colicina-receptor conducen a la muerte celular (Kadner *et al*, 1979).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el mecanismo de entrada. Como decíamos antes, no todas las interacciones colicina-receptor son fructíferas; algunas de ellas pueden quedar unidas al receptor sin ser capaces de atravesar las envueltas celulares, mientras que otras pueden ser degradadas por proteasas de la superficie celular durante su unión al receptor o antes. La internalización podría ocurrir por: elongación y/o difusión a través de los poros de la membrana externa; formación de un asa o gancho en los dominios hidrofóbicos que serviría de anclaje en una de las dos membranas; fusión de las membranas externa e interna mediada

por el receptor y/o fosfolípidos y lipopolisacárido; expansión de las membranas y espacio periplásmico con formación de canales; un último mecanismo sería la entrada de fragmentos producidos mediante proteólisis específica. Ninguno de estos posibles mecanismos sería excluyente.

La siguiente etapa consistiría en el efecto biológico conducente a la muerte celular. Se han descrito hasta seis mecanismos de acción distintos para las diversas colicinas (Pugsley, 1984b). La mayoría de las colicinas (Ia, Ib, A, E1, K, V) actuarían formando poros en la membrana citoplásmica, permitiendo de este modo la libre difusión de iones y compuestos de bajo peso molecular a través de la misma. Estas colicinas son de un interés especial para el estudio de las membranas, ya que son unas de las pocas proteínas transmembrana solubles en agua, y son capaces de insertarse en vesículas membranosas construidas artificialmente con fosfolípidos de diversa procedencia, permitiendo estudios *in vitro* sobre medidas de conductividad, potenciales de membrana, gradientes de pH y sistemas de transporte. Un hecho notable en este sentido es que los péptidos C-terminales obtenidos mediante proteólisis específica de estas moléculas presentan una actividad similar.

Otros mecanismos de acción serían los mostrados por aquellas colicinas con una actividad nucleásica, capaces de degradar al ADN ó al ARN bacteriano, tales como las colicinas E2, E3 o E7 esta última con actividad RNAasa (Boon, 1971). Dentro de este grupo se incluiría a la colicina X (más tarde denominada microcina 17), capaz de inhibir la replicación cromosómica, pero carente de actividad nucleásica (Pugsley, 1984a).

Otra forma de acción sería mediante inhibición de la síntesis de proteínas, como la cloacina Df13, que actuaría a nivel ribosómico (DeGraaf et al, 1973).

Finalmente cabría destacar a la colicina M, cuyo blanco es un enzima específico implicado en la síntesis de peptidoglicano, componente esencial de la estructura de las envueltas de las bacterias Gram-negativas (Schaller y VanBrunt, 1982).

Acerca del papel ecológico de las colicinas en el tracto intestinal no se han obtenido resultados concluyentes, ya que como apuntan ciertos autores, el tracto intestinal, por sus condiciones microaerófilas o anaerobias, no permitiría una expresión eficiente de los genes regulados por el sistema SOS, incluida la producción de colicinas; por otra parte, y en caso de que se llegasen a producir, serían fácilmente degradadas por las proteasas intestinales.

Las potenciales ventajas selectivas de la producción de colicinas podría expresarse solo cuando dichas bacterias se encontrasen fuera del tracto intestinal, como en las heces, donde su producción aseguraría el predominio numérico de las estirpes colicinogénicas en la competencia por la transmisión fecal-oral (Pugsley, 1984b). Una idea alternativa contempla el mantenimiento de los plásmidos colicinogénicos como posibilidad de supervivencia, en el sentido de que las estirpes portadoras serían inmunes a ese tipo de colicina, mientras que las no portadoras quedarían expuestas.

GEN. *Bacillus*.—

Los primeros descubrimientos sobre producción de antibióticos en eubacterias se realizaron en especies pertenecientes al género *Bacillus*. Entre ellos cabe destacar el denominado circulina, producido por *Bacillus circulans* (Murray *et al*, 1949), la biocerina, producida por *B.cereus* (Johnson *et al*, 1949), así como la polimixina,

en *B.polimyxa*, y otros descritos en *B.laterosporus* (Stamatin, 1969), *B.pumilus* (Fuller, 1955), así como los péptidos tirocidina y gramicidina D (*B. brevis*) y la subtilina, péptido pentacíclico producido por *B.subtilis* (Gross, 1977). De entre todas ellas, la mejor caracterizada ha sido la polimixina B, antibiótico peptídico de bajo peso molecular, producido por estirpes de *B.polymyxa* (Storm et al, 1977).

Estos antibióticos forman un conjunto de péptidos cíclicos policatiónicos, conteniendo un alto porcentaje de ácido diaminobutírico con un ácido graso unido mediante un enlace amida. El carácter anfipático de estos péptidos sugiere una acción desorganizadora a nivel de membrana análoga a la de los detergentes catiónicos, si bien presentan actividad biológica a concentraciones mucho más bajas.

Todos ellos son antibióticos de amplio espectro, afectando a bacterias Gram-positivas y Gram-negativa, levaduras y protozoos, ejerciendo un efecto biostático a baja concentración y biocida a concentraciones superiores. Las variaciones en los ácidos grasos presentes en las polimixinas análogas ha sido relacionada con el espectro de acción de las mismas.

Su actividad biológica se ejerce a nivel de membrana, alterando la permeabilidad selectiva de la misma, ocasionando la pérdida de material con absorción a 260 nm. Como consecuencia, se producen alteraciones en los sistemas de transporte, respiración, niveles de ATP y síntesis de macromoléculas. Estas alteraciones en muchos casos llegan a inducir la autólisis celular.

Su interacción con las células sensibles ocurriría según el siguiente esquema (Salton, 1968):

Adsorción y penetración en la pared celular

Interacción con complejos lípido-proteína implicando interacciones con porciones hidrófobas de proteínas y lípidos orientados, dando lugar a la desorganización de la membrana

Salida de la célula de compuestos de bajo peso molecular

Degradación de proteínas y ácidos nucleicos

Lisis por acción de los enzimas que degradan la pared celular

Aparte de su utilidad terapéutica, estos antibióticos peptídicos que actúan a nivel de membrana han sido utilizados como herramientas útiles para el estudio de la estructura y función de las membranas biológicas. Además, muchos de ellos presentan una fuerte afinidad por los lípidos de membrana.

Las primeras indicaciones de este tipo de asociación se basaron en la inhibición de la actividad antibiótica de la polimixina mediante adición de fosfolípidos de soja. Más tarde, Few (1955) demostró que la actividad de la polimixina E frente a *Pseudomonas denitrificans* era inhibida por los fosfolípidos bacterianos, siendo la cardiolipina el más efectivo. Así mismo, el ácido fosfatídico y el fosfatidil glicerol forman complejos con la polimixina (Teuber, 1973). Esta fuerte afinidad por los lípidos de membrana hace que muchas de ellas puedan ser utilizadas como sistemas modelo para el estudio de las interacciones péptido-lípido.

En otras especies de *Bacillus* se han descrito también diversas sustancias de tipo bacteriocina, como las termocinas, producidas por *B.stearothermophilus* (Shafia, 1966) y otras. Así mismo se ha descrito la producción de verdaderas bacteriocinas, que cumplen con los criterios clásicos de su definición; son las denominadas megacinas, habiéndose detectado varios tipos de ellas, como la megacina A, B, C y Cx-337 (Donoughe, 1972).

GEN. *Staphylococcus*.-

Los estafilococos producen varios tipos de sustancias antibacterianas que difieren en su naturaleza química y modo de acción. Aparte de los enzimas líticos como la lisostafina y la lisozima, existen otros dos grandes grupos de sustancias, las bacteriocinas (estafilococinas) y los inhibidores de bajo peso molecular de tipo antibiótico, algunos de ellos similares a las microcinas (Pulverer y Jeljaszewicz, 1976).

En contraposición a las colicinas y piocinas, solo unas cuantas estafilococinas han sido purificadas y estudiadas en detalle, como la estafilococina 414 (Gagliano y Hinsdill, 1970), la estafilococina 462 (Hale y Hinsdill, 1973, 1975), con un peso molecular de 9.000, la estafilococina A (Lachowicz y Walczak, 1968) y la bacteriocina BacR₁ (Rogolsky y Wiley, 1977). No obstante, el mayor trabajo se ha desarrollado en el campo de la estafilococina 1580, producida por diversas estirpes de *Staphylococcus epidermidis* (Jetten y Vogels, 1972a). Esta sustancia actúa sobre el metabolismo energético despolarizando la membrana citoplásmica (Jetten y Vogels, 1972b; Weerkamp et al, 1977, 1978).

Otra de las sustancias descritas sería la estafilococina C55, producida por una estirpe de *Staphylococcus aureus* (Dajani et al, 1970, Dajani y Wannamaker, 1973a y b). Las estafilococinas son normalmente complejos moleculares de gran tamaño (100.000-500.000) que pueden ser disociados en subunidades menores, y presentan un amplio espectro de acción, aunque solo frente a bacterias Gram-positivas. Esta propiedad la comparten otras bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas (Tagg et al, 1976) .

Las epidermidinas (A₁, A₂, B₁ y B₂) son péptidos cíclicos de 11 aminoácidos con pesos moleculares comprendidos entre 1.200 y 1.400,

activos frente a bacterias Gram-positivas incluídas algunas mycobacterias (Hsu y Wiseman, 1971, 1972). Así mismo cabría destacar el inhibidor gonocócico producido por una estirpe de *Staphylococcus coagulasa* (-) aislada a partir de la flora urogenital; esta sustancia sería un péptido de 1.400 (Beaudet *et al*, 1982).

Una de las sustancias antibióticas mejor caracterizadas dentro de este género ha sido el péptido de tipo estafilococina denominado Pep-5 (Sahl y Brandis, 1982); tras su repurificación mediante RP-HPLC se ha visto que en realidad se trata de una mezcla de péptidos muy relacionados (Sahl *et al*, 1985). El principal componente activo tiene un peso molecular próximo a 3.500, y un pI de 10.5. Esta sustancia antibiótica actúa rompiendo el potencial de membrana de las células bacterianas (Sahl, 1985a), produciendo además una rápida salida de compuestos de bajo peso molecular como iones K⁺, aminoácidos y ATP, lo que trae como consecuencia el cese inmediato de la síntesis de proteínas, ADN, ARN y polisacáridos (Sahl y Brandis, 1983); su mecanismo de acción sería por tanto similar al de las colicinas E₁, I_a, I_b, A (Konisky, 1982) y V (Yang y Konisky, 1984).

GEN. *Lactobacillus*.—

Desde que Metchnikoff (1908) propuso el papel que podrían desempeñar las especies de *Lactobacillus* en el control de la microflora intestinal, numerosos investigadores han estudiado la producción de sustancias antimicrobianas en especies de este género. En la mayoría de los casos se ha demostrado la existencia de una inhibición de amplio espectro debida a la producción de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno en *L.acidophilus* (Gilliland y Speck, 1977).

Por otra parte, Vincent *et al* (1959) fue el primero en describir la producción de un inhibidor de tipo bacteriocina en *L.acidophilus*, sustancia a la que llamó "lactocidina". Se trataba de una sustancia no volátil, no dializable, insensible a la catalasa y activa a pH neutro frente a numerosos géneros bacterianos, incluyendo especies de *Proteus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Debido al amplio espectro mostrado por esta sustancia, dicho autor concluyó que *L.acidophilus* desempeña un papel importante en el control de la microflora del tracto intestinal humano y de animales.

Entre las sustancias antibacterianas producidas por especies de este género se incluyen bacteriocinas propiamente dichas, como las descritas por Upreti y Hinsdill (1973, 1975), la lactocina 27, que actuaría a nivel de membrana, y la Lactacina B (Barefoot y Klaemhammer, 1984); esta última tendría un tamaño comprendido entre 6.000 y 6.500, por lo que también encuadraría dentro del grupo de sustancias antibacterianas de naturaleza peptídica y bajo peso molecular. Esta sustancia presenta sin embargo un espectro de acción muy restringido, ejerciendo un efecto de tipo bactericida frente a diversas especies de *Lactobacillus*.

No ocurre igual con otras sustancias de tipo bacteriocina producidas por especies de este género, como las descritas por McCormick y Savage (1983), con un espectro de acción más amplio, inhibiendo a diversas estirpes de *Clostridium*, o aquellas descritas por Morin *et al* (1980), activas frente a *Neisseria*, o las descritas por Mehta *et al* (1983), con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-negativas. Actualmente hay un creciente interés en el estudio de los mecanismos de antagonismo dentro de este grupo de organismos homofermentadores.

Otros géneros menos representados.-

En el género *Rhizobium*, en aquellas especies de crecimiento rápido, se ha descrito con frecuencia la producción de "bacteriocinas" de bajo peso molecular, como la denominada "small", con un tamaño entre 700 y 1.500 (Van Brussell *et al.*, 1985). Esta sustancia inhibe la división celular, aunque no parece tener ningún papel en la formación de nódulos.

La producción de bacteriocinas y sustancias de tipo bacteriocina por especies pertenecientes al género *Clostridium* también ha sido estudiada; es ya un hecho que las diversas especies de *Clostridium* producen un gran número de bacteriocinas, distinguibles por sus características fisicoquímicas así como por su espectro de acción (Sasarman y Antohi, 1963). De entre ellas citaremos a la boticina E-S5, una sustancia antibacteriana dializable producida por estirpes no toxicogénicas de *C.botulinum* (Kautter *et al.*, 1966).

Uno de los primeros autores en describir la producción de sustancias antagonistas por estirpes de *Corynebacterium* fue Thibaut (1949). Este autor confirmó la producción de diversos tipos de antibióticos por varias estirpes de *C. diptheriae* tipo gravis, en base a su espectro de acción (Thibaut y Fredericq, 1956), llegando a establecer un esquema de tipado en base a la sensibilidad a tres razas productoras de antibióticos. Aunque con posterioridad se ha descrito la producción de algunas bacteriocinas en este género, no se ha llegado en ningún caso a un aislamiento y caracterización a fondo.

Dentro del género *Micrococcus* son aún más escasas las referencias sobre producción de bacteriocinas y sustancias relacionadas, a excepción del antibiótico denominado micrococcina, producido por *Micrococcus* spp. NTCC7218 (Florey *et al*, 1949; Su, 1949)); esta sustancia es un péptido de peso molecular 2.000 (Heatley y Doery, 1951) activo principalmente frente a bacterias Gram-positivas, que actúa bloqueando la unión de los aminoacil-t-RNA al sitio A ribosómico (Cundliffe y Dixon, 1975).

Otros inhibidores difusibles poco caracterizados han sido igualmente descritos en especies de *Mycobacterium tuberculosis* (Adámek *et al*, 1968). Se trata de sustancias sensibles a agentes que desnaturalizan proteínas.

GEN. *Streptococcus*.—

Existe una extensa bibliografía sobre la producción de bacteriocinas por especies del género *Streptococcus*, pertenecientes a casi todos los grupos serológicos de Lancefield (Tagg *et al*, 1976); todos estos datos indican que la producción de bacteriocinas es una propiedad bastante extendida dentro de dicho género, aún cuando hasta el momento han sido pocas las caracterizadas, debido principalmente a las dificultades encontradas para su aislamiento y purificación a partir de medios líquidos. De entre todas ellas, haremos referencia solo a las que muestran una mayor relevancia en el marco de nuestro estudio, basándonos en criterios de tamaño molecular y espectro de acción principalmente.

Grupo A.-

Los primeros estudios dentro de este grupo fueron llevados a cabo por Sherwood *et al* (1949), quienes descubrieron la producción de un tipo de sustancias antibacterianas a las que denominaron estreptostasinas, sin llegar al aislamiento y caracterización del agente causante de la inhibición.

En 1971, Tagg *et al* descubrieron una sustancia a la que denominaron estreptocina A, producida por *S.pyogenes* F-22, con un peso molecular de 8.000, que ejercía una acción bactericida frente a bacterias Gram-positivas, mediante inhibición de la síntesis de ADN y proteínas, así como de la entrada de glucosa en la célula.

Las sustancias antibacterianas de menor tamaño molecular descritas en este grupo son aquellas aisladas por Wolf y Duncan (1974) a partir de estreptococos β -hemolíticos aislados de pacientes con glomerulonefritis. Estos autores describen tres tipos de sustancias, todas ellas muy similares, denominadas DS-1912-65, S23g y S716, con un peso molecular cercano a 200, resistentes a los enzimas proteolíticos, nucleasas, lipasas, y agentes oxidantes y reductores, así como a valores de pH entre 2 y 12, aunque sensibles al calor (60°C).

Estas sustancias mostraban una acción de tipo bactericida, con un número aproximado de dos blancos por célula, frente a un amplio espectro bacteriano, incluyendo especies Gram-positivas y Gram-negativas: *Streptococcus pyogenes*, *S.faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*.

Otra de las sustancias antibacterianas de amplio espectro dentro del grupo A es la descrita por Hynes y Tagg (1985); estos autores, en un estudio de bacteriocinotipado, encontraron que el 10% de las estirpes ensayadas producían una sustancia inhibidora del tipo P-777, con un amplio rango de inhibición frente a bacterias Gram-positivas, incluyendo la propia raza productora: *Actinomyces* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Dermatophilus* sp., *Erysipelothrix* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Listeria* sp., *Micrococcus* sp., *Streptococcus* del grupo A, B, C, D, F, E, G, L, M, P, R, S, T, *S.lactis*, *S.mutans*, *S.pneumoniae*, *S.salivarius*, *S.sanguis* y *Streptomyces* sp. La única bacteria Gram-negativa sensible fue *Bacteroides intermedius* ATCC 25611.

Grupo B.-

Dentro de este grupo, han sido poco frecuentes los estudios llevados a cabo sobre producción de este tipo de sustancias. Caben destacar los efectuados por Kramer y Brandis (1972), quienes al analizar 121 estirpes de este grupo de origen humano, encontraron que solo 8 de ellas presentaban efectos antagónicos sobre el crecimiento de las demás, y de ellas solo tres eran capaces de producir dichos inhibidores en medio líquido.

La única sustancia caracterizada por estos autores fue la producida por la estirpe *Streptococcus agalactiae* 73; esta sustancia presentaba un tamaño molecular próximo a 10.000, y era sensible a la tripsina, pepsina, así como al calentamiento a 80°C durante 20 min.

En estudios posteriores, Tagg *et al* (1975) analizaron 135 cepas pertenecientes a este grupo, y encontraron solo dos de ellas que producían alguna bacteriocina; ambas sustancias presentaban el mismo

INTRODUCCION

espectro de acción, por lo que dichos autores llegaron a la conclusión de que se trataba de un mismo tipo de sustancia, a la que denominaron estreptocina B₁.

Esta sustancia se presentaba bajo dos formas moleculares, una de ellas con un tamaño cercano a 10.000, y la otra en forma de agregado próximo a los 200.000; ambas formas eran interconvertibles según la fuerza iónica del medio, y eran sensibles al tratamiento con tripsina, pronasa, así como al calentamiento a 100°C durante 15 min. Esta sustancia presentaba una acción de tipo bactericida frente a bacterias Gram-positivas, como estreptococos pertenecientes a los grupos A, B, C, D, F y G, *Streptococcus salivarius*, *S.pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *S.aureus* y *Micrococcus luteus*, pero no frente a bacterias Gram-negativas.

Grupos F y G.-

Según el estudio llevado a cabo por Wong et al (1979), las estirpes T-29 y W2580 pertenecientes a los grupos F y G respectivamente, son productoras de sustancias antibacterianas (SF29 y SG2580) activas frente al 97 y el 96% de un conjunto de 350 estirpes de estreptococos pertenecientes al grupo A. Estas sustancias fueron purificadas a partir de cultivos obtenidos en agar-sangre, mediante congelación y posterior descongelación. SF-29 tendría un peso molecular cercano a 25.000, siendo sensible al tratamiento con tripsina y al calor (60°C durante 30 min.)

La sustancia denominada SG2580 tiene un peso molecular de 18.000, y es sensible a la tripsina y a la α -amilasa, así como al calentamiento a 60°C durante 30 min. Ambas sustancias tienen efecto bactericida frente a estreptococos del grupo A.

Grupo viridans.-

Streptococcus mutans.- En el estudio inicial realizado por Kelstrup y Gibbons (1969) sobre la producción de bacteriocinas por 13 cepas cariogénicas y no cariogénicas procedentes de humanos y roedores, se encontraron seis estirpes bacteriocinogénicas. Las bacteriocinas producidas por estas estirpes eran todas ellas sensibles al calor (80°C durante 45 min.), y cuatro de ellas se inactivaban por tripsina. Debido a su sensibilidad a los enzimas proteolíticos, podrían ser destruidas por el material de las placas dentales, así como por la saliva y los jugos intestinales, por lo que su significado ecológico sería discutible.

Otros autores (Hamada y Ooshima, 1975) analizaron 130 estirpes de *Streptococcus mutans* de origen clínico, de las cuales el 74% producían algún tipo de sustancia inhibidora activa frente a alguna de las bacterias indicadoras utilizadas (*S.mutans*, *S.salivarius*, *S.sanguis* y *S.pyogenes*), aunque ninguna era activa frente a bacterias Gram-negativas. Estos autores propusieron el nombre de "mutacinas" para dichas sustancias.

Estudios posteriores (Rogers, 1976) parecen indicar que muchas razas de *S.mutans* producen más de un tipo de bacteriocinas, unas de bajo peso molecular, y otras de mayor tamaño.

Como caso extremo de "bacteriocinas" de pequeño tamaño, cabe citar a la descrita por Ikeda et al (1982), denominada bacteriocina C3603, producida por *S.mutans* C3603, serotipo C, la cual es una proteína básica con un peso molecular de 4.800 y un pI de 10. El microorganismo fue aislado a partir de placas dentales; la producción se llevó a cabo en medio líquido. Esta sustancia antibacteriana es estable en un rango de pH entre 1 y 12, resiste el

tratamiento con calor (100°C durante 10 min.), y es resistente al tratamiento con pronasa, papaína, fosforilasa C, tripsina y α -amilasa, y parcialmente sensible al tratamiento con pancreatina y α -quimotripsina. En su composición en aminoácidos destaca la presencia de Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Tyr, Phe, Trp, Lys y Arg.

Esta sustancia antibacteriana presenta una acción de tipo bactericida frente a microorganismos Gram-positivos tales como *Streptococcus sanguis*, *S.salivarius*, *S.bovis*, *S.faecium*, *S.lactis*, *Lactobacillus casei*, *L.plantarum*, *L.fermentum*, *Bifidobacterium bifidus*, *Propionibacterium acnes* y *Bacteroides melaninogenicus*, pero es inactiva frente a bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Los experimentos llevados a cabo en ratas gnotobióticas libres de patógenos específicos e infectadas con la estirpe sensible *S.mutans* PS-14, demostraron una reducción notable en la formación de caries tras el suministro de bacteriocina C3603 en el agua o en la dieta animal (Ikeda *et al.*, 1985).

Dentro de este grupo de sustancias de pequeño tamaño se incluiría también la mutacina b, producida por una estirpe de *S.mutans* serotipo b. Esta es una sustancia antibacteriana de bajo peso molecular, comprendido entre 3.500 y 6.000, con una notable resistencia a la temperatura, al álcali y a diversos disolventes. Su naturaleza peptídica ha sido demostrada mediante tratamiento con tripsina y otras proteasas (Delisle, 1986). Su acción es bactericida frente a cierto número de estreptococos de la cavidad oral (Delisle, 1976). Otras sustancias de características similares han sido descritas en *S.mutans* serotipo c (Hillman *et al.*, 1984).

INTRODUCCION

Una de las bacteriocinas de mayor tamaño y espectro de acción relativamente amplio descritas en este grupo ha sido la mutacina Rm-10, producida por *S.mutans* Rm-10. Esta sustancia fue obtenida a partir de los sobrenadantes de cultivos en medio líquido y purificada a homogeneidad (Fukushima *et al*, 1978). La fracción pura consta de una estructura proteica con un tamaño de 973.000, rica en Asp, Gly, Ala, Val, Leu y Lys, es resistente al calor (100°C durante 30 min.) y al pH en un rango de 6 a 11, pero inestable entre 2 y 5. Esta sustancia ejerce una acción de tipo bactericida frente a todas las estirpes de *S.mutans* ensayadas, *Staphylococcus aureus* 209P, *Actinomyces viscosus*, *A.naeslundii* y *Bacillus subtilis*, pero no es activa frente a bacterias Gram-negativas (Fukushima *et al*, 1982), inhibiendo la síntesis de macromoléculas, ADN, ARN y proteínas en *Streptococcus faecalis* ODU (Fukushima *et al*, 1985).

Otra de las mutacinas producidas en medio líquido es la caracterizada por Hamada *et al* (1986), denominada mutacina MT3791, a partir de la estirpe de *S.mutans* del mismo nombre, estirpe que fue aislada a partir de caries dentales. Esta sustancia fue purificada por filtración en Sepharosa 6B, y es relativamente resistente al calor, sensible a la acción de papaína y pronasa, y resistente a la tripsina, lipasa y nucleasa.

La mutacina MT3791 inhibe el crecimiento de todas las estirpes de *S.mutans* ensayadas, incluidos los serotipos c, e, f y g, tanto *in vitro* como en placas dentarias, pero no inhibe ni a la estirpe productora ni a bacterias Gram-negativas. Su efecto antibacteriano se traduce en una inhibición de la incorporación de precursores de la síntesis de proteínas, ADN y ARN. Su marcada actividad frente a estirpes de *S.mutans* aisladas a partir de placas dentales sugiere un papel interactivo *in vivo* en los nichos ecológicos de la cavidad bucal.

INTRODUCCION

Streptococcus sanguis, *S.mitis*, *S.milleri* y *S.salivarius*.- Los estudios sobre producción de bacteriocinas por estas especies fueron iniciados por Gerasimov (1968), con el estudio de 215 estirpes bacterianas, de las cuales el 53% producían algún tipo de sustancia inhibidora.

Posteriormente, Dajani et al (1976) detectaron la producción de sustancias antibacterianas en el 78% de los estreptococos α -hemolíticos examinados procedentes de muestras clínicas. Estos autores propusieron el nombre de "viridinas" para designar a dichas sustancias antibacterianas. Se seleccionaron tres estirpes (*S.sanguis* 224658, *S.mitis* 42885 y *S.mitis* 42991), para comprobar su espectro de acción.

A las sustancias antibacterianas producidas por cada una de ellas se las denominó viridina A, B y C, respectivamente. Dichas sustancias mostraron un amplio rango de actividad inhibidora, no solo frente a bacterias Gram-positivas, sino también frente a algunas estirpes Gram-negativas como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella* y *Klebsiella*, siendo estas unas de las pocas sustancias antibacterianas descritas dentro del género *Streptococcus* con actividad inhibidora frente a bacterias Gram-negativas.

Dichas sustancias no pudieron ser obtenidas en medio líquido, aunque sí por rotura mecánica de las células productoras. La viridina B fue purificada parcialmente, obteniéndose una forma sensible al tratamiento con tripsina y proteasa, así como al calor (60°C durante 30 min.).

El fenómeno de antagonismo bacteriano en *Streptococcus salivarius* no es frecuente de encontrar en la literatura científica, siendo en muchos casos atribuido a la producción de ácido acético y

INTRODUCCION

láctico. Sin embargo, algunas de las sustancias antibacterianas producidas por esta bacteria han sido parcialmente caracterizadas, como es el caso del antibiótico de bajo peso molecular denominado "enocina" (Sanders y Sanders, 1978) descrito en *S.salivarius*. Dicha sustancia interfiere con la utilización del ácido pantoténico.

Estudios más detallados pusieron de manifiesto la producción de verdaderas bacteriocinas por estas especies, como los llevados a cabo por Tagg y Russell (1981), quienes purificaron una sustancia antibacteriana producida por *S.salivarius* P, a la que denominaron estreptococina Sal-P. Dada su escasa producción en medio líquido, esta sustancia fue obtenida a partir de medio sólido mediante congelación-descongelación. Se trata de una sustancia proteica con un tamaño molecular próximo a 8.000, muy estable a valores extremos de pH y temperatura (98°C durante 30 min.), y sensible al tratamiento con tripsina y proteasa.

Dicha sustancia se adsorbe inespecíficamente sobre receptores tanto de células sensibles como resistentes, así como a membranas de celulosa. Su acción es de tipo bactericida, solo frente a bacterias Gram-positivas, tales como estreptococos pertenecientes a los grupos A, B, C y G, *S.salivarius*, *S.sanguis*, *S.milleri*, *S.mitior*, *S.pneumoniae*, *Lactobacillus leichmanii*, *Actinomyces viscosus*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Staphylococcus epidermidis*. La única bacteria Gram-negativa sensible es *Neisseria catarrhalis*.

Es notable la gran sensibilidad de los estreptococos del grupo A, y en menor grado, la de otras especies patógenas del tracto respiratorio superior como *C.diphtheriae*, *S.pneumoniae* y otros estreptococos de los grupos C y G. Sanders (1975) ha discutido la posible contribución de los estreptococos de la flora indígena bucal a la resistencia "natural" a la infección del tracto nasofaríngeo y garganta.

INTRODUCCION

El papel ecológico en la cavidad bucal de otra de las bacterias pertenecientes a este grupo, *Streptococcus mitis*, ha sido estudiado por Vernazza y Melville (1979). Las tres estirpes ensayadas, *S.mitis* 10712, D9 y D11, producían sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano tales como agua oxigenada, ácidos grasos, bacteriocinas y otros inhibidores de alto peso molecular no identificados, ejerciendo una acción antagonista frente a una cierta variedad de bacterias de la flora bucal, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, facultativas y anaerobias. Sin embargo, ninguna de dichas sustancias ha sido aislada y caracterizada.

Resultados similares en cuanto a producción de antibacterianos de diverso tipo han sido descritos en estirpes de *Streptococcus milleri* y *S.mitior* (Drucker y McKillop, 1982), especies ambas de importancia clínica, tanto como acompañantes como causantes de la placa dentaria.

Grupo láctico.-

La producción de sustancias con carácter antibiótico en estreptococos fue descrita por primera vez en estirpes pertenecientes a este grupo por Whitehead y Riddet (1933), quienes aislaron, a partir de leche agria, estirpes de estreptococos capaces de inhibir el crecimiento y la producción de ácidos en los cultivos iniciadores durante la fabricación de queso. En estudios posteriores se identificó a uno de dichos productores como *Streptococcus cremoris*, y se demostró la naturaleza proteica de dicho inhibidor.

Mattick y Hirsch (1947) aislaron estirpes de *S.cremoris* productoras de sustancias inhibidoras a partir de leche y cultivos iniciadores. El inhibidor producido por estas especies, que fue denominado nisina, ha sido uno de los mejor estudiados dentro de

este grupo. Hoy se sabe que su estructura básica es un polipéptido de 34 aminoácidos, entre ellos restos no proteicos como la lantionina. Dado que en el código genético no existen las claves para la codificación de aminoácidos no proteicos, Bodansky y Perlman (1964) sugirieron que este antibiótico se produciría por mecanismos no ribosómicos, mediante modificación enzimática de una forma precursora o pronisina. Los trabajos de Hurst y Paterson (1971) confirmaron esta idea.

La solubilidad de la nisina depende marcadamente del pH, siendo insoluble a medida que nos acercamos a la neutralidad. Se trata de un polipéptido básico con un pI cercano a 10. A pesar de su naturaleza proteica, es resistente al tratamiento con tripsina, pepsina, carboxipeptidasa A y elastasa, aunque es sensible a la α -quimotripsina.

La nisina tiene un espectro antibacteriano reducido, y no inhibe a bacterias Gram-negativas, excepto a *Neisseria*, ni tampoco a levaduras ni a hongos. Los estreptococos más íntimamente relacionados son los más sensibles, como por ejemplo *S. cremoris*. Cabe destacar la sensibilidad de los microorganismos formadores de esporas tales como *Clostridium* y *Bacillus*, tanto en su forma vegetativa como esporulada.

La adsorción sobre las células sensibles es un fenómeno altamente dependiente del pH. Dado que los jabones aniónicos neutralizan el efecto de este antibiótico, se llegó a proponer una acción de tipo detergente catiónico (Ramseier, 1960). Estudios más recientes han demostrado su acción a nivel de membrana, provocando la salida de aminoácidos y compuestos de bajo peso molecular, y colapsando el potencial de membrana (Ruhr y Sahl, 1985); su mecanismo de acción sería, por tanto, similar al del antibiótico Pep-5 antes descrito así como otros péptidos básicos con los que comparte además ciertas

características tales como un elevado pI (cerca de 10) y un tamaño molecular comprendido entre 3.500 y 5.000.

Entre ellas cabría citar a la δ -lisina estafilocócica (Freer, 1982), la melitina de veneno de abeja (Terwilliger y Eisenberg, 1982), los péptidos básicos de la saliva (MacKay *et al*, 1984) y de los granulocitos de neutrófilos (Selsted *et al*, 1984), así como la β -lisina de las plaquetas (Donaldson y Tew, 1977). La similitud estructural de todas estas sustancias apuntaría hacia un principio general subyacente a su mecanismo de acción. Adicionalmente, muchas de ellas inducen la autólisis en las células atacadas.

En cuanto a su papel fisiológico, Hurst y Paterson (1971) sugieren que, dado que el enzima convertidor de la pronisina en nisina solo aparece al final de la fase de crecimiento exponencial, este antibiótico podría ser un metabolito secundario sin función específica alguna. Un segundo punto de vista es el que sustenta que esta sustancia asegura la dominancia de la bacteria productora cuando ésta compete con otros estreptococos lácticos. Hirsch (1952) afirma que la leche cruda es un sustrato relativamente fresco donde estos organismos compiten por su colonización, utilizando para tal fin la producción de sustancias antibacterianas.

Dado que la toxicidad de esta sustancia administrada por vía oral en organismos superiores es muy baja, su uso en la conservación y el procesamiento de productos lácteos se está extendiendo progresivamente.

En contraposición a lo ocurrido con la nisina, el inhibidor inicialmente descrito por Whitehead y Riddet (1933) a partir de *S. cremoris* era inactivo frente a *B. subtilis* y otros formadores de esporas, y recibió menos atención. Más tarde, Oxford (1944) llevó a cabo la purificación parcial de una sustancia de naturaleza antibiótica denominada diplococcina, producida por *S. cremoris*.

En estudios posteriores, como los llevados a cabo por Davey y Richardson (1981) se encontraron, de entre 150 estirpes de *S. cremoris* examinadas, 11 productoras de diplococcina. El espectro de acción de esta sustancia estaba restringido a estirpes de *S. cremoris* y *S. lactis* exclusivamente. La diplococcina producida por *S. cremoris* 346 fue purificada a homogeneidad; en su estado puro era sensible al calentamiento a 100°C durante 1 min, así como a diversos enzimas proteolíticos (tripsina, pronasa y α -quimotripsina). Su composición en aminoácidos demostró un alto contenido en restos ácidos y neutros, así como un bajo contenido en aminoácidos básicos, incluyendo un resto de ornitina por molécula; el peso molecular estimado a partir de su composición era de 5.300.

Otros estudios, quizá los más extensos en cuanto a número de muestras analizadas en estreptococos del grupo láctico fueron los llevados a cabo por Dobzansky *et al* (1982), quienes detectaron la producción de una gran diversidad de sustancias antibacterianas distintas a la nisina, para las que propusieron el nombre de "lactostrepsinas". De 47 estirpes de *S. lactis* no productoras de nisina examinadas, todas ellas producían lactostrepsinas, al igual que el 92% de las estirpes de *S. lactis* subsp. *diacetylactis* y el 6% de *S. cremoris*. Algunas estirpes producían al menos dos tipos de lactostrepsinas.

Todas las lactostrepsinas examinadas por estos autores eran susceptibles a los enzimas proteolíticos, y algunas también a la fosforilasa A y a la lipasa. El efecto bactericida de estas sustancias solo afectaba a un grupo reducido de bacterias Gram-positivas, incluyendo especies de *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* y *Lactobacillus*. La mayoría de ellas presentaban una actividad máxima a pH 5, siendo las únicas bacteriocinas con mayor actividad a pH ácido.

Estos autores diferenciaron al menos 5 tipos de lactostrepsinas, según su actividad a pH 7, inactivación por fosforilasa A y lipasa, espectro de acción y diálisis. Todas ellas requerían para su producción medios complejos, como la leche. Dos de ellas han sido parcialmente purificadas: una tiene un peso molecular de 20.000 y un pI de 4.8; la otra presenta un peso molecular de 6.000 y carece de aminoácidos no proteicos.

Grupo D.-

Las bacteriocinas producidas por enterococos representan uno de los grupos de estreptocinas mejor estudiado. Estas sustancias aparecen a menudo en la literatura científica con denominaciones tales como "enterocinas", "enterococcinas", "estreptocinas D" o "estreptococcinas D". Sin duda alguna, todas ellas forman un conjunto de sustancias muy heterogéneas, incluyendo además fagos defectivos, sustancias bactericidas de peso molecular relativamente bajo y bacteriolisinas.

La primera detección de bacteriocinas en enterococos se debe a Kjems (1955); este autor, al estudiar la incidencia de bacteriófagos en estreptococos del grupo D, descubrió la existencia de otras sustancias de naturaleza distinta a la de los fagos.

Posteriormente Pohonek (1961) estudió el antagonismo existente entre *Lactobacillus vaginalis* y algunos enterococos invasores.

Brock et al (1963), tras analizar la producción de sustancias antibacterianas por 99 estirpes de colección frente a 19 estirpes indicadoras, encontraron un 50% de razas productoras, con las cuales establecieron una clasificación en base a las características físico-químicas de dichas sustancias, tales como su sensibilidad al calor,

al cloroformo y a los enzimas proteolíticos, llegando a encuadrarlas en cinco tipos:

Tipo I: Las bacteriocinas de este tipo estarían producidas por todas las estirpes de *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*, y serían activas frente a gran número de bacterias Gram-positivas, además de presentar actividad hemolítica. Todas ellas son sensibles al cloroformo, pero resistentes al calor y a la pronasa.

Tipo II: Producidas por ciertas estirpes de *S.faecalis* subsp. *liquefaciens*, las sustancias encuadradas en este grupo actuarían principalmente sobre enterococos y sobre otras bacterias del grupo láctico. Se distinguen además por su resistencia al cloroformo y a las proteasas, así como por su sensibilidad al calor.

Tipo III: Son producidas por ciertas estirpes de *S.faecalis* y *S.faecium*, y son activas frente a gran número de estreptococos del grupo D, pero inactivas frente a bacterias del grupo láctico, exceptuando a *Leuconostoc citrovorum*. Este tipo de bacteriocinas son resistentes al cloroformo y al calor, pero sensibles a las proteasas.

Tipo IV: Las sustancias antibacterianas producidas por ciertas estirpes de *S.faecium*, se asemejan a las bacteriocinas de tipo III, pero difieren en su espectro de antagonismo. Son resistentes al cloroformo, al calor y a la pronasa.

Tipo V: Este tipo solo se ha descrito en la estirpe proteolítica *S. zymogenes* X74, y tiene un espectro de acción muy reducido. Esta estirpe también produce una bacteriocina de tipo I.

En su revisión sobre producción de bacteriocinas en estreptococos, al referirse al grupo D, Brandis (1978) distingue

INTRODUCCION

tres apartados para agrupar a dichas bacteriocinas según su estructura.

En el apartado I incluye a todas aquellas bacteriocinas con estructura similar a colas de fagos. En *S.faecalis* NTCC8175 se han encontrado diversos tipos de partículas similares a colas de fagos, encontradas todas ellas en lisados de células inducidas con mitomicina C (Bradley, 1967). Las partículas más frecuentes eran similares al colifago T3, con colas cortas no contráctiles y cabezas llenas o vacías.

En un segundo apartado, Bradley encuadra a aquellas sustancias antibacterianas que presentan un peso molecular relativamente bajo, citando como ejemplo a la bacteriocina producida por *S.faecium* E1 (Brandis et al, 1965), la cual se presenta bajo dos formas moleculares denominadas enterocina E1A y E1B respectivamente. E1A es una molécula básica con un tamaño molecular cercano a 10.000, resistente al calor y sensible a la tripsina, y representa el 90% de la actividad total detectada en los sobrenadantes del cultivo. E1B sería una partícula con un tamaño superior a 4×10^6 (Kramer y Brandis, 1975).

Ambas formas tienen un espectro de acción similar, afectando a estirpes de *Streptococcus faecium*, *S.faecalis*, *S.salivarius* y *Listeria monocitogenes*, y actúan inhibiendo la síntesis de proteínas; ninguna de ellas tiene efecto lítico.

Finalmente, las bacteriolisinas o lisinas encuadrarían dentro del tercer grupo. La estirpe *S.faecalis* subsp. *zymogenes* X14 (Brock et al, 1963) produce una bacteriolisina que posteriormente se ha identificado con la hemolisina producida por la misma estirpe (Brock y Davie, 1963). Esta sustancia sería un agente que produce la lisis inespecífica de membranas.



El poseer dos actividades en una misma molécula supondría para esta bacteria una enorme ventaja en la invasión de áreas corporales tales como garganta, vagina e intestino, contaminadas previamente por otros microorganismos, ya que le permitiría luchar a la vez contra éstos y contra las defensas propias del organismo huésped.

Resultados similares fueron descritos por Jacob y Hobbs (1974), quienes encontraron dos estirpes de *S.faecalis* subsp. *zymogenes*, JH1 y JH2, respectivamente, productoras de una bacteriocina con actividad hemolítica, al parecer idéntica a la producida por la estirpe X14; así mismo, estos autores demostraron que dicha actividad está codificada por los plásmidos pJH1 y pJH2, respectivamente, los cuales son capaces de autotransferirse a otras estirpes de *S.faecalis* no hemolíticas, posiblemente mediante conjugación. Curiosamente, la única diferencia existente entre *S.faecalis* y la subsp. *zymogenes* es que ésta es hemolítica.

Un nuevo tipo de bacteriocina sería la descrita por Bottone *et al* (1971), producida por *S.faecalis* subsp. *zymogenes*. Dicha sustancia se diferenciaría de las descritas previamente, sobre todo por su espectro de acción, presentando una marcada actividad frente a *Diplococcus pneumoniae* y frente a todos los enterococos no hemolíticos ensayados, así como algunos estreptococos del grupo viridans.

Esta bacteriocina tendría un peso molecular inferior a 30.000, siendo sensible al calor (80°C durante 30 min.) y resistente al cloroformo y a la tripsina. Aunque esta bacteriocina también va asociada a la actividad hemolítica, difiere de la hemolisina-bacteriocina perteneciente al tipo I de Brock por su resistencia al cloroformo así como por su espectro de acción más reducido, lo que

apuntaría hacia la existencia de nuevos grupos aparte de los ya descritos por Brock *et al* (1963).

Así, por ejemplo, Nakagawa (1979), al estudiar 121 estirpes de estreptococos del grupo D procedentes en su mayoría de muestras humanas, seleccionó cuatro estirpes productoras, *S.faecalis* S10 y E23, *S.faecalis* subsp. *zymogenes* E6 y *S.faecium* S34. Todas las bacteriocinas pudieron ser detectadas en medio líquido en cultivos en fase exponencial y ninguna de ellas era inducible. Todas ellas eran estables en un amplio rango de pH, y resistentes a la irradiación con UV y al tratamiento con nucleasas, acetona, etil éter y SDS. Todas eran sensibles a la tripsina. Las bacteriocinas S34 y E23 tenían un tamaño de 290.000 y 310.000 respectivamente.

Los estudios llevados a cabo con posterioridad por Nakagawa y Matsuo (1981) pusieron de manifiesto que la estirpe *S.faecium* S34 produce una sustancia con actividad α -hemolítica y una bacteriocina, ambas separables físicamente, con pesos moleculares de 220.000 y 30.000, respectivamente.

Otra de las sustancias antibacterianas producidas por *S.faecium* es la bacteriocina descrita por Harasawa *et al* (1980), producida por una estirpe obtenida a partir de heces humanas. Se trata de una molécula de un tamaño cercano a 50.000, sensible a los enzimas proteolíticos y a la α -amilasa, pero resistente a la lisozima, urea 6M y cloroformo, así como al calor (100°C durante 60 min.). Esta sustancia es marcadamente activa frente a estirpes de *Bifidobacterium*; así mismo es activa frente a algunas especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus morbillorum*, *Peptostreptococcus saccharolyticus*, *P. anaerobius*, *P. niger*, *Ruminococcus torques*, *Coprococcus eutactus* y *Clostridium septicum*.

INTRODUCCION

Cabe también citar a la enterococina Sf3, descrita en *S.faecium*, con un tamaño cercano a 9.000, carente de actividad hemolítica y con un espectro de acción restringido, principalmente a enterococos, aunque también inhibe a *Corynebacterium butyricum*, *Staphylococcus aureus* 1 y *Micrococcus luteus* NCIB8166, pero no a bacterias Gram-negativas.

Esta sustancia antibacteriana es sensible a pHs extremos, tanto ácidos como básicos, y a enzimas proteolíticos, aunque resiste el calor (80°C durante 15 min.) (Kramer *et al*, 1983), por lo que se podría encuadra dentro del grupo 3 propuesto por Brock *et al* (1963).

En un estudio iniciado en nuestro laboratorio sobre producción de sustancias antibacterianas en enterococos se analizaron 90 estirpes bacterianas procedentes de muestras clínicas, la mayoría de ellos aislados de infecciones urinarias, exudados de heridas, esputo, exudados vaginales y sangre, así como en muestras de heces y meconio (Gálvez, 1984).

La identificación se realizó en base al crecimiento en Bilis-Esculina y en NaCl 6.5%. Para la identificación de especies y subespecies se utilizó el sistema API 10-Strep (API System, S.A., Francia) junto con pruebas de hemólisis y licuación de la gelatina.

Se ensayó la producción de antagonistas del crecimiento frente a *Streptococcus faecalis* S-6 y *Escherichia coli* U-9. De todas ellas se encontró, una vez descartada la inhibición por ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno o fagos líticos, un 36% de estirpes productoras de algún tipo de sustancia antibacteriana de tipo bacteriocina, activas frente a la estirpe indicadora S-6, pero no frente a *E.coli* U-9, a excepción de la estirpe S-48. Entre las estirpes productoras se encontraron especies de *S.faecium* (3),

S.durans (1), y *S.faecalis* subsp. *faecalis*, *zymogenes* y *liquefaciens* (Gálvez et al, 1985).

Así mismo se establecieron cuatro grupos en base a su antagonismo cruzado, encontrándose diferencias notables con los tipos establecidos por Brock et al (1963). Así, el grupo A incluiría a aquellas estirpes productoras con un espectro de acción más amplio, afectando a la mayoría de los enterococos ensayados. En este grupo se incluiría la estirpe S-48, activa frente al 100% de los enterococos.

El grupo B incluiría a un conjunto de estirpes productoras con un espectro de acción bastante homogéneo, afectando al 65% de las estirpes de enterococos utilizadas como indicadoras.

El grupo C estaría formado por estirpes activas también frente al 65% de las indicadoras, pero con un patrón de inhibición completamente distinto al grupo B.

Por último, el grupo D incluiría a todas aquellas estirpes productoras con un espectro de acción mucho más reducido, que eran activas solo frente al 1-1.5% de las indicadoras.

A excepción de la estirpe S-86, en todos los casos se detectó autoinmunidad. Estos grupos mostraron por otra parte una gran heterogeneidad en su respuesta a las diversas pruebas bioquímicas efectuadas, sensibilidad al calor, cloroformo y a la pronasa, así como en cuanto a su difusión a través de membranas de diálisis con un límite de exclusión de 10.000; 12 de estas sustancias difundían a través de dichas membranas.

El 64% de estas sustancias antibacterianas se producían en medio líquido BHI-T. De entre todas ellas destaca la producida por

Streptococcus faecalis subsp. *liquefaciens* S-48. Esta estirpe se caracterizó desde el principio por ser la única en mostrar una actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram-negativos (*E.coli* U-9), así como por su actividad frente a todos los enterococos ensayados.

Los estudios de caracterización preliminares, llevados a cabo con extractos crudos obtenidos en medio BHI-T por precipitación con sulfato amónico al 60%, indicaron que se trataba de una sustancia de bajo peso molecular, comprendido entre 2.000 y 10.000, sensible al calor (70°C durante 30 min.), al pH básico (por encima de 9) y a los enzimas proteolíticos (tripsina, pronasa y proteasa), pero resistente a la lipasa, lisozima, DNAasa I, RNAasa A, así como a los disolventes orgánicos y al 2-Mercaptoetanol. En su forma parcialmente purificada, esta sustancia mostraba un amplio espectro de actividad antibacteriana, tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas; su acción frente a *S.faecalis* subsp. *zymogenes* S-6 era de tipo bacteriolítico.

OBJETO DEL TRABAJO

El plan de trabajo desarrollado a lo largo de la presente Memoria se elaboró atendiendo a dos objetivos principales: el primero de ellos consistía en la purificación y caracterización de la sustancia antibacteriana responsable del efecto inhibidor producido por la estirpe *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 frente a un amplio número de bacterias.

Como segundo objetivo se planteó el estudio de los efectos producidos por esta sustancia sobre las células sensibles, de cara a establecer un posible mecanismo de acción.

Para el cumplimiento del primero de los objetivos era primordial el desarrollo de un método de purificación adecuado, al objeto de eliminar desde el principio aquellos componentes de los medios de cultivo que mostrasen una mayor interferencia en la purificación, permitiendo a la vez la obtención de un rendimiento adecuado en cuanto a cantidad y pureza del producto final obtenido.

Así mismo era obligatorio disponer de fracciones con el mayor grado de pureza para proceder, en primer lugar, a su caracterización. A tal fin se aplicarían las técnicas analíticas así como otras pruebas físicas y químicas oportunas para obtener una idea global sobre su naturaleza, composición y estabilidad frente a diversos agentes.

La consecución de este primer objetivo nos permitiría abordar el segundo; para ello se establecerían inicialmente las condiciones adecuadas de ensayo, escogiendo a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos representativos, al objeto de aplicar sobre ellos los diversos tratamientos y pruebas biológicas que nos permitirían conocer, por una parte, los diversos aspectos concernientes a la acción bactericida y/o bacteriolítica de esta sustancia, factores que influyen en la misma y cinética de acción.

Finalmente, el estudio de la acción de este inhibidor sobre las principales rutas biosintéticas celulares nos permitiría, junto con los restantes datos acumulados, pronunciarnos en favor de un mecanismo de acción concreto.

MATERIAL Y METODOS

1.- MICROORGANISMOS

Como microorganismo productor se utilizó la cepa S-48 de *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*, procedente de una muestra clínica (Gálvez, 1984).

Los microorganismos sensibles más comúnmente utilizados fueron *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-47, *Escherichia coli* U-9 y *E.coli* K-12. Otros microorganismos utilizados para establecer el espectro de inhibición son los recogidos en las Tablas 7, 8, 9 y 10. Todos los enterococos ensayados fueron aislados a partir de muestras clínicas en el Servicio de Bacteriología de la Ciudad Sanitaria " Virgen de las Nieves" de Granada. El resto de las bacterias ensayadas pertenecen a colecciones de cultivo tipo o bien a la colección de este Departamento.

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1.- Medios de crecimiento.-

BHI

Fue el medio líquido más comúnmente utilizado (Infusión de cerebro-corazón de ternera; BBL), cuya composición, en gramos por litro de agua destilada (BHI) o tampón fosfato sódico (PanReac) 0.15 M pH 7.2 (BHI-T) es la siguiente:



MÉTODOS

Infusión de cerebro de ternera	200
Infusión de corazón de buey	250
Peptona de gelatina	10
Cloruro sódico	5
Fosfato disódico	2.5
Glucosa	2

Para su uso en forma sólida, fue suplementado con agar (Hispanagar) al 2% (BHA). Para las experiencias de incorporación de precursores marcados, este medio se diluyó 1:15 en el tampón anterior, y se suministró con glucosa (PanReac) al 1% (BHI-DTG).

TSI

El caldo infusión de Tripticasa-soja (Hispanagar) fue empleado alternativamente para el crecimiento de diversos microorganismos. Su composición en gramos por litro de agua destilada es:

Peptona de caseína	15
Peptona de soja	5
Cloruro sódico	5

LB

El caldo de Luria-Bertani fue utilizado para el crecimiento de *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* y *Nocardia*. Su composición, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

Bacto-triptona (Difco)	10
Extracto de levadura (BBL)	5
Cloruro sódico (PanReac)	10

CT-0.5%

Fue utilizado específicamente para el crecimiento de mixobacterias. Su composición en gramos por litro de tampón fosfato potásico 10 mM pH 6.5 es:

Bacto-casitone (Difco)	5
Sulfato magnésico (PanReac)	1

YGT

Medio empleado para el crecimiento de *Rhizobium meliloti*. Composición en gramos por litro de agua destilada:

Glucosa (PanReac)	15
Tryptona (BBL)	5
Extracto de levadura	2.5
Cloruro cálcico dihidratado (PanReac)	0.6

Mueller-Hinton Agar (MH-T)

Este medio, suministrado por BBL, fue el empleado como capa base para el ensayo de la actividad antibiótica. Su composición, en gramos por litro de tampón fosfato sódico 0.15M pH 7.2 es:

Extracto de carne	2
Hidrolizado ácido de caseína	17.5
Almidón	15.5
Agar	17

MMGVB

Se utilizó para el crecimiento de *E.coli* K-12 en las experiencias de actividad biológica. Es una modificación de los medios mínimos M63 y M9 (Miller, 1972), con la siguiente composición, en gramos por litro de agua destilada:

Fosfato bipotásico (PanReac)	9.06
Fosfato monopotásico (PanReac)	4.52
Sulfato amónico (PanReac)	2.00
Sulfato ferroso heptahidratado (Merck)	0.001
Sulfato magnésico	0.20
Glucosa	4.00
Tiamina (Sigma)	0.01
BHI	1.00

La tiamina, el sulfato magnésico y la glucosa fueron esterilizados por filtración.

KTY2XH

Es el medio descrito por Harold y Van Brunt (1977) para el crecimiento de *S.faecalis* en ausencia de potencial de membrana. Su composición, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

Triptona	20
Extracto de levadura	10
Glucosa	10
Fosfato bipotásico	20
HEPES (Merck)	12

pH final = 7.8

NG

El medio de Lindengren *et al* (1958) fue utilizado para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Composición en gramos por litro de agua destilada:

Extracto de levadura (BBL)	4
Peptona de carne (Analema)	3.6
Glucosa	10
Fosfato monopotásico	0.2
Sulfato magnésico	1
Sulfato amónico	2

pH final = 4-4.5

2.2.- Medios para regeneración de protoplastos.-

DM3

Este medio (Chang y Cohen, 1979) fue utilizado para la regeneración de protoplastos de *S.faecalis*. Composición en gramos por litro de tampón fosfato potásico 0.02 M pH 7.3:

Casaminoácidos (Difco)	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	5
Succinato sódico (Merck)	95
Cloruro magnésico heptahidratado (Merck)	4
Albúmina bovina sérica (Sigma)	0.1
Agar	8

La albúmina sérica se esterilizó por filtración y se adicionó al medio en sobrefusión (50°C).

OYPD

Permite la regeneración de protoplastos de *S.cerevisiae*.
Composición en gramos por litro de agua destilada:

Glucosa	20
Extracto de levadura	10
Peptona de carne	20
Sorbitol (Merck)	146
Agar	20

Este medio se empleó como capa base. La sobrecapa contenía Sorbitol 14.6% + agar 2%.

2.3.- Medios de producción.-

BHI-T

Uno de los medios utilizados para la producción del antibiótico AS-48 fue el BHI-T, antes descrito, o con las modificaciones especificadas en la Tabla 1, encaminadas a la reducción de los componentes peptídicos a cambio de suministrar otros nutrientes, principalmente glucosa, de forma que interfiriesen menos en los posteriores procesos de purificación a la vez que incrementasen los títulos de actividad antibiótica obtenidos.

Como norma, en todos los medios de producción la concentración final de tampón fosfato sódico (pH 7.2) empleada fue de 0.075M.

MÉTODOS

malmente utilizado para la producción de AS-gramos por litro de tampón fosfato, es la

	1
	1
(YNB, Difco)	1.34
	10
	0.04

Preparación del medio: Todos sus componentes se disolvieron en agua destilada (1/10 del volumen final) calentando suavemente, y se esterilizaron por filtración a vacío a través de filtros de Millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro. Esta solución fue utilizada inmediatamente o almacenada en oscuridad a -20°C . Para su uso fue diluída diez veces en tampón fosfato sódico 0.82 M pH 7.2 previamente esterilizado en autoclave.

Otras modificaciones de este medio se describen en la Tabla 1. Las variantes ensayadas fueron principalmente la concentración de glucosa y la sustitución del BHI por otros digeridos proteicos.

Medio mínimo MM

Su composición, en gramos por litro de tampón fosfato, ha sido ligeramente modificada con respecto a la descrita por Guirard y Snell (1981).

L-Alanina	0.50
L-Arginina	0.25
L-Aspártico	0.20
L-Asparagina	0.40
L-Cisteína	0.10
L-Glutámico	0.40
L-Glutamina	0.30
L-Glicina	0.30
L-Histidina-HCl	0.10
L-Isoleucina	0.30
L-Leucina	0.30
L-Lisina-HCl	0.25
L-Ornitina	0.08
L-Metionina	0.15
L-Fenilalanina	0.20
L-Prolina	0.20
L-Serina	0.10
L-Treonina	0.20
L-Triptófano	0.08
L-Tirosina	0.10
L-Valina	0.40
Glucosa	10.00
YNB (Difco)	1.34
Cloruro amónico (PanReac)	3.00
Cloruro potásico	2.00
Sulfato magnésico	0.04

Preparación: Todos los aminoácidos (Sigma) se disolvieron por adición sucesiva de pequeños volúmenes de agua destilada y calentamiento suave. Las fracciones insolubles se separaron por centrifugación y se volvieron a lavar con agua destilada. El precipitado final se disolvió a 60°C mediante acidificación y posterior neutralización de la solución. El resto de los componentes se disolvió separadamente en agua destilada. Una vez disueltos, todos ellos se esterilizaron por filtración. Para su uso, este preparado fue diluido hasta un volumen final de 1 l con tampón fosfato sódico 0.82 M estéril.

3.- CONDICIONES CULTURALES

Todos los cultivos fueron incubados en reposo a 37°C, a excepción de los de *Pseudomonas reptilivora* N-5, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* CECT194, *Nocardia corallina*, *Corynebacterium glutamicum* CECT80 y *Saccharomyces cerevisiae* (28°C en reposo), y *Rhizobium meliloti*, *Myxococcus coralloides* D y *M.virescens*. (28°C en agitación).

La incubación de muestras en anaerobiosis se llevó a cabo en jarras de anaerobiosis provistas de un sistema generador de una atmósfera de H₂ y CO₂ (GasPack, BBL).

3.1.- Curvas de crecimiento y producción de antibiótico.-

Tubos de spectronic o bien nefelómetros conteniendo medio de cultivo estéril, fueron inoculados al 4% con la raza indicada previamente crecida durante 18h en el mismo medio, y posteriormente incubados en las condiciones adecuadas. A intervalos regulares de tiempo se efectuaron medidas de la turbidez de los cultivos a la

longitud de onda adecuada en un fotocolorímetro Spectronic 20-D (Bausch & Lomb), y se retiraron alícuotas de los mismos, las cuales fueron centrifugadas inmediatamente para eliminar células. Los sobrenadantes así obtenidos se ajustaron a pH neutro mediante adición de NaOH diluido, y se ensayaron, bien directamente o bien concentrados, para determinar su actividad antibacteriana por la técnica de los pocillos.

La concentración de las muestras se llevó a cabo bien mediante evaporación a vacío a 40°C en un Rotavapor R (Buchi), o bien mediante una célula de ultrafiltración (Stirred Ultrafiltration Cell M-52, Amicon) provista de una membrana filtrante (Diaflo Ultrafiltration Membrane type UM05) con límite de exclusión de 500d. La filtración se forzó suministrando una sobrepresión de N₂ de 50 psi.

4.- ENSAYO Y VALORACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

4.1.- Ensayo y valoración.-

El ensayo de la actividad antibacteriana se realizó siguiendo la técnica de difusión en pocillos (Tagg y McGiven, 1971). Para ello se utilizaron placas de Petri conteniendo una capa base de 10 ml de medio MHA-T (en el caso de *S.cerevisiae*, tanto la capa base como la sobrecapa contenían medio NG) con la superficie bien seca, y sobre ellas se depositaron pocillos estériles de acero inoxidable de 8 mm de diámetro. Seguidamente se vertieron sobre la placa 6 ml de agar purificado (BBL) tamponado adicionado de 0.1 ml de un cultivo en fase estacionaria de la bacteria sensible (en el caso de *E.coli* se tomó 0.1 ml de la dilución 1/10 de dicho cultivo).

Una vez solidificada la sobrecapa se retiraron los pocillos, quedando los huecos correspondientes, en los cuales se depositó 0.1 ml de la muestra a ensayar. A continuación las placas se dejaron en predifusión durante 1h a temperatura ambiente, y se incubaron nuevamente a la temperatura deseada. Tras 18-24 h de incubación se midió el diámetro del halo de inhibición producido alrededor de cada muestra.

La titulación de las muestras se llevó a cabo por ensayo en pocillos de diluciones seriadas de las mismas. Se consideró como Unidad Arbitraria (UA) la concentración de antibiótico capaz de producir un halo de inhibición de 9 mm de diámetro (mínimo halo apreciable) sobre una capa de agar inoculada con 3.8×10^8 UFC de *S.faecalis* S-47 ó 3×10^7 UFC de *E.coli* U-9. El título de actividad, expresado en UA/ml, se definió como el inverso de la dilución que contenía una UA. Como actividad específica (AE) se utilizó la relación UA/ μ g de proteína.

4.2.- Determinación de proteínas

Se utilizó el método descrito por Lowry et al (1951).

Reactivos (Merck):

- A) CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0.1N
- B) $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 5% en agua destilada
- C) Tartrato de Na-K al 2% en agua destilada
- D) Reactivo de Fenol al 50% en agua destilada.

Se mezclaron 5 ml de solución C con 1 ml de solución B y 4 ml de agua destilada; 1 ml de la dilución resultante se adicionó sobre 50 ml de solución A; 1 ml de esta mezcla se adicionó a 200 μ l de la

muestra problema, y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 100 μ l de solución D, agitando a continuación, y se dejó luego reposar a temperatura ambiente durante 30 min, tras lo cual se midió su DO_{630} . La concentración de proteínas se determinó a partir de una curva patrón construida aplicando el método descrito a diluciones seriadas de una solución de albúmina bovina conteniendo 400 μ g de proteína por ml.

5.- PURIFICACION.-

5.1.- Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de concentración iónica.-

Se utilizó Carboximetil Sephadex CM-25 (Pharmacia Fine Chemicals), una resina débil de intercambio catiónico. El gel fue reconstituído por adición de tampón fosfato sódico 0.02 M pH 6.2 (20:1, vol:peso) durante 2h a 100°C (o bien durante 48h a 4°C); posteriormente fue lavado en un embudo Buchner con tres volúmenes de dicho tampón. En estas condiciones, 1 g de gel origina un volumen final de 9 a 10 ml.

Preparación de la muestra: Los sobrenadantes de los cultivos de *S.faecalis* S-48 se llevaron a temperatura ambiente (20-25°C) y se les ajustó el pH a 6.2. Gel y sobrenadantes se mezclaron en baño en proporción 1:18 (vol:vol) y se agitaron suavemente durante 30 min. Posteriormente el gel se dejó decantar durante 60 min. y se retiró el sobrenadante. Seguidamente el gel fue empaquetado en una columna de vidrio de 6x110 cm y lavado con tampón fosfato sódico 0.02 M pH 6.2 hasta retirar todo el material no adsorbido al gel. La elución se realizó a un flujo de 300 ml/h aplicando un gradiente isocrático de 0 a 2M de NaCl, a partir de las siguientes soluciones:

- A) T. fosfato sódico 0.02M pH 6.2 (2.000 ml)
B) " " " " " " + NaCl 2 (2.000)ml)

La mezcla de A y B se llevó a cabo con agitación utilizando una bomba peristáltica de tres canales P-3 (Pharmacia Fine Chemicals). A la salida de la columna se instalaron un detector de luz ultravioleta (Uvicord S-2138, LKB) conectado a un registro (Chopper-Bar Recorder 2065, LKB) y un colector de fracciones (Ultrorack Fraction Collector 7000, LKB). Este equipo cromatográfico fue el utilizado en las restantes cromatografías, exceptuando la de fase reversa.

5.2.- Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de pH.-

Se utilizó una columna de 1x30 cm rellena con Carboximetil-Sephadex CM-25 equilibrado en tampón fosfato sódico 0.2M pH 6.2. Tras la aplicación de la muestra, la columna se lavó con un volumen del mismo tampón. El gradiente de pH se generó por mezcla isocrática de 45 ml del tampón inicial y 45 ml de tampón fosfato sódico 0.2M pH 8.5 mediante una bomba de tres canales. La elución se llevó a cabo a un flujo de 15 ml/h. Se recogieron fracciones de 2 ml para ensayo de actividad y medida de pH.

5.3.- Cromatografía de exclusión molecular.-

Se utilizaron columnas de 2.5x45 cm (Pharmacia Fine Chemicals) rellenas con Biogel P-6 (Bio-Rad). El montaje de las columnas se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa suministradora. La elución se llevó a cabo con tampón acetato sódico 0.05 M pH 5.6 + NaCl 0.4 M a un flujo de 30 ml/h, recogándose fracciones de 5 ml para su ensayo.

La cromatografía de exclusión molecular también fue utilizada para una primera aproximación al tamaño molecular de AS-48. Con este fin, se utilizaron columnas de 1x47 cm rellenas con Biogel P-6, Sephadex G-25, G-50 y G-75, respectivamente (Pharmacia Fine Chemicals). La elución se llevó a cabo con agua destilada + NaCl 0.4 M a un flujo de 3 ml/h. En todos los casos se aplicó 1 ml de muestra conteniendo patrones de peso molecular conocido (0.4 mg/ml) o bien antibiótico purificado. Los patrones utilizados fueron: albúmina sérica bovina (67 Kd), quimotripsinógeno (25 Kd), mioglobina (17.8 Kd), citocromo C (12.8 Kd) (todos de Serva), insulina (5.7 Kd), β -insulina (3.4 Kd), bacitracina (1.4 Kd) y polimixina B (1.25 Kd) (Sigma).

5.4.- Cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC).-

Se utilizó una columna Aquapore C-4 (Brawnlee, Ca.) de 0.2x4 cm con un relleno irregular de tamaño medio de partícula de 300 Å. En cada cromatografía se inyectaron 100 μ l de muestra. Como tampón de partida para la elución se utilizó TFA (Merck) 10 mM; tras la aplicación de la muestra se estableció un gradiente isocrático de 0 a 100% de isopropanol:acetonitrilo (Merck) (2:1, v:v) a un flujo de 0.2 ml/ min.

Se utilizó un equipo cromatográfico provisto de los siguientes módulos: dos bombas peristálticas de alta presión (Waters 501 HPLC Pump), un programador de gradientes (Waters Automated Gradient Controller), un detector de luz ultravioleta (Waters 490 Programmable Multiwavelength Detector) y una unidad de registro de datos (Waters 740 Data Module).

5.5.-Electroforesis.-

5.5.1.- Determinación de la carga neta a pH neutro.-

Sobre una capa base de 3 mm de espesor conteniendo agar purificado al 2% se depositaron pocillos de acero inoxidable estériles, y a continuación se vertió una nueva capa de 4 mm de espesor conteniendo agar purificado al 0.75% + BHI al 1.5%. Una vez solidificada la sobrecapa y retirados los pocillos, en los huecos formados se depositaron 200 µl de una solución de antibiótico cuyo pH había sido ajustado a 7.2. Posteriormente la placa fue sometida a una corriente constante de 250 mA durante 2h a 4°C. Como tampón para los electrodos, capa base y sobrecapa se utilizó tampón fosfato sódico 0.2 M pH 7.2. Finalizada la electroforesis, se retiró la muestra residual de los pocillos, y el gel se depositó en una placa de Petri estéril. El desplazamiento de AS-48 se puso de manifiesto mediante revelado biológico. Para ello, la placa fue inoculada en masa con la estirpe indicadora adecuada, e incubada a 37°C para permitir el crecimiento de la misma.

5.5.2.- Determinación del punto isoelectrico.-

Se utilizaron minigeles de acrilamida (Pharmacia Fine Chemicals) conteniendo anfolinas generadoras de un gradiente de pH entre 3.5 y 9. Tanto el desarrollo como el revelado de la placa se realizaron de forma automatizada en un equipo de electroforesis Pharmacia Phast System (Pharmacia Fine Chemicals).

Alternativamente se construyeron geles de agarosa (Sigma) al 2% conteniendo tampón glicina-NaOH (Sigma) 0.2M pH 10.6. Este mismo tampón se utilizó para los electrodos. La electroforesis de la muestra, que había sido previamente ajustada a pH 10.6, se

desarrolló a una corriente constante de 250 mA durante 2h. Tinción y fijación se realizaron simultáneamente durante 18h en metanol:acético:agua (5:1:5) conteniendo azul de Coomassie G-250 (Merck) (2.5 g/l). La mezcla de decoloración contenía metanol:acético:agua (250:75:625).

5.5.3.- Electroforesis en geles de Poliacrilamida.-

Procedimiento a.-

A fin de comprobar la homogeneidad de las fracciones obtenidas mediante HPLC se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970). Se utilizaron geles conteniendo un gradiente de poliacrilamida del 3 al 27% en SDS (0.1%) (Sepragel, Ma.), de 1mm de espesor. La proporción acrilamida:bisacrilamida fue de 20:1 (p/p). Como tampón de electrodos se utilizó una mezcla de Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1% (todos de Sigma), a un pH final de 8.3.

La cromatografía se realizó suministrando una corriente constante de 150 mA hasta que el indicador de frente (azul de bromofenol (Merck) al 0.02%) alcanzó el extremo terminal del gel.

Una vez finalizada la electroforesis se procedió al revelado de la misma mediante tinción con plata, según la técnica descrita por Merrill *et al*, 1981 y Porro *et al* (1982). Los geles se fijaron en una mezcla conteniendo metanol 45% + acético 10% (Probus) durante 30 min. y se lavaron posteriormente con agua destilada para eliminar el exceso de disolvente. Posteriormente se sumergieron en 200 ml de una solución de glutaraldehído (Merck) durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación magnética, y luego fueron transferidos a 200 ml de una solución conteniendo: 42 ml de

hidróxido sódico al 0.36%, 2.8 ml de hidróxido amónico al 28%, 2 ml de nitrato de plata al 20% (todos ellos de Probus) y agua destilada hasta 200 ml, y se dejaron incubar durante 30 min. a temperatura ambiente con agitación magnética. Finalmente se efectuó un lavado con acético al 10% para desteñir el gel.

Los patrones de peso molecular utilizados fueron: fosfolipasa b (94 Kd), albúmina sérica bovina (67 Kd), ovalbúmina (43 Kd), anhidrasa carbónica (30 Kd), inhibidor de soja para la tripsina (20 Kd) y α -lactalbúmina (14.4 Kd) (LMW Calibration Kit, Pharmacia Fine Chemicals)

Procedimiento b.-

Se llevó a cabo según la metodología descrita por Swank y Munkres (1971) indicada para proteínas pequeñas, modificada de acuerdo con la siguiente composición: acrilamida 14%, bisacrilamida 0.14% (BDH), SDS 0.1%, TEMED (Sigma) 0.1%, persulfato amónico (fresco) (Sigma) 0.1%, Tris-HCl 0.75 M pH 8.8. Antes de adicionar el SDS y el persulfato amónico, la mezcla fue desgasificada a vacío durante 15 min. El gel fue vertido en tubos Pyrex de 0.5 x 7.5 cm y cubierto con unas gotas del mismo tampón en que fue preparado para evitar el contacto con el aire.

El tampón para los electrodos contenía Tris 0.05M, glicina 0.35M, SDS 0.1%, a un pH final de 8.8. Las muestras se calentaron a 60°C durante 15 min. en la siguiente solución: urea (Sigma) 48%, SDS 1%, 2-mercaptoetanol (Sigma) 1%, Tris-HCl 0.3 M pH 8.8. Se utilizó un juego de patrones de bajo peso molecular (MW-SDS-17, Sigma) conteniendo los siguientes péptidos: mioglobina (16.95 Kd), mioglobina (I+II) (14.4 Kd), mioglobina (I) (8.16 Kd), mioglobina (II) (6.21 Kd) y mioglobina (III) (2.51 Kd)

Los geles fueron sometidos a una preelectroforesis durante 30 min. aplicando una corriente constante de 1 mA/gel. Para el desarrollo de la electroforesis se aplicó una corriente constante de 5 mA/gel durante 90 min., hasta que el indicador de frente alcanzó el extremo terminal del gel. Fijación y tinción se realizaron de forma simultánea por inmersión en metanol:acético:agua (5:1:5) + azul de Coomassie G-250 (0.25%) durante 18 h. La decoloración se llevó a cabo mediante lavados sucesivos con metanol:acético:agua (25:7.5:75).

6.- CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA

6.1.- Sensibilidad a diferentes valores de pH.-

Alícuotas de antibiótico purificado conteniendo 200 µg de proteína/ml fueron ajustadas por adición de soluciones concentradas de HCl ó NaOH a pH 3, 5, 7, 9 y 11 e incubadas a 37°C durante 2h. Posteriormente se reajustó el pH a 7, se igualaron los volúmenes finales y se ensayó la actividad residual.

6.2.- Sensibilidad a la temperatura.-

Alícuotas de antibiótico purificado conteniendo 200 µg de proteína/ml se ajustaron a pH 7 y se incubaron en un baño a 60, 70 y 80°C durante 30 min. Seguidamente las muestras se enfriaron y se ensayaron para determinar la actividad residual.



6.3.- Análisis térmico diferencial.-

Se llevó a cabo mediante calorimetría diferencial de barrido utilizando un calorímetro DASM-1M (Privalov *et al*, 1975). La muestra ensayada (1 ml) contenía 525 μ g de proteína/ml de tampón acetato sódico 0.05 M pH 4 + NaCl 0.4 M. Este mismo tampón fue utilizado para el barrido de línea base. Para el calibrado del aparato se suministró una señal de 50 μ W de potencia durante 5' 15". La velocidad de barrido fue de 2K/min.

6.4.- Tratamientos enzimáticos y sensibilidad a otros compuestos.-

Alícuotas de una muestra purificada de AS-48, conteniendo 260 μ g de proteína/ml fueron incubadas en presencia de los siguientes enzimas y otras sustancias químicas (todos ellos de Sigma) en las condiciones a continuación indicadas:

Tripsina (0.7 mg/ml, 30 min. a 37°C, pH 7)
Proteasa (5 mg/ml, 30 min. a 37°C, pH 7)
Pronasa (5 mg/ml, 30 min. a 37°C, pH 7)
Lipasa (5 mg/ml, 30 min. a 37°C, pH 7)
Lisozima (1 mg/ml, 18h a 28°C, pH 7.8)
Neuraminidasa (1 U/ml, 60 min. a 37°C, pH 5.6)
Pectinasa (2 mg/ml, 60 min. a 37°C, pH 7)
 β -Glucosidasa (3 mg/ml, min. a 37°C, pH 7)
 β -Glucuronidasa (1000 U/ml, 60 min. a 37°C, pH 7)
Fosfatasa alcalina (0.5 mg/ml, 30 min. a 37°C, MgSO₄ 20 mM, pH 8)
DNAasa I (0.3 mg/ml, 30 min. a 37°C, MgSO₄ 20 mM, pH 7)

Cardiolipina (300 μ g/ml)
SDS (0.015%)

Urea (8 M, 60 min. a 37°C; la urea se eliminó posteriormente por cromatografía de exclusión molecular en Biogel P-6).

Tras los periodos de incubación indicados, las muestras se ensayaron para determinar su actividad residual. Para detectar el posible efecto de estos agentes sobre las células, se llevaron a cabo controles paralelos.

6.5.- Espectro de absorción.-

Se utilizó un espectrofotómetro Hitachi 100-80A de doble haz, mediante el cual se realizó un barrido entre 400 y 205 nm de longitud de onda. Como muestra problema se utilizó AS-48 purificado mediante HPLC, disuelto en bicarbonato amónico 0.025 M pH 7, solución que fue utilizada como referencia, así como para el calibrado de línea base.

6.6.- Composición en aminoácidos.-

Las fracciones purificadas mediante HPLC fueron sometidas a una hidrólisis ácida en HCl 5.6 N a 100°C durante 18h. La hidrólisis se llevó a cabo en una atmósfera de N₂ siguiendo la metodología propuesta por Jiménez y Tomas (en prensa). Una vez liofilizado, el hidrolizado fue disuelto en etanol:agua:etanolamina:PITC (Merck) (7:1:1:1) a temperatura ambiente durante 20 min.; 20 µl de esta solución fueron inyectados en un autoanalizador de aminoácidos Chromaspek K-J-180 provisto de una columna Cyano (IBM) de 25x0.45 cm. Como patrón, se inyectaron 20 µl de una solución estándar de aminoácidos conteniendo 100 pmoles/µl de cada aminoácido.

7.- PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA

7.1.- Curvas de supervivencia.-

Cultivos de la bacteria correspondiente en fase logarítmica de crecimiento fueron adicionados de la concentración adecuada de antibiótico. Se utilizaron soluciones purificadas de AS-48 obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico y posterior elución en Biogel P-6, disueltas en tampón acetato sódico 0.05 M pH 5.6 + NaCl 0.4 M, con una actividad específica de 2.5 a 2.8 UAs-47/ μ g proteína, esterilizadas por filtración; dicho tampón fue utilizado como control (tampón control). El volumen de antibiótico o tampón adicionado fue siempre inferior al 5% del volumen del cultivo.

En *S.faecalis* S-47 y *E.coli* K-12, la adición de antibiótico se efectuó cuando los cultivos alcanzaron una densidad celular entre 0.8 y 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. La evolución de los cultivos tratados de este modo con AS-48 se siguió mediante medidas turbidimétricas y recuento de células viables. Para ello, a los tiempos deseados se retiraron alícuotas de 0.5 ml de cultivo y se diluyeron en solución salina (NaCl 0.85%) estéril a 4°C. De las diluciones adecuadas se retiraron, por triplicado, alícuotas de 0.1 ml para siembra en placa. El valor medio del número de colonias crecidas tras 18-24h de incubación se utilizó para calcular el número de células viables presentes en la suspensión de partida.

7.2.- Acción de diferentes agentes físicos y químicos sobre la actividad bacteriolítica y bactericida de AS-48.-

Para determinar la influencia de la temperatura de incubación en el proceso de lisis, los cultivos fueron incubados a la temperatura deseada en presencia de antibiótico. Alternativamente se ensayó la actividad bacteriolítica de AS-48 sobre células sometidas a diferentes tratamientos térmicos; en estos casos, la incubación en presencia de AS-48 se llevó a cabo a 37°C.

Los siguientes compuestos químicos fueron adicionados, junto con el antibiótico AS-48, en diferentes condiciones de tiempo, a cultivos en fase logarítmica de crecimiento de *S.faecalis* S-47.

Los agentes ionóforos valinomicina (0.8 mM), gramicidina D (10 µM), novobiocina (0.8 mM), así como el inhibidor de ATPasa DCCD (2 mM) (todos ellos de Sigma) fueron disueltos en metanol.

Como agente quelante se utilizó EDTA (0.33 mM) (Sigma). Los cationes divalentes se ensayaron en forma de las siguientes sales: sulfato ó cloruro magnésico (2.5 mM), cloruro cálcico (2.5 mM), cloruro de manganeso (2.5 mM), sulfato ó cloruro de cinc (2.5 mM), sulfato de cobalto (1.25 mM), sulfato de cobre (1.25 mM), cloruro férrico (1.25 mM) y cloruro ferroso (1.25 mM) (todos ellos de Probus).

Como agentes inactivantes de AS-48 se utilizaron los enzimas proteolíticos pronasa B (2.5 mg/ml), proteasa (2.5 mg/ml) y tripsina (0.4 mg/ml); otros agentes utilizados fueron SDS (0.015%) y cardiolipina de corazón de buey (1.25 y 12.5 µg/ml) (todos ellos de Sigma).

7.3.- Adsorción del antibiótico sobre células y fracciones subcelulares.-

7.3.1.- Sobre células enteras.-

A partir de cultivos de *S.faecalis* S-48, *S.faecalis* S-47 y *E.coli* K-12 creciendo en fase logarítmica con una $DO_{620}=0.1$ se tomaron alícuotas de 0.5 ml, y se centrifugaron a $4.000\times g$ a $4^{\circ}C$. Las células recogidas por centrifugación se resuspendieron en 0.2 ml de tampón fosfato sódico, y se incubaron con AS-48 ($37\text{ UA}_{S-47}/\text{ml}$) a $4^{\circ}C$ durante 30 min. Como control se utilizó antibiótico disuelto en tampón a esta misma concentración. Posteriormente, las células se retiraron por centrifugación y se ensayó la actividad antibacteriana presente en los sobrenadantes.

En otro tipo de experiencias, cultivos de *S.faecalis* S-47 fueron incubados en presencia de AS-48 durante 1, 5, 10, 15 y 30 min. a $4^{\circ}C$. Así mismo se ensayó la capacidad de las células muertas por autoclavado para adsorber AS-48. Las condiciones experimentales fueron las descritas anteriormente; el tiempo de contacto fue igualmente de 30 min.

7.3.2.- Adsorción sobre paredes y membranas.-

La obtención de paredes y membranas celulares se llevó a cabo tomando como base los protocolos descritos por Kawamura y Shockman (1983) y Kobayashi *et al* (1978).

Se tomaron 100 ml de cultivo de *S.faecalis* S-47 con una $DO_{620}=0.2$ y se centrifugaron a $4.000\times g$ durante 20 min. Las células fueron resuspendidas en 10 ml de tampón fosfato sódico 0.15 M pH

7.2 y sometidas a ultrasonidos (50 wátios/ml) en frío durante 30 segs. en un emisor de ultrasonidos Branson Sonifier B-12. Las células intactas fueron retiradas por centrifugación a 4.000xg durante 20 min. El sobrenadante se dividió en cuatro alícuotas; estas se centrifugaron a 15.000xg durante 30 min., obteniéndose en el sedimento las paredes celulares. Los sobrenadantes resultantes se volvieron a centrifugar a 47.000xg durante 60 min, obteniéndose en los sedimentos las membranas celulares.

Las paredes celulares recogidas por centrifugación fueron calentadas a 70°C durante 20 min. para inactivar a los enzimas autolíticos.

Las paredes y membranas recogidas por centrifugación fueron resuspendidas en:

- 1) 200 µl de agua destilada (control)
- 2) 200 µl de agua destilada (pesos secos)
- 3) 200 µl de AS-48 (50 µg prot/ml)
- 4) 200 µl de AS-48 (50 µg prot/ml) + 0.1 mg PMSF (Sigma)

Tras 30 min. de incubación a 37°C, se volvieron a centrifugar a 47.000xg durante 60 min. Como control de sedimentación se dispuso un tubo conteniendo 200 µl de antibiótico. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en 200 µl de tampón fosfato sódico 0.075 M pH 7.2. Sedimentos y sobrenadantes se ensayaron posteriormente para determinar la actividad antibiótica residual.

La determinación de pesos secos se llevó a cabo en crisoles de porcelana vitrificada previamente tarados. La deshidratación de las muestras se consiguió en un horno a 120°C durante 24h.

7.4.- Ensayo sobre protoplastos.-

7.4.1.- Protoplastos de *S.faecalis* S-47.-

La obtención de protoplastos se realizó siguiendo la metodología descrita por Smith (1985). Cultivos en fase estacionaria fueron recogidos por centrifugación y lavados dos veces con agua destilada. Seguidamente, las células se resuspendieron en STE (Sacarosa (Merck) 25%, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, Lisozima 1 mg/ml y BSA 10 mg/ml) y se incubaron durante 1 h a 37°C, tras lo cual se volvieron a centrifugar a 3.000xg durante 20 min. El sedimento fue resuspendido en SMTB (Sacarosa 0.75M, Sulfato magnésico 20 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6). Esta suspensión, conteniendo un 70-80% de protoplastos, fue dividida en dos alícuotas. A una de ellas se le adicionó AS-48 y a la otra tampón control. Ambas suspensiones se incubaron a 37°C y se midió la evolución de su densidad óptica. A los 30 min. de incubación se retiraron alícuotas de 0.5 ml, a partir de las cuales se obtuvieron diluciones seriadas en SMTB; las diluciones adecuadas fueron sembradas en medio DM3 para la regeneración de protoplastos.

7.4.2.- Protoplastos de *E.coli* K-12.-

Para la obtención de protoplastos se siguió el procedimiento descrito por Rassoulzadegan et al (1982). La bacteria indicadora fue crecida en MMGVB hasta alcanzar la fase estacionaria. Las células de 10 ml de cultivo fueron recogidas por centrifugación y lavadas dos veces con agua destilada. Seguidamente se transfirieron a 4°C y se resuspendieron en 100 µl de TESL (Tris-HCl 50 mM pH 8, sacarosa 20% y lisozima 2 mg/ml) y se incubaron a 0°C durante 10 min. A continuación se adicionaron 50 µl de EDTA 0.25 M; la suspensión

obtenida se diluyó por adición progresiva de 1.3 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8 + sacarosa 9%. Los protoplastos fueron recogidos por centrifugación a 3.000xg durante 15 min y resuspendidos en 8 ml de SMTB. La suspensión final se dividió en dos alícuotas, a las que se adicionó AS-48 y tampón control, respectivamente. Tras sucesiva incubación a 37°C se observó la evolución de la densidad óptica de las mismas.

7.4.3.- Protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*.-

Como punto de partida se tomaron cultivos de *S.cerevisiae* 3.2 con una $DO_{620} = 0.3$. El método empleado para la obtención de protoplastos fue el descrito por Guerra *et al* (1986).

Las células fueron recogidas por centrifugación y lavadas dos veces en agua destilada. Tras el primer lavado se retiraron 0.5 ml para tratamiento con AS-48 (control células intactas). El resto de las células se volvieron a centrifugar (segundo lavado) y se resuspendieron en un volumen igual al inicial de EDTA 100 mM, MES (Sigma) 100 mM pH 6, DTT (Sigma) 5 mM y se incubaron en agitación a 28°C durante 20 min, tras lo cual se retiró una alícuota para incubar con AS-48 (células tratadas con EDTA-DTT). Seguidamente las células se centrifugaron, se lavaron con sorbitol 0.6 M, MES 20 mM pH 6, y se resuspendieron en tampón citrato-fosfato sódico 0.01 M pH 5.85 + KCl 0.6 M + DTT 5 mM + novozima 234 (Novo BioLabs) 1.6 mg/ml, incubando seguidamente en agitación a 28°C durante 30 min. Los protoplastos obtenidos se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en sorbitol 0.8 M. De aquí se tomaron dos alícuotas para incubación con AS-48 y tampón control, respectivamente, a 28°C.

Para el recuento de células viables, tanto las células intactas como las tratadas con EDTA-DTT se inocularon en placas conteniendo

medio NG. Para el recuento de protoplastos se depositaron 0.1 ml de la dilución adecuada (en sorbitol 0.8 M) sobre placas conteniendo una capa base de OYPD, sobre la cual se vertió a continuación una sobrecapa de sorbitol 0.8 M + agar al 2% mantenida en sobrefusión a 50°C.

7.5.- Incorporación de precursores marcados a macromoléculas.-

7.5.1.- Experiencias en *S.faecalis* S-47.-

Los cultivos fueron incubados en medio BHI-DTG hasta alcanzar una $DO_{620}=0.1$. En ese momento se les adicionó el precursor marcado a una concentración final de 2.5 $\mu\text{Ci/ml}$. A los 5 y 30 min. de incubación en presencia del precursor se retiraron alícuotas de 300 μl y se diluyeron en 4 ml de TCA (Probus) al 6% frío. A los 30 min. el cultivo fue dividido en dos alícuotas; a una de ellas se le adicionó AS-48 a una concentración final de 8 UAS-47/ml y a la otra un volumen equivalente de tampón control. A los 15, 30, 60, 90 y 120 min. de posterior incubación se retiraron alícuotas de 300 μl y se diluyeron sobre TCA frío. Tras dos horas de precipitación en hielo, las muestras se recogieron sobre filtros Whatman GF/C (Whatman Ltd.), y se lavaron cinco veces con 5 ml de TCA al 6% en frío. A continuación los filtros fueron secados y colocados en viales de cristal, a los que se adicionaron 10 ml de líquido de centelleo. Los viales se midieron en un contador de centelleo líquido Beckman LS70500. La eficiencia de conteo fue del 23% para el ^3H y del 85% para el ^{14}C .

El líquido de centelleo contenía, por litro de tolueno: PPO, 4 g; POPOP, 250 mg (todos ellos de Merck). Antes de usar, esta solución se sometió a agitación magnética durante 18h a 4°C en oscuridad.

En experiencias separadas se midió la tasa de incorporación de precursores marcados. Para ello, cuando los cultivos alcanzaron una $DO_{520}=0.15$ se dividieron en dos lotes: a uno de ellos se le adicionó AS-48 a la concentración final antes mencionada, y al otro un volumen equivalente de tampón control. A los tiempos deseados a partir de la adición de AS-48 se retiraron alícuotas de 300 μ l de ambos cultivos y se incubaron durante 4 min. en tubos precalentados conteniendo (6- 3 H)timidina (4.8 μ Ci/ml; actividad específica: 21 Ci/mmol), (5, 6- 3 H)uridina (2.66 μ Ci/ml; actividad específica: 48 Ci/mmol), o L-(4, 5- 3 H)leucina (4.8 μ Ci/ml; actividad específica: 120 Ci/mmol) (todos ellos de Amersham Intl. plc., Inglaterra). Transcurrido el tiempo de incubación, la incorporación se interrumpió adicionando 4 ml de TCA al 6% frío. Las muestras se dejaron precipitar en hielo durante 2h, y posteriormente fueron recogidas en filtros y procesadas como en el caso anterior.

El marcaje de pared celular se realizó siguiendo la metodología descrita por Boothby *et al* (1971). Se midió la incorporación específica de (1- 14 C)acetato a los grupos N-acetilo de los aminoazúcares presentes en la cadena de peptidoglicano (Dezelee y Shockman, 1975). Cultivos en fase logarítmica con una $DO_{520}=0.2$ fueron incubados con (1- 14 C)Acetato sódico (8 μ Ci/ml; actividad específica: 5 mCi/mmol). A los 30 min. de incubación se adicionó AS-48 (10 UAS-47/ml). A los tiempos deseados se retiraron alícuotas de 400 μ l y se diluyeron en tubos conteniendo 4 ml de TCA al 6% frío. Seguidamente los tubos se calentaron a 90°C durante 6 min. y se dejaron enfriar. Su contenido se recogió en filtros Whatman y se lavó cinco veces con 5 ml de TCA frío. A continuación los filtros se lavaron primero con 2 ml de etanol al 75% durante 10 min., y luego con 10 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M pH 8; los filtros se depositaron en tubos conteniendo 2 ml de una solución de tripsina fresca (1 mg/ml del mismo tampón fosfato sódico), y se incubaron durante 3h a 37°C, tras lo cual se volvieron a colocar en el

portafiltros conservando su orientación inicial y se lavaron sucesivamente con 4 ml de agua destilada, 2 ml de etanol puro y 2 ml de éter etílico respectivamente. Seguidamente se secaron y colocaron en viales para la determinación de la radiactividad por el procedimiento descrito anteriormente.

7.5.2.- Experiencias en *E.coli* K-12.-

La estirpe indicadora *E.coli* K-12 fue crecida en MMGVB hasta alcanzar una $DO_{620}=0.08$. En ese momento se adicionaron los precursores marcados, a las siguientes concentraciones finales: L-(4, 5- 3H)leucina: 3.42 $\mu Ci/ml$; (5, 6- 3H)uridina: 2 $\mu Ci/ml$; (6- 3H)timidina: 3.42 $\mu Ci/ml$; (DL + meso)-2, 6-Diamino (6- 3H) pimélico (meso-DAP): 3.42 $\mu Ci/ml$. A los 30 min. de incubación, cuando el cultivo alcanzó una $DO_{620}=0.1$, se dividió en dos alícuotas, a las que se adicionó AS-48 (200 UAU- g/ml) y tampón control, respectivamente. A los tiempos deseados se retiraron alícuotas de 25 μl y se diluyeron en tubos conteniendo TCA al 6% frío; a continuación se siguieron los pasos descritos en el párrafo anterior.

En el caso de la leucina se realizó una experiencia paralela en la cual las muestras fueron hervidas durante 15 min. en TCA 6%.

Para el marcaje de la pared celular, las muestras de cultivo retiradas fueron de 50 μl , en vez de 25 μl ; en este caso, la incorporación se detuvo por dilución en 4 ml de SDS al 4% en caliente. A continuación las muestras se hirvieron durante 15 min. para solubilizar todas las proteínas celulares, permaneciendo insoluble tan solo la pared celular. De esta forma se elimina la posible incorporación del meso-DAP a proteínas debida a su transformación en lisina. Finalmente las muestras se dejaron enfriar, se recogieron en filtros Whatman y se lavaron con 20 ml de SDS al

4%, tras lo cual se siguió el proceso habitual de secado y valoración de la radiactividad retenida en los filtros.

Para medir la tasa de incorporación, a cultivos creciendo en MMGVB con una $DO_{520}=0.1$ se les adicionó AS-48 a una concentración final de 200 UA_{0-9}/ml . A los tiempos deseados se retiraron alícuotas de 100 μl (500 μl para el meso-DAP) y se incubaron durante 3 min. en tubos precalentados que contenían precursores marcados a las siguientes concentraciones finales: (5, 6- 3H)uridina: 4 $\mu Ci/ml$; (6- 3H)timidina: 8 $\mu Ci/mL$; L-(4, 5- 3H)leucina: 8 $\mu Ci/ml$; y (DL + meso)-2, 6(6- 3H)DAP: 4 $\mu Ci/ml$. La incorporación se detuvo por adición de TCA al 6% en hielo, o bien SDS al 4% en caliente para el meso-DAP. Los pasos siguientes del procesado fueron los descritos para el marcaje continuo.

7.6.- Efecto del antibiótico AS-48 sobre otros parámetros celulares.-

7.6.1.- Medida del consumo celular de O_2 .-

Un mililitro de cultivo de *S.faecalis* S-47 creciendo en BHI-T con una $DO_{520}=0.1$ fue llevado a un electrodo de O_2 (Clark Oxygen Electrode, Yellow Springs Ist.) conectado a un registro (Omni Scribe Recorder, Houston Inst.). La incubación se realizó con agitación en un recipiente termostatzado a 37°C (Techne-Circulator C-100). A los 30 segundos de incubación se le adicionaron, mediante una microjeringa adosada, 20 μl de tampón acetato conteniendo 8 UA_{S-47} de AS-48.

E.coli K-12 fue crecida en MMGVB hasta alcanzar una $DO_{520}=0.1$. El proceso de medida fue idéntico al descrito. El antibiótico se adicionó a una concentración final de 200 UA_{0-9}/ml .

7.6.2.- Medida del contenido celular en Na^+ y K^+ .-

Se realizó de acuerdo con el método descrito por Upreti y Hinsdill (1975). Los cultivos de la estirpe indicadora se incubaron hasta alcanzar una $\text{DO}_{620}=0.1$. En ese momento fueron divididos en dos alícuotas: a una de ellas se le adicionó AS-48 ($8 \text{ UA}_{5-47}/\text{ml}$) y a la otra tampón control. A los tiempos correspondientes se retiraron alícuotas de 2 ml y se recogieron las células sobre filtros de Millipore ($0.45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro), que fueron lavados inmediatamente con 10 ml de sacarosa 0.25 M fría. Seguidamente las células fueron resuspendidas en 2 ml de agua bidestilada. Un mililitro de esta suspensión se retiró para determinación de pesos secos, y al otro se le adicionó ácido sulfúrico hasta una concentración final 1 M y se calentó a 100°C durante 15 min. Una vez fría, esta fracción fue centrifugada a $13.000\times g$ durante 10 min. para retirar la materia sólida residual. El sobrenadante obtenido fue diluido hasta 10 ml en agua bidestilada; su contenido en iones Na^+ y K^+ fue determinado mediante un espectrofotómetro de emisión PYE-Unicam SP-1900.

7.7.- Observación de las células tratadas con AS-48 mediante microscopía electrónica.-

Se utilizó el método descrito por Clawson y Dajani (1970) con ligeras modificaciones. Tanto las células tratadas con AS-48 como los controles fueron recogidas por centrifugación y lavadas dos veces con tampón fosfato codico 0.2 M pH 7.2. A continuación se resuspendieron en Glutaraldehído (Merck) al 2.5% en el mismo tampón, y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se recogieron por centrifugación y se lavaron tres veces con tampón fosfato durante 1 h, tras lo cual se volvieron a centrifugar. Los sedimentos se resuspendieron en OsO_4 .

(Sigma) al 1% en agua destilada, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, y se recogieron por centrifugación. La deshidratación se llevó a cabo mediante incubaciones sucesivas en soluciones de acetona (Merck) del 30 al 100%, con dos pases en óxido de propileno (Merck), previos a la inclusión en Epon 812. Para la obtención de cortes ultrafinos se utilizó un Ultramicrotomo Reichter-Jung FC4D. Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo (Merck) saturado durante 10 min. y con citrato de plomo (Merck) (1 min.). La observación de las muestras se llevó a cabo en un microscopio electrónico Zeiss 10-C.



RESULTADOS

1.- ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE EL ANTIBIOTICO AS-48

1.1.- Titulación de la actividad antibiótica.-

Cuando se ensayaron por el método de los pocillos diluciones seriadas de una solución de AS-48 parcialmente purificada, se observó una relación logarítmica entre el diámetro del halo de inhibición producido y la cantidad de antibiótico presente en la muestra ensayada, frente a las estirpes indicadoras *S.faecalis* S-47 y *E.coli* U-9. Las curvas obtenidas se muestran en la Fig. 1, y son similares en ambas bacterias. Estas curvas fueron confirmadas con muestras purificadas de antibiótico, y permiten una valoración directa del título de actividad de cualquier muestra a partir del diámetro del halo de inhibición producido sobre una capa continua estándar de la estirpe indicadora.

1.2.- Medios de producción.-

De entre todos los medios líquidos de crecimiento ensayados, el caldo Infusión de Cerebro-Corazón (BHI-T) fue en principio el más adecuado para la producción de AS-48. Sin embargo, el alto porcentaje en digeridos proteicos de este medio interfería de forma considerable en el proceso de purificación, por lo que se consideró necesario modificar la concentración de estos nutrientes en el medio, sustituyéndolos en parte por otros como la glucosa.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la influencia de la glucosa en los medios de producción. Tanto en BHI como en el medio complejo MC, la concentración óptima fue del 1%, mientras que concentraciones superiores llegaron a inhibir la producción. Así mismo, la adición de MgSO_4 a medios conteniendo glucosa favoreció la producción de forma significativa.

El medio complejo MC fue diseñado para obtener la máxima actividad antibacteriana suministrando cantidades mínimas de nutrientes. Un punto importante en este sentido fue el satisfacer la variedad de requerimientos nutricionales de los estreptococos, principalmente en lo referente a cofactores, mediante adición de preparados ricos en vitaminas, como el YNB.

Así mismo se intentó sustituir el BHI por otras peptonas, sin conseguir en ningún caso niveles de producción equivalentes a los obtenidos cuando dicho medio complejo era suplementado con BHI, aún a concentraciones del 0.1%. El medio que mejores perspectivas ofrecía no obstante, de cara a la purificación de AS-48, fue el medio mínimo MM, debido fundamentalmente a la naturaleza dializable de absolutamente todos sus componentes. Sin embargo, este medio fue desestimado debido al mayor coste y laboriosidad de su preparación, así como a su menor rendimiento en cuanto a actividad antibacteriana, seleccionándose, por tanto, el medio MC para la producción y purificación de AS-48.

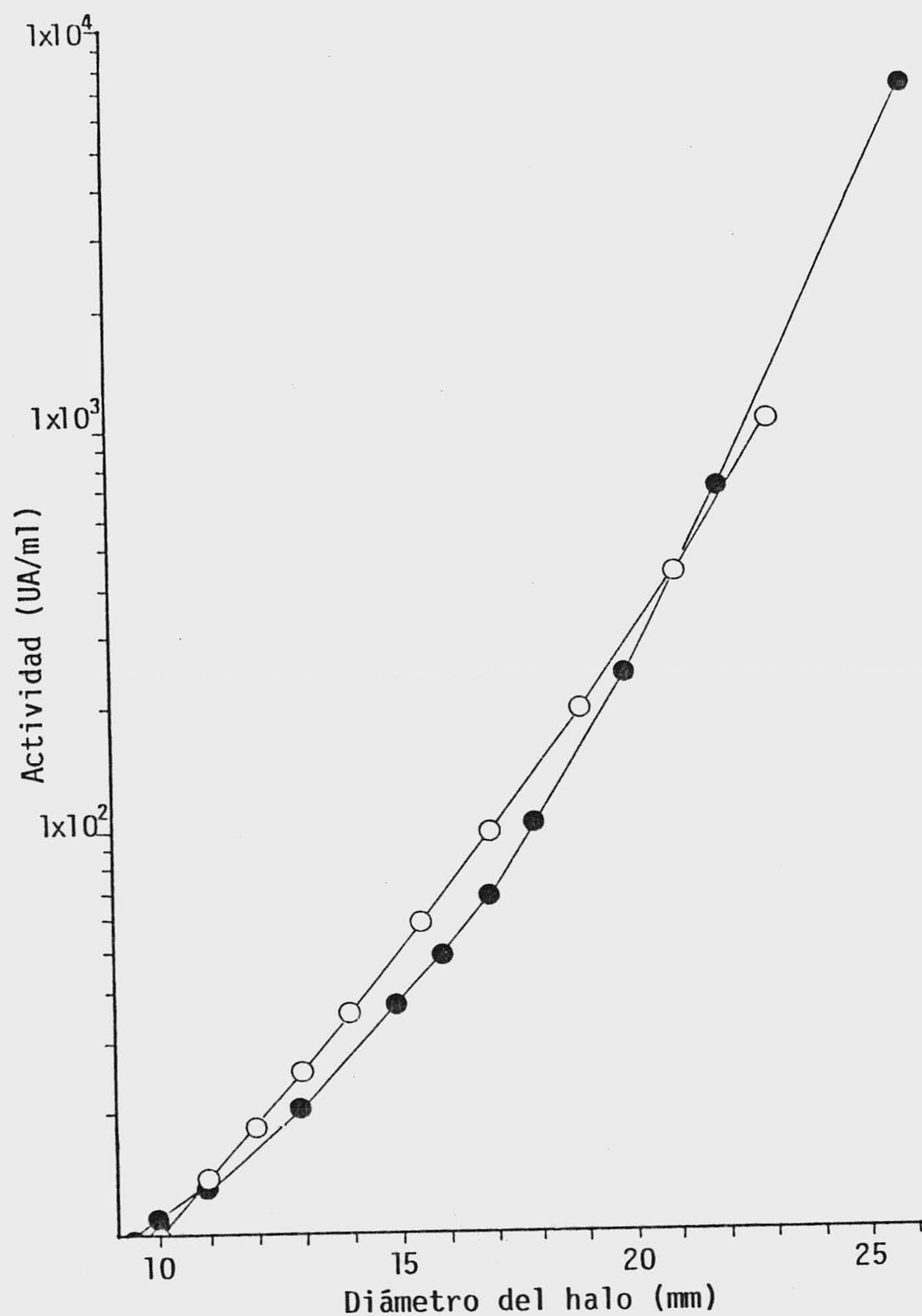


Fig. 1.- Curvas de titulación de AS-48 frente a las estirpes indicadoras *S. faecalis* S-47 (símbolos en negro) y *E. coli* U-9 (símbolos en blanco).

RESULTADOS

Tabla 1.- Producción de AS-48 en diversos medios de cultivo. Tras 8h de incubación, los sobrenadantes fueron concentrados a 1/5 de su volumen inicial y ensayados por la técnica de los pocillos.

Medio de crecimiento	Actividad	
	UAS-47/mL	UAU-9/ml
BHI	70	17
BHI + Glucosa 1%	100	30
BHI/2 + Glucosa 1%	70	19
BHI/2 + Glucosa 2%	37	12
MC	100	30
MC (Sin glucosa)	27	0
MC (Glucosa 0.2%)	50	10
MC (Glucosa 0.4%)	50	10
MC (Glucosa 0.8%)	70	15
MC (Glucosa 1%)	100	30
MC (Glucosa 2%)	100	30
MC (Glucosa 4%)	70	15
MC (Sin Sulfato magnésico)	70	15
MC (Sin BHI; + Casitone 0.1%)	50	14
MC (" " ; + Phytone 0.1%)	18	0
MC (" " ; + Peptona soja 0.1%)	50	14
MC (" " ; + Peptona carne 0.1%)	17	0
MC (" " ; + Triptona 0.1%)	37	10
Casitone 5% + YNB 0.14% + Glucosa 1%	30	10
Extracto levadura 1% + Glucosa 1%	11	0
MM	85	26

1.3.- Cinética de producción.

En la Fig. 2 se muestra la curva de crecimiento de la estirpe productora *S.faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 en medio MC. Simultáneamente se representa la cinética de producción de actividad antibacteriana frente a las estirpes indicadoras *S.faecalis* subsp. *liquefaciens* S-47 y *E.coli* U-9.

La actividad inhibidora frente a S-47 comenzó a detectarse a partir de las 3h de incubación, alcanzando un máximo a las 8h, seguido de un ligero descenso en horas posteriores. Esta pérdida de actividad no fue contrarrestada cuando se adicionaron inhibidores de proteasas como el PMSF (2 mM).

Por otra parte, no se detectó pérdida de actividad alguna cuando los sobrenadantes exentos de células fueron reincubados a 37°C, ni cuando fueron mezclados con sobrenadantes de cultivos incubados durante 9-10h, por lo que fue considerada improbable la liberación de un inhibidor.

La actividad inhibidora frente a *E.coli* fue detectada más tardíamente, y siguió una cinética similar a la de S-47. Dicho retraso no puede ser considerado real, sino debido a la mayor concentración de antibiótico requerida por esta bacteria para su inhibición.

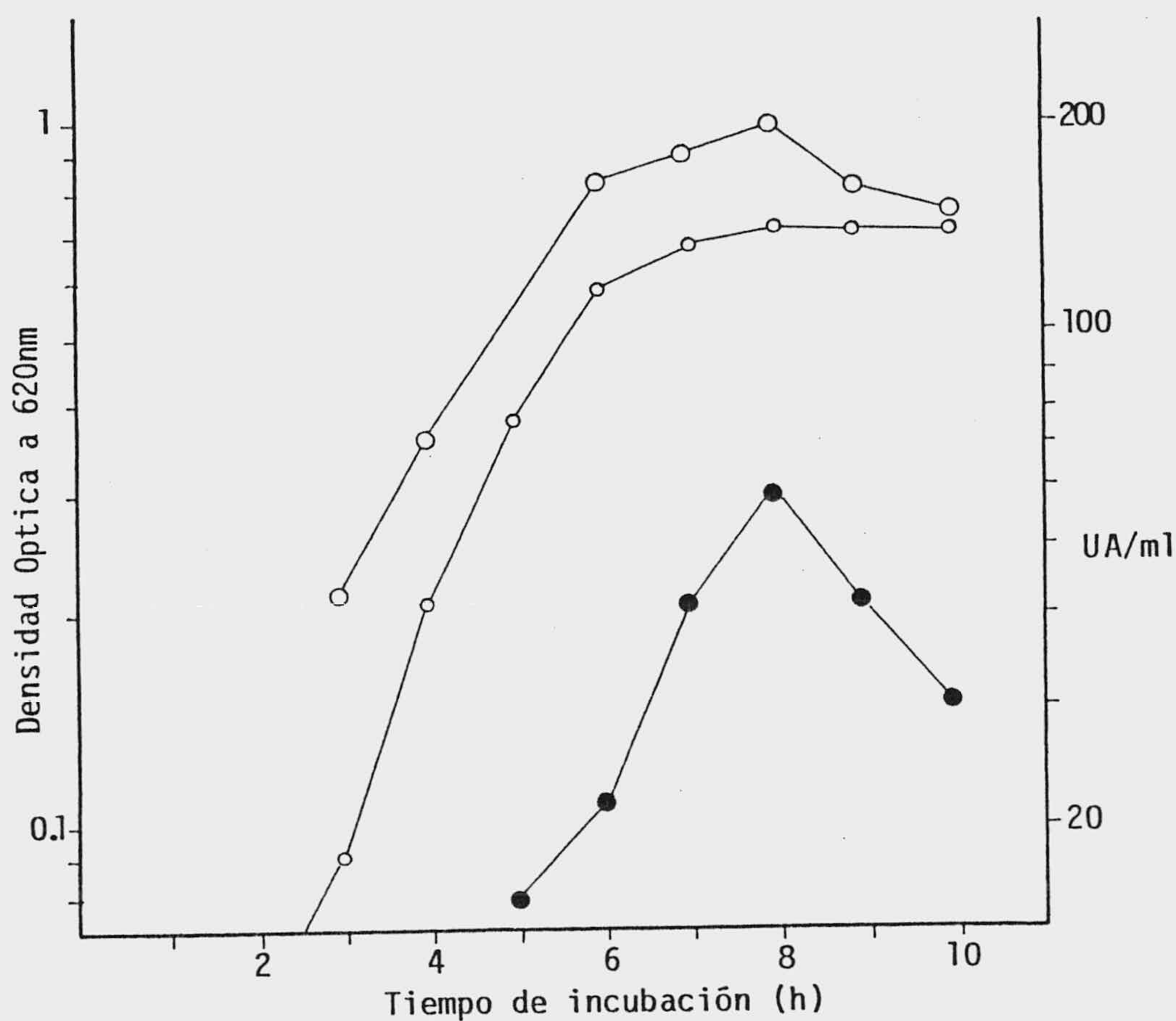


Fig. 2.- Curvas de crecimiento (o—o) y producción de AS-48 frente a *S. faecalis* S-47 (O—O) y *E. coli* U-9 (●—●) en medio complejo MC. Los sobrenadantes fueron concentrados a 1/10 de su volumen inicial y ensayados por la técnica de los pocillos.

2.- PURIFICACION

2.1.- Condiciones de crecimiento de la bacteria productora.-

De acuerdo con los datos expuestos en apartados anteriores, la producción de antibiótico se llevó a cabo en medio MC, inoculado al 4% con un cultivo en fase estacionaria crecido en este mismo medio a 37°C en reposo. Tras 8h de incubación, las células fueron retiradas por centrifugación a 7.000xg durante 15 min. y los sobrenadantes se conservaron a -20°C ó -70°C hasta su procesamiento.

2.2.- Determinación de la carga neta a pH neutro.-

Sobre pocillos excavados en una placa de electroforesis preparada para revelado biológico (Métodos, 5.5.1) se colocaron 200 µl de sobrenadantes de cultivo concentrados 200 veces cuyo pH había sido ajustado a neutralidad. La placa fue sometida a un campo eléctrico y cubierta posteriormente con la estirpe sensible adecuada, observándose tras su crecimiento un desplazamiento del halo de inhibición hacia el polo negativo, tanto en el caso de la estirpe indicadora S-47 como en U-9 (Fig. 3).

Este resultado indicaba la carga neta positiva de AS-48 a pH neutro. Idénticos resultados se obtuvieron cuando la experiencia se realizó a pH 8.5, si bien el halo de inhibición obtenido fue mucho menor, debido a la inactivación parcial de AS-48 a dicho pH.

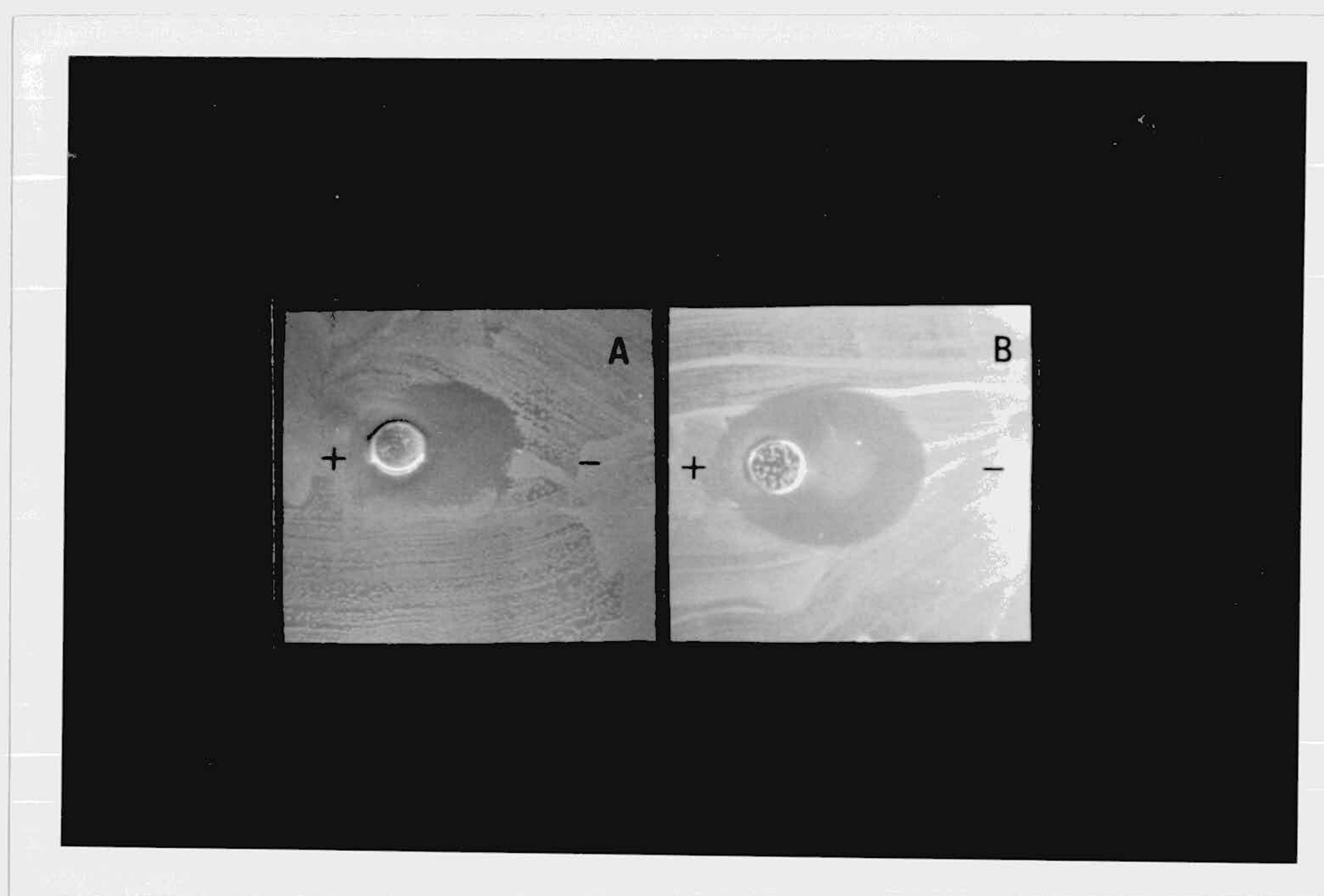


Fig. 3.- Determinación de la carga neta de AS-48 a pH neutro. Tras ser sometido a una electroforesis y posterior revelado biológico, el halo de inhibición, tanto en *E.coli* U-9 (A) como en *S.faecalis* S-47 (B), apareció desplazado hacia el polo negativo, indicando por tanto la carga positiva de AS-48 a dicho pH.

2.3.- Cromatografía de intercambio iónico.-

Se realizó a partir de los sobrenadantes de los cultivos de la estirpe S-48, según se describe en Métodos (5.1). Para ello se mezclaron en baño 54 l de sobrenadante con 2.750 ml de Carboximetil-Sephadex CM-25 previamente equilibrado a baja fuerza iónica. Una vez realizada la adsorción, el gel fue montado en una columna de vidrio y lavado con 4 l de tampón fosfato sódico 0.02 M pH 6.2 para eliminar los restos de medio de cultivo no adsorbidos. Para la elución del antibiótico se aplicó un gradiente continuo de NaCl entre 0 y 2 M (Fig. 4), a un flujo de 300 ml/h. A la salida de la columna se recogieron fracciones de volumen variable para ensayo de su actividad antibacteriana.

El antibiótico quedó fuertemente retenido en el gel, eluyendo a una concentración de NaCl cercana a 1 M. Tras este paso de purificación se obtuvo una recuperación próxima al 80% (Tabla 2), con un aumento significativo de actividad específica (de 0.066 $U_{S-47}/\mu g$ proteína y 0.015 $U_{A_{0-9}}/\mu g$ proteína en el extracto inicial a 2.5 $U_{S-47}/\mu g$ proteína y 0.63 $U_{A_{0-9}}/\mu g$ proteína en las fracciones más puras, respectivamente), que supone un factor de purificación de 38 y 39 con respecto al extracto inicial.

Así mismo, la mayor parte del antibiótico recuperado quedó recogido en un volumen 1/50 respecto del inicial, a la vez que se obtuvieron fracciones con altos títulos de actividad antibacteriana.

Cabe también comentar que los componentes coloreados del medio de cultivo quedaron prácticamente eliminados en este paso.

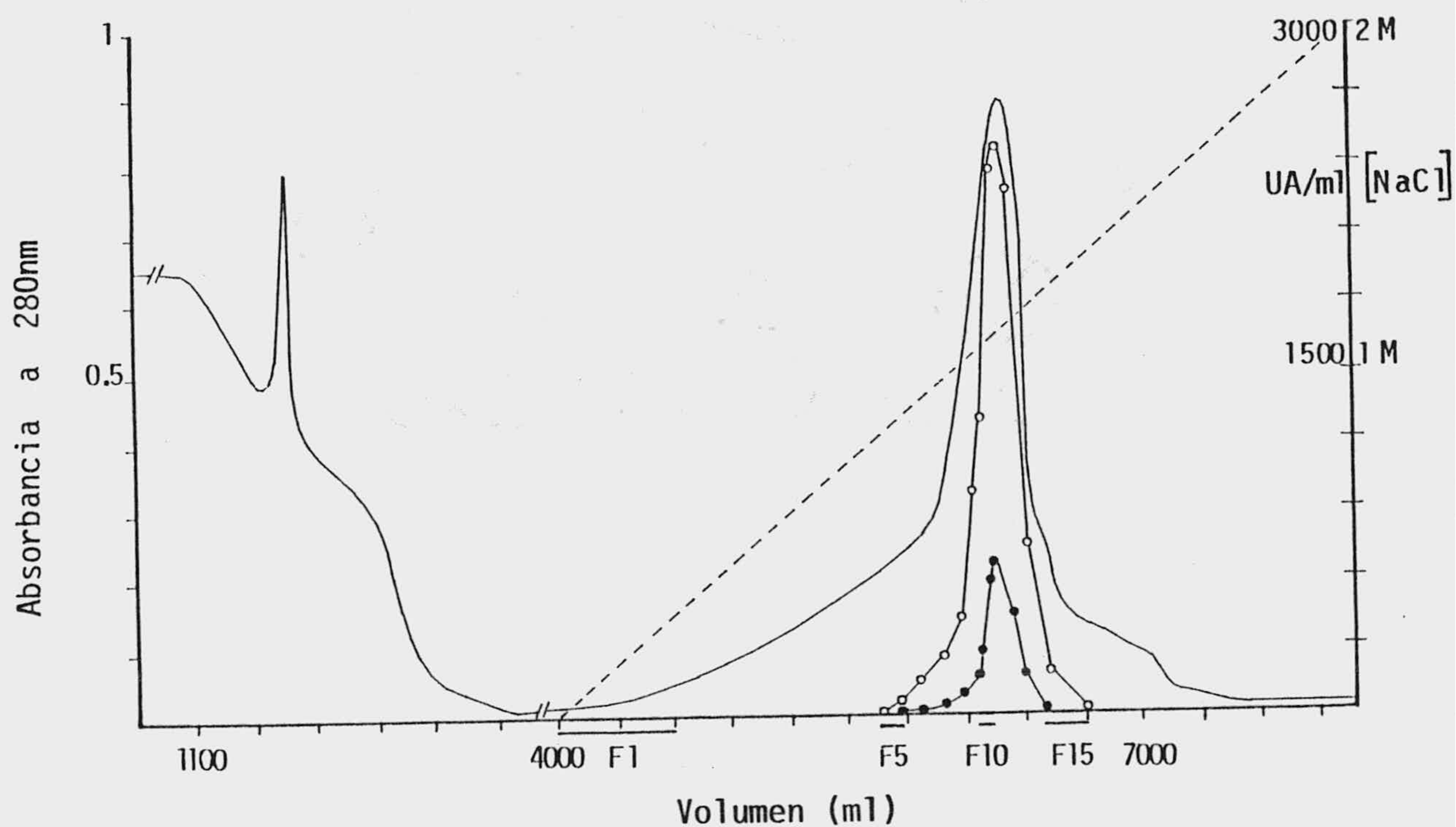


Fig. 4.- Cromatografía de intercambio iónico en Sephadex CM-25 de los sobrenadantes de un cultivo de S-48 en MC; 54 l de sobrenadante fueron mezclados con 2.750 ml de gel. La elución se llevó a cabo en una columna de 6 x 120 cm en T. fosfato sódico 0.02 M pH 6.2 con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 2 M (----), a un flujo de 300 ml/h. Absorbancia a 280 nm (—); actividad antibacteriana frente a *S. faecalis* S-47 (o—o) y *E. coli* U-9 (●—●).

RESULTADOS

Tabla 2.- Purificación de AS-48 mediante cromatografía en Carboximetil-Sephadex CM-25.

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (μ g/ml)	UA/ml		Act. específica	
			S-47	U-9	S-47	U-9
3	510	40	-	-	-	-
4	300	94	37	10	0.39	0.10
5	158	113	105	32	0.92	0.28
6	120	128	200	52	1.56	0.40
7	180	196	250	72	1.27	0.36
8	59	405	440	120	1.08	0.29
9	150	660	1000	300	1.51	0.45
10	48	740	1320	300	1.78	0.40
11	98	950	2400	600	2.52	0.63
12	108	960	2300	450	2.39	0.46
13	75	500	750	170	1.50	0.34
14	95	160	160	35	1.00	0.21
15	97	132	14	-	0.10	-
E. crudo	54.000	314	21	5	0.066	0.015
Lavado CM-25	"	298	-	-	-	-

UA totales

	UA totales		% Recup.	Factor purificación
	E. crudo	CM-25		
S-47	1134.000	892.369	78.69	38.18
U-9	270.000	217.211	80.45	39.56

2.4.- Cromatografía de exclusión molecular.-

Las fracciones activas obtenidas mediante intercambio iónico, bien directamente o bien concentradas mediante ultrafiltración o por evaporación a vacío, fueron cromatografiadas en columnas de Biogel P-6, obteniéndose perfiles de elución como el que se muestra en la Fig 5. Si bien todas las fracciones obtenidas mediante intercambio iónico presentaron un único pico activo en idéntica posición tras la cromatografía en Biogel P-6, las primeras fracciones eluidas de CM-25 presentaron una mayor contaminación que se tradujo en un aumento de los picos no activos en Biogel P-6.

Tanto la actividad antibacteriana frente a *S.faecalis* S-47 como frente a *E.coli* U-9 eluyeron en un solo pico bien definido; este pico era mayoritario en el cromatograma, indicando el alto grado de purificación obtenido mediante el intercambio iónico. De ahí que el aumento de actividad específica y por tanto el factor de purificación (1.2) obtenidos no fueran muy elevados (Tabla 3).

Las fracciones activas obtenidas en Biogel P-6 fueron recromatografiadas en idénticas condiciones (Fig. 6), volviéndose a obtener un pico idéntico, con un factor de purificación de 1.05 con respecto al pase anterior (Tabla 4). En ambos pases se recuperó alrededor del 70% de la actividad presente en la muestra aplicada. La simetría de este pico en cuanto a su DO_{280} y actividad biológica apuntan hacia un alto grado de pureza para la fracción activa así obtenida. Por todo ello se consideró que las fracciones obtenidas mediante CM-25 y posterior elución en Biogel P-6 poseían un grado de pureza suficiente como para ser utilizadas en los estudios posteriores de actividad biológica.

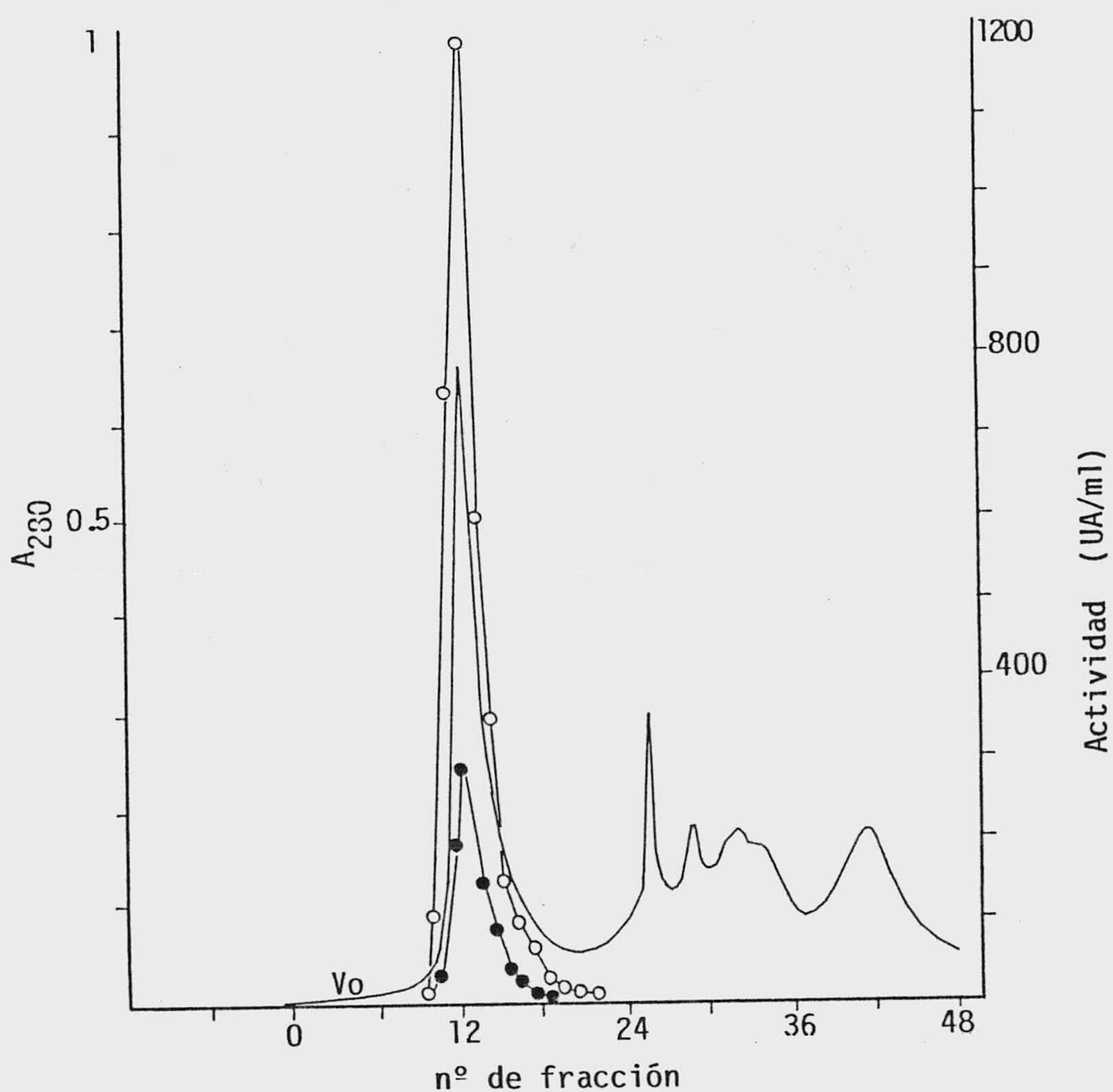


Fig. 5.- Perfil de elución de las fracciones más activas procedentes de CM-25 en una columna de Biogel P-6 (2.5 x 40 cm); como eluyente se utilizó T. acetato sódico 0.05 M pH 5.6 + NaCl 0.4 M a un flujo de 30 ml/h. Absorbancia a 280 nm (—); actividad antibacteriana frente a *S. faecalis* S-47 (o—o) y *E. coli* U-9 (●—●).

RESULTADOS

Tabla 3.- Purificación de AS-48 mediante cromatografía en Biogel P-6.

Fracción	Proteína ($\mu\text{g/ml}$)	UA/ml		Activ. específica	
		S-47	U-9	S-47	U-9
10	40	105	30	2.62	0.75
11	280	750	200	2.67	0.71
12	395	1200	300	3.03	0.75
13	206	600	150	2.91	0.74
14	126	350	90	2.80	0.71
15	59	160	43	2.71	0.72
16	40	105	30	2.62	0.75
17	26	70	19	2.69	0.73
18	12	28	9	2.33	0.75
19	7	17	-	2.50	-
20	5	13	-	2.70	-
21	4	10	-	2.50	-
CM-25	950	2400	600	2.52	0.63

UA totales

	CM-25	Biogel P-6	% Recup.	F. purificación
S-47	21600	17045	78.91	1.2
U-9	5400	4355	80.00	1.1

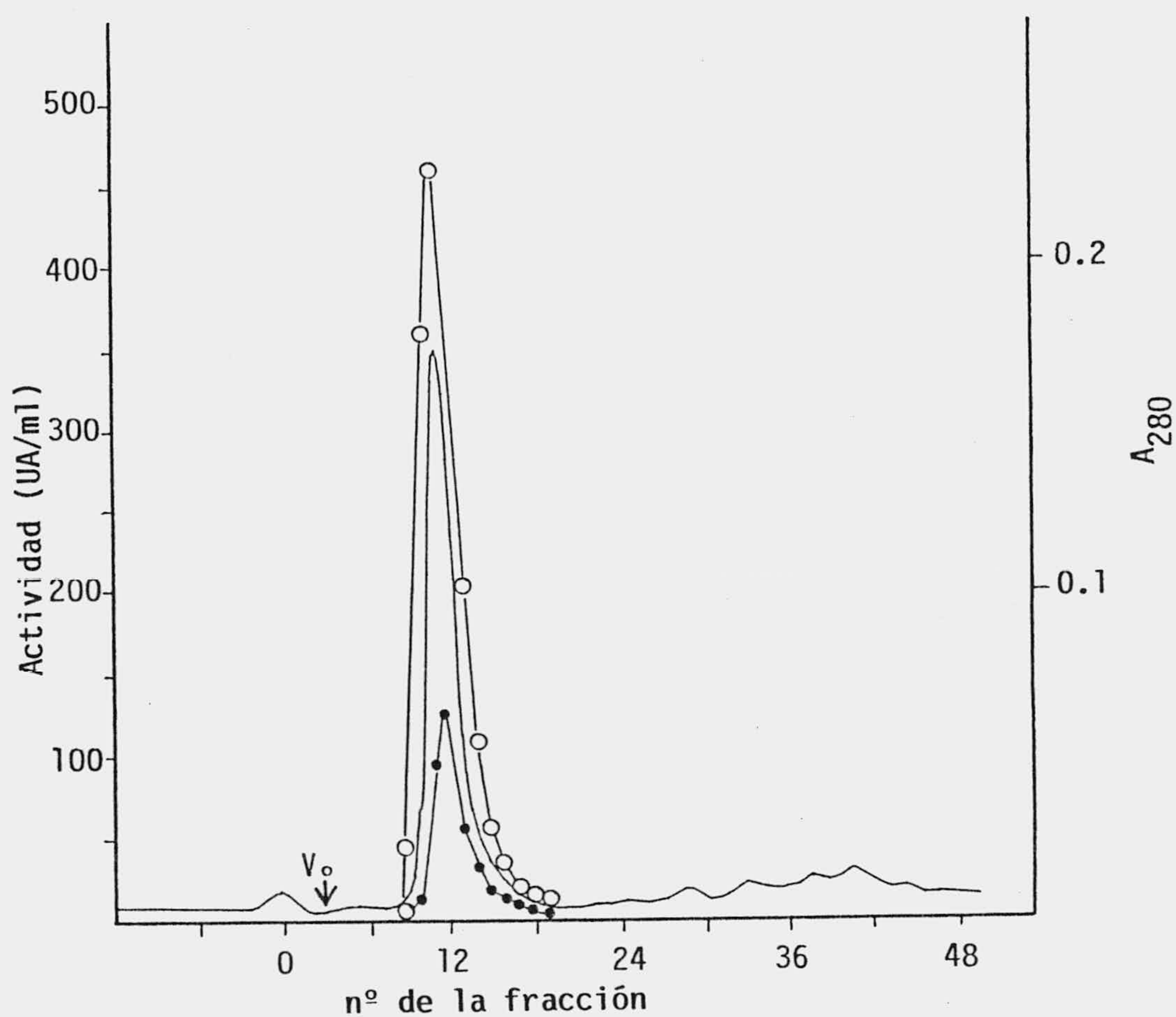


Fig. 6.- Segunda cromatografía en Biogel P-6 de las fracciones activas obtenidas tras cromatografía en este mismo tipo de gel. Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la Fig. 5. Absorbancia a 280 nm (—); actividad antibacteriana frente a *S. faecalis* S-47 (o—o) y *E. coli* U-9 (●—●).

Tabla 4.- Segundo paso de AS-48 a través de Biogel P-6.

Fracción	Proteína ($\mu\text{g/ml}$)	UA/ml		Activ. específica	
		S-47	U-9	S-47	U-9
10	12	37	10	3.08	0.83
11	110	350	90	3.18	0.81
12	140	450	120	3.20	0.85
13	64	200	50	3.12	0.78
14	34	105	27	3.08	0.79
15	17	50	14	2.94	0.82
16	12	37	10	3.08	0.83
17	7	21	-	3.00	-
18	6	17	-	2.83	-
19	4	10	-	2.50	-
P-6 (I)	325	975	250	3.03	0.75

UA totales

	P-6 (I)	P-6 (II)	% Recup.	F.purif. P-6(I)/P-6(II)	F.purif. final (*)
S-47	8775	6385	72.76	1.05	48.48
U-9	2250	1605	71.30	1.13	56.66

(*): Act. específica extracto crudo inicial/ Act. específica P-6(II).

2.5.- Intercambio iónico con gradiente de pH.-

Con objeto de comprobar la homogeneidad de las fracciones purificadas mediante filtración en Biogel P-6 se realizó un nuevo paso por CM-25 utilizando esta vez un gradiente de pH para la elución, tal como se describe en Métodos 5.2. Para ello se adsorbieron 200 μ g de proteína purificada sobre una columna rellena con Carboximetil Sephadex CM-25; la columna fue eluída con un gradiente continuo de pH entre 6.5 y 8.5 (Fig 7). La elución del antibiótico tuvo lugar a un pH de 7.75; se obtuvo un solo pico muy bien definido, con una actividad específica de 3.29 para S-47 y 0.80 para U-9. Cabe señalar que cuando se utilizaron tampones con una molaridad inferior a 0.2 M el antibiótico quedó retenido en el gel.

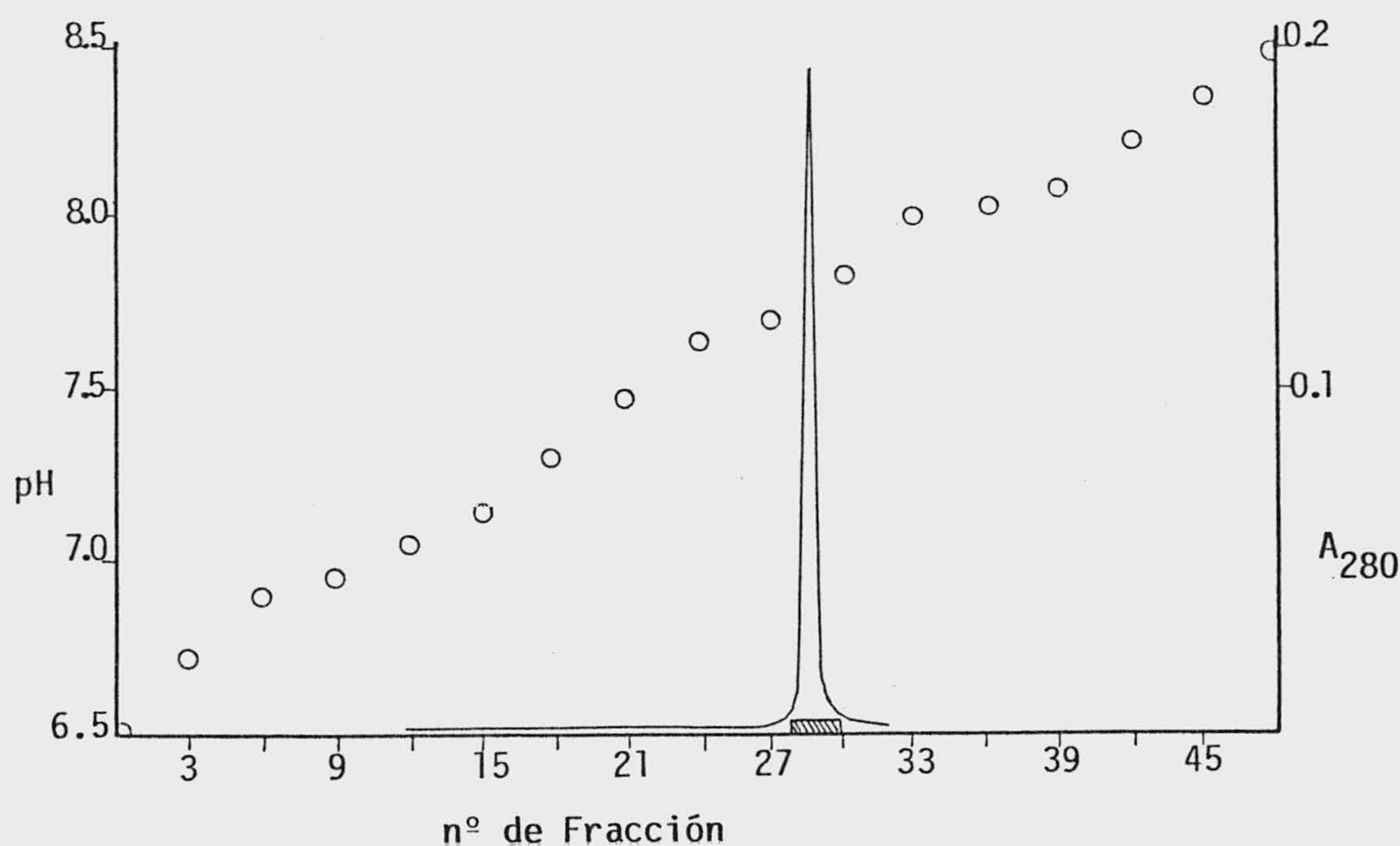


Fig. 7.- Perfil de elución en CM-25 de las fracciones parcialmente purificadas de AS-48, tras aplicar un gradiente de pH entre 6.5 y 8.5 (O O); absorbancia a 280 nm (—); actividad antibacteriana (///).

2.6.- Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC).-

Cuando se abordó el último paso en la purificación de AS-48 mediante cromatografía en fase reversa utilizando columnas C-18 se observó una fortísima retención del antibiótico en las mismas, sin que se consiguiesen obtener resultados reproducibles. Ello planteó la necesidad de utilizar columnas con un menor poder de retención, como las de tipo C-8 y C-4.

Las fracciones purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico y posterior filtración en Biogel P-6 fueron eluidas en una columna de fase reversa C-4 aplicando un gradiente de isopropanol: acetonitrilo (2:1), obteniéndose en el cromatograma un pico predominante y bien definido, lo que por una parte indicaba el alto grado de pureza del material de partida, y por otra, ponía de manifiesto la homogeneidad de la fracción obtenida tras este paso.

En la Fig. 8 se muestra el perfil de elución obtenido. Las distintas fracciones recogidas fueron liofilizadas y resuspendidas en bicarbonato amónico 0.025 M. Solo se detectó actividad antibacteriana en la fracción nº 10, con una actividad específica de 3.46 (S-47) y 0.85 (U-9); estos valores representarían un factor de purificación de 1.14 con respecto a las fracciones de entrada; con referencia a los extractos de partida utilizados en este proceso de purificación, el aumento en la actividad específica total sería de 52.4 (S-47) y 56.6 (U-9). Las diferencias entre ambos factores de purificación no son significativas, y estarían dentro del margen de error cometido en la valoración de la actividad.

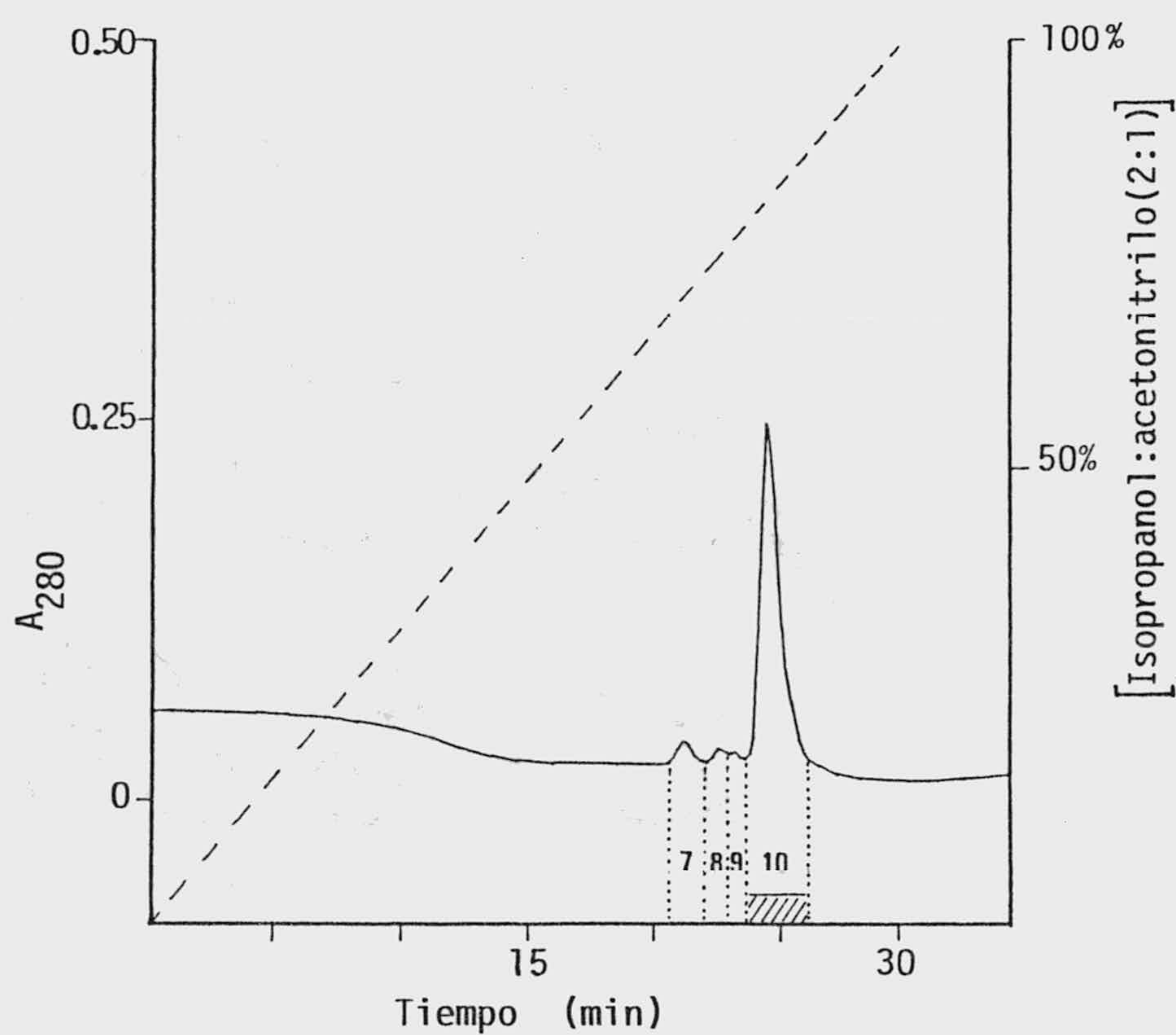


Fig. 8.- Purificación de AS-48 mediante cromatografía de fase reversa. Se utilizó una columna C-4 de 0.4 x 2.5 cm; la elución se llevó a cabo en TFA 10 mM con un gradiente del 0 al 100% de isopropanol:acetonitrilo (2:1) (---), a un flujo de 0.2 ml/min.. Absorbancia a 280 nm (—); actividad antibacteriana (////).

2.7.- Electroforesis.-

La pureza de las fracciones obtenidas por filtración en HPLC fue comprobada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente del 3 al 27%. Tras la electroforesis apareció una sola banda de proteína, localizada hacia el extremo terminal del gel (Fig. 9). El revelado se efectuó mediante tinción con plata en condiciones que permitían la detección de 1 ng de proteína/mm. Cuando el gel fue cargado con 400 ng de AS-48 no se detectó ninguna contaminación apreciable (Fig. 9), lo que indicaría por tanto una pureza cercana al 99.75% para dicha muestra.

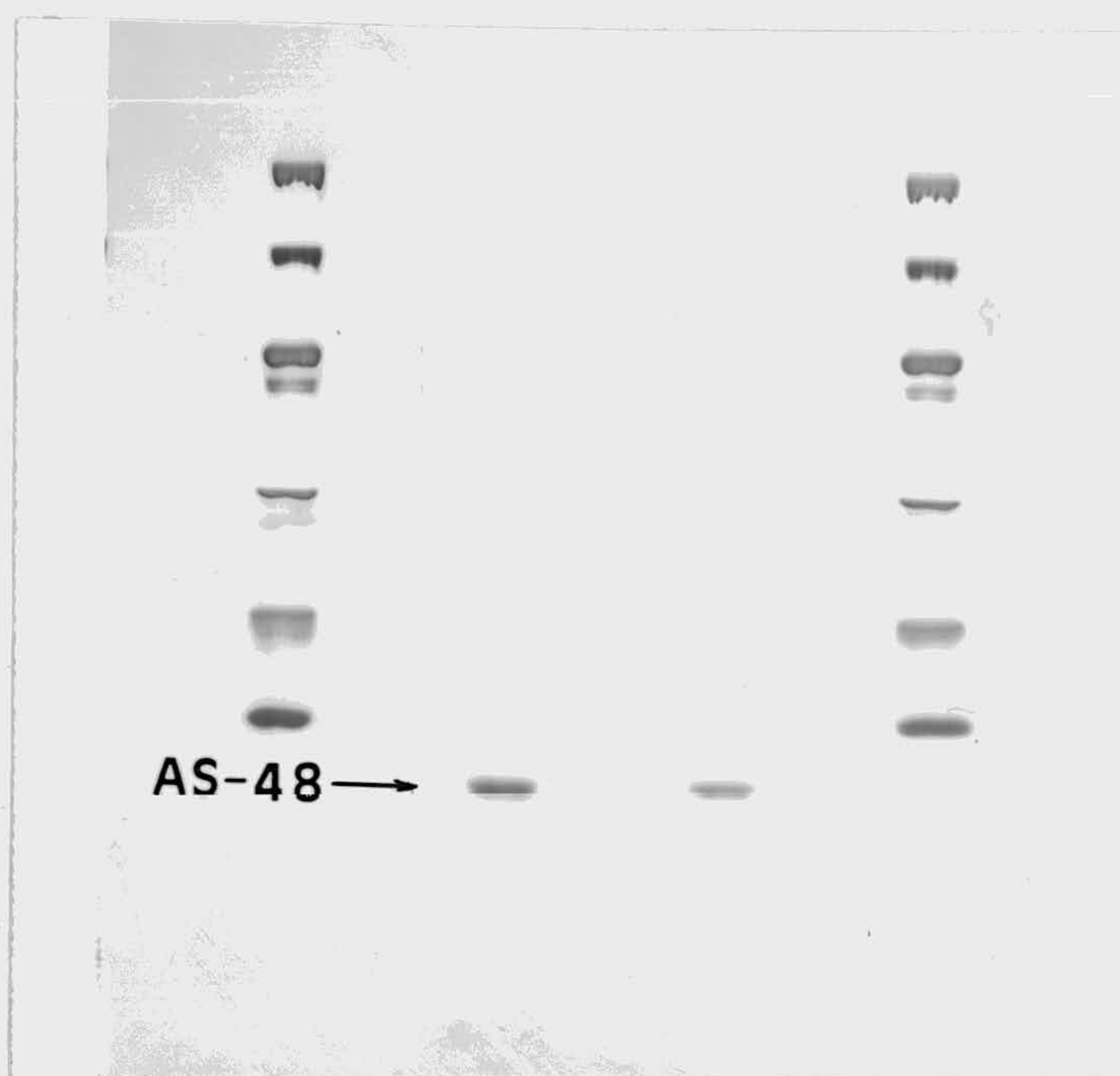


Fig. 9.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (del 3 al 27%) de la fracción activa repurificada mediante RP-HPLC. Los patrones de peso molecular utilizados fueron: fosfolipasa b (94 Kd), albúmina bovina sérica (67 Kd), ovalbúmina (43 Kd), anhidrasa carbónica (30 Kd), inhibidor de tripsina (soja) (20 Kd) y α -lactalbúmina (14.4 Kd).

RESULTADOS

A partir de la recta de regresión obtenida mediante los patrones de peso molecular utilizados cabría estimar un peso molecular de 11.34 Kd para AS-48 (Fig. 10). Este tamaño molecular sería, como veremos a continuación, bastante superior al real; esto sería perfectamente explicable, ya que la banda correspondiente a AS-48 detectada en el gel apareció fuera del rango de resolución del juego de patrones empleado.

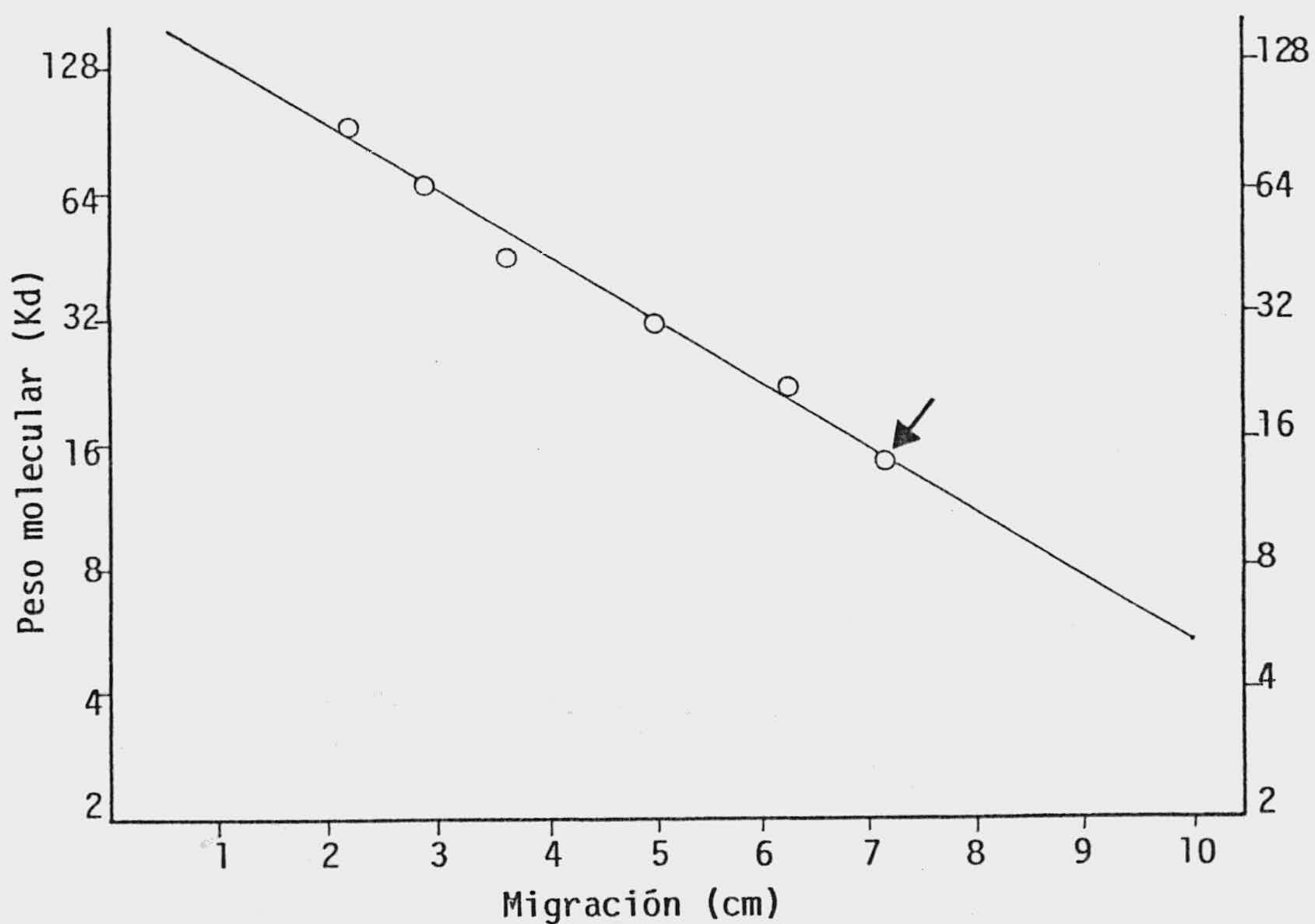


Fig. 10.- Recta de regresión de los patrones empleados en la electroforesis en gradiente del 3 al 27%. Dichos patrones fueron descritos en la Fig. 9. La flecha indica la posición de AS-48.

3.- CARACTERIZACION DEL ANTIBIOTICO AS-48

3.1.- Composición en aminoácidos.-

Una vez confirmada mediante electroforesis la homogeneidad de la fracción repurificada por HPLC se procedió a determinar su contenido en aminoácidos mediante hidrólisis ácida.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. Como patrón se utilizó una mezcla conteniendo 2.000 pmoles de cada aminoácido. La cantidad de hidrolizado de la muestra problema se obtuvo a partir de las áreas de los picos obtenidos en comparación con las del patrón. Como unidad base para el cálculo estequiométrico se tomó la de 290 pmoles de hidrolizado. El número mínimo de aminoácidos por molécula de AS-48 sería de 65, lo que supone un peso molecular mínimo de 7.63 Kd; este valor debería ser corregido para el triptófano, que se destruye en la hidrólisis.

En dicha composición cabría destacar:

- un 49.2% de aminoácidos con restos apolares (Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu, Phe)
- aproximadamente un 30% de aminoácidos con restos polares sin carga a pH neutro (Ser, Gly, Thr y Tyr)
- la presencia de aminoácidos básicos como la lisina (8 restos por molécula) y la arginina (2)
- la ausencia de cisteína
- la presencia de aminoácidos que inestabilizan la configuración en α -hélice (Asp, Glu, Ser, Gly, Arg, Thr, Pro, Ile, Lys), lo que supone un 58.4% del total; entre ellos se incluye la prolina, molécula que rompe la estructura en α -hélice. Estos datos hacen suponer la carencia de una estructura plegada compleja en la molécula de AS-48.

Tabla 5.- Composición en aminoácidos del antibiótico AS-48.

Aminoácido	Patrón	AS-48			
	Area	Area	pmoles hidrol.	N° restos	
Aspártico	456066	66298	290.7386	1.00	(1)
Glutámico	441697	247128	1118.9933	3.86	(4)
Serina	365998	210595	1150.7986	3.97	(4)
Glicina	451540	615165	2724.7240	9.40	(9)
Histidina	359583	-----	-----	-----	-----
Arginina	406391	127966	629.7679	2.17	(2)
Treonina	331504	167222	1008.8687	3.48	(4)
Alanina	402012	692971	3447.5140	11.88	(12)
Prolina	483807	53748	222.1878	0.77	(1)
Tirosina	475589	73877	310.6758	1.07	(1)
Valina	510754	472756	1851.2082	6.38	(6)
Metionina	435713	22913	105.1747	0.36	(1)
Cisteína	175727	-----	-----	-----	-----
Isoleucina	483862	356022	1471.5849	5.07	(5)
Leucina	500664	400823	1601.1657	5.52	(6)
Fenilalanina	480690	67894	282.4856	0.97	(1)
Lisina	895130	942625	2106.1187	7.76	(8)
Total			18322.0245		65

3.2.- Espectro de absorción.-

Cuando se examinó el espectro de absorción de las fracciones de AS-48 repurificadas a homogeneidad mediante HPLC se obtuvo un máximo de absorbancia entre 205-210 nm (Fig. 11), típico de los enlaces peptídicos, y una absorbancia bastante más baja comparativamente, a 280 nm, relacionada con el bajo contenido en aminoácidos aromáticos, lo que concuerda con el aminograma, en el que solo se detectó un resto de fenilalanina y uno de tirosina. Cabría suponer también la presencia de algún resto de triptófano, según sugiere el pequeño bache de absorción detectado a 288 nm y la fuerte absorción a 220 nm.

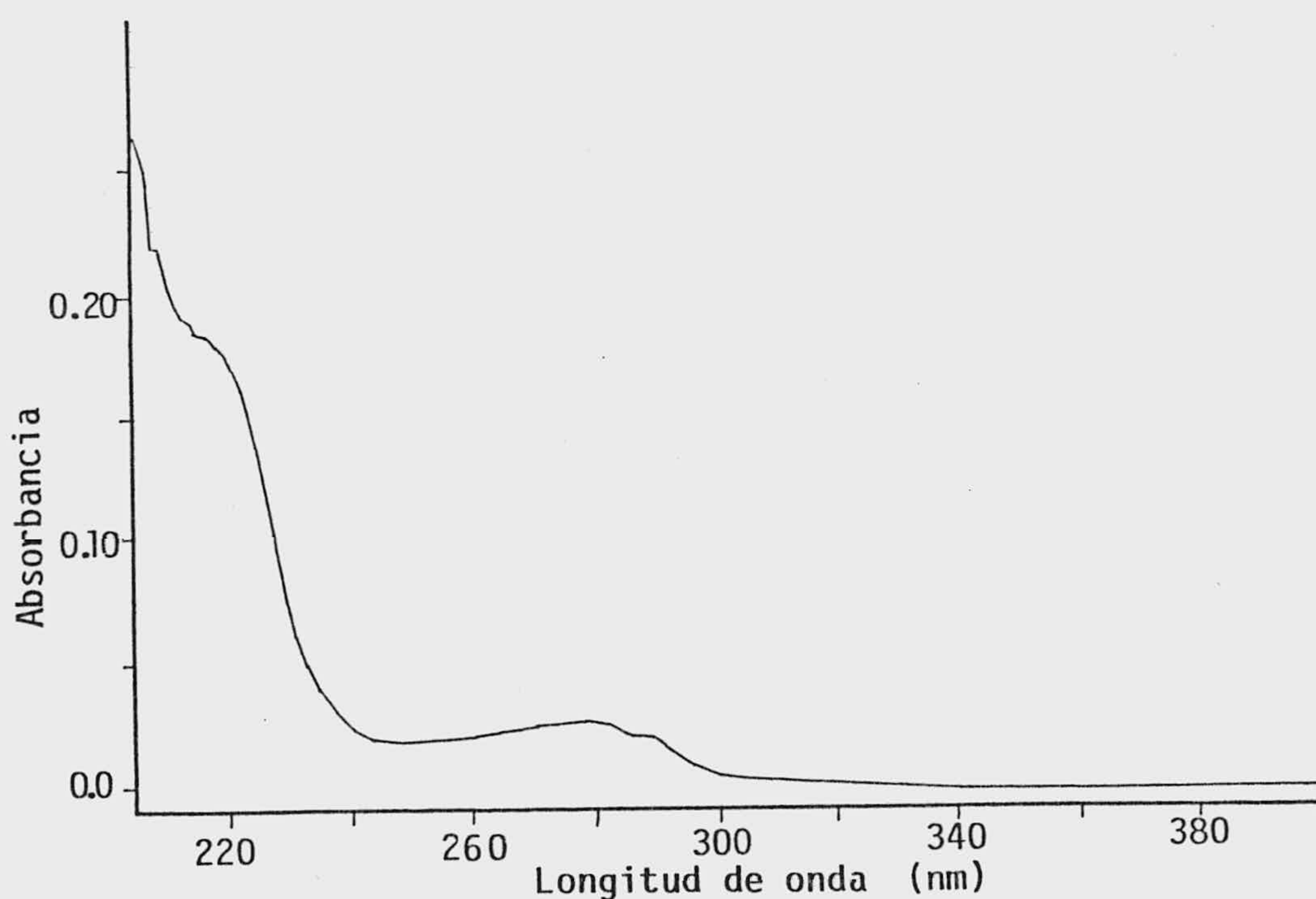


Fig. 11.- Espectro de absorción de AS-48. Se realizó un barrido de longitud de onda entre 400 y 205 nm.

3.3.- Aproximación al tamaño molecular.-

3.3.1.- Mediante cromatografía de exclusión molecular.-

Los primeros datos disponibles sobre el tamaño de AS-48 apuntaban hacia un peso molecular próximo a 2.000 d. Estos datos fueron obtenidos a partir del perfil de elución de AS-48 en columnas de Biogel P-6 utilizando un tampón de baja concentración iónica. En estas condiciones se obtenía una recuperación muy baja en relación a la muestra aplicada, lo que hizo pensar en una posible interacción de AS-48 con la matriz del gel.

Para confirmar este punto se aumentó la concentración iónica del tampón hasta 0.4 M de NaCl; en estas condiciones se observó un desplazamiento del pico activo hacia la región correspondiente a 3.500 d, a la vez que se obtuvo una recuperación bastante superior de la actividad antibacteriana. Este comportamiento fue comprobado utilizando columnas de Sephadex G-25, obteniéndose en ambos tipos de geles un tamaño similar (Fig. 12).

Sorprendentemente, cuando se utilizaron columnas con un rango de resolución superior (Sephadex G-50 y G-75) utilizando NaCl 0.4 M como eluyente, el tamaño mínimo determinado fue considerablemente mayor, próximo a los 8.000 d (Fig. 12). Este peso molecular sería, por tanto, el más acorde con el determinado a partir de la composición en aminoácidos.

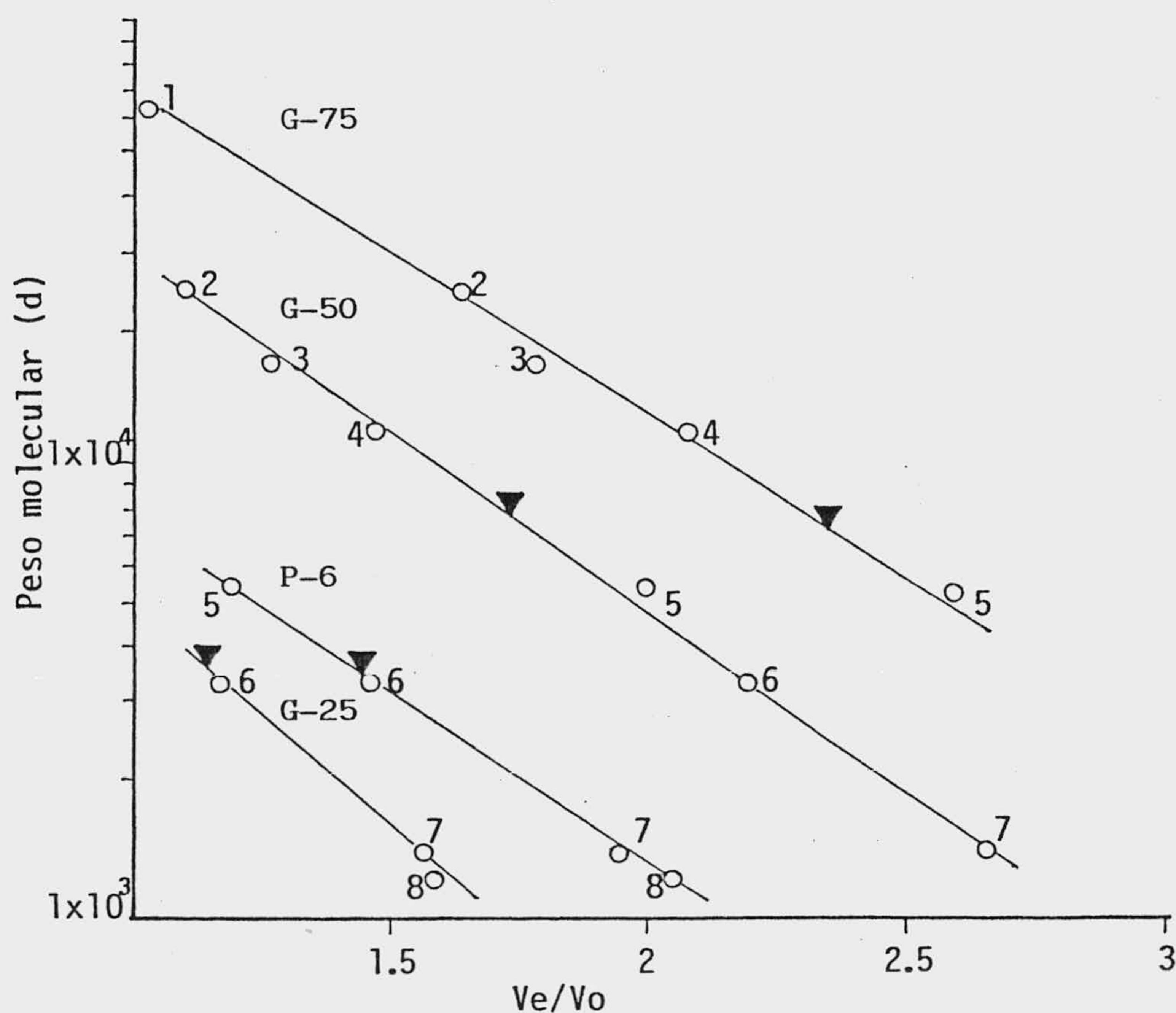


Fig.12.- Determinación del tamaño molecular de AS-48 mediante filtración en Biogel P-6, Sephadex G-25, G-50 y G-75; como eluyente se utilizó NaCl 0.4 M. Los patrones utilizados fueron: 1.- albúmina sérica bovina (67 Kd); 2.- quimotripsinógeno (25 Kd); 3.- mioglobina (17.8 Kd); 4.- citocromo C (12.3 Kd); 5.- insulina (5.4 Kd); 6.- β -insulina (3.4 Kd); 7.- bacitracina (1.4 Kd) y 8.- polimixina B (1.25 Kd). Las flechas indican la posición de AS-48.

3.3.2.- Mediante electroforesis.-

El tamaño molecular de AS-48 determinado inicialmente mediante electroforesis no encuadraba con ninguno de los datos disponibles hasta el momento, presumiblemente debido a la utilización de patrones inadecuados. Para evitar este problema se utilizó otro tipo de geles y patrones más adecuados para la aproximación al tamaño molecular de proteínas pequeñas, siguiendo las recomendaciones de Swank y Munkres (1971). Se utilizaron patrones de peso molecular comprendido entre 2.5 y 17 Kd (Fig. 13). En estas condiciones, trazando la correspondiente recta de regresión (Fig. 14), se obtuvo un peso molecular cercano a los 8 Kd para AS-48, dato que concuerda perfectamente con el tamaño estimado mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50 y G-75, así como con el obtenido a partir de su composición en aminoácidos.

3.4.- Aproximación al punto isoeléctrico.-

Para la determinación del mismo, una muestra purificada de AS-48 fue sometida a isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 3.5 a 9. La banda de proteína apareció completamente desplazada hacia el polo negativo, indicando un punto isoeléctrico igual o superior a 9.

En otras experiencias, una solución de antibiótico cuyo pH había sido ajustado a 10.6 fue sometida a un campo eléctrico en un gel igualmente tamponado a dicho pH (Fig. 15). También en este caso se observó una migración de la banda de proteína hacia el polo negativo, lo que indicaría la existencia de una carga neta positiva de esta molécula a pH 10.6, y un punto isoeléctrico por encima de este valor.

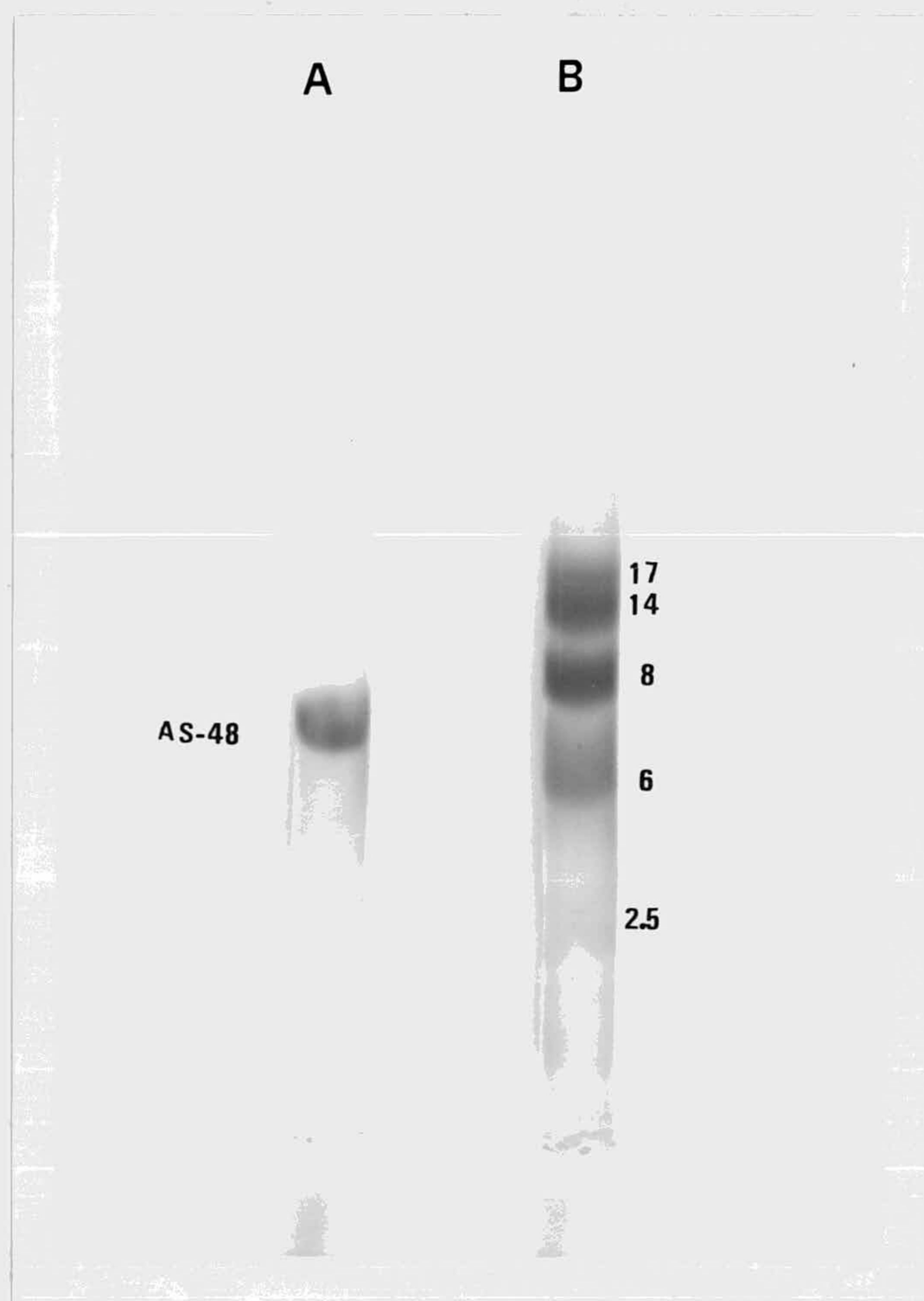


Fig. 13.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (14%) de AS-48 purificado (gel B). Los patrones de peso molecular utilizados (gel A) fueron: mioglobina (16.95 Kd), mioglobina (I+II) (14.4 Kd), mioglobina (I) (8.16 Kd), mioglobina (II) (6.21 Kd) y mioglobina (III) (2.51 Kd).

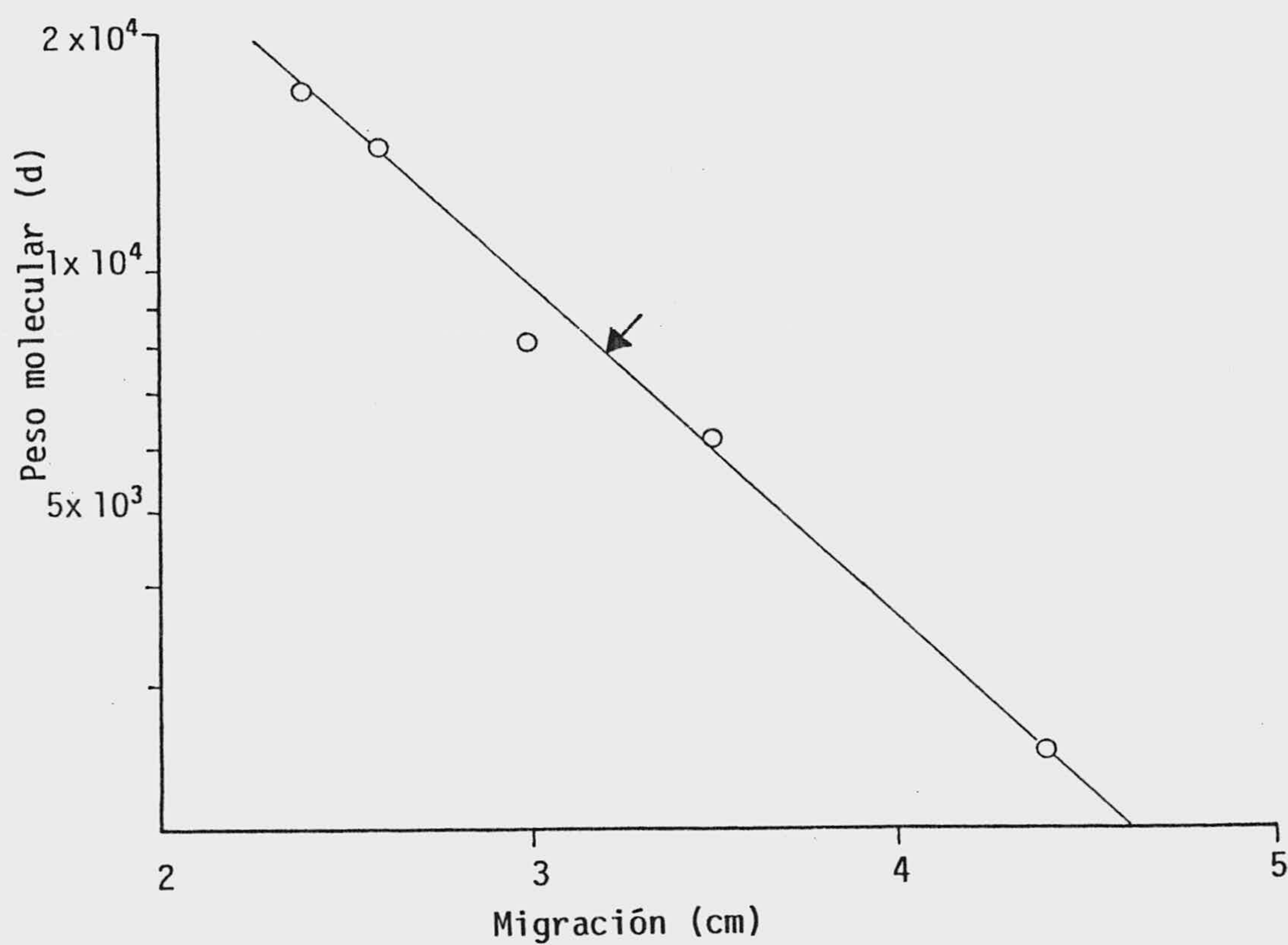


Fig. 14.- Recta de regresión de los patrones de bajo peso molecular sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 14%. La flecha indica la posición de AS-48.

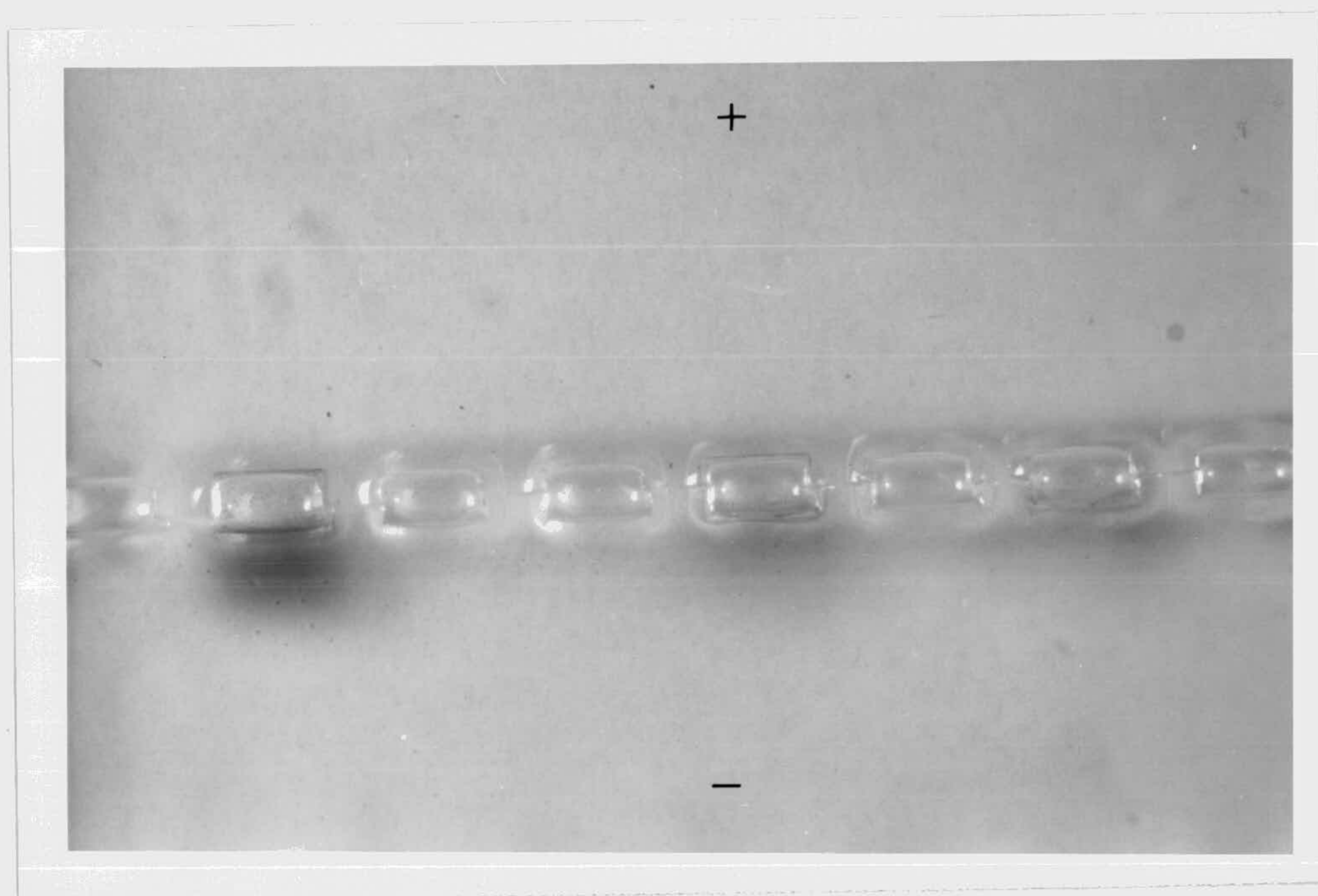


Fig. 15.- Migración de AS-48 en un gel de agarosa tamponado a pH 10.6 tras ser sometido a una corriente constante de 250 mA durante 2h. Se utilizaron varias cantidades de antibiótico: 50, 20 y 10 μ g.

3.5.- Sensibilidad a enzimas y otros agentes químicos.-

Se determinó el efecto de diversos enzimas sobre el antibiótico AS-48 repurificado. La marcada sensibilidad detectada a los enzimas proteolíticos, y muy especialmente a la tripsina, concuerda perfectamente con la naturaleza peptídica establecida para la molécula (Tabla 6).

La resistencia de la actividad antibiótica al tratamiento con enzimas que atacan a componentes glucídicos o lipídicos indicaría la ausencia de una fracción de esta naturaleza en dicha molécula, o al menos su irrelevancia en la actividad biológica de la misma.

Por otra parte, se detectó una fuerte sensibilidad a los detergentes aniónicos como el SDS, lo que estaría relacionado tanto con la naturaleza proteica como con la carga positiva neta de AS-48.

También se puso de manifiesto una fuerte inactivación por cardiolipina, con aparición de un precipitado abundante tras su adición.

Por otra parte, la conservación de la actividad antibacteriana tras incubación con urea 8 M podría apuntar hacia la ausencia de una estructura terciaria, tal como sugeríamos en otros apartados.

Tabla 6.- Sensibilidad del antibiótico AS-48 a diversos enzimas y otros agentes químicos.-

Agente ensayado	Actividad residual (%) (S-47 y U-9)
Tripsina	20
Pronasa	40
Proteasa	50
Lisozima	100
Lipasa	100
Neuraminidasa	100
Pectinasa	100
β -Glucosidasa	100
β -Glucuronidasa	100
Fosfatasa alcalina	100
DNAasa I	100
SDS	20
Cardiolipina	00
Urea	100

3.6.- Sensibilidad al calor y al pH.-

Las fracciones purificadas de AS-48 fueron sometidas a diversos tratamientos térmicos durante 30 min., observándose tras los mismos una pérdida progresiva de actividad a partir de los 60°C, con una inactivación total a 80°C (Fig. 16A). Por el contrario, tras el almacenamiento durante periodos de tiempo superiores a tres meses a bajas temperaturas (4°C, -20°C y -70°C) no se observó pérdida alguna de actividad.

La incubación a distintos valores de pH demostró la alta resistencia de AS-48 al pH ácido y su inactivación parcial a pH básico (por encima de 8) (Fig. 16 B). La resistencia en medio ácido se corroboró en condiciones mucho más drásticas como la adición de TCA al 5%; los precipitados así obtenidos, cuando fueron resuspendidos en tampón a pH neutro, conservaron una actividad antibacteriana cercana al 100%.

3.7.- Calorimetría térmica diferencial de barrido.-

En una experiencia previa se aplicó un barrido de temperatura entre 40 y 100°C a una solución de antibiótico disuelto en tampón acetato sódico pH 5.6 + NaCl 0.4M, observándose una drástica transición hacia un estado desnaturalizado a 87°C, con un fuerte efecto de agregación. Ya que estos resultados no permitían realizar cálculo calorimétrico alguno, y conociendo la mayor estabilidad de la molécula a pH ácido y en presencia de altas concentraciones de sales, se repitió el experimento en las condiciones que se describen a continuación.

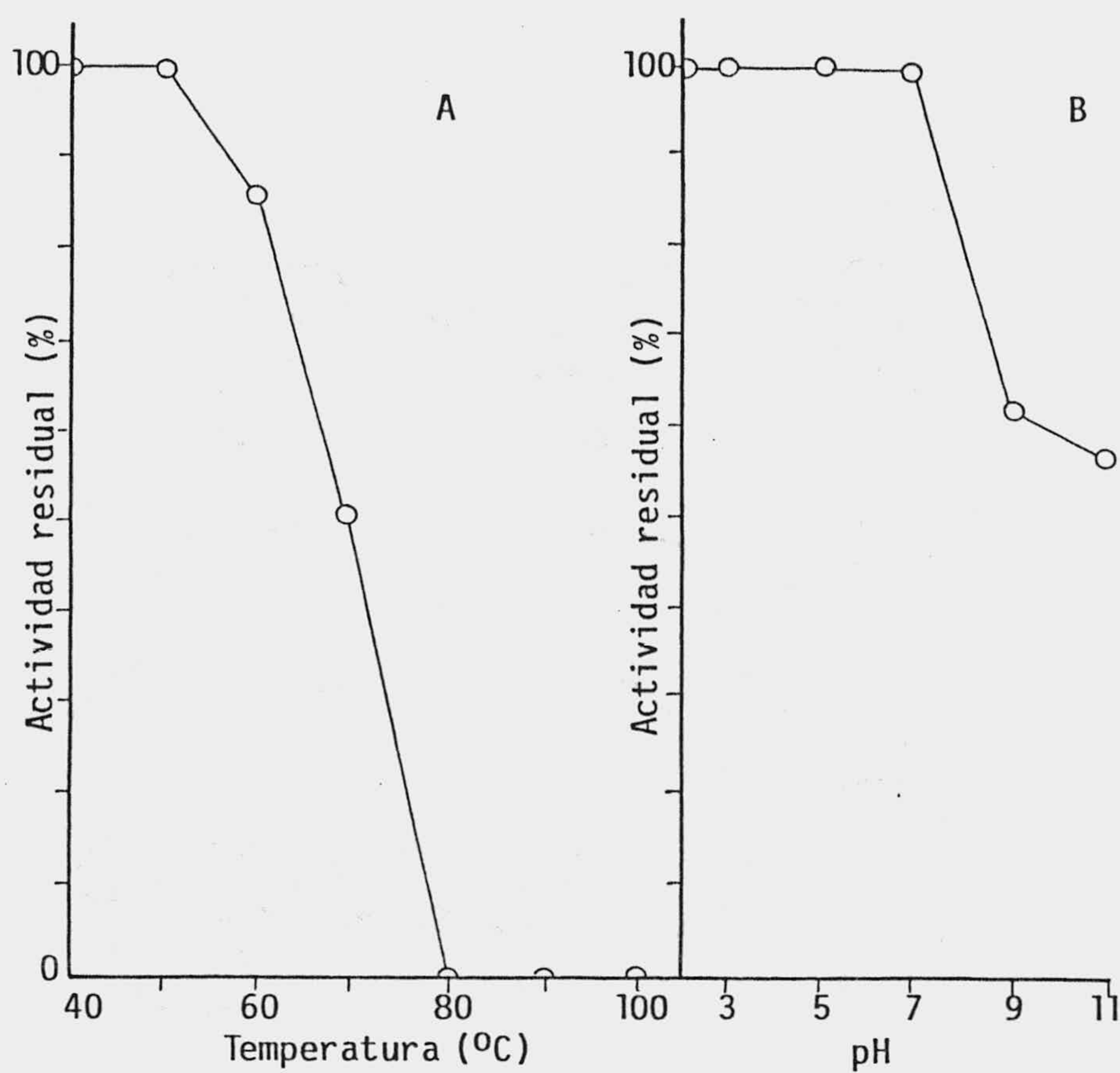


Fig. 16.- (A) Sensibilidad de AS-48 al tratamiento con calor. Las muestras fueron incubadas a la temperatura indicada durante 30 min. (B) Sensibilidad al pH. La incubación se realizó a 37°C durante 2h. Antes de su ensayo, las muestras fueron reajustadas a neutralidad.

RESULTADOS

En la Fig. 17 se muestran las curvas calorimétricas de una solución de AS-48 (0.525 mg proteína/ml disueltos en tampón acetato sódico 0.05 M pH 4 + NaCl 0.8 M) al ser sometida a un barrido de temperatura entre 40 y 100°C. La velocidad de barrido fue de 2 K/min. El barrido de línea base se efectuó con el tampón en que iba disuelta la muestra. Bajo estas condiciones se observó una temperatura de transición (T_m) de 93.4°C. Después de enfriada la muestra, se efectuó un segundo barrido para comprobar la reversibilidad del proceso, detectándose una total irreversibilidad del mismo (Fig 17).

Con objeto de calcular la entalpía calorimétrica del proceso se suministró una señal de calibrado de 50 μ W de potencia durante 5'15". Los valores estimados de las áreas del calibrado y de la muestra problema fueron de 0.3100 g y 0.1373 g, respectivamente.

$$\begin{aligned}\Delta H^{(\text{calibrado})} &= 50 \mu\text{J/s} \times 315 \text{ s} = 15750 \mu\text{J} = 15.75 \text{ mJ} \\ \text{mJ (problema)} &= 15.75 \text{ mJ} \times 0.31 \text{ g} / 0.1373 \text{ g} = 6.98 \text{ mJ} \\ \Delta h &= 6.98 \text{ mJ} \times 1000 \text{ mg} / 0.525 \text{ mg} = 13.3 \text{ J/g} = 3.2 \text{ cal/g}\end{aligned}$$

Este valor de entalpía específica calorimétrica de AS-48, teniendo en cuenta además su temperatura de transición, es propio de proteínas carentes de estructura compacta (Privalov, 1979).

Para un peso molecular aproximado de 8.000d, la $\Delta H^{(\text{calorimétrica})}$ sería:

$$\Delta H^{(\text{cal})} = M_w \times \Delta h = 8.000 \times 13.3 = 106400 \text{ J/mol} = 106.40 \text{ kJ/mol}$$

El valor de la capacidad calorífica para la T_m (C_p^m) se obtuvo a partir de los siguientes datos:

$$d(\text{calibrado}) = 8.5 \text{ cm}; d^m = 4.45 \text{ cm}; v = 2 \text{ K/min.} = 2/60 \text{ K/s}$$

RESULTADOS

$$Cp^{\text{Calibrado}} = 50 \mu\text{J/s} \times 60/2 \text{ s/K} = 1500 \mu\text{J/K} = 1.5 \text{ mJ}$$

$$Cp^m = Cp^{\text{cal}} \times d^m/d = 1.5 \text{ mJ} \times 4.45 \text{ cm}/8.5 \text{ cm} = 0.78 \text{ mJ/K}$$

A partir de todos estos datos se calculó la entalpía de van't Hoff (Privalov, 1979; Mateo, 1984):

$$\Delta H^{\text{vH}} = 4RT_m^2 Cp^m / Q$$

$$\Delta H^{\text{vH}} = 4 \times 8.314 \text{ J/Kmol} \times 366.4 \text{ K}^2 \times 0.785 \text{ mJ/K} / 6.98 \text{ mJ} = 502 \text{ kJ/mol}$$

El cociente entre la entalpía de van't Hoff y la entalpía calorimétrica, sería por tanto:

$$\Delta H^{\text{vH}} / \Delta H^{\text{cal}} \approx 5$$

Este valor es indicativo de una fuerte cooperatividad intermolecular en la transición de AS-48 hacia un estado desnaturalizado, que incluiría un máximo de cinco moléculas de antibiótico como unidad cooperativa (Privalov, 1979; Mateo, 1984); este caso sería análogo al del inhibidor de la tripsina pancreática así como la β -lactoglobulina 4 a pH 2 (López, 1987) cuya unidad cooperativa es un dímero en ambos casos.

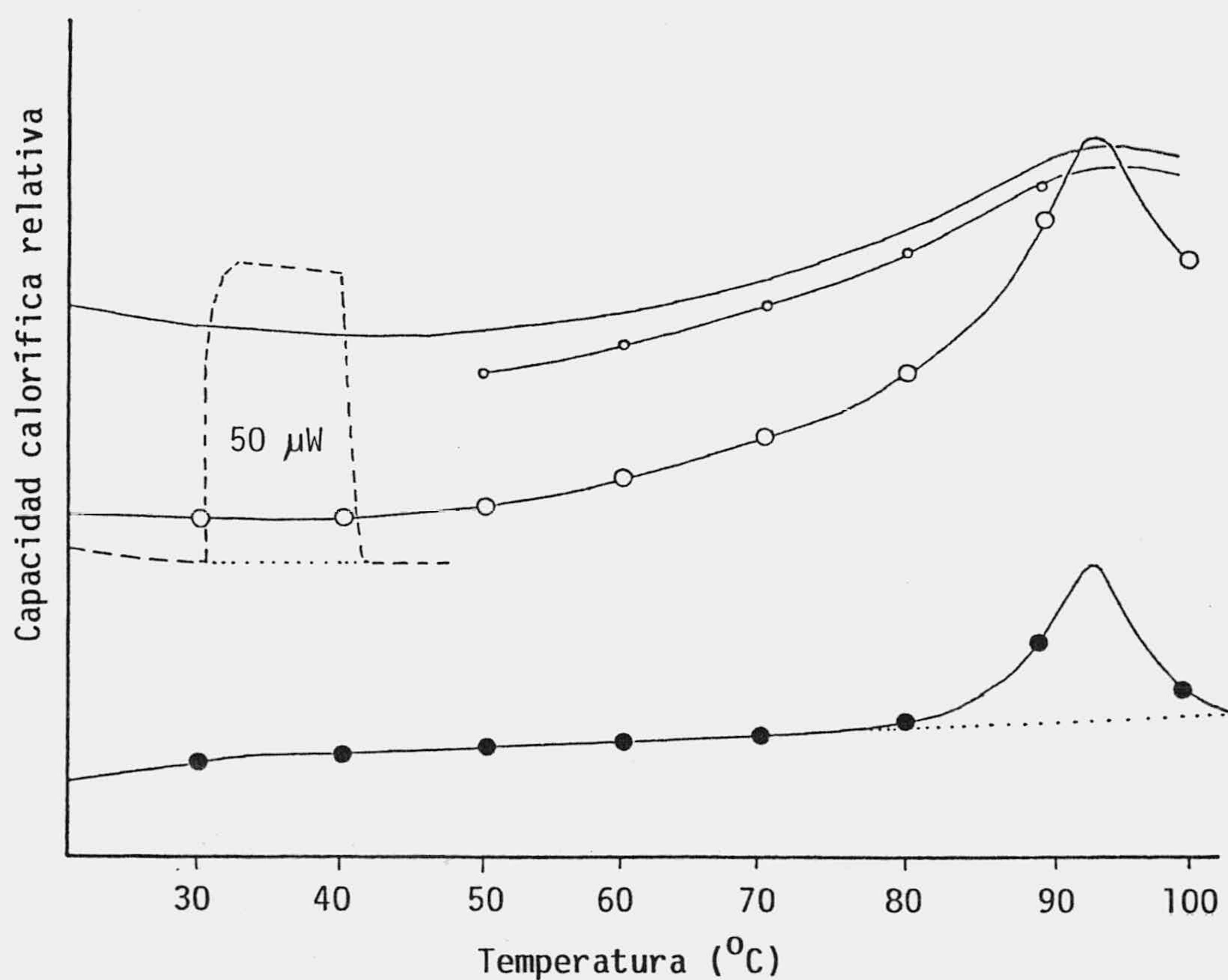


Fig. 17.- Calorimetría diferencial de barrido de una solución conteniendo 525 $\mu\text{g/ml}$ de AS-48 purificado, disuelto en tampón acetato sódico 0.05 M pH 4 + NaCl 0.8 M (O—O); para comprobar la irreversibilidad del proceso se realizó un segundo barrido de temperatura (●—●). Línea base (—). Calor absorbido (●—●). Señal de calibrado (---).

4.- ACTIVIDAD BIOLOGICA Y MECANISMO DE ACCION DEL ANTIBIOTICO AS-48

4.1.- Espectro heterólogo.-

Uno de los aspectos abordados en esta Memoria sobre el antibiótico AS-48 ha sido la determinación de su espectro de actividad antibacteriana frente a diversos microorganismos, por ser esta una de las propiedades que hacen más relevante su estudio. Para establecer el espectro de acción se utilizaron muestras purificadas mediante intercambio iónico y filtración en Biogel P-6 conteniendo 260 μg de proteína/ml, las cuales fueron ensayadas frente a las diversas bacterias y células eucariotas por la técnica de los pocillos; el ensayo frente a amebas así como la línea celular *Vero* se llevó a cabo en medio líquido, dadas las características de estas células, adicionando la muestra de antibiótico a pocillos planos de placas de microtitulación (Nunc) donde previamente se habían inoculado dichas células.

La sensibilidad de las distintas bacterias se expresó en UA/ml, calculadas a partir del diámetro de inhibición producido en cada caso, y haciendo uso de las curvas de valoración adecuadas.

En la Tabla 7 se muestra el espectro de acción del antibiótico AS-48 frente a diversas estirpes de enterococos, todas ellas

RESULTADOS

procedentes de muestras clínicas, así como frente a algunas estirpes de colección. Es interesante resaltar que el 100% de las estirpes ensayadas fueron inhibidas por el antibiótico AS-48, aunque con diferentes grados de sensibilidad, sin que al parecer ello estuviese relacionado con el tipo de especie o subespecie a que pertenecían.

En la Tabla 8 se recoge el comportamiento de las restantes bacterias Gram-positivas ensayadas; salvo algunas excepciones, como *Staphylococcus* y *Micrococcus*, todas ellas mostraron una alta sensibilidad a AS-48, bastante similar a la detectada en enterococos, sobresaliendo en este sentido algunas especies de *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Planococcus*, con títulos de actividad entre 1000 y 4000 UA/ml, superiores a la mayoría de los calculados en enterococos.

Tabla 7.- Espectro de acción de AS-48 frente a diversas estirpes de enterococos. Se utilizó una muestra de antibiótico purificado mediante filtración en Biogel P-6 conteniendo 260 µg de proteína/ml.

Bacteria indicadora			Sensibilidad (UA/ml)	
<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>subsp. liquefaciens</i>		S-47	750
"	"	"	S-2	420
"	"	"	S-39	1300
"	"	"	S-40	750
"	"	"	S-54	85
"	"	"	S-55	85
"	"	"	S-71	70

(Continúa)

Tabla 7 .- (Continuación)

Bacteria indicadora			Sensibilidad (UA/ml)	
<i>Streptococcus faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>			S-13	750
"	"	"	S-14	160
"	"	"	S-32	1400
"	"	"	S-34	450
"	"	"	S-51	160
"	"	"	S-58	250
"	"	"	S-59	160
"	"	"	S-61	250
"	"	"	S-62	70
"	"	"	S-63	160
"	"	"	S-66	250
"	"	"	S-67	70
"	"	"	S-68	255
"	"	"	S-72	450
"	"	"	S-73	750
"	"	"	S-86	450
<i>Streptococcus faecalis</i> subsp. <i>zymogenes</i>			S-50	450
"	"	"	S-56	450
"	"	"	S-77	750
"	"	"	S-79	1100
"	"	"	S-80	750
"	"	"	S-81	450
"	faecium		S-29	555
"	"		S-60	200
"	"		S-84	555
"	"		CECT410	250
"	durans		S-76	1100
"	"		CECT411	3000

RESULTADOS

Tabla 8.- Espectro de acción de AS-48 frente a diversas bacterias Gram-positivas. Las condiciones experimentales son las descritas en la Tabla 7.

Bacteria indicadora	Sensibilidad (UA/ml)
<i>Bacillus cereus</i>	70
<i>Bacillus laterosporus</i> CMM1616	4200
<i>Bacillus subtilis</i>	90
<i>Bacillus megaterium</i>	750
<i>Bacillus pumilus</i>	750
<i>Bacillus circulans</i>	250
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC8	300
<i>Staphylococcus aureus</i> P-18	50
<i>Staphylococcus aureus</i> P-20	50
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 231	70
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 232	30
<i>Corynebacterium bovis</i>	250
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CECT78	1300
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CECT79	--
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CECT80	500
<i>Corynebacterium laevaniformis</i> CECT 445	2000
<i>Micrococcus</i> sp.	--
<i>Micrococcus luteus</i>	105
<i>Mycobacterium phlei</i>	2000
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1100
<i>Nocardia corallina</i>	4000
<i>Planococcus citreus</i>	4000

RESULTADOS

En la Fig. 18 se muestra el aspecto de los halos de inhibición obtenidos tras ensayar AS-48 frente a diversas especies bacterianas, Gram-positivas y Gram-negativas. Se observó una gran heterogeneidad tanto en el diámetro de los halos como en la nitidez de sus contornos. Los halos de mayor tamaño fueron los obtenidos frente a *Nocardia corallina*.

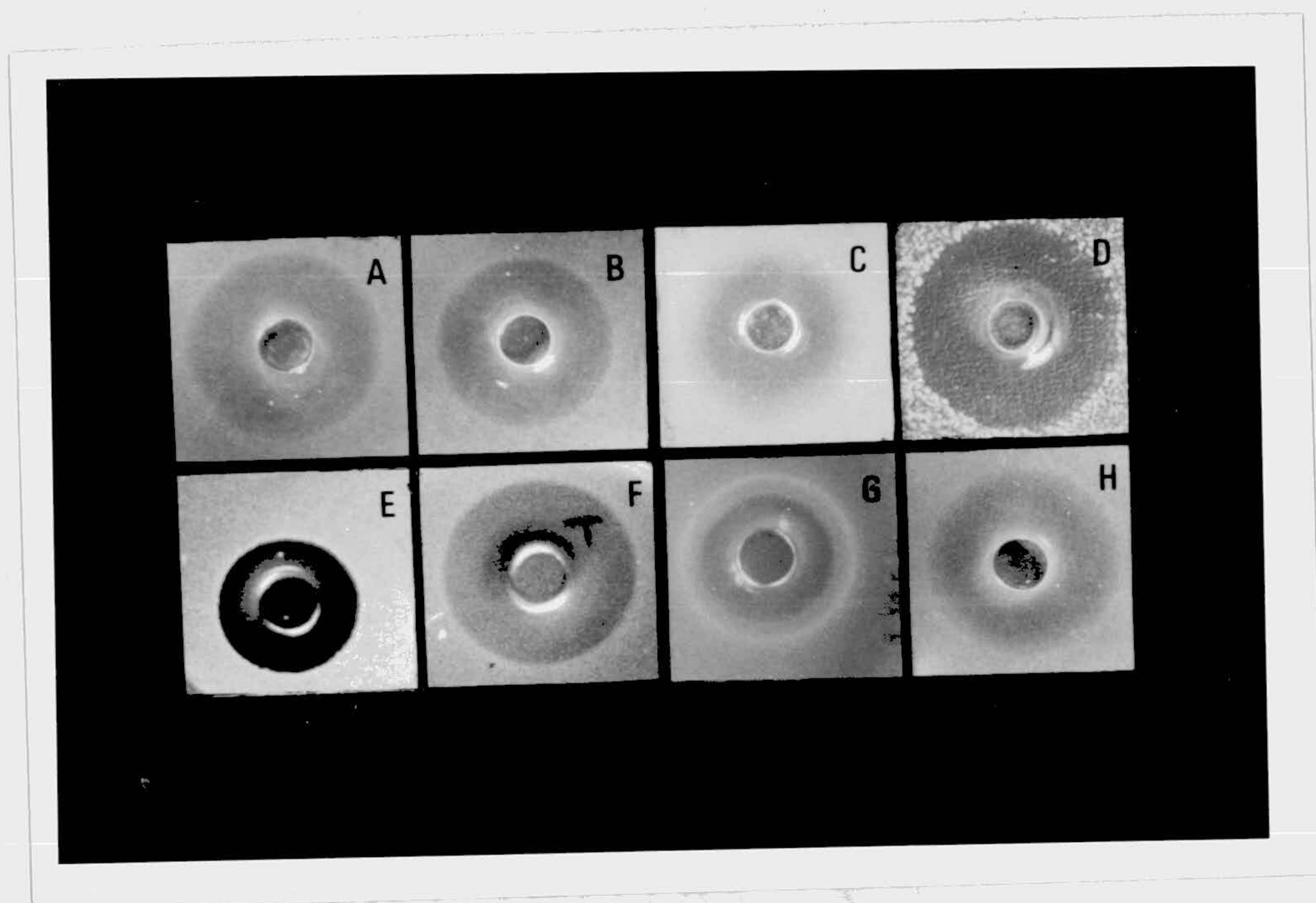


Fig. 18.- Halos de inhibición producidos por AS-48 (260 $\mu\text{g/ml}$) frente a A.- *Bacillus laterosporus* CMM1616; B.- *Corynebacterium glutamicum* CECT78; C.- *Agrobacterium tumefaciens*; D.- *Nocardia corallina*; E.- *Escherichia coli* U-9; F.- *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-39; G.- *Staphylococcus aureus* ATCC8; H.- *Mycobacterium smegmatis*.

RESULTADOS

En la Tabla 9 se muestra el espectro de acción de AS-48 frente a bacterias Gram-negativas; dicho espectro es más reducido, y con títulos de actividad más bajos en general. No obstante, se encontraron estirpes sensibles entre los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Agrobacterium* y *Myxococcus*. Las especies ensayadas pertenecientes a este último género presentaron, además, una alta sensibilidad a AS-48, comparable a la que mostraron las bacterias Gram-positivas.

El efecto antibiótico de AS-48 frente a los organismos eucariotas ensayados, tales como levaduras, amebas y líneas celulares queda recogido en la Tabla 10. Solamente se detectó actividad antibiótica frente a la línea celular Vero, en la cual se observó un marcado efecto citotóxico con alteración en la morfología celular y pérdida de la capacidad de adherencia.

Para el ensayo de la actividad antibiótica de AS-48 en anaerobiosis se utilizaron las estirpes indicadoras *S.faecalis* S-47 y *E.coli* U-9. El ensayo de actividad se llevó a cabo por duplicado: uno de los lotes fue incubado en aerobiosis y el otro en anaerobiosis. En ambos casos, los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para cada bacteria fueron idénticos, independientemente de las condiciones de incubación.

Tabla 9.- Espectro de AS-48 frente a bacterias Gram-negativas. Las condiciones experimentales fueron descritas en Tabla 7.

Bacteria indicadora	Sensibilidad (UA/ml)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
<i>Salmonella</i> SV3	35
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	35
<i>Salmonella</i> sp.	--
<i>Shigella sonnei</i>	25
<i>Enterobacter cloacae</i>	--
<i>Enterobacter cloacae</i> CECT194	--
<i>Enterobacter aerogenes</i> CECT684	--
<i>Pseudomonas reptilivora</i> N5	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
<i>Alcaligenes faecalis</i>	--
<i>Alcaligenes faecalis</i> CMM1052	--
<i>Proteus</i> sp.	--
<i>Escherichia coli</i> Delbruck	--
<i>Escherichia coli</i> CMM1839	50
<i>Escherichia coli</i> CMM2688	300
<i>Escherichia coli</i> CMM2690	300
<i>Escherichia coli</i> F1	--
<i>Escherichia coli</i> U-9	200
<i>Escherichia coli</i> K-12	220
<i>Escherichia coli</i> Mb3	180
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	--
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CECT141	18
<i>Zymomonas mobilis</i>	--
<i>Myxococcus coralloides</i> D	450
<i>Myxococcus virescens</i>	350

Tabla 10.- Efecto antibacteriano de AS-48 frente a levaduras, amebas y líneas celulares. La concentración final de antibiótico empleada fue de 260 $\mu\text{g/ml}$ para levaduras y 100 $\mu\text{g/ml}$ para los restantes ensayos.

Organismo indicador	Actividad
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X3	--
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K-2	--
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 3.2	--
<i>Naegleria fowleri</i>	--
<i>Acanthamoeba</i> GR-1	--
Línea Vero	+

4.2.- Efecto sobre cultivos en medio líquido-

El efecto antibacteriano de AS-48 en medio líquido se ensayó con objeto de determinar su capacidad inhibidora, así como el tipo de acción, bactericida ó bacteriolítica ejercida.

Estudios previos demostraron que AS-48, a concentraciones relativamente bajas (2-4 $\mu\text{g/ml}$) inducía un descenso en la DO de los cultivos de *S.faecalis* S-6, lo que apuntaba en principio hacia una acción bacteriolítica.

Como primer paso se comprobó este efecto en diversas estirpes de *S.faecalis*, *S.faecium* y *S.durans*, según se muestra en la Fig. 19 A, B y C. Los ensayos se llevaron a cabo sobre cultivos creciendo en BHI-T, a los que se les adicionó AS-48 hasta una concentración final de 8 UAs-47 (unos 3 μg de proteína/ml). En todos los estreptococos

ensayados, salvo en las estirpes S-14, S-54, S-55, S-59, S-62, S-67, S-71, S-73 y *S.faecium* CECT 410 se observó una lisis progresiva de los cultivos en las horas sucesivas a la adición de AS-48. En dichas estirpes no se observó lisis alguna, incluso cuando se utilizaron concentraciones mayores de antibiótico (20 UAS-47/ml) (Fig. 20). Sin embargo, en todos los casos la fracción superviviente tras dos horas de incubación en presencia de antibiótico fue inferior al 2%, lo que apunta claramente hacia una acción de tipo bactericida independiente, y quizá previa, al efecto bacteriolítico detectado en el resto de las especies.

La sensibilidad de otras especies bacterianas fue ensayada de forma similar. En la Fig. 21 se muestra el efecto bacteriolítico de AS-48 (8 UAS-47/ml) sobre varias especies de *Bacillus* creciendo en medio LB. La lisis más rápida se detectó en *B.cereus* y *B.subtilis*. Aquellas especies que mostraron un crecimiento más lento en este medio, como *B.circulans* y *B.megaterium* tardaron más en lisarse.

Un efecto bacteriolítico similar se detectó en los cultivos de *Corynebacterium bovis* y *C.glutamicum* (Fig. 22). Estas bacterias fueron también incubadas en medio LB. La concentración final de antibiótico fue de 10 UAS-47/ml.

En el caso de *Micrococcus lysodeikticus* y *M.luteus* no se detectó lisis alguna en presencia de AS-48, mientras que *Mycobacterium phlei* y *Nocardia corallina* sufrieron una ligera disminución en la turbidez de los cultivos en las horas siguientes a la adición de AS-48 (Fig. 23). Estas bacterias fueron crecidas en medio LB; la concentración de antibiótico empleada fue de 10 UAS-47/ml.

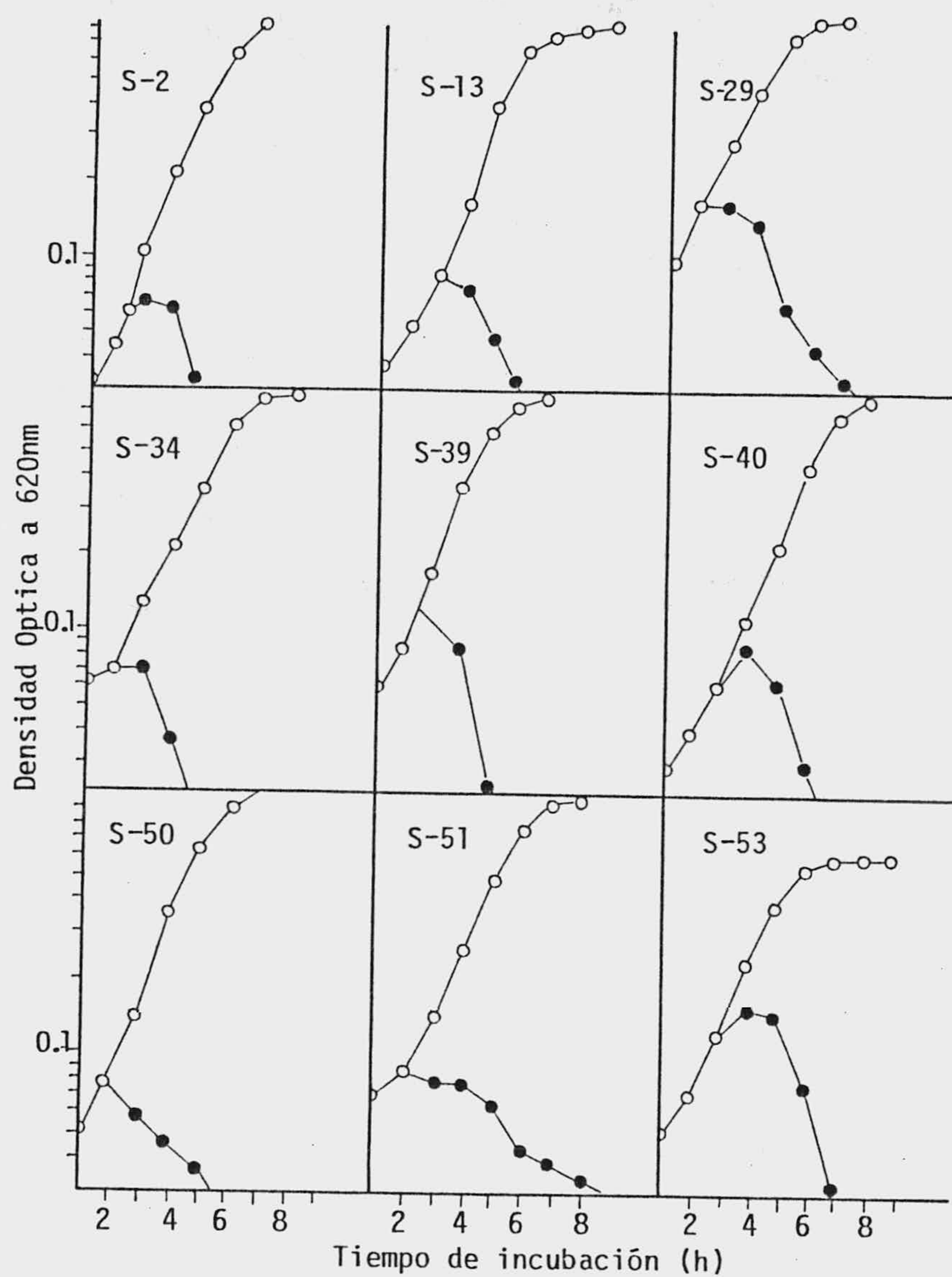


Fig. 19 A .- Efecto bacteriolítico de AS-48 frente a diversas estirpes del Gen. *Streptococcus* creciendo en BHI-T. La concentración final de antibiótico fue de 8-10 UA_{S-47}/ml. Controles: (o—o); tratados con AS-48: (●—●).

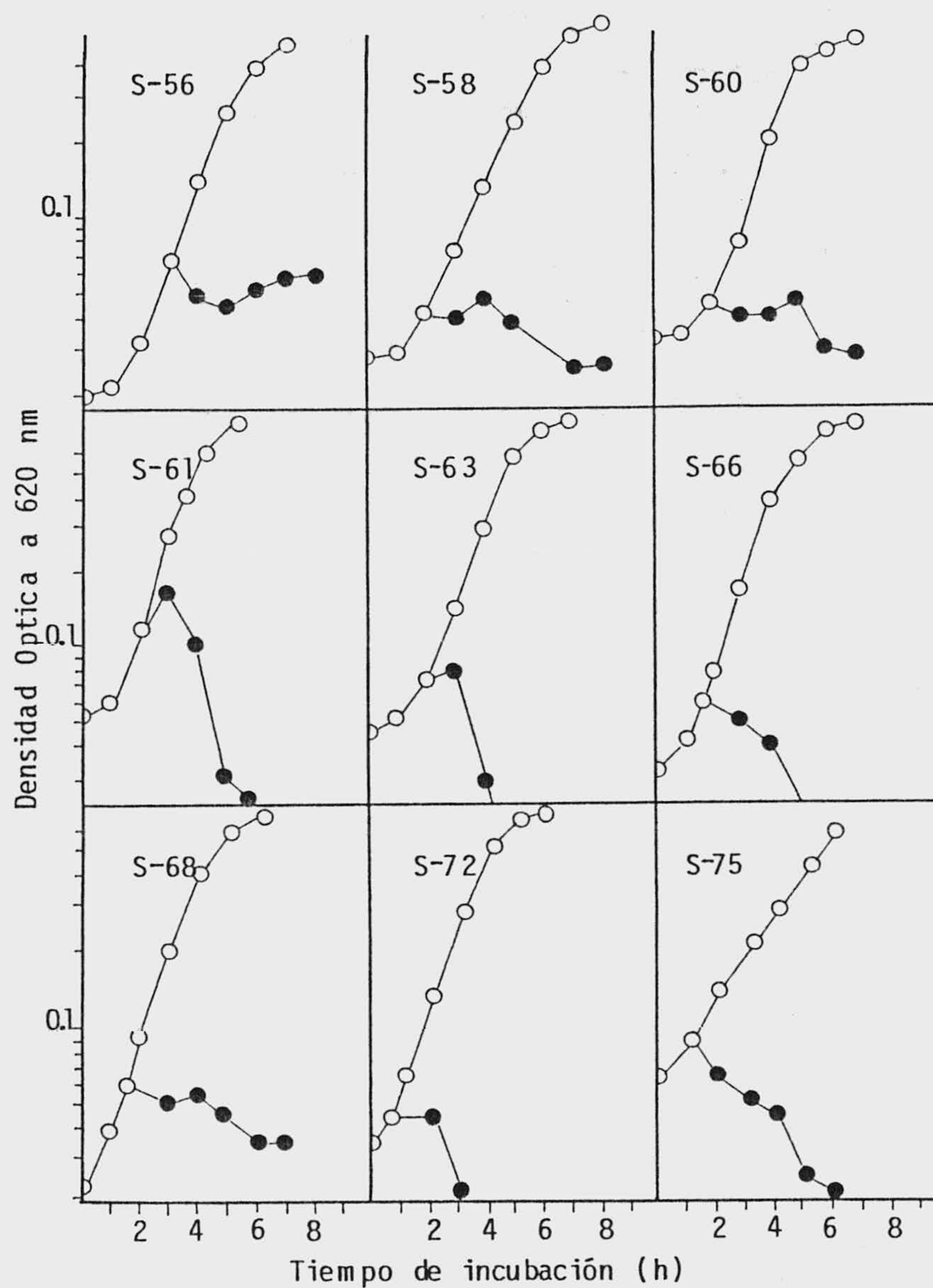


Fig. 19 B.- Efecto bacteriolítico de AS-48 frente a diversas estirpes del Gen. *Streptococcus*. Las condiciones experimentales fueron descritas en Fig. 19A. Controles: (o—o); cultivos tratados con AS-48: (●—●).

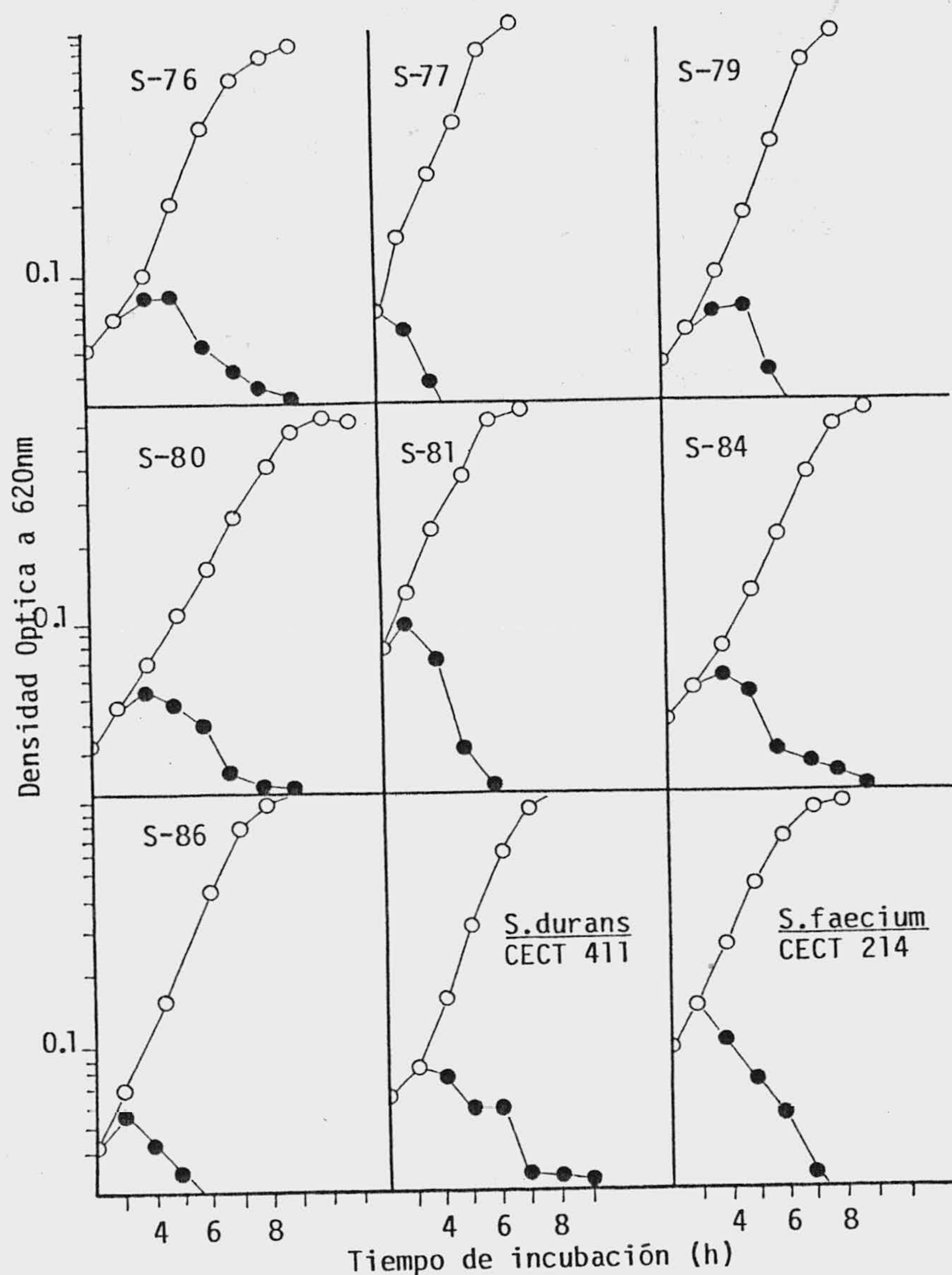


Fig. 19 C.- Efecto bacteriolítico de AS-48 frente a diversas estirpes del Gén. *Streptococcus*. Las condiciones experimentales fueron descritas en Fig. 19A. Controles: (o—o); cultivos tratados con AS-48: (●—●).

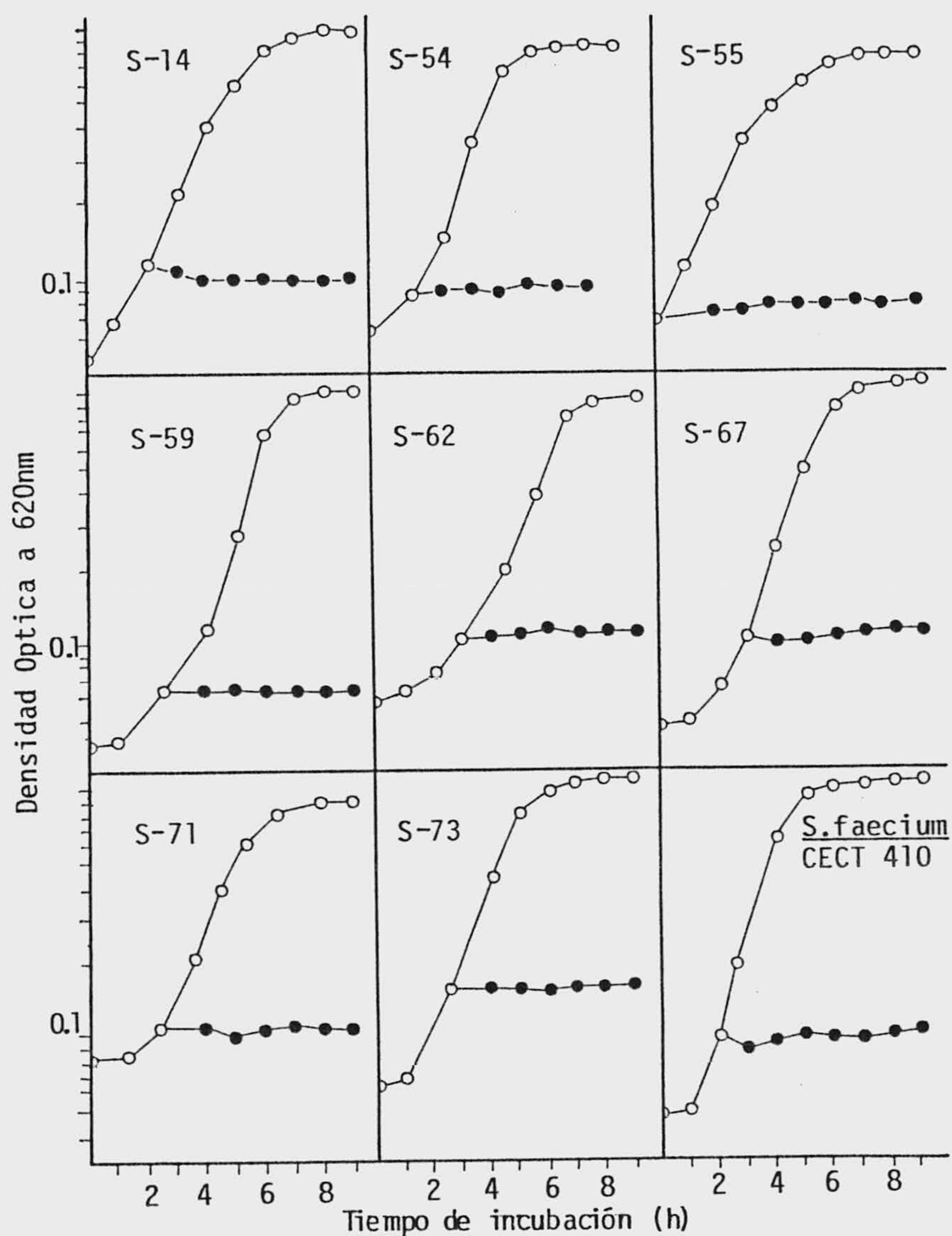


Fig. 20.- Efecto bactericida de AS-48 sobre diversas estirpes pertenecientes al Gén. *Streptococcus*. La concentración final de antibiótico fue de 20 UAS-47/ml. Controles: (○—○); cultivos tratados con AS-48: (●—●).

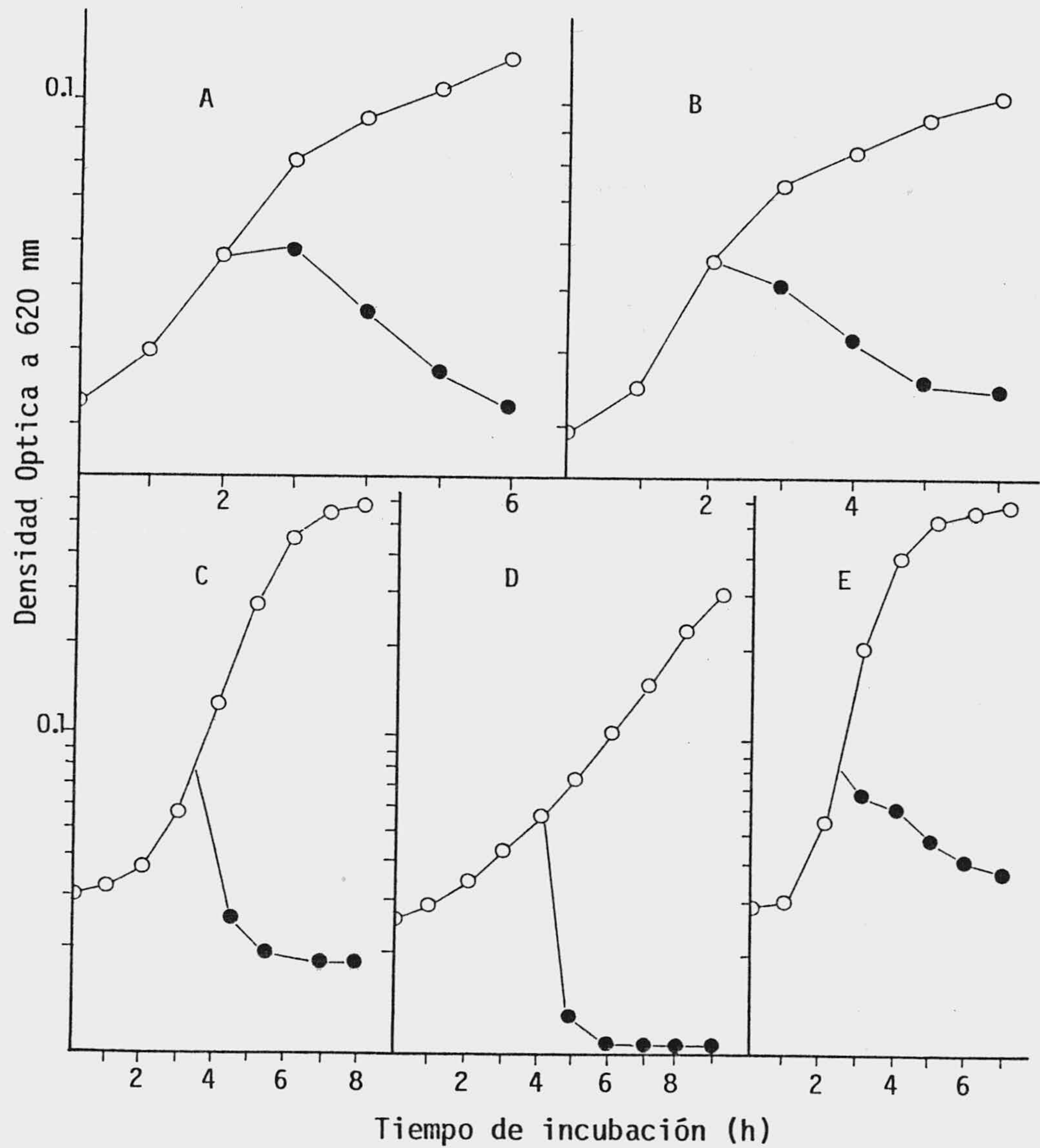


Fig. 21.- Acción bacteriolítica de AS-48 (8 UAS-47/ml) frente a A) *Bacillus circulans*; B) *B. megaterium*; C) *B. cereus*; D) *B. subtilis*, y E) *B. laterosporus* 1612 en medio LB. Controles: (O—O); cultivos tratados con AS-48 (●—●).

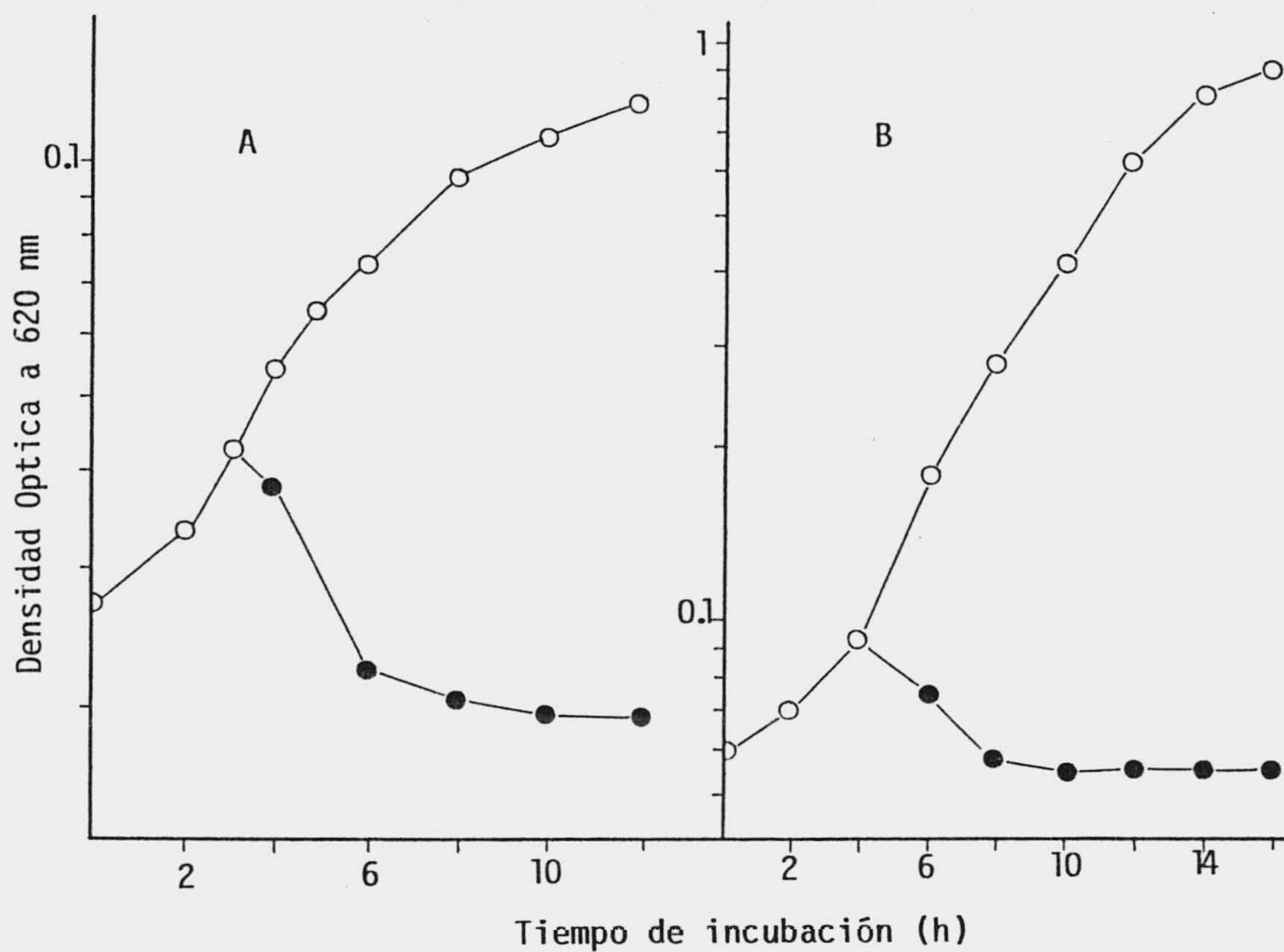


Fig. 22.- Efecto bacteriolítico de AS-48 (10 UAS-47/ml) frente a A) *Corynebacterium bovis* y B) *C. glutamicum* creciendo en LB. Controles: (O—O); cultivos tratados con AS-48: (●—●).

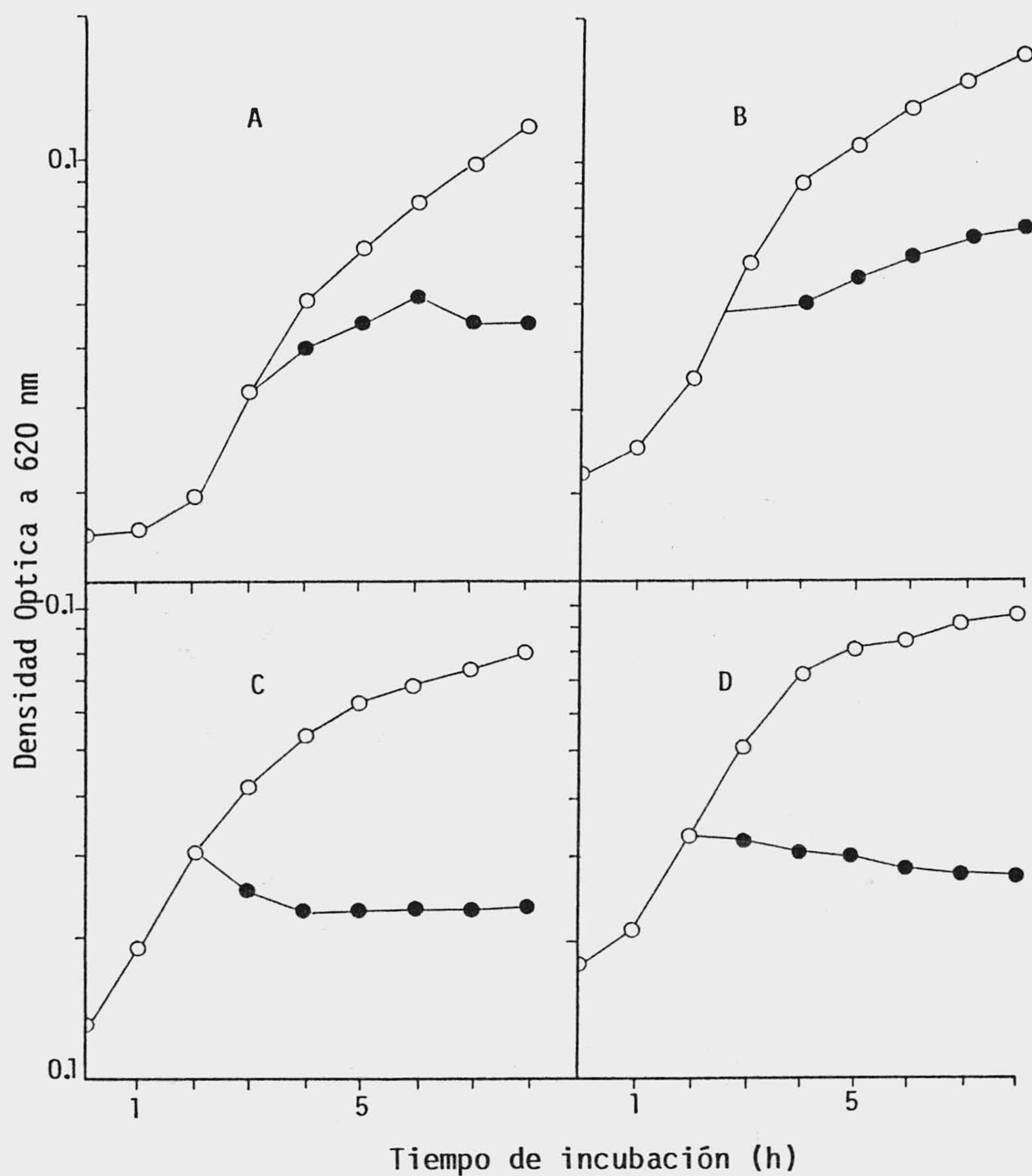


Fig. 23.- Efecto antibacteriano de AS-48 (10 UAS-47/ml) frente a A) *Micrococcus lysodeikticus*; B) *M. luteus*; C) *Mycobacterium phlei* y D) *Nocardia corallina* creciendo en LB. Controles: (O—O); cultivos tratados con AS-48: (●—●).

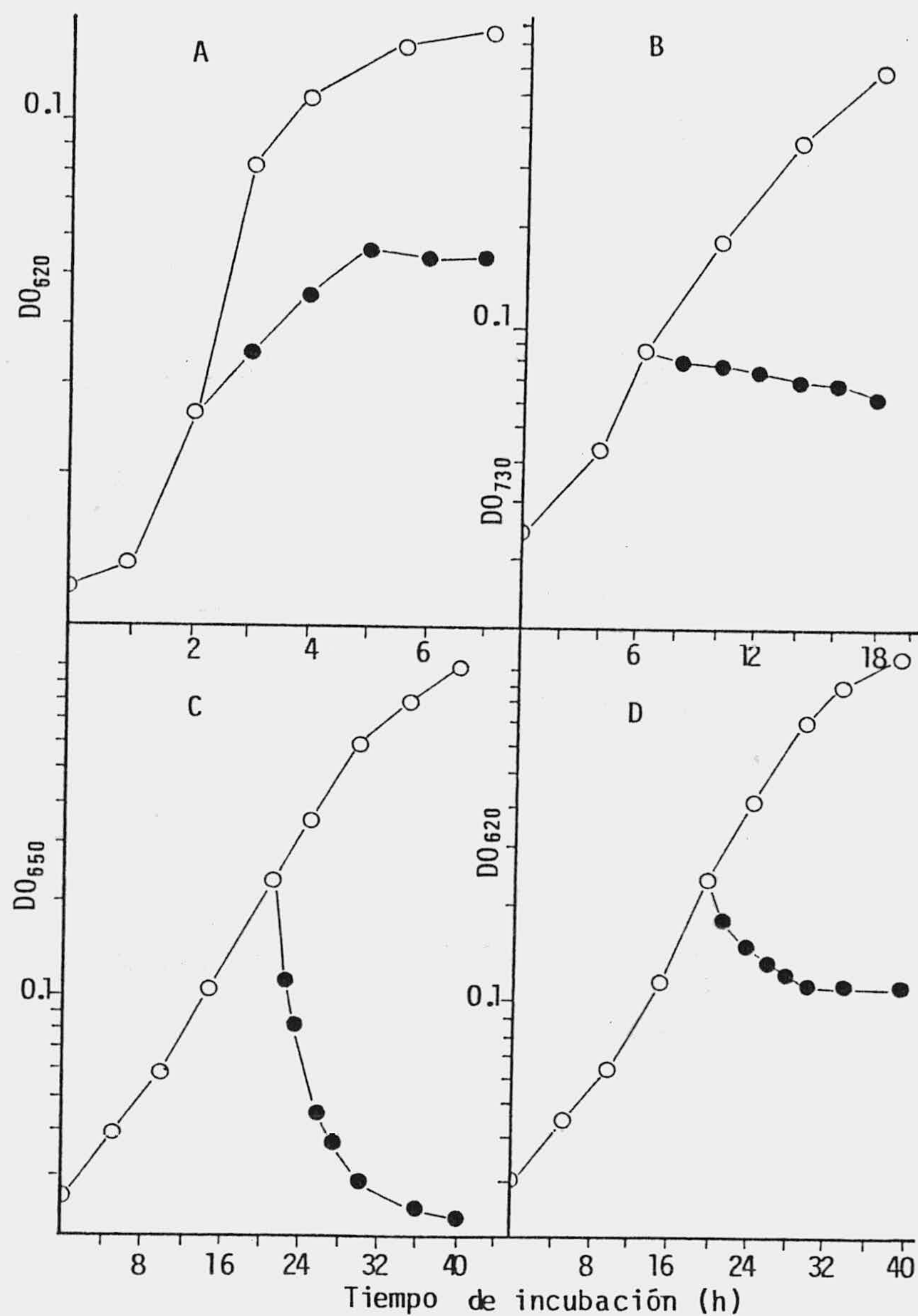


Fig. 24.- Efecto antibacteriano de AS-48 frente a A) *Escherichia coli* 2688 (100 UA_{0-9}/ml); B) *Rhizobium meliloti* (10 UA_{S-47}/ml); C) *Myxococcus coralloides* D y D) *M. virescens* (8 UA_{S-47}/ml cada uno). Controles: (O—O); cultivos tratados con AS-48 (●—●).

La inhibición de las bacterias Gram-negativas en medio líquido requiere, en general concentraciones bastante más altas de antibiótico, como se pone de manifiesto en los resultados obtenidos en medio líquido con *E.coli* 2688 (Fig. 24) .

Un caso excepcional por su alta sensibilidad fueron las *Myxobacterias*, en las que se observó una rápida lisis tras el tratamiento con AS-48 a concentraciones idénticas a las empleadas en *S.faecalis* (o sea, 8 UAS-47/ml). El ensayo se llevó a cabo en medio CT a 28°C con agitación. La estirpe de *Rhizobium meliloti* ensayada, si bien requería menores concentraciones de antibiótico para su inhibición, no experimentó una lisis significativa tras el tratamiento (Fig. 24).

4.3.- Curvas de supervivencia de las estirpes sensibles.-

En las Figs. 25, 26 y 27 se muestra la supervivencia de cultivos de *S.faecalis* S-47, *E.coli* U-9 y *E.coli* K-12 tras la adición de AS-48, calculada mediante el recuento en placa de células viables.

En *S.faecalis* S-47 se observó una rápida disminución del número de células viables tras la adición de concentraciones relativamente bajas de AS-48 (5.6 y 8 UAS-47/ml) (Fig. 25A). Así, por ejemplo, concentraciones de 8 UAS-47/ml (de 2.5 a 3 µg prot./ml) redujeron la viabilidad de los cultivos hasta valores próximos al 0.1% del número de células iniciales tras 2h de contacto. Esta concentración fue seleccionada como óptima para los estudios de actividad biológica. Así mismo, se observó un marcado descenso en la DO₆₂₀ de los cultivos a partir de 2h de incubación en presencia de antibiótico (Fig. 25B). Este efecto bacteriolítico sería posterior, por tanto, a la muerte celular.

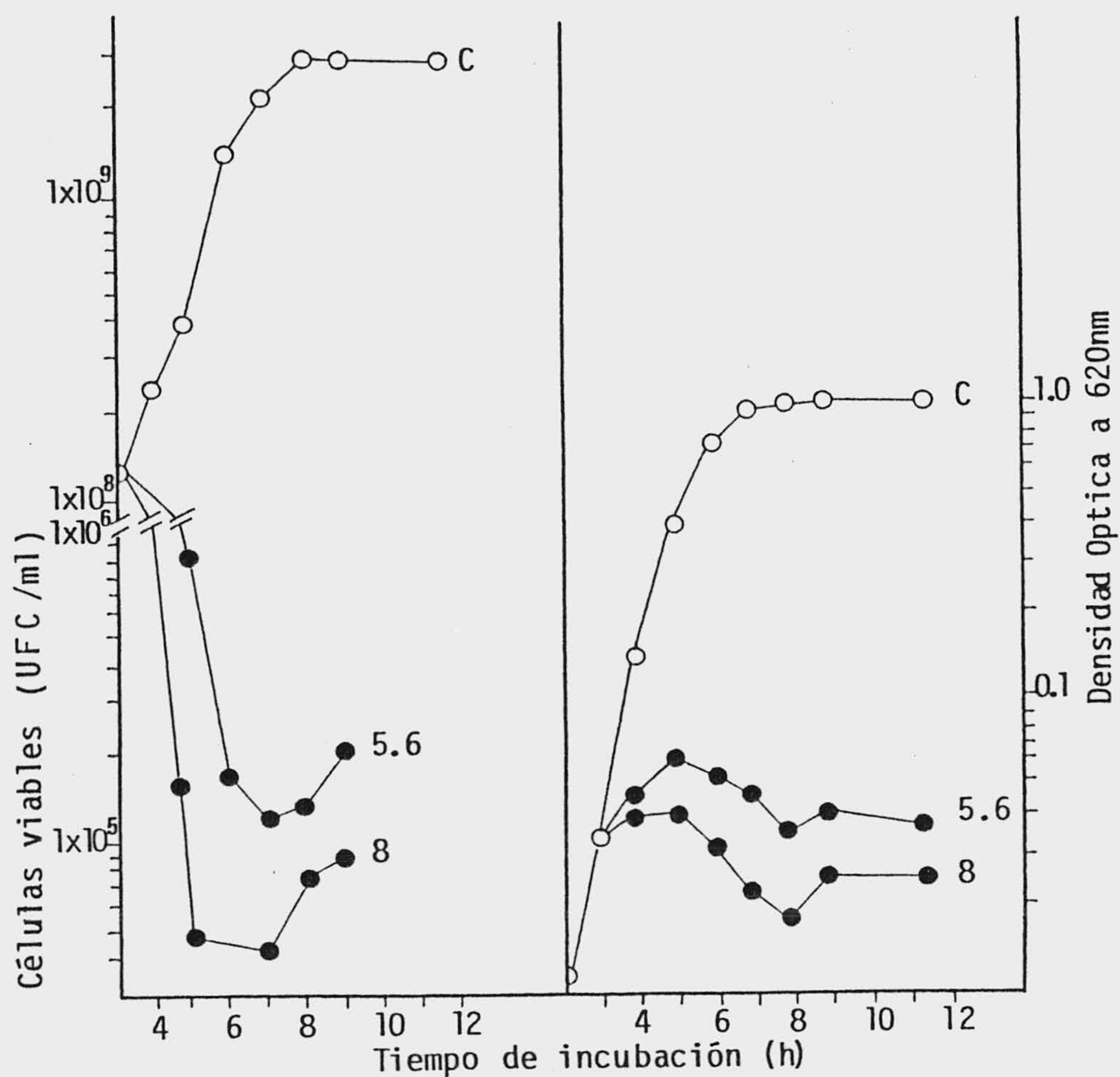


Fig. 25.- Curvas de supervivencia (A) y evolución de la DO_{620} (B) de cultivos de *S. faecalis* S-47 creciendo en BHI-T, adicionados de AS-48 (5.6 y 8 UA_{S-47}/ml). Controles (C).

En la Fig. 26A se muestran las curvas de crecimiento y supervivencia de los cultivos de *E.coli* U-9 tras la adición de 50 y 150 UAU-9/ml. Una vez más se puso de manifiesto la mayor resistencia de las bacterias Gram-negativas a la acción antibacteriana de AS-48, ya que solo a concentraciones de 150 UAU-9/ml (alrededor de 180 µg proteína/ml) se consiguió inhibir de forma significativa el crecimiento de dicha bacteria.

En *E.coli* K-12 se ensayaron también diversas concentraciones de AS-48 (Fig. 27A), obteniéndose un efecto similar al caso anterior, si bien se detectó una sensibilidad ligeramente mayor si comparamos la disminución en el número de células viables obtenido. En este caso, la cantidad mínima para detener el crecimiento celular de forma significativa fue de 100 UAU-9/ml. Concentraciones de 50 UAU-9/ml no lograban detener el crecimiento, pero el efecto bactericida detectado fue más significativo que en *E.coli* U-9.

A diferencia de lo ocurrido en *S.faecalis* S-47, ni en *E.coli* U-9 ni en *E.coli* K-12 se detectó descenso alguno en la densidad óptica del cultivo, aún a concentraciones de 150 y 200 UAU-9/ml respectivamente (Figs. 26B y 27B)

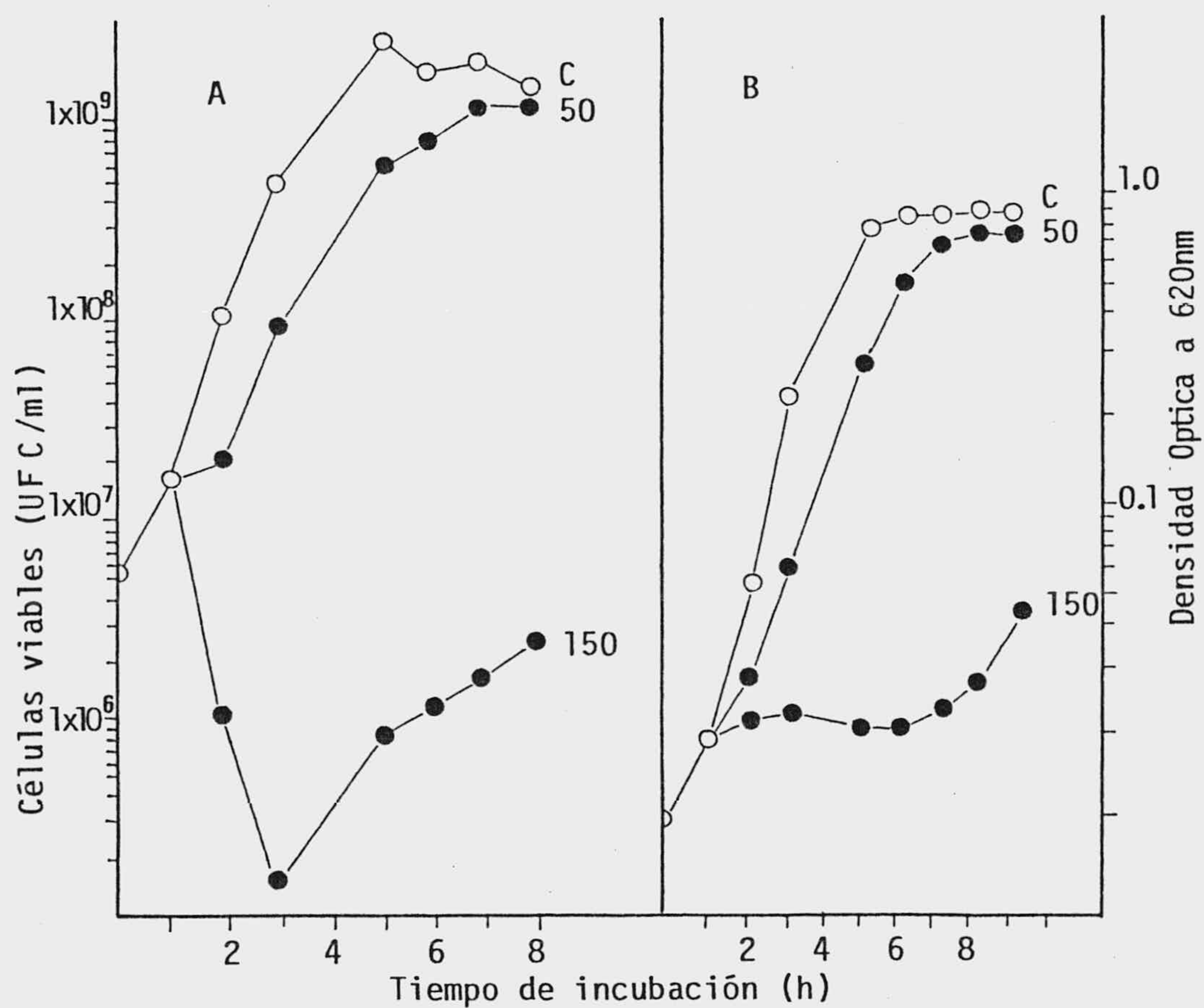


Fig. 26.- Curvas de supervivencia (A) y evolución de la DO_{620} (B) de cultivos de *E.coli* U-9 creciendo en BHI-T, adicionados de AS-48 (50 y 150 UAU/ml). Control (C).

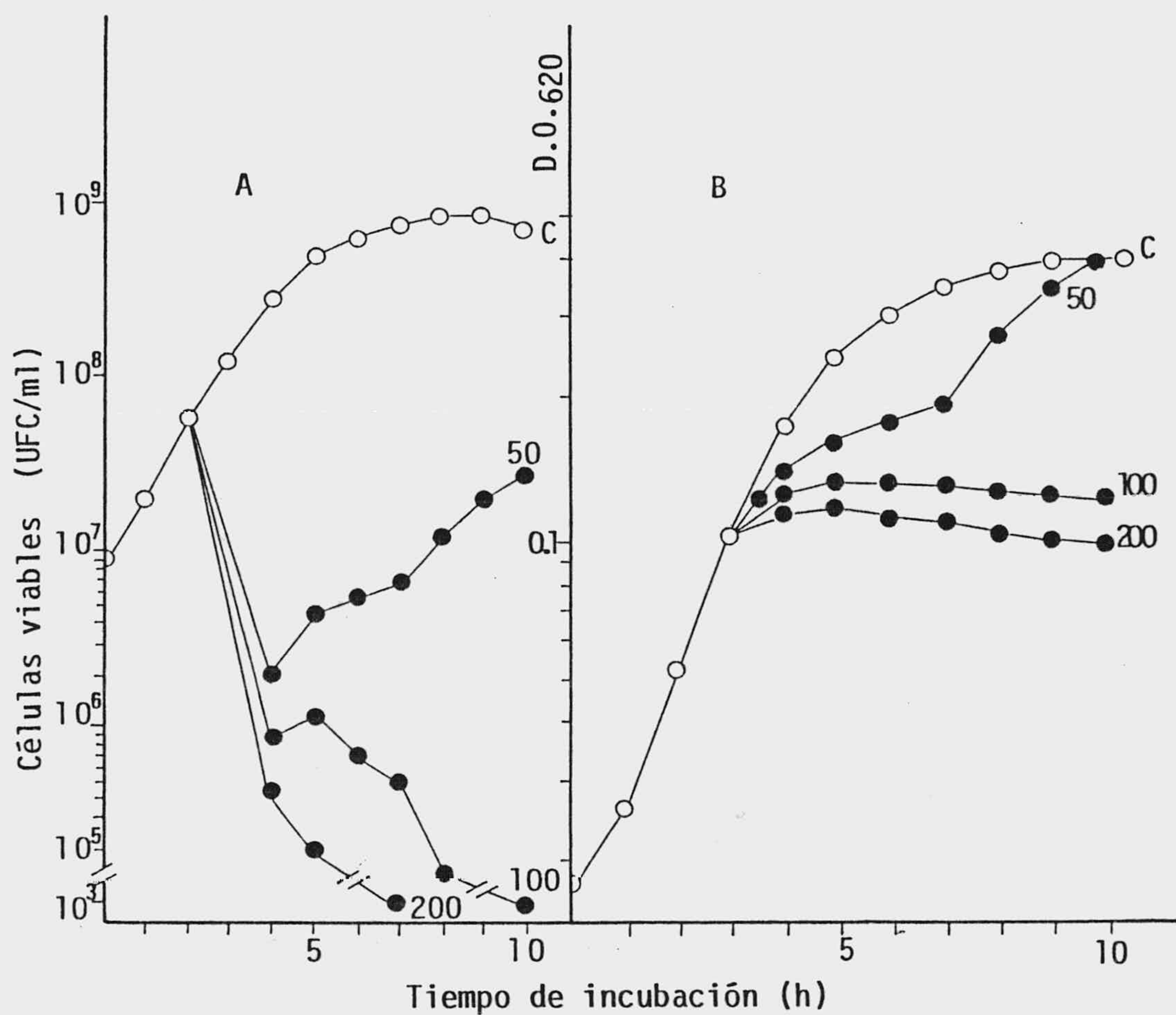


Fig. 27.- Curvas de supervivencia (A) y evolución de la DO_{620} (B) de cultivos de *E.coli* K-12 creciendo en MMGVB, adicionados de AS-48 (50, 100 y 200 UAU-9/ml). Control (C).

4.4.- Cinética de acción.-

Para determinar la cinética de acción de AS-48 sobre *S.faecalis* S-47 se adicionaron concentraciones crecientes de AS-48 (5, 10 y 15 U_{AS-47}/ml) a cultivos de esta estirpe creciendo en fase logarítmica, con una densidad celular de 1×10^8 UFC/ml, y se incubaron durante distintos periodos de tiempo (1, 5, 20, 40 y 60 min.). A concentraciones de antibiótico superiores a 10 U_{AS-47}/ml se observó que el tiempo de contacto requerido para reducir la supervivencia de los cultivos por debajo del 1% era muy corto, próximo a 1 min. (Fig. 28A), lo que indicaba una rápida captación del antibiótico por las células sensibles.

En experiencias separadas, las células fueron incubadas en idénticas condiciones con concentraciones crecientes de AS-48 durante 5 min., tras lo cual se procedió a su dilución en solución salina fría y posterior recuento en placa. Tal como se muestra en la Fig. 28B, a concentraciones superiores a 5 U_{AS-47}/ml se detectó una relación lineal entre la fracción de células supervivientes y la concentración de antibiótico empleada. A concentraciones inferiores, se observó un ligero hombro en la curva, característico de una cinética de blanco múltiple, aunque con un reducido número de impactos por célula.

Experiencias similares fueron llevadas a cabo en *E.coli* K-12. Los cultivos creciendo en medio MMGVB con una densidad celular de 1.3×10^8 UFC/ml, fueron incubados con concentraciones crecientes de AS-48. A los tiempos deseados (5, 10, 20, 40, 60 y 90 min.) se retiraron alícuotas para su dilución en solución salina fría y recuento (Fig. 29A).

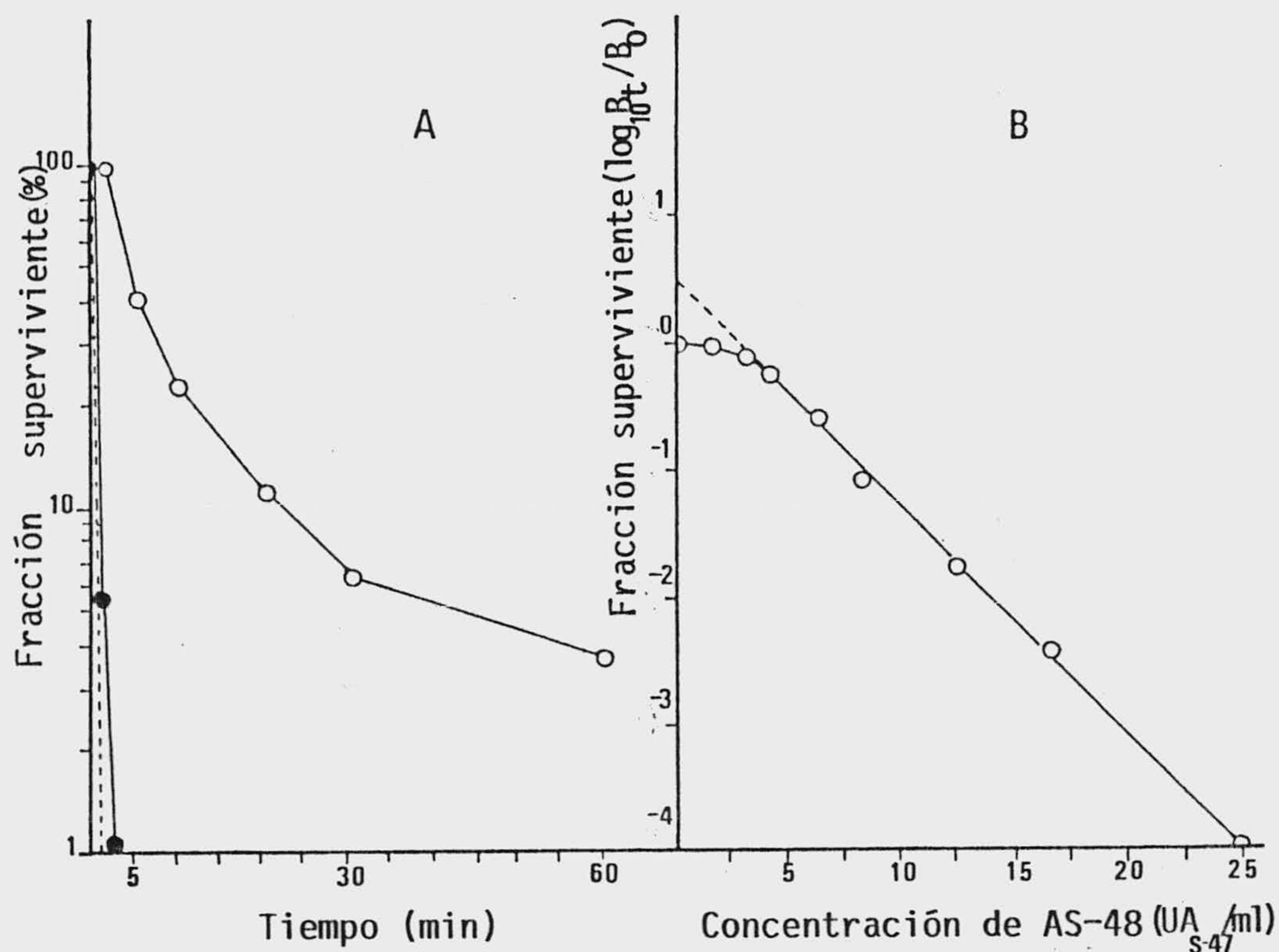


Fig. 28.- Cinética de muerte de *S. faecalis* S-47 por adición de AS-48. A.- Relación entre supervivencia, tiempo de contacto y concentración de antibiótico: 5 (o—o), 10 (●—●) y 15 UA_{S-47}/ml (-----). B.- Las células fueron incubadas durante 5 min. con concentraciones crecientes de antibiótico. (B_t = nº de células supervivientes en el tiempo t; B_0 = nº de células en el tiempo cero).

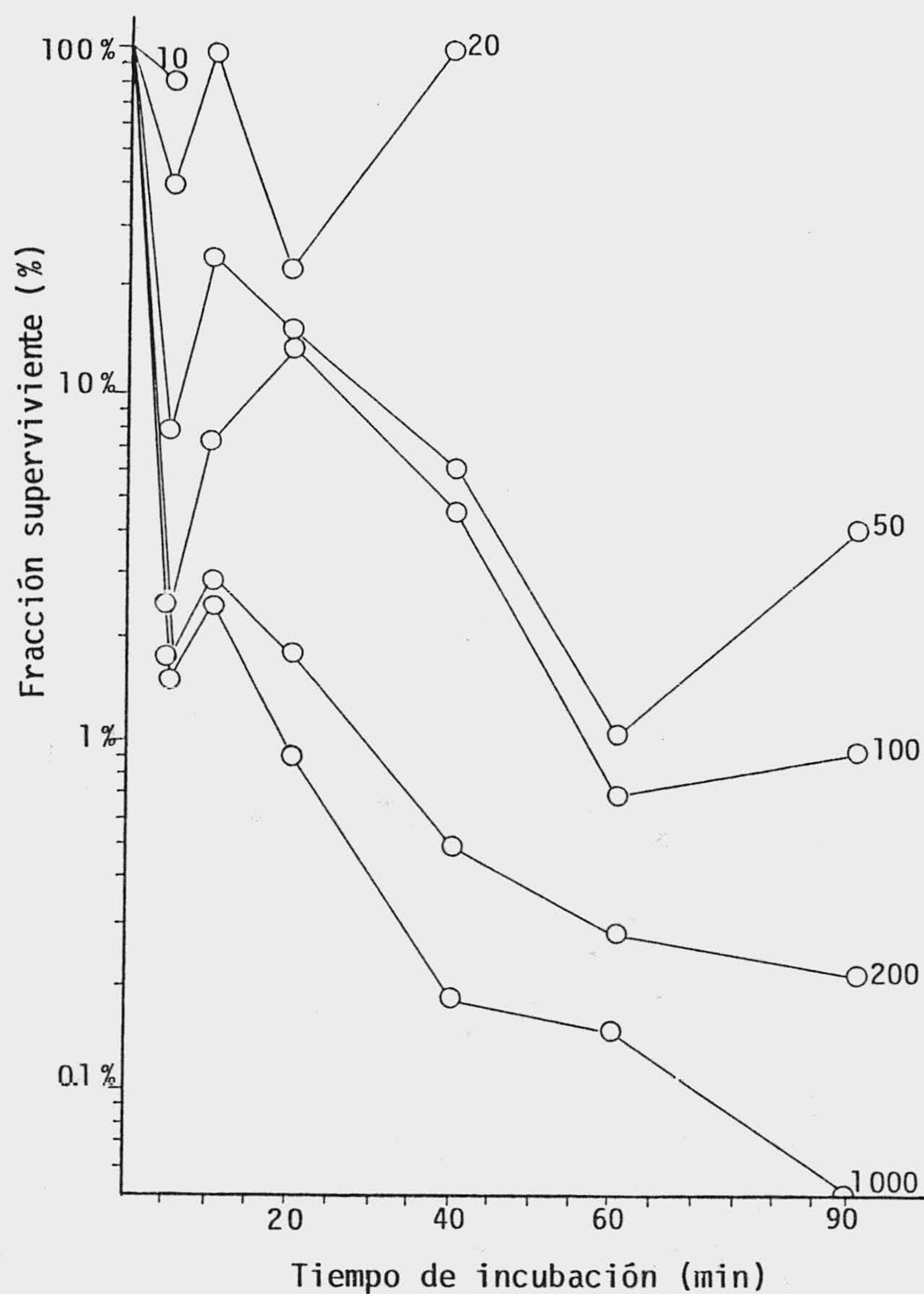


Fig. 29A.- Cinética de muerte de *E.coli* K-12 tras la incubación durante distintos intervalos de tiempo con concentraciones crecientes de AS-48 (de 10 a 1.000 UAU-g/ml).

Pese a las altas concentraciones de antibiótico usadas, no se logró disminuir la supervivencia por debajo del 1.5% tras 5 min. de contacto. Entre los 5 y 10 min. de incubación, la supervivencia del cultivo aumentó en general, para descender nuevamente en tiempos posteriores de incubación.

Cuando se representaron los porcentajes de supervivencia de *E.coli* K-12 obtenidos tras 5 min. de incubación en presencia de concentraciones crecientes de AS-48 (Fig. 29B) se obtuvo una curva de tipo sigmoidal, con tres tramos bien definidos: 1°.- A bajas concentraciones de antibiótico (entre 0 y 10 UAU₅₀/ml, la curva presenta un hombro típico de una cinética de impacto múltiple con un elevado número de blancos. 2°.- A concentraciones comprendidas entre 10 y 200 UAU₅₀/ml se observó un descenso en la viabilidad directamente proporcional al aumento en la concentración de antibiótico. 3°.- A concentraciones superiores a las 200 UAU₅₀/ml se alcanza una asíntota en la que no se consigue disminuir la fracción superviviente por debajo del 1.5%.

4.5.- Adsorción sobre células enteras y estructuras subcelulares.-

Se ensayó la capacidad de las células de *S.faecalis* S-47, *E.coli* K-12 (estirpes indicadoras) y *S.faecalis* S-48 (estirpe productora) de adsorber moléculas de AS-48, siguiendo el procedimiento descrito en Métodos 7.3.1. En todos los casos se observó una pérdida de actividad comprendida entre el 34 y el 40% de la actividad inicial, tras 30 min. de contacto (Tabla 11). Puesto que la incubación se llevó a cabo a 4°C, es difícil atribuir dicha pérdida a actividades enzimáticas propias de las células. Para descartar esta posibilidad, el experimento se repitió con células de *S.faecalis* S-47 muertas por autoclavado, detectándose también en este caso una capacidad de adsorción similar.

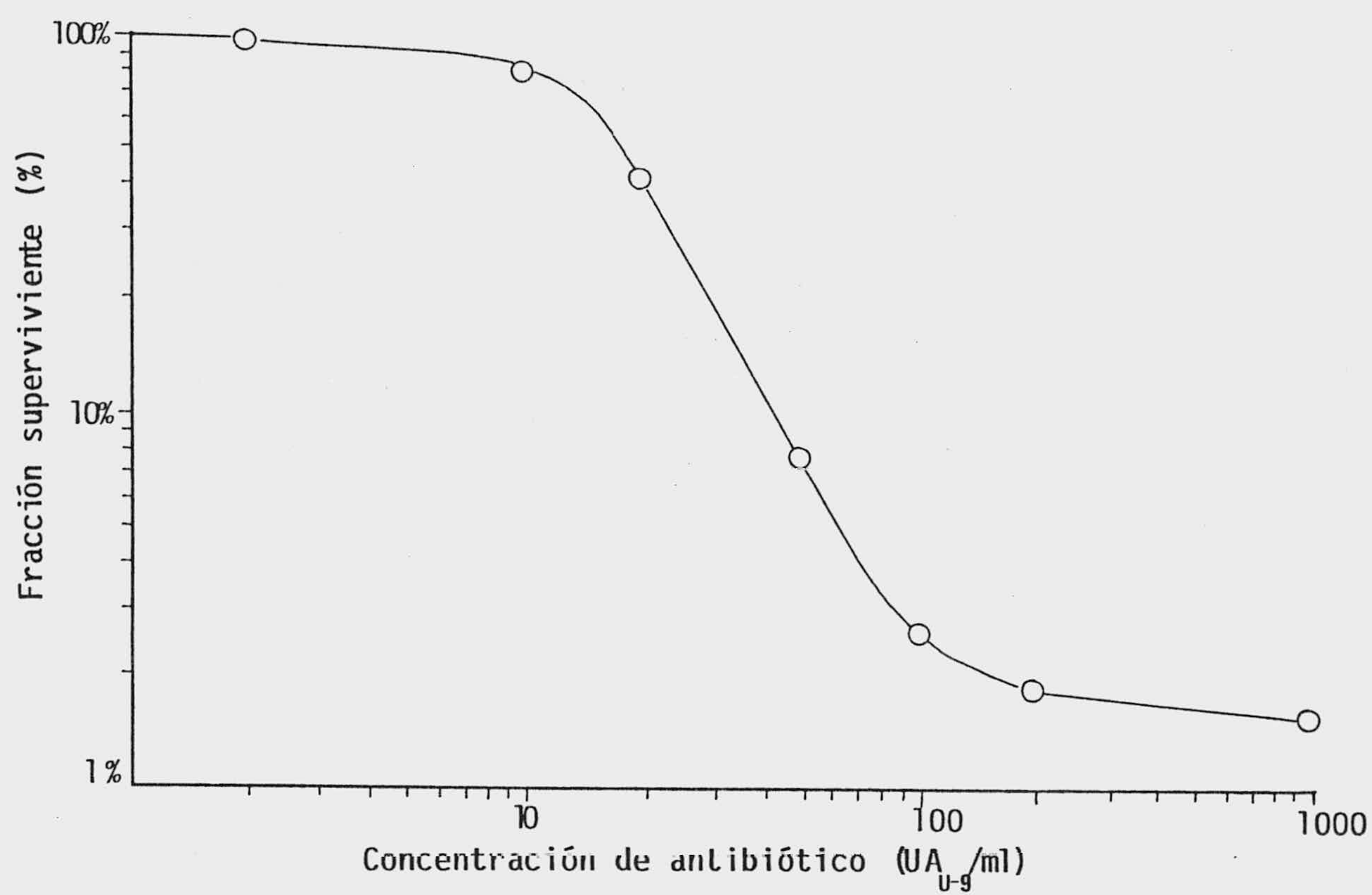


Fig. 29B.- Relación entre la concentración de antibiótico y el porcentaje de células supervivientes en *E.coli* K-12 tras 5 min. de contacto.

RESULTADOS

El tiempo de contacto requerido para dicha adsorción era mínimo. Así pues, en 1 min. de contacto *S.faecalis* S-47 adsorbía un 27% de la actividad presente, mientras que con tiempos de incubación entre 5 y 30 min. no se consiguió aumentar la cantidad de antibiótico adsorbido por encima del 32%.

En experiencias similares se determinó la adsorción de AS-48 (50 µg/ml) sobre paredes (2 mg/ml) y membranas (0.15 mg/ml) de *S.faecalis* S-47 obtenidos por lisis enzimática y centrifugación diferencial (Tabla 12). En ambos casos se observó una fuerte retención de AS-48 a estas estructuras celulares, detectándose posteriormente parte de la actividad en los sedimentos recogidos por

Tabla 11.- Adsorción de AS-48 sobre células bacterianas, autoclavadas o no.

Muestra	Actividad residual (UAS-47/ml)		% Adsorbido
Control		37	
Células de S-48	(30 min.)	22	40.5
Células de U-9	(30 min.)	25	32.4
Células de S-47	(1 min.)	27	27.0
"	" (5 min.)	25	32.4
"	" (10 min.)	25	32.4
"	" (15 min.)	25	32.4
"	" (30 min.)	25	32.4
"	"		
(autoclavadas)	(30 min.)	24	35.0

RESULTADOS

ultracentrifugación. La posibilidad de sedimentación de AS-48 a altas velocidades quedó desechada mediante un control paralelo. Tanto en la incubación con paredes como con membranas se detectó una pérdida importante de actividad, la cual no fue contrarrestada por adición del inhibidor de proteasas PMSF (2 mM).

Tabla 12.- Adsorción de AS-48 sobre paredes y membranas de *S.faecalis* S-47.

Paredes		Membranas	
Act. residual (UAS-47/ml)		Act. residual (UAS-47/ml)	
<u>Sobrenadantes:</u>		<u>Sobrenadantes:</u>	
AS-48	105	AS-48	105
Control pared	--	Control membranas	--
Pared + AS-48	19	Membranas + AS-48	--
Pared + AS-48 +PMSF	19	Membranas + AS-48 + PMSF	--
<u>Sedimentos:</u>		<u>Sedimentos:</u>	
AS-48	--	AS-48	--
Control pared	--	Control membranas	--
Pared + AS-48	10	Membranas + AS-48	--
Pared + AS-48 + PMSF	10	Membranas + AS-48 + PMSF	--

Peso seco Paredes: 2 mg/ml

Peso seco Membranas: 0.15 mg/ml.

4.6.- Acción sobre protoplastos.-

Con objeto de determinar el posible papel protector de las envueltas celulares en la actividad antibacteriana de AS-48 se ensayó su efecto sobre protoplastos de *S.faecalis* S-47, *E.coli* K-12, así como sobre protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* 3.2, cuyas células intactas habían mostrado ser resistentes a la acción de AS-48.

Cuando se incubaron protoplastos de *E.coli* K-12 con AS-48 (100 µg/ml) se observó un aclaramiento inmediato de la suspensión, presumiblemente debido a la lisis de los mismos (Fig. 30A), mientras que en los controles no se observó ningún efecto comparable.

La adición de AS-48 (100 µg/ml) a suspensiones de protoplastos de *S.faecalis* S-47 no ocasionó una disminución tan drástica en la turbidez de los mismos, sino una caída lenta y progresiva (Fig. 30B). Sin embargo, sí se observó un marcado efecto bactericida, con una supervivencia inferior al 0.001% tras 30 min. de incubación.

La sensibilidad de *S.cerevisiae* a AS-48 se ensayó en las distintas etapas seguidas para la obtención de protoplastos, de acuerdo con el procedimiento descrito en Métodos 7.4.3. Solamente tras el tratamiento con novozima, llevado a cabo a fin de eliminar la pared celular, se observó un descenso significativo en la supervivencia (Tabla 13), tras 30 min. de incubación con AS-48 (100 µg/ml). Así mismo, las medidas turbidimétricas realizadas mostraron un ligero descenso con respecto al control, sin que se llegase a observar una lisis significativa (Fig. 30C); esta evolución fue similar a la observada en *S.faecalis* S-47.

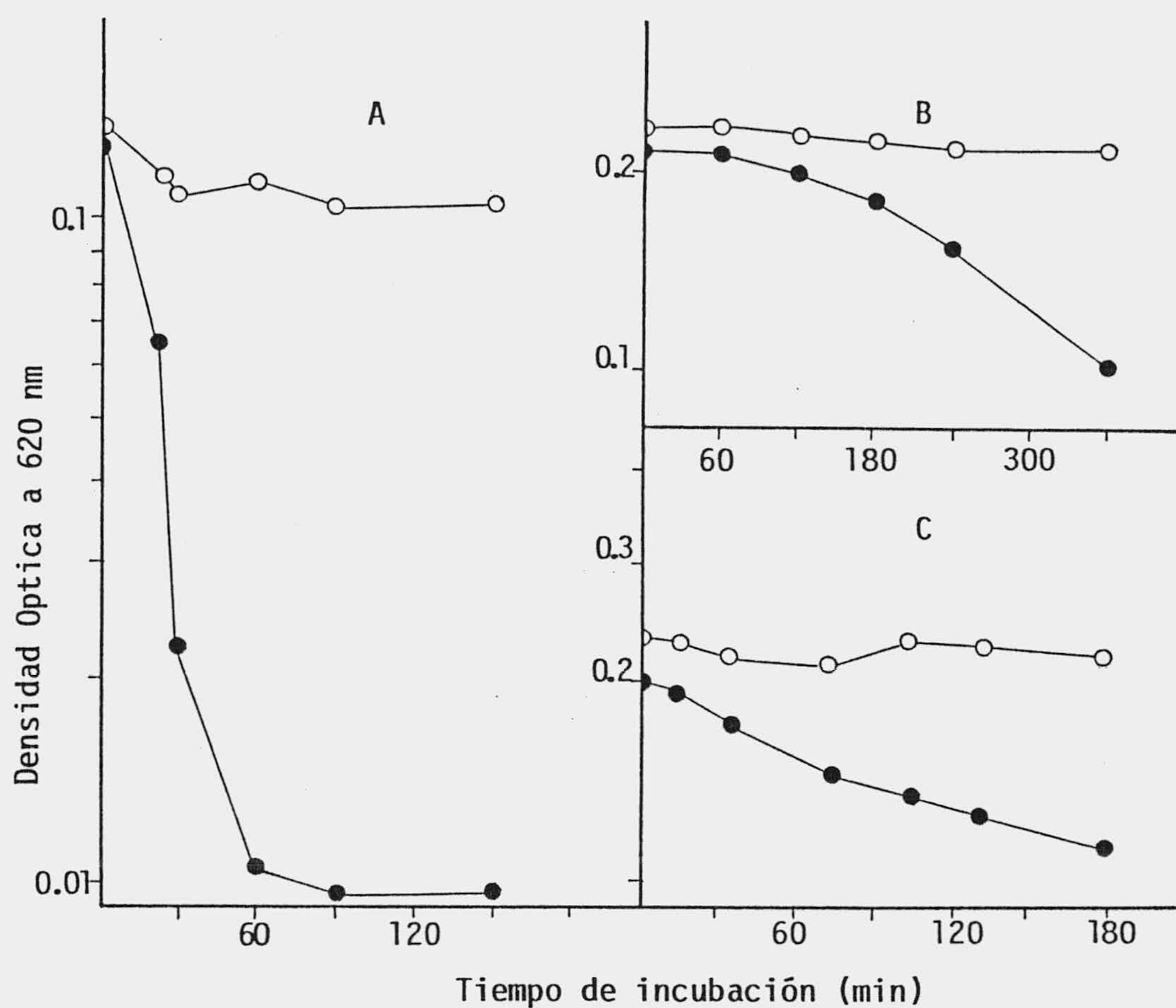


Fig. 30.- Efecto de AS-48 (100 $\mu\text{g/ml}$) sobre suspensiones de protoplastos de A.- *E.coli* K-12; B.- *S.faecalis* S-47; C.- *Saccharomyces cerevisiae* 3.2. Los símbolos en blanco representan a los controles; los símbolos en negro indican incubación con AS-48

RESULTADOS

Tabla 13.- Efecto del antibiótico AS-48 sobre la viabilidad de células enteras y protoplastos de *S.cerevisiae* 3.2.

Muestra	Células viables	
	Tampón	AS-48
Células enteras	6.2×10^7	6.2×10^7
Células + EDTA-DTT	5.6×10^7	4.8×10^7
Protoplastos	4.2×10^5	5.4×10^5

4.7.- Factores que influyen en la lisis de *S.faecalis* S-47 por AS-48.-

En primer lugar se determinó la influencia de la fase de crecimiento en la susceptibilidad de las células a AS-48; se comprobó que, tanto los cultivos en fase logarítmica como en fase estacionaria, se lisaban tras la adición de AS-48 (Fig. 31 A). Para los cultivos en fase logarítmica (DO_{620} comprendida entre 0.08 y 0.1) la concentración final de antibiótico fue de 8 UAS-47/ml. Para los cultivos en fase estacionaria se utilizaron 20 UAS-47/ml, en razón al mayor número de células presentes.

Seguidamente se determinaron aquellos factores que pudieran modular el efecto lítico ejercido por AS-48 sobre esta bacteria.

4.7.1.- Influencia del medio de cultivo.-

La composición del medio de cultivo, bien referida a los nutrientes empleados o a la presencia o no de tampón fosfato, influyó de forma más o menos significativa en la lisis. Así, por ejemplo, los cultivos creciendo en medio TSI se lisaron más rápidamente que los incubados en BHI (Fig. 31A). Así mismo, la presencia de tampón fosfato sódico (0.15 M, pH 7.2) en el medio TSI provocó un ligero retraso en la lisis, si bien cambios en el pH de dicho tampón entre 6 y 7.8 no tuvieron efecto alguno.

Los cultivos creciendo en el medio KTY2XH, que permite el crecimiento de *S.faecalis* en ausencia de un potencial de membrana, a pHs de 7.2 y 7.8 respectivamente, se lisaron de igual modo tras la adición de AS-48 (Fig. 31A).

Por otra parte, la adición de extracto de levadura a concentraciones finales de 2.5% y 5% respectivamente, a cultivos creciendo en medio BHI-T, previno parcial o totalmente la lisis de los mismos tras la adición de AS-48 (Fig. 31A). Para comprobar la viabilidad de las células tratadas en estas condiciones, se determinó el número de células viables en placas conteniendo BHI-T + E. levadura (5%). En todos los casos se observó una supervivencia inferior al 0.1%, tras 3h de incubación, indicando posiblemente un efecto bactericida como mecanismo de acción primario para AS-48, independiente quizá de su efecto bacteriolítico (Tabla 14).

4.7.2.- Influencia de la temperatura.-

La influencia de la temperatura de incubación en el proceso de lisis fue igualmente estudiada mediante transferencia de los cultivos a la temperatura deseada antes de la adición de AS-48. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 31B. Temperaturas de incubación en el rango de 28 a 37°C no alteraron significativamente el curso de la lisis, si bien los cultivos incubados a 45°C se lisaron más lentamente.

Así mismo, los cultivos incubados en presencia de antibiótico durante 4h a 4°C no se lisaron hasta que, una vez transferidos a 37°C, comenzó a detectarse crecimiento celular en el control, lo que indica una clara dependencia de la lisis con respecto a la actividad metabólica celular. De igual modo, los cultivos calentados a 60°C durante 15 min. no se lisaron hasta que las células supervivientes se recuperaron del tratamiento térmico; las células muertas por calentamiento a 100°C durante 15 min. no se llegaron a lisar (Fig. 31C).

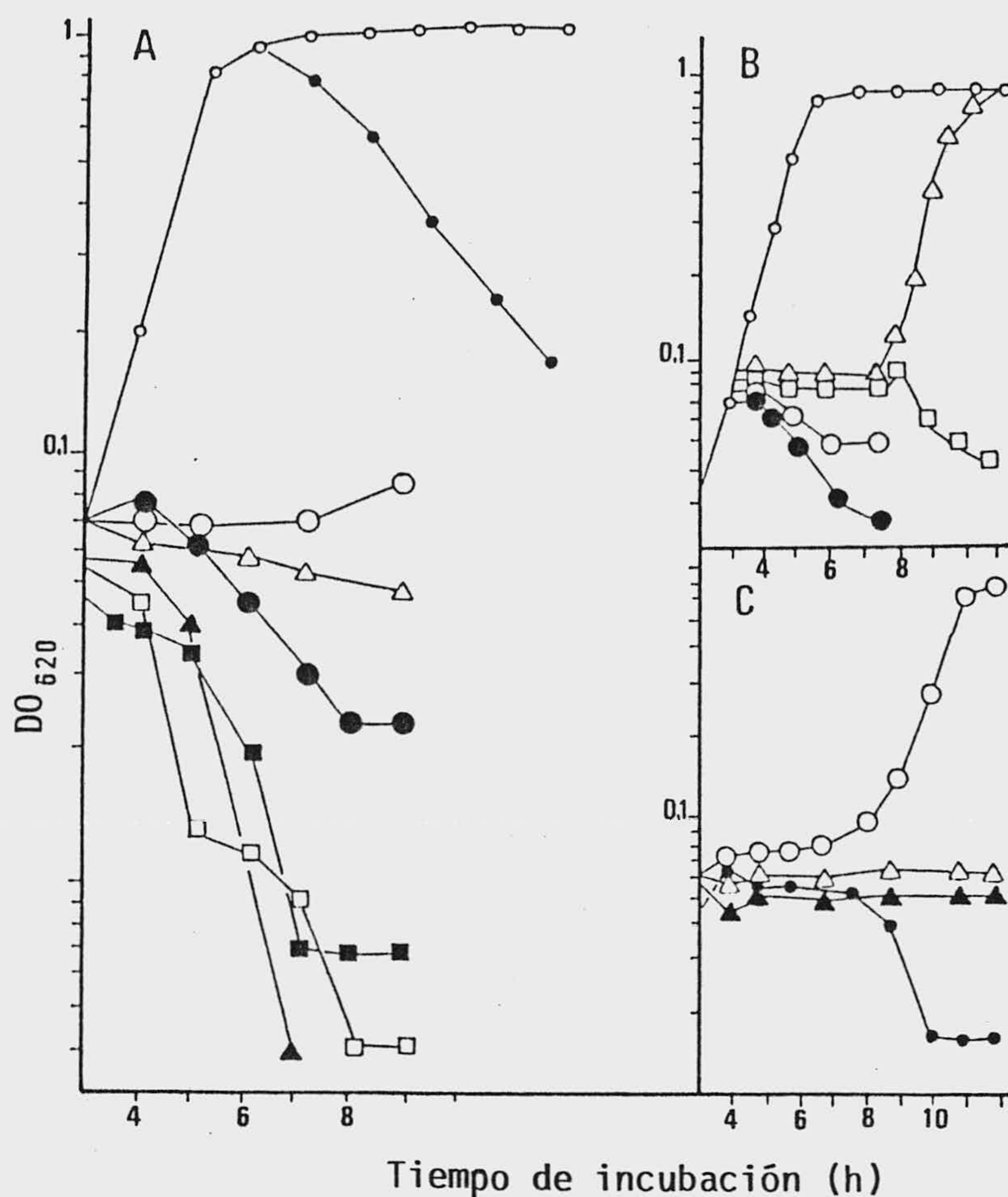


Fig. 31.- A.- Influencia del medio de cultivo en la lisis de *S. faecalis* S-47 creciendo en medio TSI ($\square$ — $\square$), TSI-T ($\blacksquare$ — $\blacksquare$), KTY2XH (pH 7.8) ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$), BHI-T ($\bullet$ — $\bullet$), BHI-T + E. levadura al 2.5% ($\triangle$ — $\triangle$) y al 5% ($\circ$ — $\circ$); BHI-T, en fase estacionaria ($\bullet$ — $\bullet$).

B.- Influencia de la temperatura de incubación en la lisis. La incubación se realizó en medio BHI-T a 37°C ($\bullet$ — $\bullet$), 45°C ($\circ$ — $\circ$) y 4°C ($\square$ — $\square$); control incubado a 4°C ($\triangle$ — $\triangle$); tras 4h de incubación a 4°C, los cultivos fueron transferidos a 37°C. C.- Los cultivos fueron calentados a 60°C ($\circ$ — $\circ$) y 100°C ($\triangle$ — $\triangle$) durante 15 min.; una vez fríos, se incubaron con AS-48 a 37°C (símbolos en negro).

4.7.3.- Influencia de los cationes mono y divalentes-

La adición de NaCl ó KCl a concentraciones finales entre 0.1 y 0.4 M a cultivos de *S.faecalis* S-47 en fase logarítmica no presentó influencia alguna sobre la lisis de los mismos tras la adición de AS-48. Sin embargo, la influencia de los cationes divalentes sobre la lisis fue notable. Los requerimientos en cuanto a cationes divalentes se pusieron de manifiesto por el hecho de que los cultivos adicionados de EDTA (0.33 mM) no sufrieron lisis alguna tras la posterior incubación en presencia de AS-48 (Fig. 32A). El efecto de AS-48 sobre *S.faecalis* S-47 bajo estas condiciones fue de tipo bactericida, ya que cuando se hizo recuento de células viables en placa, la supervivencia tras 3h de incubación con AS-48 fue del 0.23% (Tabla 14). Cuando la adición de EDTA se efectuó 5 min después que la de AS-48 no se observó ningún efecto antagonista sobre la lisis de los cultivos.

Para comprobar si la inhibición de la lisis por EDTA podía ser revertida mediante adición de cationes divalentes, los cultivos fueron tratados con EDTA + AS-48 y, 5 min. más tarde, se les adicionó CaCl_2 , MnCl_2 , MgSO_4 y ZnSO_4 a una concentración final de 2.5 mM respectivamente (Fig. 32B). La adición de sales de calcio y manganeso disminuyó parcialmente el antagonismo por EDTA, en el sentido de que se observó una lisis más o menos acusada. La adición de MgSO_4 o ZnSO_4 produjo una lisis rápida y completa de los cultivos, superior incluso a la observada solo en presencia de AS-48. Identicos resultados se obtuvieron cuando se utilizó MgCl_2 ó ZnCl_2 . La adición de ambos cationes 5 min. antes de adicionar AS-48 a cultivos no tratados con EDTA no mostró efecto alguno sobre la lisis de los mismos, posiblemente debido a que el medio de cultivo contenía ya las cantidades básicas necesarias de estos iones.

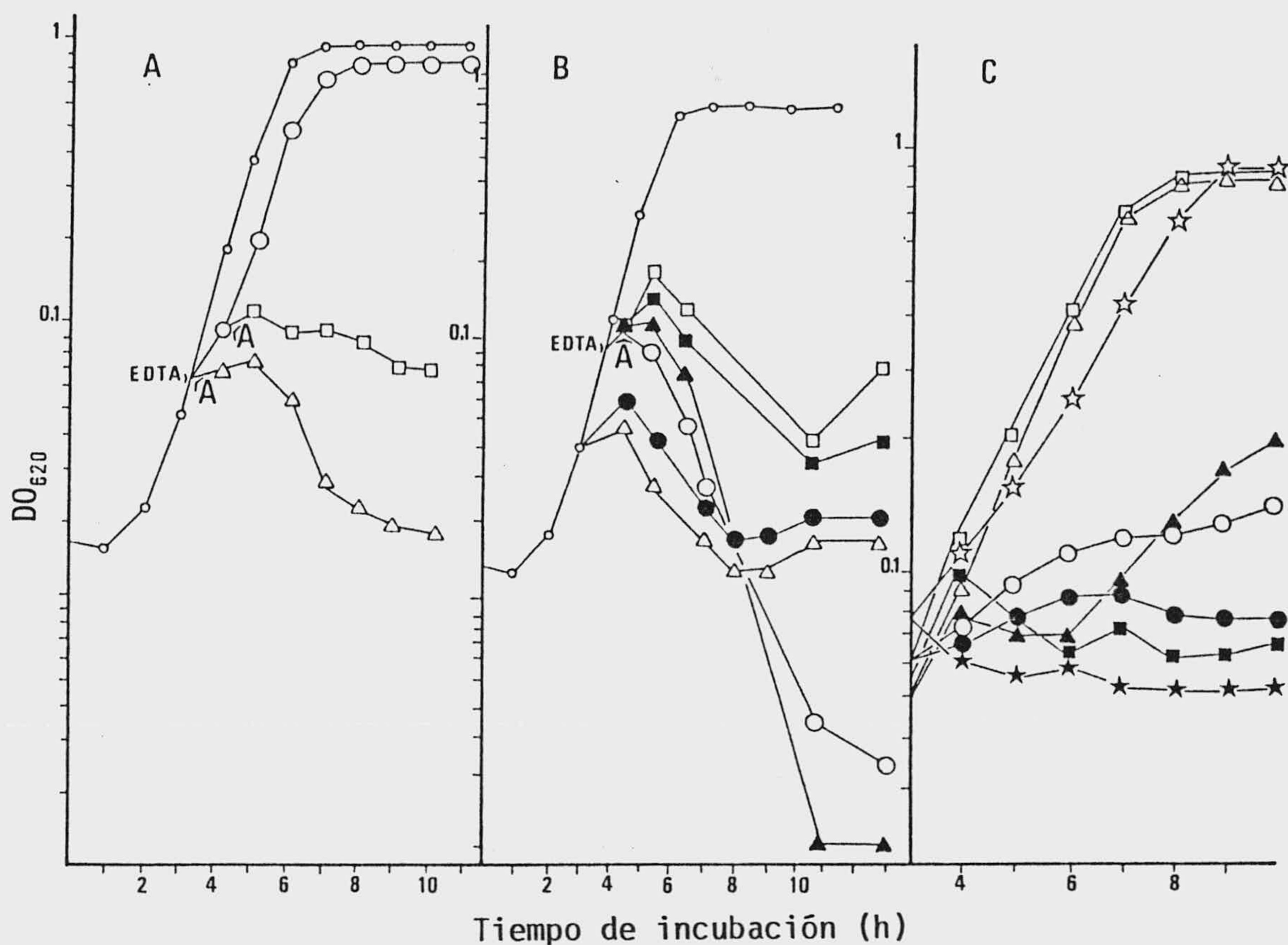


Fig. 32.- Influencia del EDTA (0.33 mM) y de los cationes divalentes en la acción bacteriolítica de AS-48 sobre *S. faecalis* S-47. A.- Antagonismo por EDTA. Cultivo control (○—○); control + EDTA (○—○); EDTA + AS-48 (adicionado 30 min. después que el EDTA) (□—□); AS-48 + EDTA (adicionado a los 5 min.) (△—△). B.- Efecto de los cationes divalentes (2.5 mM) sobre cultivos tratados con EDTA + AS-48 (adicionado a los 30 min. de incubación con EDTA). Los cationes se adicionaron a los 5 min. de incubación con AS-48: CaCl₂. (□—□); MnCl₂ (■—■); MgSO₄ (▲—▲); ZnSO₄ (○—○). Efecto del MgSO₄ en ausencia de EDTA (●—●). Efecto de AS-48 en ausencia de EDTA (△—△). C.- Efecto antagonista de otros cationes divalentes (1.25 mM) adicionados a los 5 min. de incubación con AS-48: CoSO₄ (☆—☆); FeCl₂ (△—△); FeCl₃ (□—□), o CuSO₄ (○—○). los símbolos en blanco representan los controles. Los símbolos en negro indican incubaciónn con AS-48.

Otros cationes como el Cobre, Cobalto, Hierro (II) y Hierro (III) a concentración final 1.25 mM mostraron un efecto antagonista sobre la lisis cuando se adicionaron 5 min. antes que AS-48 (Fig. 32C). Con la excepción del sulfato cúprico, que inhibió el crecimiento de *S.faecalis*, ninguno de ellos presentó efecto alguno sobre el crecimiento de los controles.

4.7.4.- Influencia de los agentes ionóforos-

Al adicionar agentes que alteran la permeabilidad de membrana bien para el K⁺ (valinomicina) o bien para los H⁺ (novobiocina o gramicidina D) a cultivos de *S.faecalis* S-47 en medio BHI-T, no se observó ningún efecto bacteriolítico sobre los mismos tras la posterior adición de AS-48 (Fig. 33A).

En el caso de la gramicidina D, la supervivencia de los cultivos tras 3h de incubación en presencia de AS-48 fue inferior al 5% con respecto a los cultivos incubados solo con gramicidina D (Tabla 14). Si embargo, la cantidad absoluta de células matadas por AS-48 en estas condiciones se vio sensiblemente reducida (de 6.99×10^7 células/ml en condiciones normales a 7.73×10^4 en presencia de gramicidina D) hasta un 1.15%, indicando una clara interferencia en la acción letal de AS-48. La adición de gramicidina D antagonizó la lisis de cultivos preincubados durante 1min., 30 min. o 60 min. con AS-48, pero no en los preincubados durante 120 min. (Fig. 33B).

S.faecalis, al igual que otras bacterias, como *E.coli* (Kinoshita et al, 1984) es capaz de crecer en ausencia de un potencial de membrana bajo ciertas condiciones culturales, como son un alto contenido en K⁺, bajo contenido en Na⁺, un pH básico (7.8) y un medio rico en nutrientes, condiciones que reúne el medio KTY2XH (Harold y Van Brunt, 1977). En este medio, *S.faecalis* S-47 se lisó de igual modo

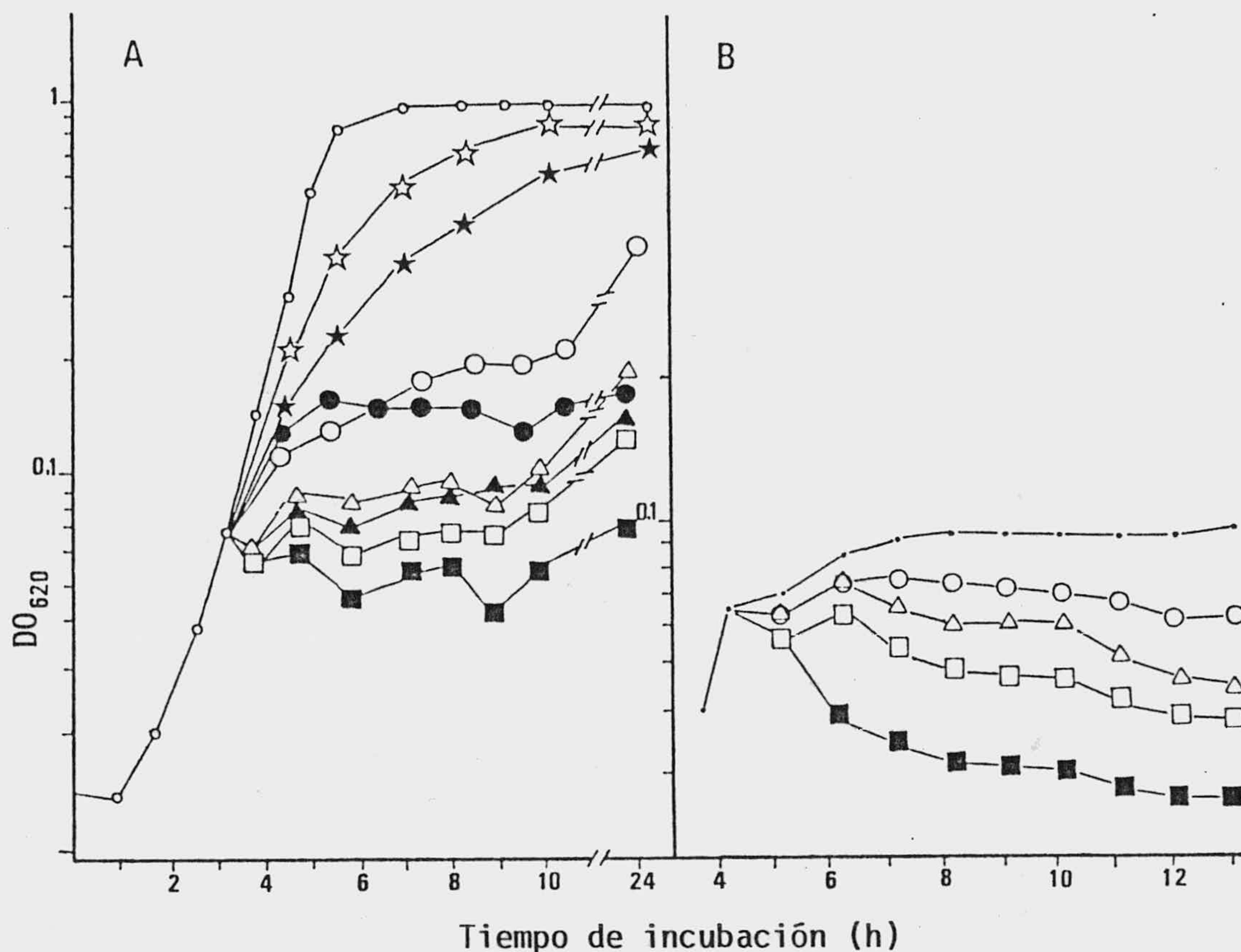


Fig. 33.- Interferencia de los agentes ionóforos con la acción lítica de AS-48. A.- Los agentes ionóforos fueron adicionados 30 min. antes que AS-48. Los símbolos en blanco representan los controles; los símbolos en negro corresponden a la incubación en presencia de ionóforo + AS-48: Valinomicina (0.8 mM) (○—○), Gramacidina D (10 μ M) (△—△), Novobiocina (0.8 mM) (□—□). Cultivos creciendo en medio KTY2XH + Gramacidina D (10 μ M) (☆—☆), y con Gramacidina D + AS-48 (8 U_{AS-48}/ml) (★—★). B.- Inhibición de la lisis por adición de Gramacidina D (10 μ M) 30 min. antes que AS-48 (•—•), o bien 1 min. (○—○), 30 min. (△—△), 60 min. (□—□) ó 120 min después (■—■).

que en otros medios tras la adición de AS-48, a la vez que presentó un crecimiento normal en presencia de gramicidina D (10 μ M) (Fig. 33A).

La adición de AS-48 a cultivos incubados en medio KTY2XH en presencia de gramicidina D, no tuvo ningún efecto detectable sobre el crecimiento de los mismos (Fig. 33A), posiblemente debido a la necesidad de un potencial de membrana adecuado, bien para la captación o para la acción letal de AS-48.

4.7.5.- Influencia del inhibidor de ATPasa DCCD.-

La inhibición específica de la ATPasa de membrana mediante adición de DCCD (2 mM) también impidió la lisis de los cultivos por efecto de AS-48 en medio BHI-T (Fig. 34A). Tras 3h de incubación en presencia de ambos agentes, la supervivencia fue del 25.8% con respecto al control (DCCD) (Tabla 14), valor este bastante superior a la supervivencia detectada en presencia de otros antagonistas ensayados. Por otra parte, el número de células /ml muertas por AS-48 tras 3h de incubación en estas condiciones fue de 9×10^3 , lo que supone un 0.01% del número de células muertas por AS-48 en condiciones normales en el mismo periodo de tiempo. Estos resultados indican una clara dependencia energética en la acción letal de AS-48.

La adición de DCCD previno la lisis de los cultivos incubados con AS-48 durante 30 min, pero no de los incubados durante 60 min (Fig. 34B).

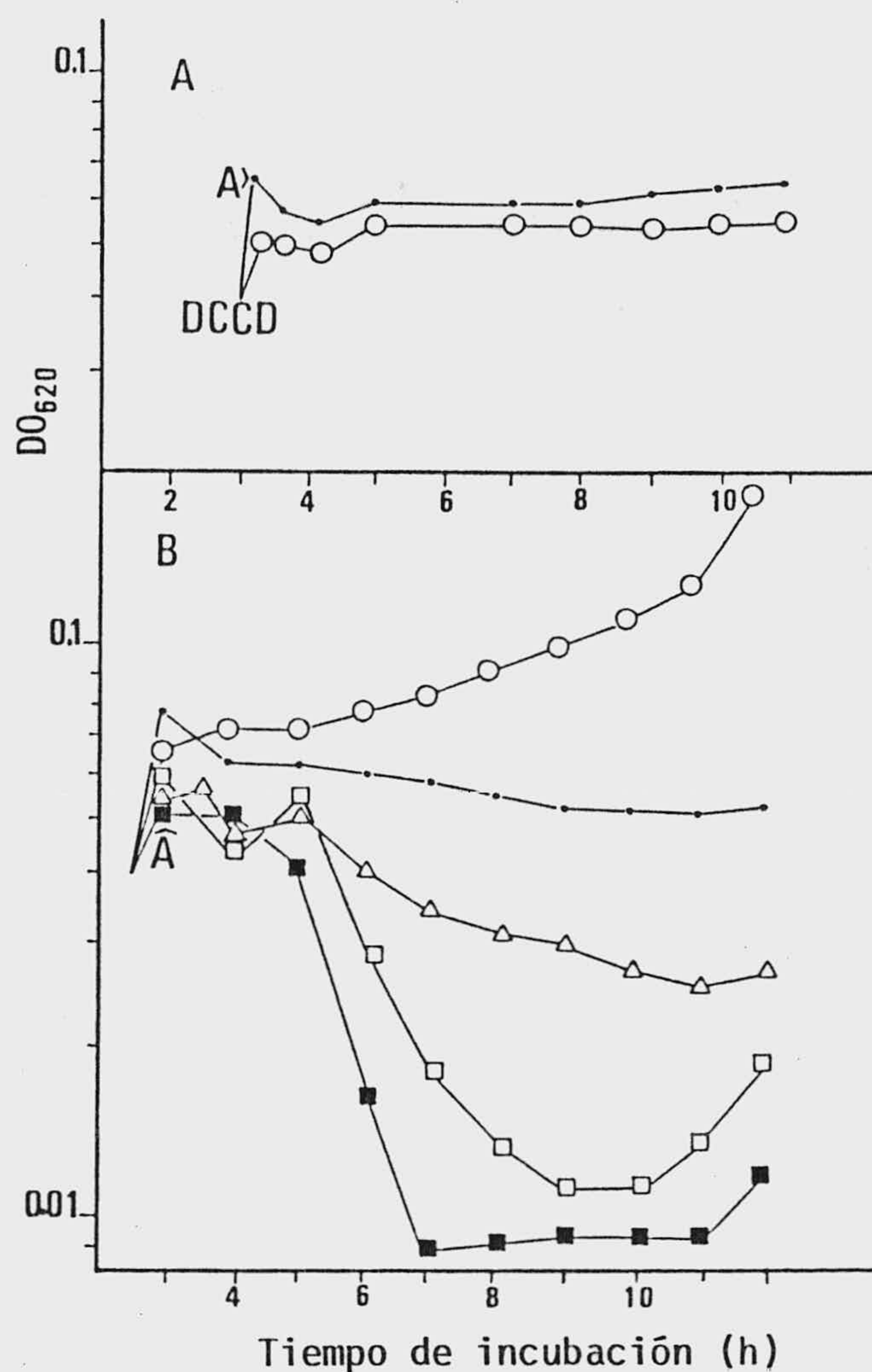


Fig. 34.- Efecto antagonista del inhibidor de la ATPasa DCCD (2 mM). A.- Control + DCCD (•—•); adición de AS-48 a los 15 min. de adicionar DCCD (O—O). B.- Adición de DCCD 30 min. antes que AS-48 (O—O), o bien 1 min. (•—•), 30 min. (Δ—Δ), 60 min. (□—□) o 120 min. (■—■) después.

RESULTADOS

Tabla 14.- Efecto de los distintos agentes antagonistas de la lisis sobre la supervivencia de *S.faecalis* S-47 tratado con AS-48.

Agente	t=0 UFC/ml	t=3h UFC/ml	% Supervivientes
Control	6.7x10 ⁷		
" + AS-48		4.5x10 ⁴	0.006
E. levadura (2.5%)	6.67x10 ⁷		
" " + AS-48		1.0x10 ³	0.001
E. levadura (5%)	6.76x10 ⁷		
" " + AS-48		2.6x10 ³	0.003
EDTA	2.6x10 ⁶		
" + AS-48		6.0x10 ³	0.23
Gramicidina D		8.1x10 ⁴	
" + AS-48		3.7x10 ³	4.50
DCCD		1.2x10 ⁴	
" + AS-48		3.0x10 ³	25.80

4.8.- Rescate de las células tratadas con AS-48

La posibilidad de revertir el efecto letal de AS-48 sobre las células tratadas fue verificada mediante tratamiento con diversos agentes antagonistas o inactivantes de este antibiótico, con objeto de determinar por una parte la reversibilidad del proceso, así como de definir posibles fases en su mecanismo de acción.

4.8.1.- Rescate mediante proteasas.-

Los cultivos de *S. faecalis* S-47 en fase logarítmica fueron adicionados de AS-48 y 5 min. más tarde, incubados con pronasa o proteasa. En ningún caso se observó recuperación alguna de los mismos hasta pasadas las 7h de incubación (Fig. 35A). El único efecto detectado en presencia de estos enzimas fue la inhibición total o parcial de la lisis. Ello planteó la necesidad de utilizar otros enzimas que tuviesen una mayor acción sobre AS-48, como la tripsina. Este enzima, además, presenta actividad proteolítica frente a las autolisinas latentes de la pared celular de *S. faecalis*, produciendo fragmentos activos a partir de las mismas (Shockman, 1974). Para ello el enzima debe acceder a las autolisinas celulares, lo que no ocurre en circunstancias normales; este enzima no mostró ningún efecto sobre el crecimiento de los cultivos control.

El efecto de la tripsina sobre cultivos tratados con AS-48 dependió del momento de su adición (Fig. 35B). Así, cuando dicha adición se efectuó 1 min. antes que AS-48, se observó una disminución rápida en la absorbancia del cultivo durante la hora siguiente de incubación, tras lo cual el cultivo empezó a recuperar su tasa de crecimiento normal, presumiblemente debido a la degradación de AS-48 por acción de la tripsina.

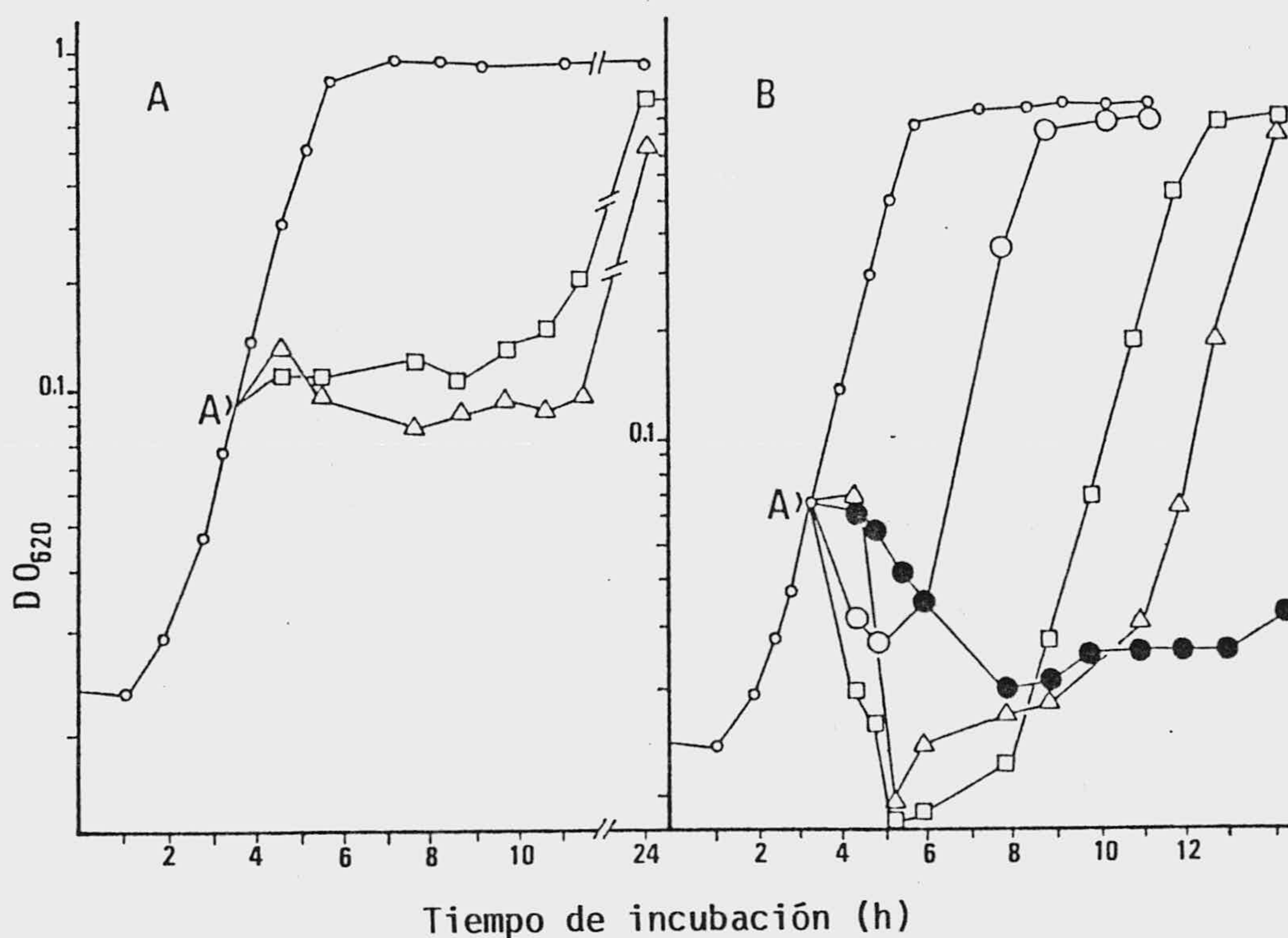


Fig. 35.- A.- Efecto de la adición de los enzimas proteolíticos (2.5 mg/ml) pronasa B ($\square-\square$) ó proteasa ($\Delta-\Delta$) a cultivos de *S. faecalis* S-47 a los 5 min. de adicionar AS-48. B.- Adición de tripsina (0.4 mg/ml) a cultivos tratados con AS-48: Efecto de AS-48 solo ($\bullet-\bullet$). Adición de AS-48 a cultivos en presencia de tripsina ($\circ-\circ$); adición de tripsina al minuto ($\square-\square$) ó a los 60 min. ($\Delta-\Delta$) después de adicionar AS-48.

Sin embargo, cuando la tripsina fue adicionada 1 min (ó bien 60 min.) después que AS-48, se detectó un descenso rápido y marcado en la DO_{520} del cultivo, y la recuperación del mismo tuvo lugar ya en etapas más tardías, posiblemente debido a que el número de células viables remanentes era mucho menor. La diferencia en la supervivencia del cultivo observada en un periodo de incubación tan corto apunta hacia una entrada muy rápida de AS-48 en las células, pasando a ser inaccesible al ataque por este enzima.

Para evitar esta acción cooperadora de la tripsina se diseñó otro tipo de experiencias, en las cuales los cultivos fueron incubados durante 5, 15, 30 ó 60 min. con AS-48 y posteriormente lavados con solución salina y resuspendidos en medio nuevo precalentado a 37°C, con objeto de medir el efecto de la tripsina sobre las moléculas de AS-48 adsorbidas a las células.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 36A. El tiempo requerido por los controles para recuperar la tasa normal de crecimiento aumentó con el tiempo de incubación en presencia de AS-48. Esta fase de retardo se vió reducida de forma relativa cuando las células fueron reincubadas en presencia de tripsina (Fig. 36B), de forma que sólo las células incubadas con AS-48 durante un corto periodo de tiempo (5 min.) recuperaron rápidamente su tasa de crecimiento normal.

El largo intervalo requerido por los cultivos incubados durante 15 o 30 min. para su recuperación, muy similar por otra parte al de los cultivos control, indicaría posiblemente la internalización de las moléculas de AS-48, de forma que solo una baja proporción de las moléculas adsorbidas se encontrarían en la superficie celular y serían susceptibles de ser atacadas por la tripsina. Solo en aquellos cultivos incubados durante 60 min.

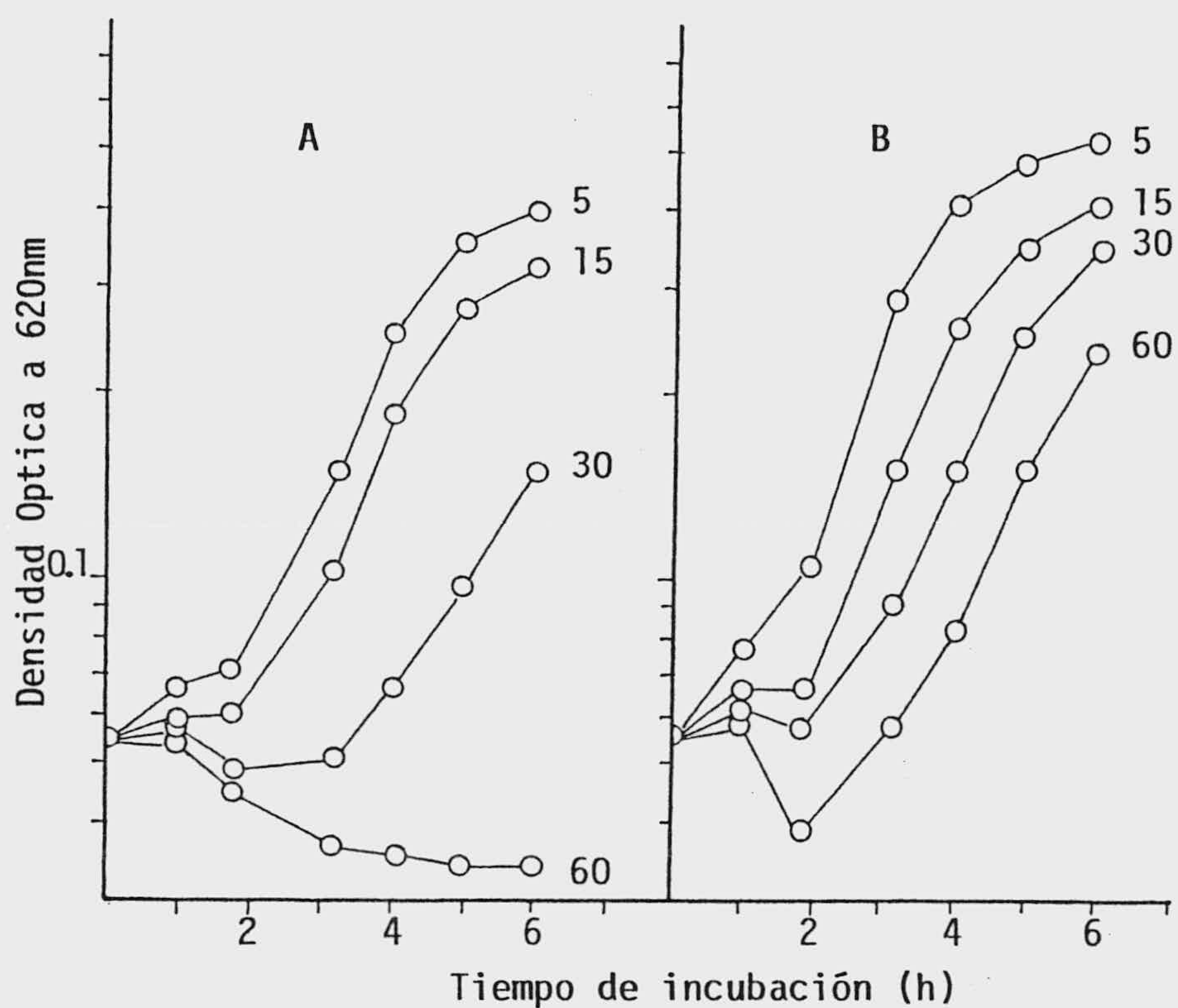


Fig. 36- Rescate por tripsina (0.4 mg/ml) de los cultivos incubados durante distintos intervalos de tiempo (5, 15, 30 y 60 min.) con AS-48 y posteriormente lavados con solución salina e incubados en medio nuevo. A.- Cultivos control. B.- Cultivos reincubados en presencia de tripsina.

con AS-48 se observó ya un efecto cooperador por parte de la tripsina en el sentido de acelerar, aunque no de forma notable, la lisis del cultivo.

4.8.2.- Rescate por SDS.-

La sensibilidad del antibiótico AS-48 al SDS quedó reflejada en el apartado 3.5 de este capítulo. Este agente desnaturalizante fue utilizado a concentraciones que permitiesen el crecimiento celular y que a la vez mostrasen un efecto inactivador significativo sobre AS-48. Para ello, la concentración final de antibiótico fue rebajada a 6 UAS-47/ml.

La adición de SDS (0.015%) a cultivos de *S. faecalis* S-47 a diversos tiempos (1, 30, 60 o 120 min.) después de adicionar AS-48, produjo una recuperación más o menos tardía del crecimiento normal. La fase de retardo más corta detectada fue de 1h para los cultivos preincubados con AS-48 durante 1 min. antes de adicionar el SDS. En todos los casos se observó una inhibición total de la lisis, posiblemente debida a la inactivación de las autolisinas por el SDS, si bien la recuperación del crecimiento fue ya muy tardía cuando este agente se adicionó a los 30 y 60 min.

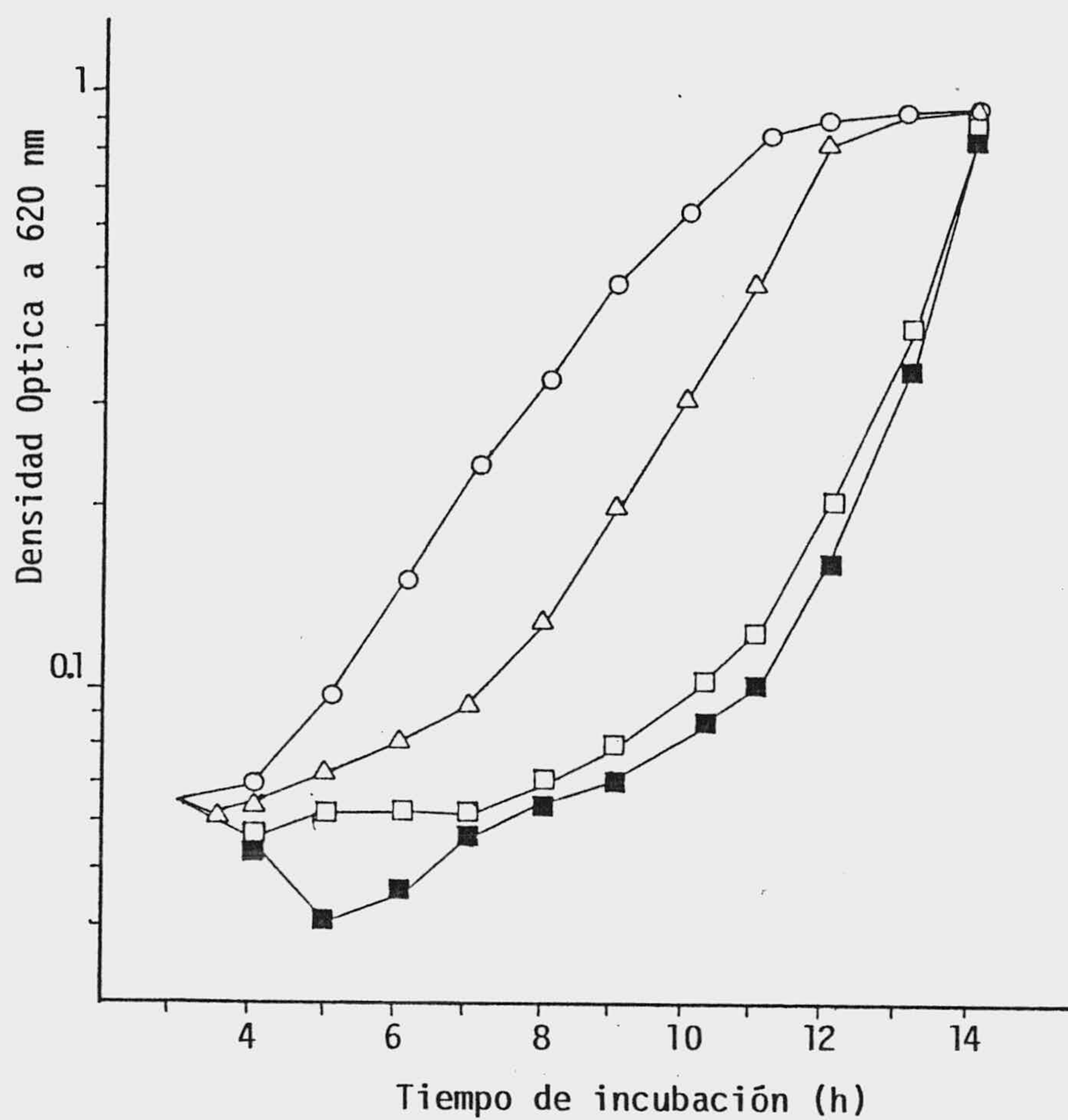


Fig. 37.- Efecto del SDS (0.015%) sobre cultivos de *S. faecalis* S-47 incubados en presencia de AS-48 (6 UAS-47/ml). La adición de SDS se efectuó al minuto (O—O), a los 30 min. (Δ—Δ), a los 60 min. (□—□) y a los 120 min. (■—■) de haber adicionado el antibiótico, respectivamente.

4.8.3.- Rescate por cardiolipina.-

Otro de los agentes antagonistas utilizados fue la cardiolipina, tanto por su capacidad de inhibir a las autolisinas de *S. faecalis* (Cleveland *et al.*, 1976) como por su efecto inactivante sobre AS-48 (apartado 3.5 de este capítulo).

La adición de cardiolipina a cultivos de *S. faecalis* S-47 10 min. antes que AS-48 (6 UAs-47/ml) antagonizó de forma muy significativa su efecto antibacteriano, ya que apenas se observó retraso en la evolución de la DO₆₂₀ del cultivo, y el número de células viables sólo se vió ligeramente afectado (Fig. 38A).

Resultados similares se obtuvieron cuando la cardiolipina fue adicionada 5 min. después de AS-48, si bien en este caso se observó ya una fase de retardo en la DO₆₂₀ del cultivo y una disminución del número de células viables.

La adición de cardiolipina tras periodos de incubación superiores a los 20 min. en presencia de AS-48 presentó ya una capacidad muy limitada para rescatar a las células dañadas, posiblemente debido a que éstas se encontrarían ya en una fase irreversible.

La presencia de cardiolipina sí manifestó, sin embargo, un efecto antagonista sobre la lisis de los cultivos aún en fases tardías tras la adición de AS-48 (Fig. 38B), presumiblemente debido a su efecto inhibidor sobre las autolisinas en *S. faecalis*.

Otros compuestos lipídicos como el fosfatidil inositol y el dicetil-fosfato mostraron un efecto antagonista similar sobre la actividad antibacteriana de AS-48 en *Streptococcus faecalis* S-47.



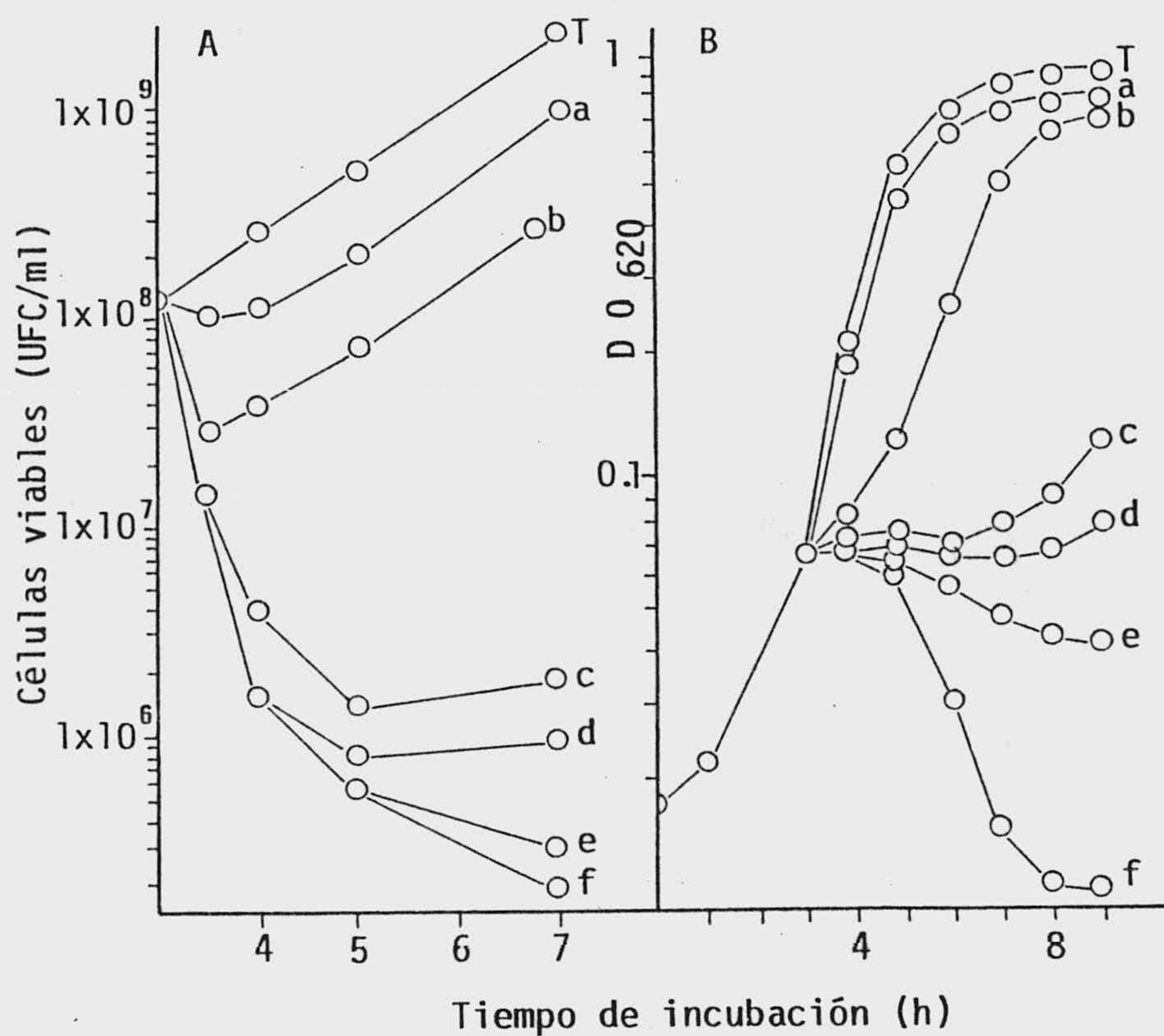


Fig. 38.- Rescate celular por adición de cardiolipina ($12.5 \mu\text{g/ml}$) a cultivos de *S. faecalis* S-47 incubados en presencia de AS-48 ($6 \text{ UA}_{S-47}/\text{ml}$). La cardiolipina se adicionó bien 10 min. antes que AS-48 (a), o bien a los 5, 20, 60 y 120 min. después (b-e). Efecto de AS-48 solo (f); control (T). A.- Número de células viables. B.- Evolución de la DO_{620} de los cultivos.

4.9.- Efecto sobre la incorporación de precursores de macromoléculas marcados con elementos radiactivos.-

Se realizaron dos tipos de experimentos. Por una parte se midió el efecto de AS-48 sobre cultivos creciendo en presencia de precursores marcados, y por otra sobre la tasa de incorporación de dichos precursores después de adicionar el antibiótico (Métodos, 7.5).

4.9.1.- Experiencias en *S. faecalis* S-47.-

Los cultivos de *S. faecalis* S-47 creciendo en presencia de precursores marcados fueron tratados con AS-48, observándose a continuación una detención inmediata en la acumulación de los mismos con respecto a los controles en cuanto a síntesis de proteínas, ADN, ARN y pared celular (Fig. 39). Así mismo, en periodos posteriores de incubación (a partir de 15 min.) se detectó una pérdida progresiva del material radiactivo previamente incorporado a ARN y pared celular, mientras que el incorporado a proteínas y ADN permaneció constante.

En experiencias separadas se midió la tasa de incorporación de precursores marcados (cantidad de radiactividad acumulada tras 3 min. de incubación con los mismos) en las células tratadas con AS-48. En todos los casos se observó una drástica reducción en la tasa de incorporación a los 5 min. de adicionar el antibiótico (Fig. 40).

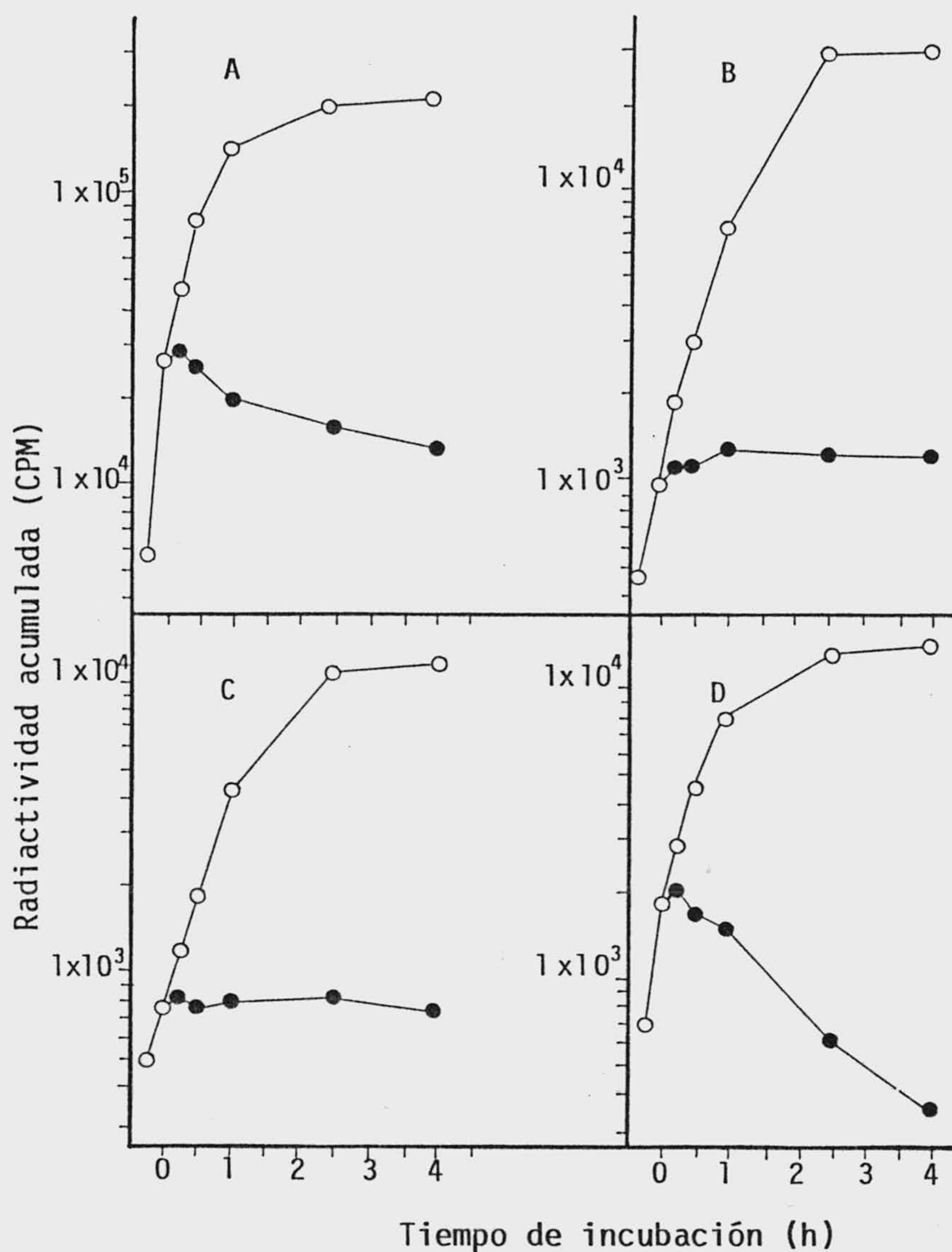


Fig. 39.- Efecto del antibiótico AS-48 (8 UAS-47/ml) sobre la incorporación de precursores marcados a macromoléculas en *S. faecalis* S-47. A.- Uridina. B.- Timidina. C.- Leucina. D.- Acetato. Los símbolos en blanco representan a los cultivos control, y los símbolos en negro a los adicionados de AS-48.

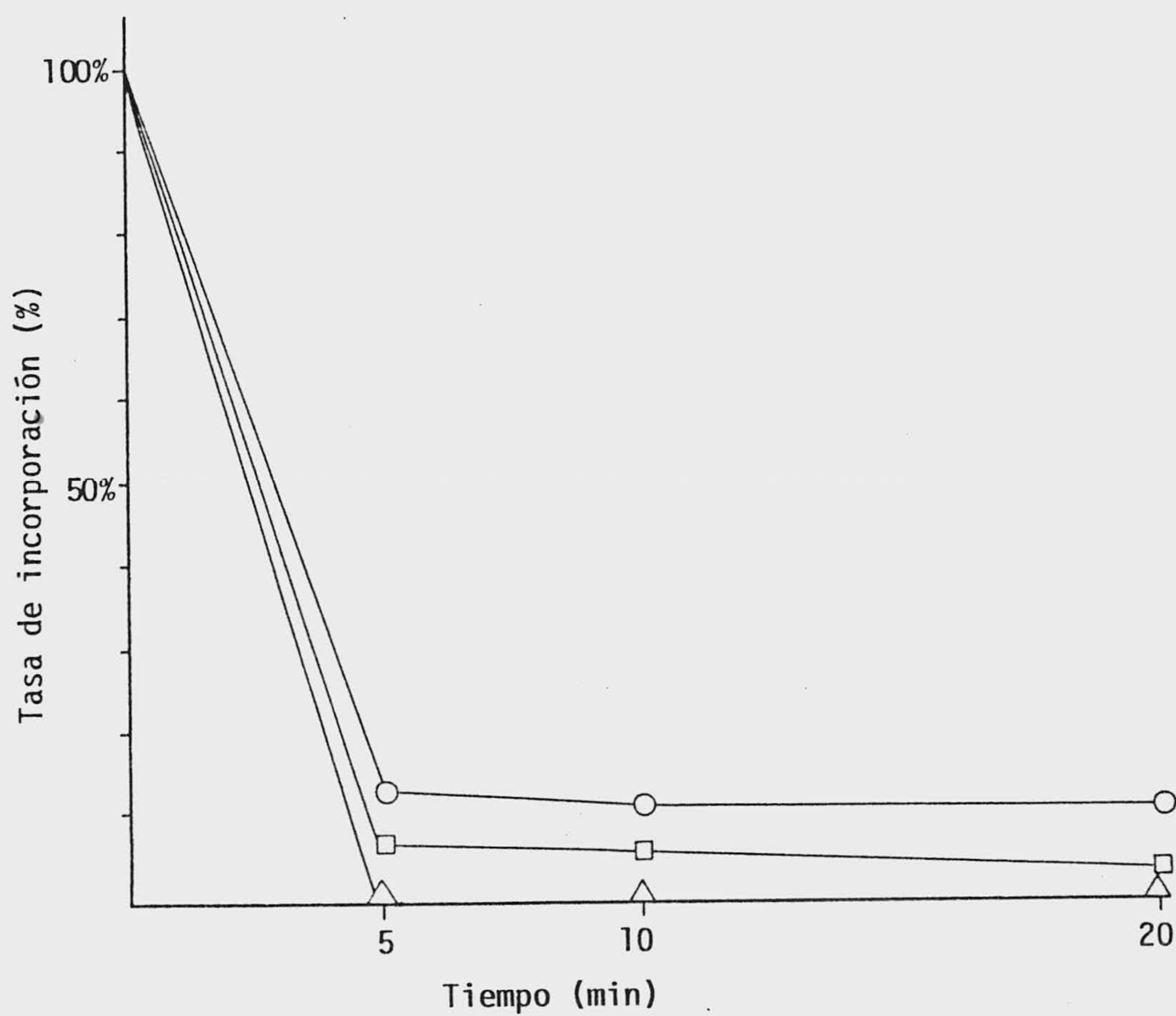


Fig. 40.- Efecto del antibiótico AS-48 (8 UAs-47/ml) sobre la tasa de incorporación en *S. faecalis* S-47 de precursores marcados a proteínas (O—O), ADN (□—□) y ARN (△—△).

4.9.2.- Experiencias en *E.coli* K-12.-

Experiencias similares fueron llevadas a cabo en *E.coli* K-12, siguiendo la metodología ya descrita.

En esta bacteria se observó una detención gradual en la incorporación de precursores marcados a proteínas, ADN, ARN y pared celular, detectándose una reducción significativa en la incorporación de dichos precursores entre los 15 y 30 min. siguientes a la adición de AS-48 (Fig. 41), sin que se pudiese asignar una inhibición primaria a ninguna de las rutas analizadas.

En todo caso se podría considerar que la síntesis de proteínas fuera la primera en detenerse. No obstante, el tratamiento a 100°C durante 15 min. llevado a cabo con este precursor podría ocasionar la pérdida de leucina incorporada a la célula pero no a proteínas, pérdida que no ocurriría en el caso de la uridina o la timidina acumuladas por la célula pero no incorporadas a ARN ó ADN. En efecto, cuando se repitió el experimento suprimiendo el tratamiento con calor, la detención en la incorporación de leucina marcada fue similar a la de los restantes precursores.

Así mismo, cuando se estudió el efecto de AS-48 sobre la tasa de incorporación de precursores marcados, se observó una reducción gradual en la misma en todas las rutas ensayadas, salvo en el caso de la leucina, en la que se detectó una reducción muy rápida en la tasa de incorporación en aquellas muestras calentadas a 100°C. Las muestras de este precursor no tratadas con calor mostraron una reducción en su tasa de incorporación paralela a la del resto de los precursores (Fig. 42).

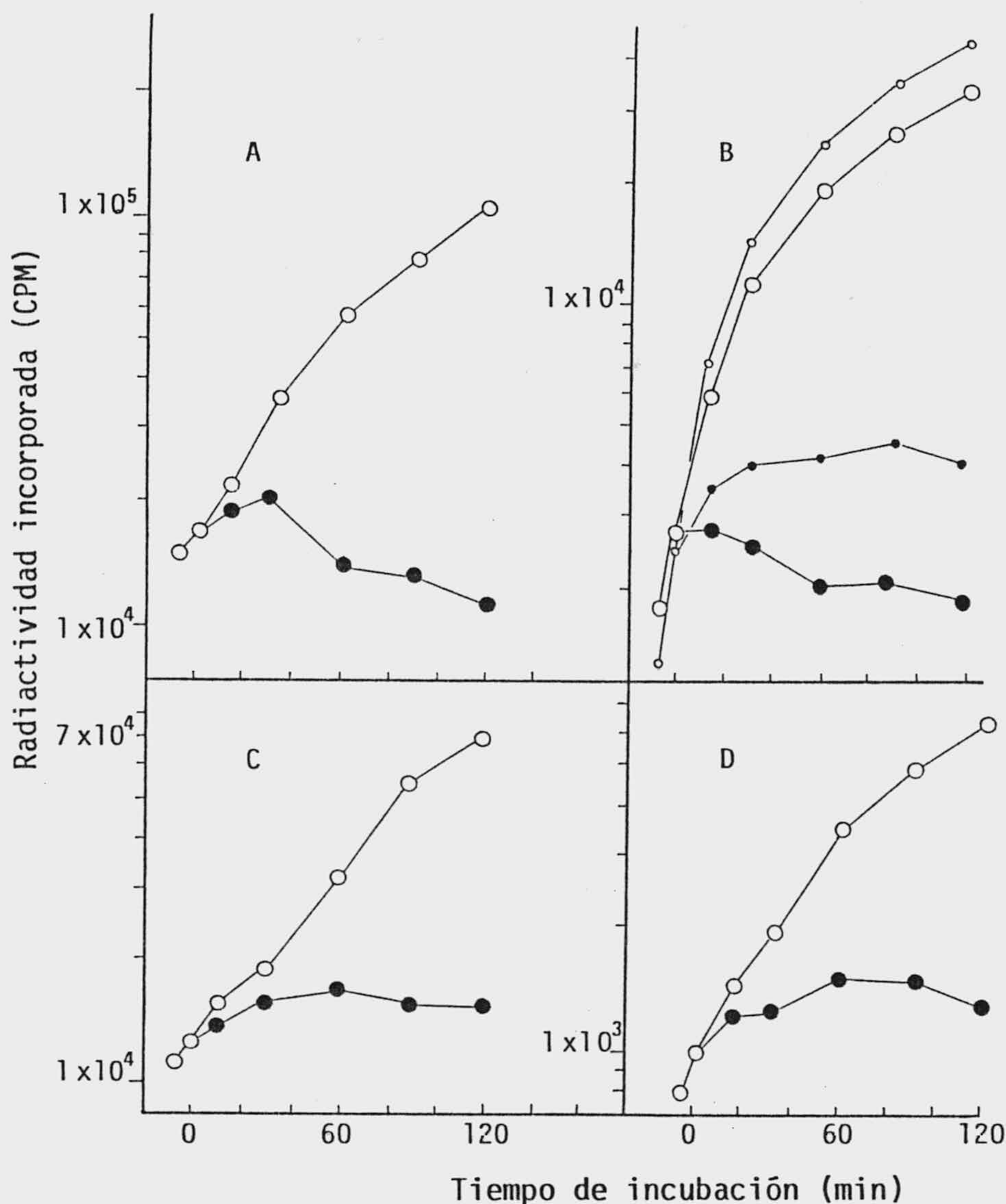


Fig. 41.- Efecto del antibiótico AS-48 (200 UAU₉/ml) sobre la incorporación de: A.- Uridina. B.- Leucina. C.- Timidina. D.- Meso-DAP, a macromoléculas en *E.coli* K-12. Los símbolos en blanco representan a los controles; los símbolos en negro corresponden a la incubación con AS-48. Para medir la incorporación de Leucina marcada se utilizó el procedimiento habitual, calentando las muestras a 100°C durante 15 min. (O—O); alternativamente se efectuaron determinaciones equivalentes suprimiendo el tratamiento térmico (o—o).

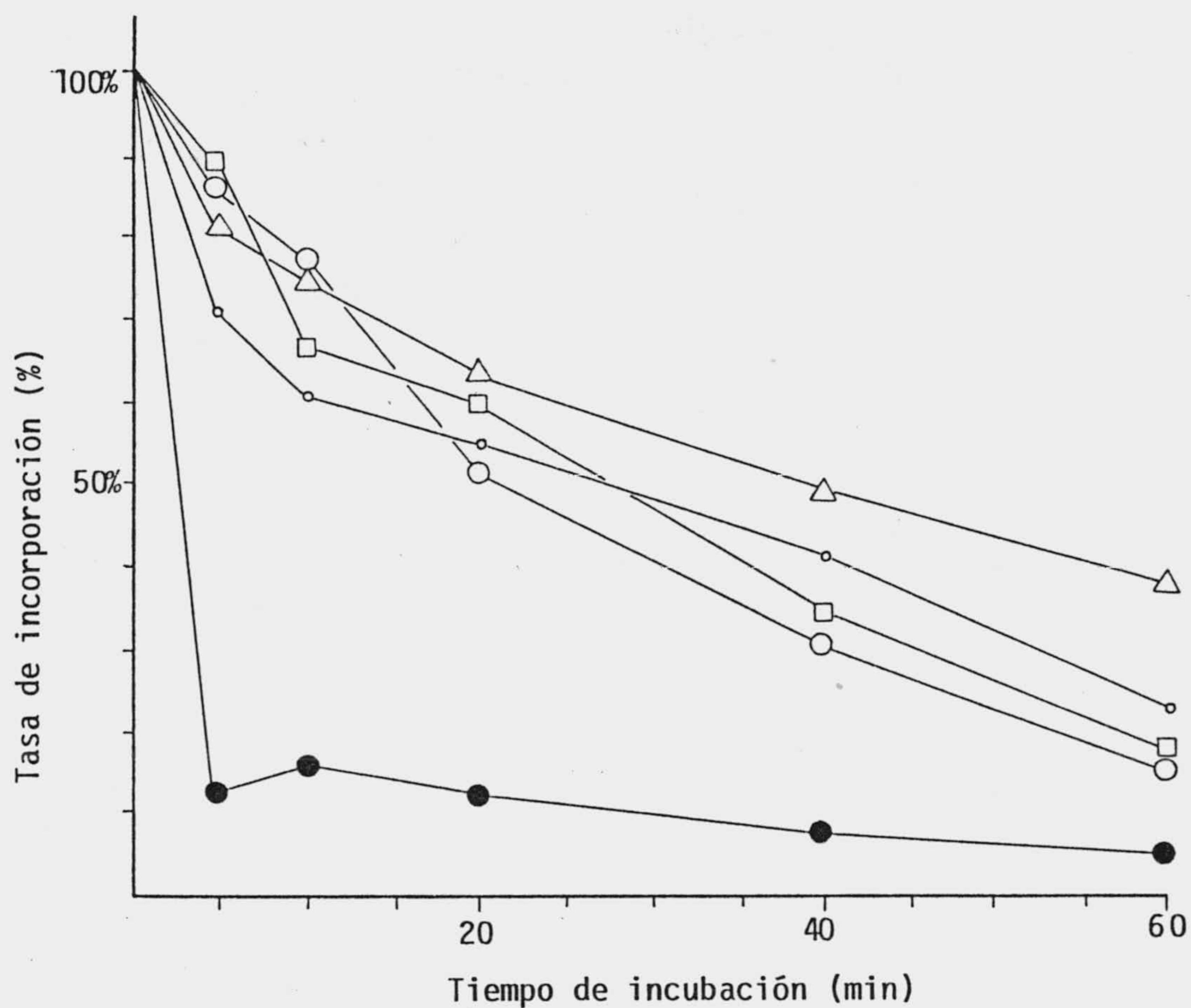


Fig. 42.- Efecto del antibiótico AS-48 (200 UAU-g/ml) sobre la tasa de incorporación en *E. coli* K-12 de precursores marcados a proteínas (●—●), ADN (□—□), ARN (△—△) y pared celular (○—○). La incorporación de Leucina marcada se midió también en muestras sin calentar (○—○).

4.10.- Efecto de AS-48 sobre el consumo de O_2 .-

El efecto de AS-48 sobre el consumo de O_2 en las células tratadas fue examinado de acuerdo con el procedimiento descrito en Métodos 7.6.1. Los cultivos de *S. faecalis* S-47 fueron incubados hasta alcanzar una $DO_{620} = 0.1$. En ese momento se retiraron alícuotas para medida del consumo de O_2 . Tras 30 segundos de estabilización, se registró la evolución de los niveles de O_2 en el cultivo, observándose un descenso rápido y lineal de los mismos (Fig. 43A). Seguidamente se adicionó AS-48 (8 UA_{S-47}/ml), detectándose a continuación una estabilización en los niveles de O_2 del cultivo, indicando el cese inmediato en el consumo del mismo por parte de las células. Esta estabilización no pudo deberse a un agotamiento del O_2 disuelto en el medio, según se comprobó con los controles adecuados.

La detención del consumo de O_2 en *E. coli* K-12 fue más lenta que en *S. faecalis* S-47. El cultivo fue incubado hasta una $DO_{620} = 0.1$. En ese momento se midió su tasa de consumo de O_2 (cantidad de O_2 consumido durante 20 segs.) y se le adicionó AS-48 a una concentración final de 200 UA_{K-12}/ml ; a continuación se observó una reducción progresiva en la tasa de consumo de O_2 (Fig. 43B) similar o quizá un poco más rápida, que la reducción detectada en la tasa de incorporación de precursores de macromoléculas marcados. Así, a los 30 min. de contacto con AS-48 la tasa de consumo de O_2 se redujo al 30% con respecto al control.

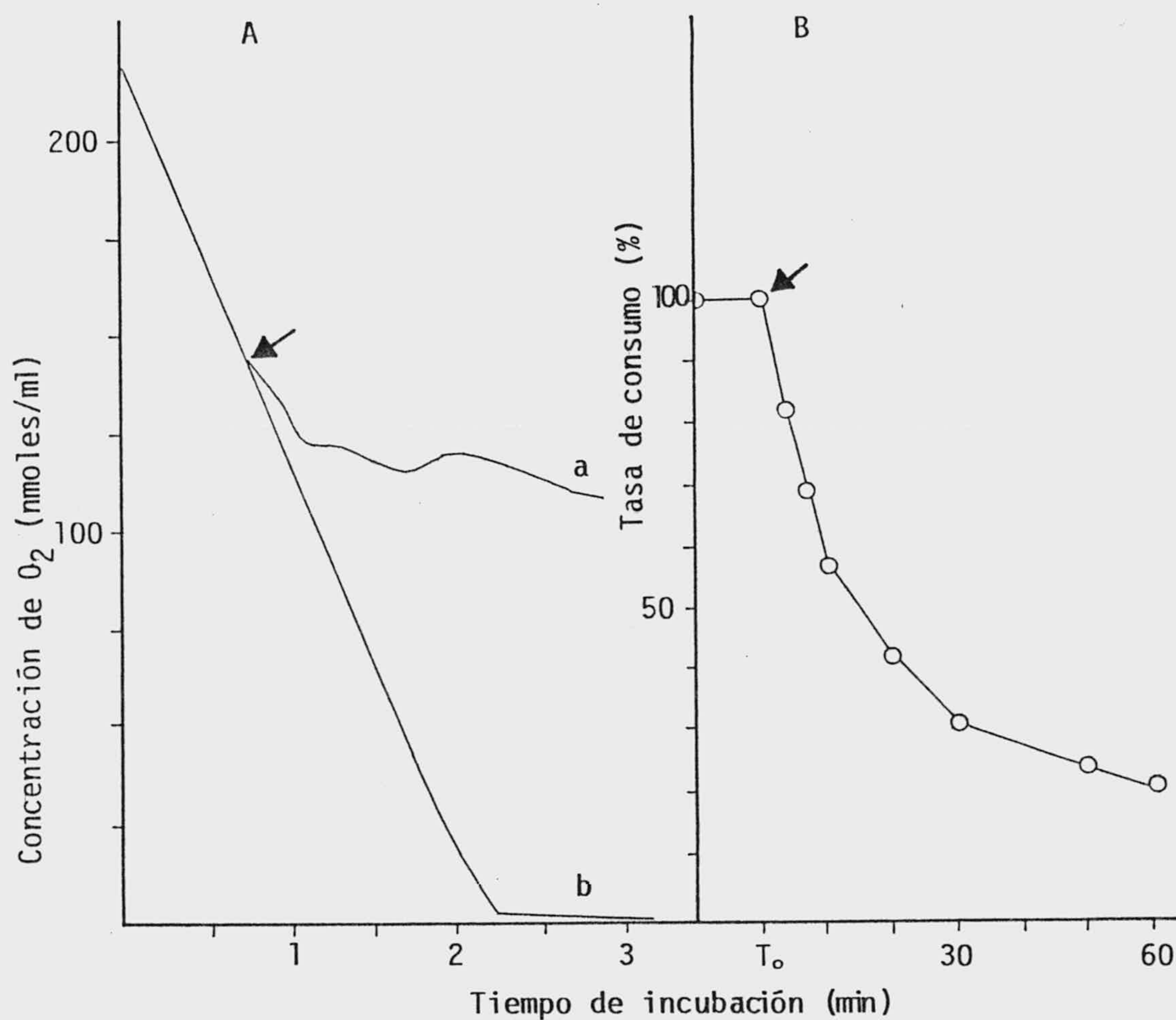


Fig. 43.-A.- Efecto del antibiótico AS-48 (8 UA_{S-47}/ml) sobre el consumo de O_2 en *S. faecalis* S-47 creciendo en medio BHI-T (a); consumo de O_2 por el control (b). B.- Inhibición de la tasa respiratoria en *E. coli* K-12 creciendo en MMGVB tras la adición de AS-48 (200 UA_{U-9}/ml). En ambos experimentos, las flechas indican el momento de adición del antibiótico.

4.11.- Efecto de AS-48 sobre la permeabilidad de la membrana celular.-

Para completar este estudio sobre los efectos de AS-48 sobre las células sensibles y profundizar en su mecanismo de acción se midieron dos nuevos parámetros:

Por una parte, se siguió espectrofotométricamente la liberación de material con absorción entre 260-280 nm, y por otra se determinó el contenido celular en Na^+ y K^+ .

Ni en *S. faecalis* S-47 ni en *E. coli* K-12 se detectó liberación alguna de material con absorción a estas longitudes de onda durante los 60 min. siguientes a la adición de AS-48.

Sin embargo, en *S. faecalis* S-47 se observó una inversión en el contenido celular en Na^+ y K^+ a los 5 min. de adicionar AS-48 (8 $\text{UAS}_{-47}/\text{ml}$) (Fig. 44), con una pérdida importante del contenido en K^+ , pérdida que se mantuvo en etapas posteriores, así como un fuerte aumento en los niveles internos de Na^+ ; el contenido de este ión descendió a niveles básicos después de 40 min. de incubación en presencia de antibiótico.

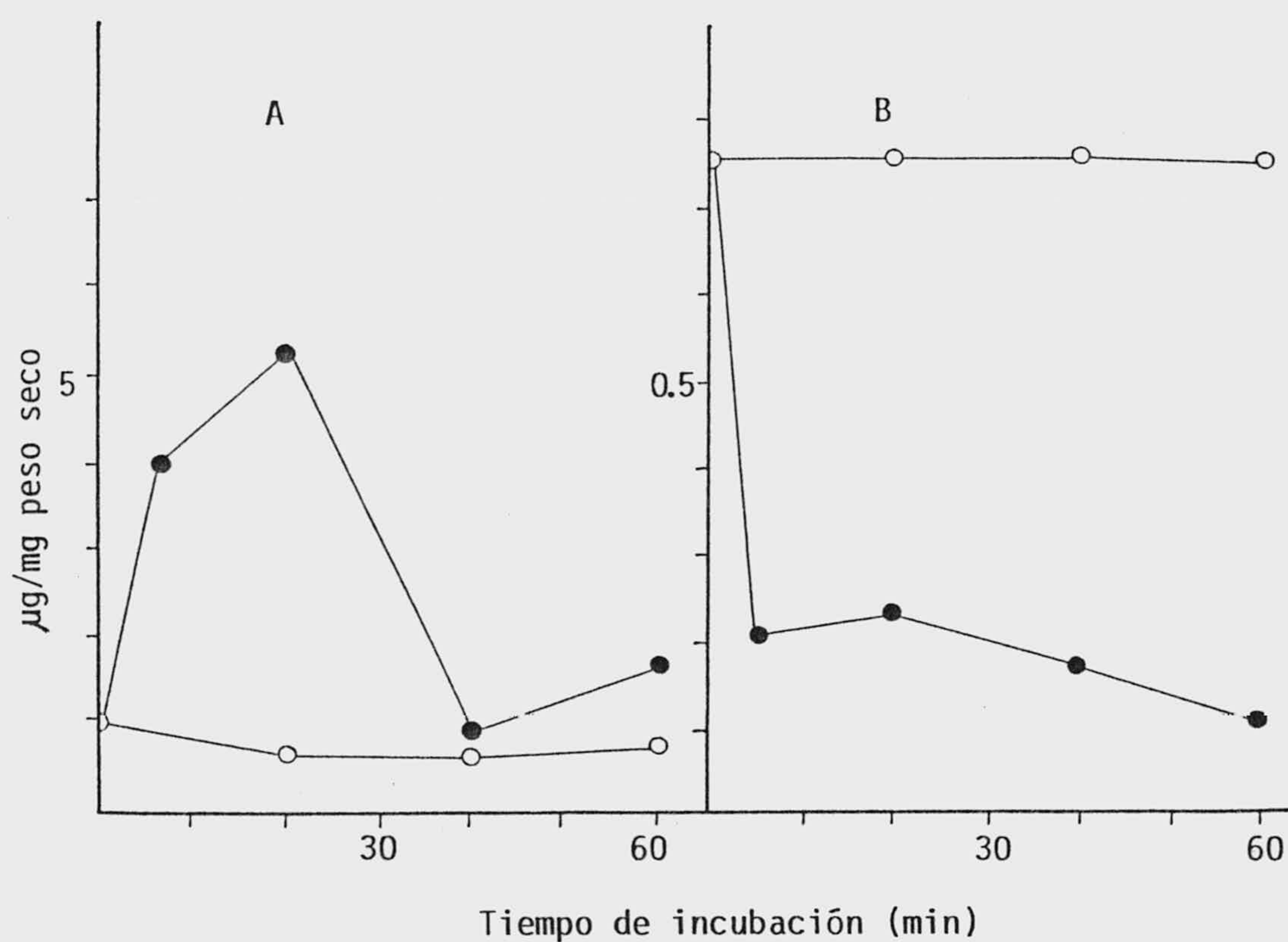


Fig. 44.- Efecto de AS-48 sobre el contenido celular en Na^+ (A) y K^+ (B). Los símbolos en blanco representan al control; los símbolos en negro corresponden a las muestras tratadas con AS-48.

4.12.- Observación al microscopio electrónico de las células de *Streptococcus faecalis* S-47 tratadas con AS-48.-

En la Fig. 45 se observa el aspecto de las células de *S. faecalis* S-47 tras dos horas de incubación en presencia de AS-48. En ellas se aprecia una pérdida total del contenido citoplásmico, así como rotura de la pared celular a nivel del septo de separación, conservando en el resto de la periferia la estructura típica más o menos intacta, lo que sugiere una degradación puntual a nivel de la zona de crecimiento de la pared celular, precisamente donde se localiza la mayor actividad autolítica en condiciones normales de crecimiento.

Este fenómeno, junto con un aclaramiento progresivo del contenido citoplásmico se observa en células tratadas con AS-48 durante periodos de tiempo más cortos.

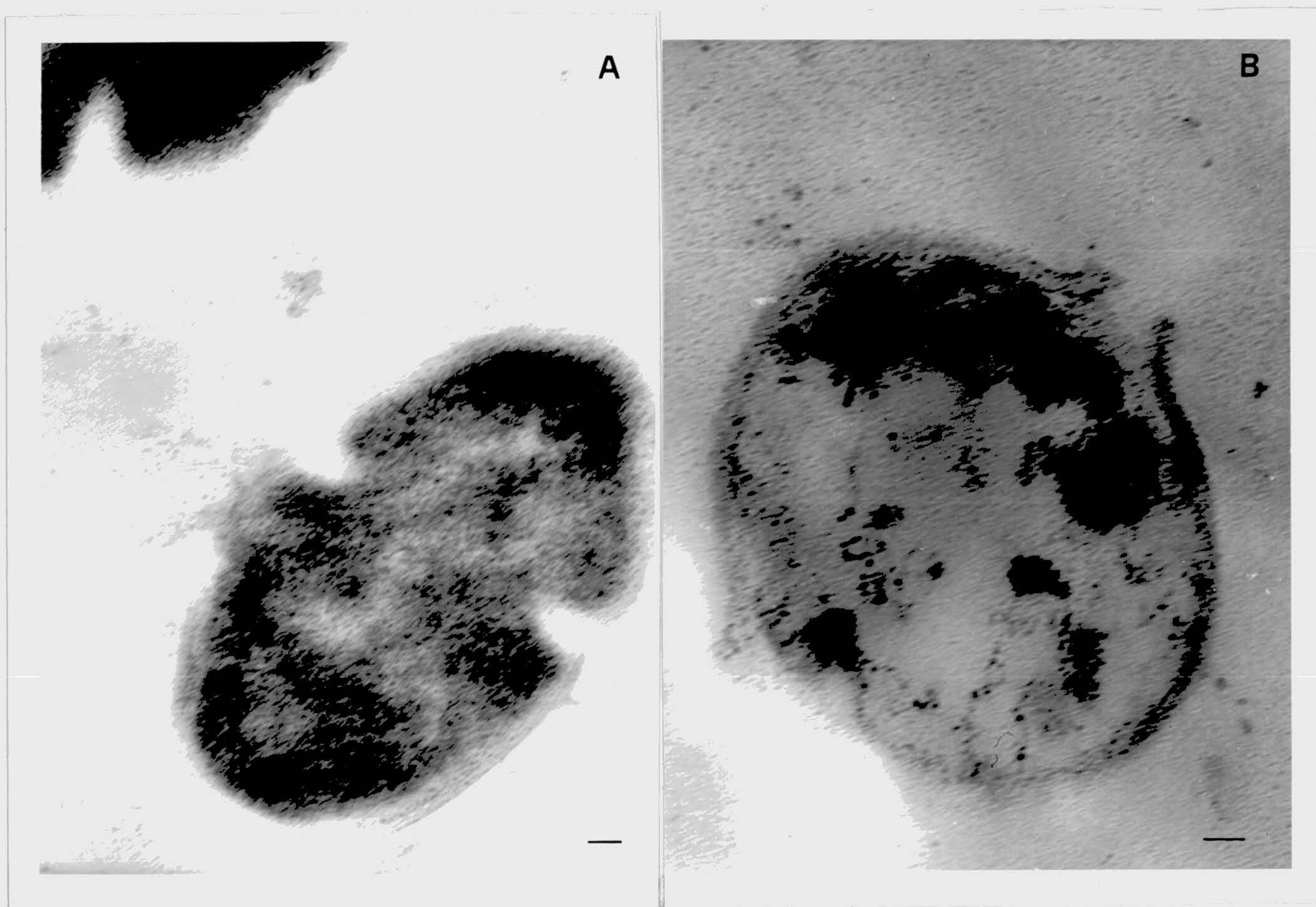


Fig. 45.- Observación a microscopio electrónico de cortes ultrafinos las células de *S. faecalis* S-47 tras 2h de incubación en presencia de AS-48. A.- Control (x50.000). B.- Células tratadas (x63.000). La barra equivale a 100 nm.

DISCUSSION

Streptococcus faecalis subsp. *liquefaciens* S-48 es una bacteria, procedente de un exudado de herida, que constituye un interesante ejemplo de microorganismo poseedor de recursos que le permiten el predominio en su hábitat natural. En efecto, aparte de aquellas características de resistencia incrementada a los agentes ambientales propias de los enterococos, tales como crecimiento a elevadas temperaturas (45°C), pH alcalino, alta concentración de NaCl (6.5%), y sales biliares, esta bacteria produce sustancias antagonistas de muy diversa naturaleza.

Además de la capacidad propia del grupo para fermentar una amplia variedad de sustratos, con abundante producción de ácidos orgánicos, especialmente láctico, que determinan la bajada del pH con el consiguiente efecto inhibidor del crecimiento, esta bacteria libera al medio dos inhibidores específicos actualmente en estudio: una bacteriocina y el antibiótico peptídico AS-48. Ambos son de naturaleza proteica, como se estableció inicialmente por su sensibilidad a los enzimas proteolíticos. El estudio de este último constituye el objeto de esta Memoria.

El primer punto de discusión acerca de esta sustancia surgió en lo referente a su encuadre dentro de la amplia gama de inhibidores específicos de origen biológico, ya que participa de las características de varios de ellos. Si bien por su peso molecular estaría en el límite entre las bacteriocinas de pequeño tamaño y los antibióticos, su amplio espectro de acción lo asemeja más a estos

últimos. Igualmente estaría relacionado por su tamaño y naturaleza con los inhibidores descritos en enterobacterias denominados microcinas.

Un nuevo grupo de inhibidores que han polarizado recientemente la atención de diversos autores es el constituido por los péptidos básicos, producidos por una gama heterogénea de células, procariotas y eucariotas, con características comparables a nuestro inhibidor, si bien el espectro de acción de los mismos es más restringido en general. De acuerdo con todas estas similitudes y diferencias, hemos considerado esta sustancia como antibiótico, y en razón a su origen la hemos denominado AS-48.

A lo largo de este estudio hemos abordado aquellos aspectos concernientes a la purificación, caracterización y actividad biológica de este antibiótico peptídico.

Las dificultades encontradas inicialmente en el proceso de purificación de esta sustancia, debidas por una parte a su retención en los geles utilizados para la misma, y por otra a la interferencia de los componentes de los medios de cultivo, han sido superadas gracias al diseño de medios de producción con una reducción importante en los componentes que mostraban una mayor interferencia, permitiendo sin embargo la obtención de niveles significativos de actividad antibacteriana, como el medio complejo (MC), en el que se obtuvo una concentración de antibiótico cercana a 6 mg/l, muy similar a la de otras sustancias como la lactocina B (5 mg/l) descrita por Barefoot y Klaenhammer (1984).

En este medio, la presencia de BHI, aún a muy bajas concentraciones (0.1%), resulta imprescindible para obtener unos niveles aceptables de actividad, siendo insustituible por ningún digerido proteico comercial de los utilizados. Presumiblemente, este

componente aportaría algún cofactor necesario, en cantidades trazas, para la producción de AS-48. Este medio cubre por otra parte los extensos requerimientos nutricionales de los estreptococos, aún cuando los enterococos son unos de los miembros de este género con menores exigencias en este sentido.

Cabe destacar también la producción de AS-48 en un medio mínimo (MM), aunque en cantidades significativamente inferiores a las detectadas en el medio complejo MC.

La producción de antibiótico en este medio sigue una evolución similar a la de la curva de crecimiento; los niveles máximos de actividad se obtienen cuando el cultivo entra en fase estacionaria (esto es, a las 8h de incubación). Posteriormente se ha detectado un descenso paulatino en los niveles de actividad, similar al descrito por muchos otros autores (Tagg *et al*, 1975; Aguilar, 1979; Duro, 1984), siendo en algunos casos atribuible a la liberación de un inhibidor específico (de Lorenzo *et al*, 1984).

Sin embargo, en el caso de AS-48 no se han logrado esclarecer las causas de dicha pérdida de actividad; la adición del inhibidor de proteasas PMSF no ejerce protección alguna frente a dicha pérdida; ello no descarta, sin embargo, la acción destructora de las proteasas propias de la subsp. *liquefaciens* de *S.faecalis*; esta suposición, junto con la liberación de un inhibidor específico, parecen improbables, ya que dicha pérdida de actividad no ocurre ni en los sobrenadantes exentos de células cuando son reincubados de nuevo, ni cuando son adicionados de sobrenadantes recogidos en fases más tardías y que han perdido ya parte de su actividad. Dicha pérdida parece más bien estar relacionada con la presencia de las células productoras en el medio. Se ha demostrado así mismo la capacidad de dichas células de adsorber de forma inespecífica moléculas de AS-48, por lo que no se descarta que ello contribuya a

la pérdida de actividad detectada. Igualmente se podría contemplar la posibilidad de que, una vez agotados los componentes del medio de cultivo, las propias células productoras pudieran reutilizar el antibiótico previamente liberado.

Los primeros indicios sobre el carácter básico de esta sustancia nos permitieron la utilización de una resina de intercambio catiónico para su purificación. El empleo de esta resina como primera etapa del proceso ha supuesto una gran ventaja, ya que:

- Permite el manejo de grandes volúmenes de cultivo
- Se obtienen concentrados del orden 1/50 con altos títulos de actividad antibacteriana
- La recuperación de actividad alcanza valores del 80% utilizando una proporción gel: sobrenadante de 1/18, pudiendo incrementar dicho rendimiento aumentando esta proporción.
- Se eliminan la mayoría de los componentes del medio que inicialmente mostraban una mayor interferencia con los posteriores pasos de purificación
- Se obtienen fracciones con un grado de pureza 38 veces superior al de partida, siendo este el paso de purificación en el que se obtiene un mayor aumento en actividad específica.

Esto puede deberse en parte a la fuerte retención de AS-48 en dicha resina. La alta concentración de sal requerida para su elución (alrededor de 1M) podría indicar, aparte de la fuerza de unión propia de los aminoácidos con carga positiva, otro tipo de interacción con el gel, ya que se ha detectado fijación a otra clase de geles inertes como el Sephadex G-25 y el Biogel P-6, así como en la cromatografía en fase reversa. Cuando la separación en Biogel P-6 era llevada a cabo a baja concentración de sales la elución de AS-48 ocurría siempre muy por detrás de la correspondiente a su tamaño molecular, por lo que en las estimaciones iniciales se pensó que AS-

48 tuviera un tamaño próximo a 2.000 (Gálvez *et al*, 1986), mientras que al aumentar la fuerza iónica en el eluyente entre 0.4 y 0.8M de NaCl, el pico de actividad se correspondía con un peso molecular de 3.500.

Las diferencias de tamaño atribuidas a esta molécula, según el volumen de elución, tanto en P-6 como en G-25 y G-50, podrían ser explicadas por la existencia de interacciones hidrofóbicas de AS-48 con las matriz de dichos geles. Por otra parte, la elución de los péptidos en este tipo de cromatografías dista mucho del comportamiento ideal seguido por las proteínas globulares, al aumentar la relación carga/tamaño; esto también sería válido para la eletroforesis de proteínas pequeñas en geles de poliacrilamida (Fish *et al*, 1970; Sahl *et al*, 1985).

Las condiciones de elución en Biogel P-6 quedaron estandarizadas adicionando NaCl 0.4 M en el eluyente, obteniéndose así fracciones con un alto grado de pureza según se comprobó mediante electroforesis así como por su reelución en Biogel P-6 y cromatografía de intercambio iónico, forzando esta vez la elución mediante un gradiente de pH. Todos estos criterios indicaron un grado de pureza lo suficientemente alto como para la utilización de dichas fracciones en las experiencias de actividad biológica. Así mismo, el comportamiento seguido a lo largo del proceso de purificación por la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas ha sido idéntico, sin que se haya conseguido separar ambas actividades, por lo que ambas deben ir ligadas a la misma molécula.

No obstante, para proseguir con la caracterización molecular de esta sustancia se creyó necesario someter dichas fracciones a un proceso de repurificación mediante cromatografía líquida en fase reversa. Como apuntábamos al principio, se ha encontrado una fuerte

retención de AS-48 en este tipo de matriz, siendo necesario para su elución disolventes con baja polaridad, como la mezcla isopropanol:acetonitrilo (2:1).

La homogeneidad de la fracción activa obtenida por este método ha sido comprobada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones que permitían la detección de cantidades mínimas de proteína; de este modo se llegó a confirmar su alto grado de pureza, con un máximo de contaminación inferior al 0.25%, lo que pone de manifiesto la adecuación del método seguido en el proceso de purificación, diseñado y adaptado a las especiales características de la molécula de AS-48.

La determinación del contenido en aminoácidos ha puesto de manifiesto por una parte la relativa hidrofobicidad de esta sustancia, debida fundamentalmente al alto contenido en aminoácidos con restos apolares (próximo al 50%), así como de aminoácidos sin carga neta a pH neutro (30.6%). Así mismo se ha detectado un contenido muy alto en alanina (12 restos por molécula) y glicina (9). La escasez de aminoácidos aromáticos justifica la baja absorción que muestra la molécula a 280 nm, habiéndose determinado solo un resto de Phe y otro de Tyr, aunque cabe esperar la presencia de triptófano de acuerdo con el ligero hombro apreciable a 288 nm en el espectro de absorción.

La presencia de Trp, aunque en baja proporción, aumentaría ligeramente el tamaño molecular mínimo de 7.630 estimado a partir de la composición en aminoácidos, por lo que el tamaño real estaría en torno a 8.000, lo que por otra parte concuerda con el perfil de elución obtenido mediante cromatografía de exclusión molecular en geles de Sephadex G-50 y G-75, así como mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (14%).

La presencia de aminoácidos básicos es relativamente baja; sin embargo, su contribución a la carga neta de la molécula sería muy significativa dada la baja proporción de aminoácidos polares y grupos ácidos. Esto explicaría el alto pI (próximo a 10.6). Por otra parte, es de suponer que los restos de aspártico y glutámico detectados puedan realmente encontrarse en forma de asparagina y glutamina, las cuales se hidrolizan durante el tratamiento con HCl 6N (Sahl y Brandis, 1981).

Así mismo, la carencia de cisteína y la alta proporción de aminoácidos que inestabilizan a las estructuras en α -hélice hacen pensar en la carencia de una estructura tridimensional compleja para esta molécula; estos datos vendrían avalados por la estabilidad a altas concentraciones de sal y por los resultados obtenidos mediante la aplicación de calorimetría diferencial de barrido, que apuntan hacia la ausencia de una estructura compacta. Así mismo, la cooperatividad observada en la desnaturalización por calor podría estar favorecida por la presencia de regiones hidrófobas o regiones sin carga neta.

Con todos estos datos sería tentador pensar en la posible naturaleza anfifílica de AS-48, considerando además la relevancia de este carácter en la actividad biológica de tantas moléculas con acción a nivel de membrana (unidad de ataque a membrana del complemento, δ -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, así como otras sustancias antibióticas, tales como las polimixinas, y también muchas bacteriocinas), en las cuales existiría una región polar rica en cargas positivas, y que sería por tanto responsable de su actividad biológica, y una región hidrófoba relacionada con la interacción de la molécula con las estructuras externas de la célula. En este sentido se ha llegado a proponer una relación directa entre el número de átomos de carbono de la fracción apolar y el espectro de acción de la molécula, con especial referencia a su importancia

en cuanto a la actividad frente a bacterias provistas de una membrana externa, como las gram-negativas.

AS-48 es una molécula relativamente sensible al calor, comenzando a perder actividad por encima de los 60-70°C. Sin embargo, su temperatura de transición hacia un estado desnaturalizado es bastante superior (93.4°C). Sin embargo, éste sería un valor máximo para un tiempo de calentamiento mínimo en relación con los valores anteriores. Dado que la transición se alcanzó de forma progresiva, es lógico que tiempos de incubación más largos a temperaturas inferiores, siempre por encima de los 60°C, ocasionen, como se ha puesto de manifiesto, una inactivación gradual de AS-48.

Otra de las características notables de esta moléculas es su enorme resistencia al pH ácido y su inactivación a pH básico. Teniendo en cuenta el predominio de cargas básicas en la molécula, estos datos serían perfectamente acordes con la misma suponiendo un papel para las cargas positivas en el mantenimiento del centro activo del antibiótico, ya que los grupos amino no se verían afectados en su carga neta por las bajadas de pH. Por otra parte, la pérdida de actividad ocurre cuando se alcanzan valores de pH entre 8 y 9, valores éstos muy cercanos al pK' de los grupos ϵ -amino de los aminoácidos básicos en su estado libre.

Las características fisicoquímicas de AS-48 indican una notable semejanza con otros péptidos con actividad antibiótica, de origen bacteriano o no, en cuanto a los siguientes aspectos:

-Todos ellos serían proteínas de bajo peso molecular, próximo a 5.000.

-Se trata de sustancias básicas, con un pI próximo a 10, o superior.

-Su actividad antibacteriana o antibiótica en general se ejerce a nivel de membrana.

La amplia distribución de este tipo de sustancias podría reflejar la conservación, a lo largo de la evolución, de un mecanismo general de antibiosis mediatizada por péptidos básicos, lo que realza la importancia de dichas sustancias en la interacción bacteriana así como en la relación parásito-huésped (Sahl, 1985b).

Como ejemplos de este tipo de sustancias cabría citar a los péptidos de origen bacteriano nisina (Hurst, 1981), Pep-5 (Sahl *et al*, 1985), bacteriocina IYS2 (Nakamura *et al*, 1983), y a la bacteriocina C3603 (Ikeda *et al*, 1982) entre otros. Cabe resaltar la gran similitud en el contenido de aminoácidos de esta última y el antibiótico AS-48.

Así mismo se han descrito otros péptidos no bacterianos de características similares, tales como las cecropinas, producidas por *Hyalophora cecropia* (Hultmark *et al*, 1982), la seminalplasmina de semen de toro (Theil y Scheit, 1983), los polipéptidos básicos ricos en histidina (HRPs) y en prolina (PRPs) aislados de la saliva humana (McKay *et al*, 1984), la β -lisina producida por las plaquetas (Donaldson y Tew, 1977), los péptidos lisosomales de granulocitos de conejo (Selsted *et al*, 1984) y los péptidos básicos MCP-1 y MCP-2 aislados a partir de los macrófagos de pulmón de conejo (Selsted *et al*, 1983), o la melitina de veneno de abeja (Tosteson y Tosteson, 1984).

Respecto a la actividad biológica de esta sustancia es interesante señalar su amplio espectro de acción, siendo mucho más activa frente a bacterias Gram-positivas. Sin embargo, y a diferencia de las bacteriocinas, las especies relacionadas, es decir los enterococos, no son especialmente más sensibles. De hecho, los grupos más sensibles son los de aquellas bacterias con una composición común en su pared celular: *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*, caracterizadas por la presencia de ácidos micólicos en la misma. Quizá la naturaleza hidrófoba de estas estructuras facilite el acceso de la molécula de AS-48.

Dentro de las bacterias Gram-negativas se encuentran diversos grados de sensibilidad, requiriendo concentraciones inhibitorias de 60 a 100 veces superiores a las de bacterias Gram-positivas, con algunas excepciones.

Igualmente se ha ampliado la determinación del espectro de acción de AS-48 a microorganismos eucariotas como levaduras y amebas de vida libre, no encontrándose en ningún caso resultados positivos. Sin embargo, en células *Vero* se observan alteraciones morfológicas patentes, con pérdida de adherencia.

Entre las sustancias antibacterianas descritas en especies del género *Streptococcus* con un espectro de acción más amplio cabría destacar a las descritas en estreptococos del grupo A tipo P-777 (Hynes y Tagg, 1985), la estreptocina B₁ (Tagg *et al.*, 1975), la mutacina C3603 (Ikeda *et al.*, 1982), la mutacina Rm-10 (Fukushima *et al.*, 1982), la estreptococcina sal-P (Tagg y Russell, 1981), la hemolisina producida por *S. faecalis* X-14 (Brock *et al.*, 1963) o la nisina (Hurst, 1981), así como las sustancias antibióticas DS-1912-65, S23g y S716 producidas por estreptococos del grupo A (Wolf y Duncan, 1974) o las viridinas A, B, y C (Dajani *et al.*, 1976); las sustancias antibacterianas de estos dos últimos grupos serían las

únicas activas frente a bacterias Gram-negativas. Todos estos antibacterianos presentan además la peculiaridad de ser sustancias de bajo peso molecular, inferior a 15.000 en general, y casi siempre próximo a 5.000; la única excepción sería la mutacina Rm-10, de gran tamaño.

No obstante, la producción de sustancias antibacterianas en enterococos con estas características es escasa o nula, a excepción de la hemolisina X-14, netamente diferenciable del antibiótico AS-48.

Respecto al mecanismo de acción de AS-48, la evolución de los cultivos adicionados del antibiótico en medio líquido nos llevó a establecer en principio una posible dualidad de acción, según las estirpes ensayadas, ya que los valores de densidad óptica descienden en muchos casos, debido a un efecto claramente lítico, mientras que en otros casos se mantiene inalterada. No se ha podido establecer ninguna relación sólida entre el grado de sensibilidad que muestra una estirpe en placa y su comportamiento bacteriolítico en medio líquido; si bien la mayoría de los enterococos que mostraron una mayor resistencia en medio sólido eran resistentes a la lisis en medio líquido, dicha resistencia no fue superada cuando se utilizaron concentraciones de antibiótico muy superiores a las normales. Incluso dentro del grupo de bacterias que son lisadas tras la adición de AS-48, se observan comportamientos muy diversos, requiriendo normalmente fases variables de retardo o de "preparación para la lisis".

Sin embargo, esta dualidad quedó descartada posteriormente, al realizarse recuento de células viables en varios casos, quedando establecido el efecto bactericida como acción primaria. Efectivamente, en *S.faecalis*, el 99.9% de las células habían muerto tras dos horas de contacto con el antibiótico, siendo por tanto la lisis observada posterior a su acción letal.

Resultados similares se obtuvieron al determinar el porcentaje de supervivencia en *E. coli*, confirmando por otra parte la menor sensibilidad de las bacterias Gram-negativas en comparación con el efecto producido sobre bacterias Gram-positivas en idénticas condiciones. En ambos casos, la adición de AS-48 produce un descenso inmediato en la viabilidad celular, correspondiente a un mecanismo de acción bactericida.

Dicho efecto se consigue en *S. faecalis* a concentraciones bastante bajas de antibiótico (unos 3 $\mu\text{g/ml}$, lo que asumiendo un peso molecular de 8.000 supondría una concentración cercana a 0.4 μM), mientras que para conseguir una reducción del número de células viables equivalente en *E. coli* se necesita una concentración de antibiótico 60 veces superior (o sea, 180 $\mu\text{g/ml}$, lo que supone una concentración final próxima a 24 μM). La excepción a esta mayor resistencia sería el notable efecto lítico producido por 8 UAS-47/ml sobre cultivos de Myxobacterias, lo que está en consonancia con el activo sistema autolítico de este microorganismo. Resultados diferentes se obtienen con *Rhizobium*, siendo suficientes 10 UAS-47/ml para detener su crecimiento sin que haya efecto lítico apreciable.

Estas diferencias en cuanto a sensibilidad han quedado reflejadas en la cinética de acción. Si bien en ambos casos se ha detectado una cinética de impacto múltiple, el número de blancos calculado para *S. faecalis* sería muy bajo (inferior a 5) en comparación con el detectado en *E. coli*.

En *S. faecalis* se ha puesto de manifiesto la rápida adsorción de AS-48, ya que a concentraciones lo suficientemente altas de antibiótico, se consigue una reducción superior al 95% de las células viables con 1 min. de incubación. Así mismo, la cantidad de

antibiótico adsorbida por las células tras 1 min. de contacto es prácticamente igual a la adsorbida en periodos más largos.

Resultados similares se han obtenido en *E.coli*. Si bien el intervalo más corto de incubación utilizado ha sido de 5 min., también se ha demostrado la rápida adsorción de AS-48. Sin embargo, la incubación con AS-48 durante periodos más largos, entre 5 y 10 min. antes de proceder a detener el crecimiento en solución salina fría, da lugar a un aumento en el número de células viables, tras lo cual se vuelve a detectar una nueva reducción en el número de supervivientes. Este fenómeno sería explicable si consideramos la curva correspondiente a la cinética de acción de AS-48 en esta bacteria. Sorprendentemente, el aumento en la concentración de antibiótico hasta valores tan altos como 1000 UAU-9/ml no logra disminuir la supervivencia, tras 5 min. de contacto, por debajo del 1.5%.

Estos resultados estarían justificados suponiendo una fase de resistencia celular, de forma que la fracción de la población que se encontrara en dicha fase podría escapar al efecto antibacteriano de AS-48, lo que explicaría el aumento de viabilidad observado entre los 5 y 10 min. posteriores a la adición de A-48, seguido de un nuevo descenso en la viabilidad. Los ciclos de oscilación en la supervivencia de *E.coli* podrían ser explicados en base al corto periodo de tiempo de generación de esta estirpe en las condiciones de cultivo ensayadas (35 min.) y la falta de sincronía en el crecimiento.

Dicha fase de resistencia queda representada por la asíntota que se obtiene de relacionar los porcentajes de supervivencia con dosis crecientes de antibiótico, y podría contribuir a la menor sensibilidad de esta bacteria al antibiótico, ya que en dicho intervalo de tiempo las moléculas adsorbidas podrían ser atacadas

por las proteasas existentes en la membrana externa (McGregor *et al*, 1979).

Aparte ya de este fenómeno, la mayor resistencia de las bacterias Gram-negativas estaría mediada por la presencia de una membrana externa que podría actuar de barrera para el acceso de AS-48 a su sitio de acción, tal como ocurre con otras sustancias antibióticas que son inactivas frente a este tipo de bacterias.

Con la excepción de los antibióticos β -lactámicos, que entrarían a través de los canales formados por las porinas, la mayoría de los antibióticos activos frente a bacterias Gram-negativas no podrían, por razones de tamaño, penetrar por dichos canales. Alternativamente se han propuesto dos modelos para su entrada: 1º, la entrada autopromovida, como en el caso de aminoglucósidos y agentes policatiónicos como la polimixina (Hancock, 1984). Estos se unirían primero al lipopolisacárido, desplazando a los iones Mg^{2+} , y anulando el efecto estabilizador proporcionado por los puentes establecidos por dichos iones entre las moléculas de lipopolisacárido adyacentes. Esta acción daría lugar a la permeabilización de la membrana externa, permitiendo así la entrada del antibiótico (Moore *et al*, 1986).

El segundo mecanismo sería la entrada mediante interacción hidrofóbica con los componentes lipídicos de las envueltas celulares (Nikaido, 1976, 1979).

Así mismo se ha llegado a suponer que ciertos antibióticos que actúan a nivel de membrana en bacterias Gram-negativas no ejercerían su efecto directamente sobre la membrana plasmática, sino sobre la membrana externa, siendo los cambios provocados en la misma los responsables del efecto letal.

Los argumentos expuestos con anterioridad ponen de manifiesto la influencia de las cubiertas celulares ya sea en el sentido de permitir la entrada del antibiótico, como en las bacterias Gram-positivas, o de obstaculizarla, según se podría deducir de la mayor resistencia de las bacterias Gram-negativas. Para ello se ensayó la acción de AS-48 sobre protoplastos de *S.faecalis* S-47 y *E.coli* U-9, e incluso se amplió el ensayo a protoplastos de *S.cerevisiae* para confirmar la resistencia mostrada. Los resultados obtenidos evidencian la gran sensibilidad de los mismos, más acentuado si cabe en el caso de *S.cerevisiae* y *E.coli*, donde los valores de turbidez se redujeron al 50 y 100% respectivamente tras 1h de contacto.

La importancia de la membrana en la adsorción del antibiótico se ha puesto de manifiesto en las experiencias llevadas a cabo con células enteras y fracciones subcelulares de *S.faecalis* y *E.coli*. La capacidad de adsorción de las fracciones membranosas fue significativamente mayor, ya que mientras 4 mg de paredes adsorbían un 82% de la actividad, 0.15 mg de membranas eran capaces de adsorber el 100% de la misma.

Estos resultados se han corroborado con los de adsorción inespecífica del antibiótico sobre células enteras, ya sea autoclavadas o no, incluso sobre las propias células productoras, lo que podría explicar, como apuntábamos al principio, la pérdida de actividad detectada en los cultivos de S-48 en fase estacionaria.

Estos datos apuntan hacia una interacción inespecífica de AS-48 con los componentes de pared y membranas más que a la presencia de receptores específicos. Adicionalmente, la capacidad de la cardiolipina de neutralizar la actividad de AS-48 libre en sobrenadantes estaría de acuerdo con lo expuesto. Suponiendo este tipo de interacción, cabría especular sobre el papel de la composición lipídica de las estructuras externas celulares en la

sensibilidad o resistencia al antibiótico, siendo interesante señalar que dos de los microorganismos resistentes (*Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba*) presentan una membrana celular con una relación colesterol/fosfolípidos muy alta.

La adsorción inespecífica, aunque no es común en las bacteriocinas, ha sido también descrita en el caso de las estafilococcinas 414 (Gagliano y Hinsdill, 1970) y 1580 (Jetten y Vogels, 1972a), así como en la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975) y la estreptococcina Sal-P (Tagg y Russel, 1981) entre otras.

Aunque diversas bacterias manifiestan una lisis progresiva con posterioridad al tratamiento con AS-48, en el resto de los casos solo se observa una acción bactericida, por lo que el fenómeno de lisis podría ser considerado en principio como consecuencia de otras alteraciones celulares primarias, y sería atribuible a la activación de las autolisinas presentes en la pared celular.

Esta suposición nos llevó a determinar la influencia de diversos factores en la lisis de los cultivos tras la adición de AS-48. En general, la composición del medio no ejercía efectos significativos sobre la lisis de los cultivos, si bien la adición de tampón fosfato mostraba un ligero efecto de retardo. Las únicas diferencias notables se observaron cuando el medio BHI-T era suplementado con extracto de levadura, detectándose en estos casos una inhibición total o parcial de la lisis, si bien la detención del crecimiento del cultivo y la notable reducción de la supervivencia indicaban un modo de acción bactericida bajo estas condiciones.

La ausencia de actividad lítica en la molécula de AS-48 se puso de manifiesto tras su ensayo sobre células dañadas por calor, ya que solo cuando los cultivos controles reanudaron su crecimiento logarítmico comenzó a detectarse la lisis en los cultivos incubados

con AS-48. Resultados similares se obtuvieron en los cultivos incubados a 4°C con AS-48; así mismo se demostró la disminución en la velocidad de lisis tras la incubación a temperaturas distintas de la óptima para el crecimiento. La necesidad de una temperatura fisiológica también ha sido descrita para la acción de otras bacteriocinas (Fukushima *et al*, 1985). Todos estos datos indicarían, por tanto, la estrecha relación entre la actividad metabólica celular y la lisis tras la adición de AS-48.

Los requerimientos de cationes divalentes para la lisis, pero no para la muerte de las células tratadas con AS-48, son un indicador más de la independencia de ambos tipos de acción; así pues, la lisis de los cultivos requiere iones Mg^{2+} , que pueden ser sustituidos por Zn^{2+} , Ca^{2+} o Mn^{2+} , a la vez que es antagonizada por Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} , mientras que el efecto bactericida es independiente de estos cationes.

El papel de los cationes divalentes en la actividad de las autolisinas ha sido establecido en otras bacterias, como por ejemplo *Clostridium botulinum*. Las autolisinas de esta bacteria están claramente estimuladas por los iones Co^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} , y son inhibidas por el Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Ni^{2+} (Kawata y Takumi, 1971). Así mismo, los cationes divalentes podrían actuar interaccionando con los ácidos lipoteicoicos (Lambert *et al*, 1977), los cuales a su vez son unos de los principales reguladores topológicos de las autolisinas de la pared celular de *Streptococcus faecalis*, así como de otras bacterias, por ejemplo *Bacillus* (Meyer y Wouters, 1987).

La activación de las autolisinas latentes de la pared celular de *S. faecalis* es dependiente de la acción de una proteinasa citoplásmica. Otras formas de regulación incluyen la acción inhibidora de ligandos como los ácidos lipoteicoicos antes

mencionados y ciertos lípidos, como la cardiolipina; además, existe una regulación topológica (Shockman *et al*, 1985).

La activación de las autolisinas mediante proteinasas citoplásmicas en estreptococos ha sido descrita tras el tratamiento con ciertos lípidos que presentan actividad antibacteriana, tales como el dodeciliglicerol (Ved *et al*, 1984). La lisis observada tras el tratamiento con AS-48 podría atribuirse en principio a la activación de las autolisinas mediante alguna de estas vías.

La adición de gramicidina D o DCCD previa al tratamiento con AS-48 presentó un efecto antagonista no solo sobre la lisis, sino también sobre la muerte celular, ya que la capacidad bactericida de AS-48 se vio sensiblemente reducida con respecto a la obtenida en otras experiencias. La interacción de muchas sustancias antibacterianas y bacteriocinas con las células sensibles ocurre en dos etapas: la primera de ellas implica la adsorción de la molécula antibiótica a la superficie celular, en un estado reversible por acción de agentes desnaturalizantes o enzimas proteolíticos; la segunda etapa implicaría la internalización de las moléculas de antibiótico, pasando así a un estado en que su acción no es ya reversible por enzimas proteolíticos. En la mayoría de los casos, la transición hacia este segundo estado requiere energía (Streker *et al*, 1981).

La necesidad de un potencial de membrana adecuado ha sido descrita en las colicinas que forman canales transmembrana. La adición de agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa y otros agentes que descargan el estado energético de la membrana ejercen un efecto protector frente a dichas colicinas (Schein, 1978).

El aumento de supervivencia en los cultivos tratados con gramicidina D o DCCD tras la adición de AS-48 sería indicativo de

los requerimientos energéticos necesarios para su acción. Esta suposición ha sido comprobada ensayando el efecto de AS-48 sobre cultivos de *S.faecalis* creciendo en ausencia de un potencial de membrana, mediante adición de gramicidina D e incubación en medio KTY2XH. La total resistencia a AS-48 detectada en estas condiciones confirmaría el papel del potencial transmembrana en la acción de AS-48.

Dado que los agentes empleados en este estudio intervienen bloqueando la utilización de la energía metabólica para el transporte a nivel de membrana, pero no en la obtención de energía metabólica, cosa que en *S.faecalis* ocurre por fosforilación a nivel de sustrato a partir de la glicolisis (Harold y Baarda, 1968), cabría suponer el papel de los sistemas de transporte en la acción bactericida de AS-48. Como alternativa se contempla la necesidad de una polaridad correcta de la membrana para la acción de AS-48. La capacidad de estos agentes de antagonizar la acción bacteriolítica de AS-48 debe ser considerada como una consecuencia secundaria de su efecto antagonista sobre la acción bactericida.

La existencia de dos etapas en el mecanismo de acción de AS-48 ha sido corroborada mediante el rescate de las células tratadas con agentes que inactivan a AS-48, como la tripsina. Este enzima ha mostrado un fuerte efecto cooperador en presencia de AS-48, en el sentido de acelerar la lisis de los cultivos, presumiblemente mediante activación proteolítica de las autolisinas latentes presentes en la pared celular.

La acción activadora de la tripsina sobre la N-acetilmuramoilhidrolasa (EC 3.2.1.17) ha sido demostrada por otros autores en paredes de *S.faecalis*, así como en preparados de proenzima purificado (Barrett *et al*, 1984). La adición de tripsina a cultivos previamente tratados con AS-48 e incubados en ausencia

del mismo aceleró la recuperación solo en los cultivos tratados con AS-48 durante 5 min., pero no en los incubados durante tiempos superiores, lo que indicaría la entrada en una etapa irreversible.

Los resultados similares obtenidos tras el empleo de otros agentes inactivantes como el SDS o la cardiolipina indicarían la existencia de una fase muy corta en la cual las moléculas de antibiótico unidas a las células serían accesibles a dichos agentes, así como una segunda fase en la que ya no serían accesibles. El paso a esta segunda fase sería dependiente de la existencia de un potencial de membrana adecuado según comentamos con anterioridad, y podría coincidir con la fase de actividad biológica, dada la rapidez con que se manifiestan las alteraciones metabólicas observadas tras la adición de AS-48. La acción antagonista ejercida por ambos agentes sobre la lisis indicaría el papel de las autolisinas en la misma, enzimas que son susceptibles de inactivación por SDS, a la vez que están regulados de forma natural por cardiolipina (Cleveland *et al*, 1976).

La detención inmediata de la síntesis de proteínas, ADN, ARN y pared celular, muy similar a la producida por la mutacina Rm-10 en *Streptococcus faecalis* ODU (Fukushima *et al*, 1985), así como por otras bacteriocinas de estreptococos (Tagg *et al*, 1973, Kramer y Brandis, 1975) sería, presumiblemente, un efecto secundario de la acción primaria a nivel de membrana, efecto que se manifiesta ante todo por el cese inmediato en la entrada de precursores a la célula y en el consumo de O_2 (utilizado en la regeneración de coenzimas reducidos), así como por la pérdida inmediata de la capacidad de acumular iones K^+ y la entrada pasiva de iones Na^+ , lo que indicaría el cese en el funcionamiento de los sistemas de transporte. La entrada de K^+ en *S.faecalis* ocurre por dos mecanismos: un simporte con protones, posiblemente promovido por la fuerza protonmotriz, y

un sistema antiporte K^+/Na^+ ambos movidos por ATP (Kakimura y Harold, 1985; Giunta *et al*, 1986).

La posibilidad de que AS-48 actúe como un agente ionóforo colapsando el potencial de membrana parece improbable, ya que los cultivos incubados en medios que permiten el crecimiento en presencia de agentes ionóforos, como el medio KTY2XH, son sensibles a AS-48. Así mismo, tampoco se ha detectado pérdida de material celular con absorción a 260 nm al menos en la hora siguiente a la adición de AS-48. En este sentido la acción de AS-48 sería similar a la de la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975), o a la bacteriocina producida por *Streptococcus sanguis*, las cuales actuarían produciendo cambios conformacionales en la membrana plasmática, originando perturbaciones metabólicas en cuanto a niveles energéticos, transporte y permeabilidad de membranas, y síntesis de macromoléculas. También en este caso se detectó pérdida de iones K^+ , pero no de macromoléculas (Schlegel y Slade, 1974).

Como contrapartida a la formación de canales transmembrana, se contempla la posibilidad de una acción similar a la de los agentes policationicos, desorganizando la membrana celular y perturbando de forma inespecífica todas sus funciones. Este mecanismo de acción sería igualmente válido para *E.coli*, si bien la presencia de una membrana externa supondría un efecto protector considerable, impidiendo la acción inmediata sobre la membrana citoplásmica como en *S.faecalis*.

La lisis observada en muchos casos tras el tratamiento con AS-48 sería, pues, una consecuencia de la alteración en las funciones metabólicas de la célula, que llevaría finalmente a la activación y acción incontrolada de las autolisinas. La relación entre actividad autolítica y estado energético de la membrana ha sido demostrada por diversos autores. Así, por ejemplo, en *Bacillus subtilis* se ha

demostrado la lisis de los cultivos tras la adición de agentes que disipan el gradiente eléctrico o el gradiente de pH de las membranas celulares, sugiriendo así la estrecha relación entre la lisis y el estado energético de la membrana (Jolliffe *et al*, 1981). Resultados similares fueron los obtenidos en *Myxococcus coralloides* D tras el tratamiento con agentes desacoplantes (Fernández-Vivas *et al*, 1985), como el DNP, el TMPP y la DCCD, pero no con agentes ionóforos como la gramicidina y la valinomicina.

En *S.faecalis* la situación es más complicada, ya que esta bacteria es incapaz de sintetizar grupos hemo, y por tanto carece de citocromos, por lo que genera el ATP exclusivamente por la vía fermentativa, manteniendo el estado energético de la membrana mediante la actividad hidrolítica de la ATPasa (Harold, 1978).

Los resultados de Harold y VanBrunt (1977) sobre el crecimiento de *S.faecalis* en medio KTY2XH en presencia de gramicidina D, indicarían en principio que las autolisinas de esta bacteria no estarían reguladas por la fuerza protonmotriz. Sin embargo, las medidas de potencial de membrana efectuadas por estos autores fueron indirectas, basándose solo en el transporte de sustratos, por lo que no se descarta la existencia de un potencial de membrana, por debajo del umbral que permite el transporte de sustrato, pero suficiente para regular a las autolisinas. Este supuesto vendría avalado por los resultados obtenidos por otros autores mediante la inhibición simultánea de la ATPasa por adición de DCCD, así como de la glicolisis, por adición de fluoruro sódico. En estas condiciones se indujo la autólisis celular en *S.faecalis* (Ternove-Hinks, 1978).

En base a todos estos datos, la actividad bacteriolítica de AS-48 podría ser considerada como un efecto secundario de la acción primaria a nivel de membrana, así como de otras alteraciones metabólicas ocasionadas por la misma.

Otros hechos en favor de la activación de los sistemas autolíticos por agentes que actúan a nivel de membrana serían los referentes a la actividad biológica de los antibióticos peptídicos nisina y Pep-5. estos agentes actúan desorganizando la membrana, produciendo el cese inmediato de todos los procesos biosintéticos. Uno de sus efectos secundarios es la inducción de la autólisis (Bierbaum y Sahl, 1985). La lisis de *Staphylococcus aureus* tras la adición de Pep-5 comienza a detectarse en los lugares de síntesis de pared, que es donde se concentran las autolisinas latentes. Acorde con esto cabe señalar que las observaciones al microscopio electrónico de células tratadas con AS-48 muestran una especial desorganización de las cubiertas celulares a nivel del septo de separación de las células hijas, lugar donde se localizan las autolisinas recién sintetizadas en las células en crecimiento logarítmico.

El significado de este tipo de acción en el marco del antagonismo microbiano podría suponer para la estirpe productora no solo la muerte de las bacterias competidoras en presencia del antibacteriano, sino que además éstas son degradadas, liberando al medio todos sus componentes, algunos de los cuales constituyen factores limitantes o necesarios para el crecimiento de la estirpe productora.

Son muchos los argumentos en contra del papel ecológico de este tipo de agentes en los hábitats naturales, principalmente en el tracto intestinal humano, donde aquellas sustancias antibacterianas reguladas por el sistema SOS no llegarían a producirse; además, en diversos casos se ha demostrado su neutralización o destrucción por las proteasas presentes en el intestino. No obstante, en diversos casos, como en el de aquellos inhibidores no inducibles y que muestran una mayor resistencia a los agentes exógenos, como las



microcinas, se ha llegado a demostrar su presencia en heces y su papel antagonista.

Alternativamente, se ha sugerido que este tipo de sustancias desempeñarían un papel ecológico una vez fuera del tracto intestinal, asegurando la proliferación de las estirpes productoras y aumentando por tanto las posibilidades de reinfección, en las que, por otra parte, las condiciones ambientales sí podrían ser ya favorables a su producción, como por ejemplo, en el desplazamiento de *Lactobacillus* del tracto vaginal por enterococos contaminantes, así como en otras infecciones oportunistas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- La estirpe *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 produce una sustancia inhibidora, a la cual hemos denominado AS-48, que ha sido encuadrada dentro del grupo de antibióticos peptídicos en razón a sus características y amplio espectro de acción.

2.- El antibiótico AS-48 se produce tanto en medios mínimos como en medios complejos, si bien en estos últimos la producción es considerablemente mayor, estando especialmente favorecida por la presencia de infusión de cerebro-corazón de ternera.

3.- Esta sustancia ha sido purificada a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio iónico, exclusión molecular y fase reversa, obteniéndose un rendimiento elevado en todos los pasos.

4.- La fracción purificada tiene un peso molecular cercano a 8.000, y es una molécula sensible al calor y a los enzimas proteolíticos, pero resistente a otros enzimas. Su composición en aminoácidos indica la abundancia de restos apolares y el predominio de restos básicos, lo que confirma su alto pI, superior a 10.6.

5.- La fracción purificada ejerce un efecto bactericida (y bacteriolítico en muchos casos) frente a un extenso número de bacterias, Gram-positivas y Gram-negativas, así como frente a ciertas células eucariotas y protoplastos.

CONCLUSIONES

6.- Se distinguen dos fases en el mecanismo de acción de AS-48 en *Streptococcus faecalis* S-47: una fase de adsorción, muy rápida, independiente de la temperatura, y una fase de entrada, dependiente de energía e irreversible.

7.- Tras la adición de AS-48 se observa el cese inmediato en la incorporación de precursores a las principales rutas biosintéticas (proteínas, ADN, ARN y pared), así como en la captación de los mismos y de iones K^+ , unido a la entrada masiva de iones Na^+ y al cese inmediato en el consumo de O_2 , indicando una acción primaria a nivel de membrana citoplásmica.

8.- La acción bacteriolítica observada en *S.faecalis* parece estar promovida por la activación de las autolisinas, influyendo en ello diversos factores, tales como temperatura de incubación, composición del medio, y presencia de cationes divalentes y agentes ionóforos. Este efecto se considera secundario y consecuencia de la acción bactericida a nivel de membrana.

9.- La acción bactericida en *Escherichia coli* K-12 ocurre de forma similar a la detectada en *S.faecalis*, si bien la detención en los procesos biosintéticos ocurre de forma más lenta en el tiempo, posiblemente debido al efecto protector de la membrana externa, efecto que explicaría la mayor resistencia de las bacterias Gram-negativas a AS-48.

BIBLIOGRAFIA

ADAMEK, L., L. TRNKA, P. MISON, y M. GUTOVA, 1968. Hemmstoffe vom Bakteriocin-Typus bei schnell wachsenden saprophytischen Stämmen der Mycobakterien. Beitr. Klin. Tuberk. Spezifischen Tuberk. Forsch. 138, 51-55.

AGUILAR, A., 1979. Identificación y propiedades de un grupo de microcinas antagonizables por L-metionina. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

AGUILAR, A., J. C. PEREZ-DIAZ, F. BAQUERO y C. ASENSIO, 1982. Microcin 15m from *Escherichia coli*: Mechanism of antibiotic action. Antim. Agents Chemother. 21, 381-386.

AGUILAR, A., F. BAQUERO, J. L. MARTINEZ y C. ASENSIO, 1983. Microcin 15n: A second antibiotic from *Escherichia coli* LP15. J. Antibiot. 36, 325-327.

ASENSIO, C. y J. C. PEREZ-DIAZ, 1976. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. Biochem. Biophys. Res. Com. 69, 7-14.

AUSTIN-PRATHER, S. L., y S. J. BOOTH, 1984. Evidence for a membrane-bound form of a bacteriocin of *Bacteroides uniformis* Tl-1. Can. J. Microbiol. 30, 268-272.

BAQUERO, F. y C. ASENSIO, 1979. Microcins as ecological effectors in human intestinal flora: preliminary findings. In "New criteria for antimicrobial therapy: maintenance of digestive tract colonization resistance." pp. 90-94. D. van der Waaij y J. Verhoef (ed.) Excerpta Medica, Amsterdam.

BAREFOOT, S. F., y T. R. KLAENHAMMER, 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lactacin B. Antim. Agents Chemother. 26, 328-334.

BARRET, J. F., V. L. SCHRAMM, y G. D. SHOCKMAN, 1984. Hydrolysis of soluble, linear, un-cross-linked peptidoglycan by endogenous bacterial N-acetylmuramoylhydrolases. J. Bact. 159, 520-526.

BEAUDET, R., J. G. BISAILLON, S. A. SAHEB, y M. SYLVESTRE, 1982. Production, purification and preliminary characterization of a gonococcal growth inhibitor produced by a coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from the urogenital flora. Antim. Agents Chemother. 22, 277-283.

BEN-GURION, R., y Y. FLASHNER, 1982. New antibiotic substance produced by *Salmonella typhimurium* LT2. J. Bacteriol. 152, 542-544.

BIERBAUM, G., y H. G. SAHL, 1985. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep-5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. Arch. Microbiol. (En prensa).

BODANSKY, M. y D. PERLMAN, 1964. Are peptide antibiotics small proteins? Nature 204, 840-844.

BOON, T., Inactivation of ribosomes *in vitro* by colicin E3. Proc. Natl. Ac. Sci. USA. 68, 2421-2425.

BOOTH, S. L., J. L. JOHNSON, y T. D. WILKINS, 1977. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. Antim. Agents Chemother. 11, 718-724.

BOOTHBY, L., D. MOORE, y G. D. SHOCKMAN, 1971. A rapid, quantitative and selective estimation of radioactively labeled peptidoglycan in Gram-positive bacteria. Anal. Biochem. 44, 645-653.

BOTTONE, E., J. ALLERHAND y M. A. PISANO, 1971. Characteristics of a bacteriocin derived from *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* antagonistic to *Diplococcus pneumoniae*. Appl. Microbiol. 22, 200-204.

BRADLEY, D. E., 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bact. Rev. 31, 230-314.

BRANDIS, H., U. BRANDIS, y W. VAN DE LOO, 1965. Bakteriocinahnliche stoffe von enterokokken. Zentralbl. Bakt. Parasitenkd. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A 196, 331-340.

BRANDIS, H., 1978. Bacteriocins of streptococci and bacteriocin typing. Methods in Microbiol. 12, 221-239.

BROCK, T., B. PEACHER, y D. PIERSON, 1963. Survey of the bacteriocines of enterococci. J. Bacteriol. 86, 702-709.

BROCK, T., y J. M. DAVIE, 1963. Probable identity of a group D-hemolysin with a bacteriocine. J. Bacteriol. 86, 709-712.

VAN BRUSSEL, A. A. N., S. A. J. ZAAT, C. A. WIJFFELMAN, E. PEES, y B. J. J. LUGTENBERG, 1985. Bacteriocin *small* of fast-growing *Rhizobia* is chloroform soluble and is not required for effective nodulation. *J. Bacteriol.* **162**, 1079-1082.

CANDELA, A., 1980. Caracterización y mecanismos de acción de las microcinas 509. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

CHANG, S., y N. COHEN, 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Molec. Gen. Genet.* **168**, 111-115.

CLAWSON, C. C., y A. S. DAJANI, 1970. Effect of bactericidal substance from *Staphylococcus aureus* on group A streptococci. II. Structural alterations. *Infect. Immun.* **1**, 491-498.

CLEVELAND, R. F., A. J. WICKEN, L. DANEO-MOORE y G. D. SHOCKMAN, 1976. Inhibition of wall autolysis in *Streptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipid. *J. Bacteriol.* **126**, 192-197.

MCCORMICK, F. L., y D. C. SAVAGE, 1983. Characterization of a *Lactobacillus* sp. strain 100-37 from the murine gastrointestinal tract: ecology, plasmid content, and antagonistic activity toward *Clostridium ramosum* H-1. *Appl. Env. Microbiol.* **46**, 1103-1112.

CUNDLIFFE, E., y P. D. DIXON, 1975. Inhibition of ribosomal A site functions by sporangiomycin and micrococcin. *Antim. Agents Chemother.* **8**, 1-4.

DAJANI, A. S., E. D. GRAY, y L. W. WANNAMAKER, 1970. Bactericidal substance from *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.* **131**, 1004-1015.

BIBLIOGRAFIA

DAJANI, A. S., y L. W. WANNAMAKER, 1973a. Kinetic studies of the interaction of bacteriophage type 71 staphylococcal bacteriocin with susceptible bacteria. *J. Bacteriol.* 114, 738-742.

DAJANI, A. S., y L. W. WANNAMAKER, 1973b. In vitro and in vivo studies on a phage type 71 staphylococcal bacteriocin. In "Staphylococci and staphylococcal infection", pp. 413-421. Ed. by J. Jejaszewicz. Basel: S. Karger.

DAJANI, A. S., M. C. TOM, y D. J. LARO, 1976. Viridins, bacteriocins of α -hemolytic streptococci: isolation, characterization and partial purification. *Antim. Agents Chemother.* 9, 81-84.

DAVEY, G. P., y B. C. RICHARDSON, 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Env. Microbiol.* 41, 84-89.

DELISLE, A. L., 1976. Activity of two *Streptococcus mutans* bacteriocins in the presence of saliva, levan and dextran. *Infect. Immun.* 13, 619-626.

DELISLE, A. L., 1986. Properties of mutacin b, an antibacterial substance produced by *Streptococcus mutans* strain BHT. *Microbios.* 46, 21-28.

DEZELEE, P., y G. D. SHOCKMAN, 1975. Studies of the formation of peptide cross-links in the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 250, 6806-6816.

DOBZANSKY, W., J. BARDOWSKY, W. KOZAK, y J. ZADJEL, 1982. Lactostrepsins: Bacteriocins of lactic streptococci. *Microbiology ASM*, 1982, 225-229.

BIBLIOGRAFIA

DONALDSON, D. M., y J. G. TEW, 1977. Beta-lysin of platelet origin. *Bacteriol. Rev.* **41**, 501-513.

DONOGHUE, H. D., 1972. Properties and comparative starch-gel electrophoresis of megacins from several *Bacillus megaterium* strains. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 473-483.

DRUCKER, D. B., y C. M. McKILLOP, 1982. Bacteriocin production by *Streptococcus milleri*. *Can. J. Microbiol.* **28**, 278-283.

DURO, A. F., R. SERRANO, y C. ASENSIO, 1979. Effect of the antibiotic microcin 140 on the ATP level and aminoacid transport of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **88** (1), 297-304.

DURO, A., 1980. Caracterización y mecanismo de acción de la microcina 140. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

FERNANDEZ-VIVAS, A., J. M. ARIAS, y E. MONTOYA, 1985. Lysis induced by uncoupling agents in *Myxococcus coralloides* D. *FEMS Microbiol. Lett.* **27**, 99-102.

FEW, A. V., 1955. Interaction of polymyxin E with bacterial and other lipides. *Biochim. Biophys. Acta.* **16**, 137-145.

FISH, W. W., J. A. REYNOLD, y C. TANFORD, 1970. Gel chromatography of proteins in denaturing solvents. *J. Biol. Chem.* **245**, 5166-5168.

FLOREY, H. W., E. CHAIN, N. G. HEATLEY, M. A. JENNINGS, A. G. SANDERS, E. P. ABRAHAM, y M. E. FLOREY, 1949. Antibiotics from bacteria. In "The Antibiotics", pp. 417-565. Oxford Univ. Press, London.

FREER, J. H., 1982. Cytolytic toxins and surface activity. *Toxicon*. 20, 217-221.

FUKUSHIMA, H., S. FUKUSHIMA, T. UMEMOTO, Y. TSUBOI, y H. SAGAWA, 1978. Studies on bacteriocin from *Streptococcus mutans* Rm-10. Isolation and characterization. *J. Osaka Odont. Soc.* 41, 439-446.

FUKUSHIMA, H. S., T. FUKUSHIMA, T. UMEMOTO, H. FUKUHARA, y H. SAGAWA, 1982. Purification and chemical analysis of a bacteriocin from the oral bacterium *Streptococcus mutans* Rm-10. *Archs. Oral Biol.* 27, 721-727.

FUKUSHIMA, H., J. KELSTRUP, S. FUKUSHIMA, T. UMEMOTO, A. KAIBORI, y H. SAGAWA, 1985. Characterization and mode of action of a purified bacteriocin from the oral bacterium *Streptococcus mutans* RM-10. *Archs. Oral. Biol.* 30, 229-234.

FULLER, A. T., 1955. A new antibiotic of bacterial origin. *Nature (Londres)* 175, 722.

GAGLIANO, V. J., y R. D. HINS DILL, 1970. Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *J. Bacteriol.* 104, 117-125.

GALVEZ, A., 1984. Producción de sustancias antibacterianas por estreptococos del grupo D. Tesis de Licenciatura. Universidad de Granada.

GALVEZ, A., E. VALDIVIA, M. MAQUEDA, y E. MONTOYA, 1985. Production of bacteriocin-like substances by group D streptococci of human origin. *Microbios.* 43, 223-232.

GALVEZ, A., M. MAQUEDA, E. VALDIVIA, A. QUESADA, y E. MONTOYA, 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum



antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. Can. J. Microbiol. 32, 765-771.

GARCIA-BUSTOS, J. F., N. PEZZI, y C. ASENSIO, 1984. Microcin 7: purification and properties. Biochem. Biophys. Res. Comm. 119 (2), 779-785.

GARCIA-BUSTOS, J. F., N. PEZZI y E. MENDEZ, 1985. Structure and mode of action of microcin 7, an antibacterial peptide produced by *Escherichia coli*. Antim. Agent. Chemother. 27 791-797.

GERASIMOV, A., 1968. Bacteriocinogenia in *Streptococcus viridans*. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 45, 28-32.

GILLILAND, S. E., y M. L. SPECK, 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative culture. J. Food Prot. 40, 820-823.

GIUNTA, S., L. GALEAZZI, G. TURCHETTI, G. SAMPAOLI, y G. GROPPA, 1986. Effect of amiloride on the intracellular sodium and potassium content of intact *Streptococcus faecalis* cells *in vitro*. Antim. Agents Chemother. 29, 958-959.

DeGRAAF, F. K., H. G. D. NIEKUS, y J. KLOOTWIJK, 1973. Inactivation of bacterial ribosomes *in vitro* by cloacin DF13. FEBS Lett. 35, 161-165.

MCGREGOR, C. H., C. W. BISHOP, y J. E. BLECH, 1979. Localization of proteolytic activity in the outer membrane of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 137, 574-583.

GROSS, E., 1977. In "Protein cross-linking-B" (M. Friedman, ed.), pp. 131-153. Plenum, N.Y.

GUERRA, I., M. MARTIN, M. T. GONZALEZ, y E. MONTOYA, 1986. Endocytic uptake of *Escherichia coli* by *Saccharomyces cerevisiae* sphaeroplasts: complementation of yeast nutritional requirements. *Microbios Lett.* 32, 113-118.

GUIRARD, B. M., y E. E. SNELL, 1981. Biochemical factors in growth. *Manual of Methods for General Bacteriology*. 1st. ed. Am. Soc. Microbiol. Washington, DC. pp. 79-111.

HALE, E. M., y R. D. HINS DILL, 1973. Characterization of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* strain 462. *Antim. Agents Chemother.* 4, 634-640.

HALE, E. M., y R. D. HINS DILL, 1975. Biological activity of staphylococcin 462: bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *Antim. Agents Chemother.* 7, 74-81.

HAMADA, S. y T. OOSHIMA, 1975. Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* 54, 140-145.

HAMADA, S., H. IMANISHI, y T. OOSHIMA, 1986. Isolation and mode of action of a cell-free bacteriocin (mutacin) from serotype g *Streptococcus mutans* MT3791. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 261, 287-298.

HANCOCK, R. E. W., 1984. Alterations in outer membrane permeability. *Ann. Rev. Microbiol.* 38, 237-264.

HARASAWA, R., K. SOZUKI, y T. MITSUOKA, 1980. *Streptococcus faecium*-derived antibacterial substance antagonistic to Bifidobacteria. *Antim. Agents Chemother.* 18, 58-62.

HAROLD, F. M., y J. R. BAARDA, 1968. Inhibition of membrane transport in *Streptococcus faecalis* by uncouplers of oxidative phosphorylation and its relationship to proton conduction. J. Bact. 96, 2025-2034.

HAROLD, F. M., y J. VAN BRUNT, 1977. Circulation of H^+ and K^+ across the plasma membrane is not obligatory for bacterial growth. Science. 197, 372-373.

HAROLD, F. M., 1978. Vectorial metabolism. In The Bacteria, 6, L. N. Ornston and J. R. Sokatch, eds. (New York: Ac. Press), pp. 463-521.

HAYES, T. J., K. R. CUNDY, P. B. FERNANDES, y J. K. HOOBER, 1983. Purification and characterization of a bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. J. Bacteriol. 155, 1171-1177.

HEATLEY, N. G., y H. M. DOERY, 1951. The preparation and some properties of purified micrococcin. Biochem. J. 50, 247-253.

HERRERO, M., R. KOLTER y F. MORENO, 1986. Effects of Microcin B17 on Microcin B17-immune Cells. J. Gen. Microbiol. 132, 403-410.

HILLMAN, J. D., K. P. JOHNSON, y B. I. YAPHE, 1984. Isolation of a *Streptococcus mutans* strain producing a novel bacteriocin. Infect. Immun. 44, 141-144.

HIRSCH, A., 1952. Growth and nisin production of a strain of *S. lactis*. J. Gen. Microbiol. 5, 208-221.

HOLLAND, I., 1975. Physiology of colicin action. Adv. Microbiol. Physiol. 12, 55-139.

BIBLIOGRAFIA

HSU, C. Y., y G. M. WISEMAN, 1971. Purification of epidermidins, new antibiotics from staphylococci. *Can. J. Microbiol.* 17, 1223-1226.

HSU, C. Y., y G. M. WISEMAN, 1972. The nature of epidermidins, new antibiotics from staphylococci. *Can. J. Microbiol.* 18, 121-125.

HULTMARK, D., A. ENGSTROM, H. BENNICH, R. KAPUT, y H. G. BOMAN, 1982. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Secropia* pupae. *Eur. J. Biochem.* 127, 207-217.

HURST, A., y G. M. PATERSON, 1971. Observations on the conversion of an inactive precursor protein to the antibiotic nisin. *Can. J. Microbiol.* 17, 1379-1384.

HURST, A., 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27, 85-123.

HYNES, W. L., y J. R. TAGG, 1985. Production of broad-spectrum bacteriocin-like activity by group A streptococci of particular M-types. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 259, 155-164.

IKEDA, T., T. IWANAMI, M. HIRASAWA, CH. WATANABE, J. R. MCGHEE, y T. SHIOTA, 1982. Purification and certain properties of a bacteriocin from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 35, 861-868.

IKEDA, T., T. KOULOURIDES, T. KURITA, T. HOUSCH, y M. HIRASAWA, 1985. Anti-dental caries effect in rats and man of a bacteriocin purified from the oral bacterium *Streptococcus mutans* C3603.

JACOB, F., S. LWOFFA y E. WOLLMAN, 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur. Paris*, 84, 222-224.

BIBLIOGRAFIA

JACOB, A. E., y S. S. HOBBS, 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. J. Bacteriol. 117, 360-372.

JETTEN, A. M., y G. D. VOGELS, 1972a. Nature and properties of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. J. Bacteriol. 112, 243-250

JETTEN, A. M., y G. D. VOGELS, 1972b. Mode of action of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. Antim. Agents Chemother. 2, 456-463.

JOHNSON, C. W., H. D. WEST, H. L. JONES, y C. J. LONG, 1949. Biocerin: an antibiotic produced by *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 57, 63-65.

JOLLIFFE, L., R. J. DOYLE, y U. N. STREIPS, 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. Cell. 25, 753-763.

KADNER, J. R., P. J. Jr. BASSFORD, y A. P. PUGSLEY, 1979. Colicin receptors and mechanisms of colicin uptake. Zbl. Bakt. Parasit. Infect. Hyg. 244, 90-104.

KAKIMURA, Y., y F. HAROLD, 1985. ATP-driven exchange of Na^+ and K^+ ions by *Streptococcus faecalis*. J. Biol. Chem. 4, 2086-2091.

KAUTTER, D. A., S. M. HARMON, R. K. LYNT, y T. LILLY, 1966. Antagonistic effect on *Clostridium botulinum* type E by organisms resembling it. Appl. Microbiol. 14, 616-622.

KAWAMURA, T., y G. D. SHOCKMAN, 1983. Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramoylhydrolase of

Streptococcus faecium, a bacterial glycoenzyme. J. Biol. Chem. 258, 9514-9521.

KAWATA, T., y K. TAKUMI, 1971. Autolytic enzyme system of *Clostridium botulinum* I. Partial purification and characterization of an autolysin of *Clostridium botulinum* type A. Japan. J. Microbiol. 15, 1-10.

McKAY, B. J., L. DENEPIITIYA, V. J. IACONO, S. B. KROST, y J. J. POLLOCK, 1984. Growth inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 44, 695-701.

KELSTRUP, J., y J. R. GIBBONS, 1969. Bacteriocins from human and rodent streptococci. Arch. Oral. Biol. 14, 251-258.

KINOSHITA, N., T. UNEMOTO, y H. KOBAYASHI, 1984. Proton motive force is not obligatory for growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 160, 1074-1077.

KJEMS, E., 1955. Studies on streptococcal bacteriophages. I. Techniques of isolating phage producing strains. Pathol. Microbiol. Scand. 36, 433-440.

KOBAYASHI, H., J. VAN BRUNT, y F. M. HAROLD, 1978. ATP-linked calcium transport in cells and membrane vesicles of *Streptococcus faecalis*. J. Biol. Chem. 253, 2085-2092.

KONISKY, J., 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. Ann. Rev. Microbiol. 63, 125-144.

KRAMER, J., y H. BRANDIS, 1972. Charakterisierung eines *Streptococcus agalactiae* bacteriocins. Zbl. Bakt.Paras. Infekt. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A 219, 290-310.

KRAMER, J., y H. BRANDIS, 1975. Mode of action of two *Streptococcus faecium* bacteriocins. Antim. Agents Chemother. 7, 117-120.

KRAMER, J., J. KENESS, y H. BRANDIS, 1983. Transfer of a miniplasmid determining bacteriocin production and bacteriocin immunity in *Streptococcus faecium*. FEMS Microbiol. Lett. 20, 385-389.

LACHOWICZ, T., y Z. WALCZAK, 1968. Purification and properties of staphylococcin A. Arch.Immunol. Ther. Exp. 16, 855-863.

LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

LAMBERT, P. A., I. C. HANCOCK, y J. BADDILEY, 1977. Occurrence and function of membrane teichoic acids. Biochim. Biophys. Acta. 472, 1-12.

LINDENGREN, C. C., S. NAGAI, y H. NAGAI, 1958. Induction of respiratory deficiency by manganese, copper, cobalt and nickel. Nature. 182, 446-448.

LOPEZ, J. L., 1987. Estudios de la desnaturalización térmica de diversas proteínas por calorimetría diferencial de barrido. Tesis Doctoral. Univeridad de Granada.

DE LORENZO, V., J. L. MARTINEZ y C. ASENSIO, 1984. Microcin-mediated interactions between *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. J. Gen. Microbiol. 130, 391-400.

BIBLIOGRAFIA

DE LORENZO, V. y A. AGUILAR, 1984. Antibiotics from Gram-negative bacteria: do they play a role in microbial ecology? TIBS 9, 266-269.

LOWRY, O. H., N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, y R. L. RANDALL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

MARTINEZ, J. L., 1985. Microcina D93: Estudios bioquímicos y genéticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

MATEO, P. L., 1984. Differential scanning calorimetry applications to protein solutions. In Thermochemistry and its applications to chemical and biochemical systems (ed. M. R. da Silva), Reidel, Holland, 1984. pp. 541-568.

MATTICK, A. T. R., y A. HIRSCH, 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. Lancet. 2, 5-8.

MEHTA, A. M., K. A. PATEL, y P. J. DAVE, 1983. Purification and properties of the inhibitory protein isolated from *Lactobacillus acidophilus* AC₁. Microbios 38, 73-81.

MERRILL, C. R., D. GOLDMAN, S. A. SEDMAN, y M. H. EBERT, 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins. Science. 211, 1437-1438.

METCHNIKOFF, E., 1908. The prolongation of life. G. P. Putnam's Spos. New York.

BIBLIOGRAFIA

MEYER, P. D., y J. T. M. WOUTERS, 1987. Lipoteichoic acid from *Bacillus subtilis* subsp. *niger* WM: Isolation and effects on cell wall autolysis and turnover. *J. Bacteriol.* 169, 973-980.

MILLER, J. H., 1972. "Experiments in molecular genetics". Cold Spring Harbor Lab. New York.

MOORE, R. A., N. C. BATES, y R. E. W. HANCOCK, 1986. Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. *Antim. Agents Chemother.* 29, 496-500.

MORIN, A., S. A. SAHEB, J. G. BISAILLON, R. BEAUDET, y M. SYLVESTRE, 1980. Effect of culture medium composition on inhibition of growth of *Neisseria gonorrhoeae* by lactobacilli. *Curr. Microbiol.* 4, 283-286.

MOSSIE, K. G., D. T. JONES, F. T. ROBB, y D. R. WOODS, 1979. Characterization and mode of action of a bacteriocin produced by a *Bacteroides fragilis* strain. *Antim. Agents Chemother.* 16, 724-730.

MURRAY, F. J., P. A. TETRAULT, O. W. KAUFMANN, H. KOFFER, D. H. PETERSON, y D. R. COLINGSWORTH, 1949. Circulin, an antibiotic from an organism resembling *Bacillus circulans*. *J. Bacteriol.* 57, 305-312.

NAKAGAWA, S., 1979. Studies on bacteriocins produced by group D streptococci. I: Characterization of several bacteriocins. *Hiroshima Med. J.* 27, 809-825.

NAKAGAWA, S., y Y. MATSUO, 1981. Bacteriocin and hemolysin from *Streptococcus faecium*. *Antim. Agents Chemother.* 20, 542-544.

NAKAMURA, T., N. YAMAZAKI, H. TANIGUCHI, y S. FUJIMURA, 1983. Production, purification and properties of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* isolated from saliva. Infect. Immun. 39, 609-614.

NIKAIDO, H., 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. Biochim. Biophys. Acta. 433, 118-132.

NIKAIDO, H., y T. NAKAE, 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. 19, 163-250.

NOMURA, M., 1967. Colicins and related bacteriocins. Ann. Rev. Microbiol. 21, 257-284.

OXFORD, A. E., 1944. Diplococcin, an antibacterial protein elaborated by certain milk streptococci. Biochem. J. 38, 178-182.

POHONEK, M., 1961. Streptococci antagonizing the vaginal *Lactobacillus*. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 3, 267-270.

PORRO, M., S. VITI, G. ANTONI, y M. SALETTI, 1982. Ultrasensitive silver-stain method for the detection of proteins in polyacrylamide gels and immunoprecipitates on agarose gels. Anal. Biochem. 127, 316-321.

PRIVALOV, P. L., V. V. PLOTNIKOV, y V. V. FILIMONOV, 1975. Precision scanning microcalorimeter for the study of liquids. J. Chem. Thermodyn. 7, pp. 41-47.

PRIVALOV, P. L., 1979. Stability of proteins. Small globular proteins. Adv. Prot. Chem. 33, 167-241.

PUGSLEY, A. P., 1984a. The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membranes. Microbiol. Sci. 1, 168-175.

PUGSLEY, A. P., 1984b. The ins and outs of colicins. Part II: Lethal action, immunity and ecological implications. Microbiol. Sci. 1, 203-205.

PULVERER, G., y J. JELJASZEWICZ, 1976. Staphylococcal microcins. In "Staphylococci and staphylococcal diseases, pp. 599-621. Ed. by J. Jeljaszewicz. Stuttgart & New York: G. Fischer Verlag.

RAMSEIER, H. R., 1960. Effects of nisin on *Clostridium butyricum*. Arch. Mikrobiol. 37, 57-94.

RASSOULZADEGAN, M., B. BINETRUY, y F. CUZIN, 1982. High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eukariotic cells. Nature. 295, 257-259.

ROGERS, A. H., 1976. Bacteriocinogeny and the properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 21, 99-104.

ROGOLSKY, M., y B. B. WILEY, 1977. Production and properties of staphylococcin genetically controlled by the staphylococcal plasmid for exfoliative toxin synthesis. Infect. Immun. 15, 726-732.

RUHR, E., y H. G. SAHL, 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and cytoplasmic and artificial membrane vesicles. Antim. Agents Chemother. 27, 841-845.

SAHL, H. G., y H. BRANDIS, 1981. Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. J. Gen. Microbiol. 127, 377-384.

SAHL, H. G., y H. BRANDIS, 1982. Mode of action of the staphylococcin-like peptide Pep-5 and culture conditions effecting its activity. Zbl. Bakteriologie. Hyg. I Abt. Orig. A 252, 166-175.

SAHL, H. G., y H. BRANDIS, 1983. Efflux of low-M_r substances from the cytoplasm of sensitive cells caused by the staphylococcin-like agent Pep-5. FEMS Microbiol. Lett. 16, 75-79.

SAHL, H. G., 1985a. Influence of the staphylococcinlike peptide Pep-5 on membrane potential of bacterial cells and cytoplasmic membrane vesicles. J. Bacteriol. 162, 833-836.

SAHL, H. G., 1985b. Bactericidal cationic peptides involved in bacterial antagonism and host defense. Microbiol. Sci. 2, 212-217.

SAHL, H. G., M. GROSSGARTEN, W. R. WIDGER, W. A. CRAMER, y H. BRANDIS, 1985. Structural similarities of the staphylococcin-like peptide Pep-5 to the peptide antibiotic nisin. Antim. Agents Chemother. 27, 836-840.

SALTON, M. R. J., 1968. Lytic agents, cell permeability, and monolayer penetrability. J. Gen. Physiol. 52, 227S-252S.

SANDERS, W. E., 1975. Interactions between streptococci and other bacteria in the throat. In Microbiology-1975. Edited by D. Schlessinger. Am.Soc. Microbiol. Washington DC, pp. 106-109.

SANDERS, C. C., y W. E. SANDERS, 1978. Abstr. No. 178. Interscience Conference on Antim. Agents Chemother.

BIBLIOGRAFIA

SASARMAN, A., y M. ANTOHI, 1963. Présence des bactériocines chez le *Clostridium perfringens*. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol. 22, 377-381.

SCHALLER, K., y H. J. V. BRAUN, 1982. Colicin M is an inhibitor of murein biosynthesis. J. Bacteriol. 152, 994-1000.

SCHEIN, S. J., B. L. KAGAN, y A. FINKELSTEIN, 1978. Colicin K acts by forming voltage-dependent channels in phospholipid bilayer membranes. Nature. 276, 159-163.

SCHLEGEL, S. y H. D. SLADE, 1974. Alteration of macromolecular synthesis and membrane permeability by a *Streptococcus sanguis* bacteriocin. J. Gen. Microbiol. 81, 275-277.

SELSTED, M. E., D. M. BROWN, J. R. DeLANGE, y R. I. LEHRER, 1983. Primary srtructures of MCP-1 and CP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. J. Biol. Chem. 258, 14485-14489.

SELSTED, M. E., D. SZKLAREK, y R. I. LEHRER, 1984. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. Infect. Immun. 45, 150-154.

SHAFIA, F., 1966. Thermocins of *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. 92, 524-525.

SHERWOOD, N. P., B. E. RUSSELL, A. R. JAY, y K. BOWMAN, 1949. Studies on streptococci III. New antibiotic substances produced by β -hemolytic streptococci. J. Infect. Dis. 84, 88-91.

SHOCKMAN, G. D., 1974. Autolytic formation of protoplasts (autoplasts) of *Streptococcus faecalis* 9790: Release of cell wall,

autolysin, and formation of stable autoplasts. J. Bacteriol. 118, 735-746.

SHOCKMAN, G. D., T. KAWAMURA, J. F. BARRET, y D. L. DOLINGER, 1985. The autolytic peptidoglycan hydrolases of *Streptococcus faecium*. Ann. Inst. Pasteur /Microbiol. 136A, 63-66.

SIMPSON, D. y CH. P. DAVIS, 1979. Properties of a gonococcal growth inhibitor produced by *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 115 , 471-477.

SMITH, M. D., 1985. Transformation and fusion of *Streptococcus faecalis* protoplasts. J. Bacteriol. 162, 92-97.

STAMATIN, N., 1969. Blocage de la germination des spores et effet d'autoantibiose exercés par un métabolite synthétisé par *Bacillus laterosporus*. Ann. Inst. Pasteur Paris 116, 19-21.

STORM, D. R., K. ROSENTHAL, y P. E. SWANSON, 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. Ann. Rev. Biochem. 46, 723-763.

STREKER, R. G., R. A. VENEZIA, y R. G. ROBERTSON, 1981. Interaction of haemocin with *Escherichia coli*. Antim. Agents Chemother. 19, 668-671.

SU, T. L., 1949. Antibiotic-producing organisms in faeces and sewage. Br. J. Exp. Pathol. 30, 466-473.

SWANK, R. T., y K. D. MUNKRES, 1971. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulphate. Anal. Biochem. 39, 462-477.

BIBLIOGRAFIA

TAGG, J. R., A. S. DAJANI, y L. W. WANNAMAKER, 1971. Bacteriocins of a group D streptococcus: partial purification and characterization. *Antim. Agents Chemother.* 7, 764-772.

TAGG, J. R., y A. R. MCGIVEN, 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21, 943.

TAGG, J. R., A. S. DAJANI, L. W. WANNAMAKER, y E. D. GRAY, 1973. Group A streptococcal bacteriocin production, purification, and mode of action. *J. Exp. Med.* 138, 1168-1183.

TAGG, J. R., A. S. DAJANI, y W. L. WANNAMAKER, 1975. Bacteriocin of a group B streptococcus: partial purification and characterization. *Antim. Agents Chemother.* 7, 764-772.

TAGG, J. R., A. S. DAJANI, y L. W. WANNAMAKER, 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722-756.

TAGG, J. R., y C. RUSSELL, 1981. Bacteriocin production by *Streptococcus salivarius* strain P. *Can. J. Microbiol.* 27, 918-923.

VAN TASSEL, R. L., D. K. McDONALD y T. D. WILKINS, 1982. Production of a faecal mutagen by *Bacteroides* spp. *Infect. Immun.* 37, 975-980.

TERNHOVE-HINKS, E., 1978. Studies on cell autolysis and antibiotic-induced lysis in *Streptococcus faecium*. Ph. D. Thesis, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania.

TERWILLINGER, T. C., y D. EISENBERG, 1982. The structure of mellitin. *J. Biol. Chem.* 257, 6012-6022.

TEUBER, M., 1973. Detection of a single, metal-independent aminopeptidase activity in polymyxin-extracts from *Escherichia coli* B. Z. Naturforsch. 28, 476-477.

THEIL, R., y K. H. SCHEIT, 1983. Aminoacid sequence of seminalplasmin, an antimicrobial protein from bull semen. The EMBO J. 2, 1159-1163.

THIBAUT, J., 1949. Activité antibiotique de *Corynebacterium diphtheriae* gravis. C. R. Soc. Biol. Paris 143, 1002-1004.

THIBAUT, J., y P. FEDERICQ, 1956. Actions antibiotiques réciproques chez *Corynebacterium diphtheriae*. C. R. Biol. Paris 150, 1512-1514.

TOSTESON, M. T., y D. C. TOSTESON, 1984. Activation and inactivation of mellitin channels. Biophys. J. 45, 112-114.

UPRETI, G. C., y R. D. HINS DILL, 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antim. Agents Chemother. 4, 487-494.

UPRETI, G. C., y R. D. HINS DILL, 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antim Agents Chemother. 7, 139-145.

VED, H. S., E. GUSTOW, y R. A. PIERINGER, 1984. The involvement of the proteinase from *Streptococcus faecium* ATCC 9790 in the stimulation of its autolysin activity by dodecylglycerol. J. Biol. Chem. 259, 8122-8124.

VERNAZZA, T. R., y H. MELVILLE, 1979. Inhibitory activity of *Streptococcus mitis* against oral bacteria. Microbios. 26, 95-101.

BIBLIOGRAFIA

VINCENT, J. G., R. C. VEOMETT, y R. F. RILEY, 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. J. Bacteriol. 78, 477-484.

WEERKAMP, A., W. GEERTS y G. D. VOGELS, 1977. Conditional killing effect of Staphylococcin 1580 and repair of sublethal injury in *Staphylococcus aureus*. Antim. Agents Chemother. 12, 314-321.

WEERKAMP, A., U. J. HEINEN-VON BORIES, y G. D. VOGELS, 1978. Biochemical and ultrastructural changes in *Staphylococcus aureus* treated with Staphylococcin 1580. Antonie van Leeuwenhoek 44, 35-48.

WHITEHEAD, H. R., y W. RIDDET, 1933. Slow development of acidity in cheese manufacture investigation of a typical case of "non acid" milk. N. Z. J. Agric. 46, 225-229.

WOLF, L. F., y J. L. DUNCAN, 1974. Studies on a bactericidal substance produced by group A streptococci. J. Gen. Microbiol. 81, 413-424.

WONG, M. K., J. R. TAGG, y W. L. HYNES, 1979. Bacteriocin-like inhibitors of group A streptococci produced by group F and group G streptococci. Proc. Univ. Otago Med. School. 59, 105-106.

YANG, CH.-CH., y J. KONISKY, 1984. Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. J. Bacteriol. 158, 757-759.