

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Estudios sobre un antibiótico producido
por Myxococcus coralloides

José M.º Arias Peñalver

Tesis Doctoral

1977

R.49.40Z



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	13606499
Nº Copia	15641594

"ESTUDIOS SOBRE UN ANTIBIOTICO PRODUCIDO POR
MYXOCOCCUS CORALLOIDES"

José M^a Arias Peñalver

UNIVERSIDAD DE GRANADA
1977



**" ESTUDIOS SOBRE UN ANTIBIOTICO PRODUCIDO POR
MYXOCOCCUS CORALLOIDES "**

**MEMORIA presentada para aspirar al Grado
de Doctor en Ciencias por el Licenciado D.
José M^a Arias Peñalver.**

**PROF. DR. D. ENRIQUE MONTOYA GOMEZ
Director de Tesis**

**JOSE M^a ARIAS PEÑALVER
Aspirante al grado de Doctor en Ciencias**

Granada, Julio de 1.977.

Mi agradecimiento

Al Director de esta Tesis Doctoral, Prof. Dr. Montoya Gómez, Director del Departamento Interfacultativo de Microbiología de la Universidad de Granada, por su constante orientación y ayuda en la realización de este trabajo, y por la gran lección humana y científica que de él he recibido.

Al Prof. Dr. Olivares Pascual, Profesor de Investigación del C.S.I.C. por sus consejos a lo largo de todo este trabajo.

A la Dra. Rodríguez Franco por su gran interés, amistad e inestimable ayuda y que tan directamente ha seguido la realización de esta Tesis.

Igualmente, quiero dar las gracias a mis compañeros, personal técnico y auxiliar del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

INDICE

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION	11
MATERIAL Y METODOS	27
1. - Microorganismos	29
2. - Medios de cultivo	31
2. 1. - Medios para el aislamiento	31
2. 2. - Medios de conservación	32
2. 3. - Medios de crecimiento	34
2. 4. - Medios para el estudio de la producción de antibiótico por <u>M. coralloides</u>	45
2. 5. - Medios para la medida cuali y cuan - tiva de actividad antibiótica	37
2. 6. - Medios especiales	38
3. - Técnicas de aislamiento y cultivo	41
3. 1. - Método de Singh para el aislamiento de my xobacterias	41
3. 2. - Conservación de <u>M. coralloides</u>	42
3. 3. - Mantenimiento de las restantes bacterias.	42
3. 4. - Obtención de masas de eubacterias	43

3.5. - Obtención de inóculos de <u>M. coralloides</u> ...	43
3.6. - Condiciones de cultivo	44
4. - Controles de actividad antibiótica	47
4.1. - Ensayos sobre antagonismo bacteriano....	47
4.2. - Ensayos de actividad por el método de las diluciones seriadas	48
4.3. - Método de los pocillos	49
4.4. - Método de los discos	50
4.5. - Preparación del microorganismo prueba..	51
4.6. - Preparación de las placas	51
4.7. - Bioautograffa	54
5. - Métodos empleados en la extracción y purificación del antibiótico	57
5.1. - Técnicas preliminares de extracción del antibiótico de los caldos de cultivo	57
5.1.1. - Extracción con disolventes orgánicos.....	57
5.1.2. - Diálisis	59
5.1.3. - Adsorción sobre carbón activado ..	59
5.2. - Concentración y aclaramiento de los caldos	60
5.3. - Fraccionamiento por Sephadex	60
5.4. - Cromatografía de intercambio iónico	62
5.5. - Adsorción sobre ácido silícico	64



6. - Ensayos sobre propiedades del antibiótico	67
6. 1. - Tratamiento con enzimas proteolíticos	67
6. 2. - Cromatografía descendente	67
6. 3. - Electroforesis a distintos pHs	69
6. 4. - Espectroscopia ultravioleta y visible	70
7. - Experiencias en animales	73
7. 1. - Toxicidad para el ratón del antibiótico	74
7. 2. - Control de abscesos de <u>St. aureus</u> en ratones	75
EXPERIENCIAS Y RESULTADOS	77
1. - Identificación del microorganismo	79
2. - Producción de antibiótico por <u>M. coralloides</u>	81
2. 1. - Estudios preliminares	81
2. 1. 1. - Producción de antibiótico en medio sólido	81
2. 1. 2. - Actividad antibiótica en filtrados procedentes de cultivos en medios líquidos	83
2. 1. 3. - Sensibilidad de <u>St. aureus</u> al antibiótico	85
2. 2. - Factores culturales que afectan su producción	87



3.2.1. - Crecimiento vegetativo	110
3.2.2. - Estado de mixósporas	111
4. - Extracción y purificación del antibiótico	117
4.1. - Estudios previos de extracción del anti- biótico de los caldos de cultivo	117
4.1.1. - Extracción con disolventes orgáni- cos	117
4.1.2. - Adsorción sobre carbón activado ..	117
4.1.3. - Diálisis	119
4.2. - Concentración de los sobrenadantes	120
4.3. - Aclaramiento de los caldos	120
4.3.1. - Tratamiento con sulfato amónico ..	121
4.3.2. - Tratamiento con perclorato sódico.	122
4.3.3. - Tratamiento con etanol	122
4.4. - Extracción con cloroformo	123
4.5. - Tratamiento con sulfato sódico anhidro ..	124
4.6. - Adsorción sobre ácido silícico	125
4.7. - Otros métodos ensayados para la purifi- cación del antibiótico	128
4.7.1. - Resinas	128
4.7.2. - Filtración por Sephadex	128
4.8. - Esquema de purificación	129
5. Estudios sobre algunas propiedades del antibi <u>ó</u> tico	133

5.1. - Efecto de la temperatura sobre la estabilidad.....	133
5.2. - Efecto del pH sobre la estabilidad	134
5.3. - Tratamientos con enzimas proteolíticas ..	137
5.4. - Comportamiento electroforético del antibiótico	138
5.5. - Cromatografía descendente	138
5.6. - Espectro ultravioleta	139
6. - Espectro de acción del antibiótico	141
6.1. - Espectro antibacteriano	141
6.2. - Comprobación de la no resistencia cruzada con otros antibióticos	142
7. - Modo de acción del antibiótico	145
7.1. - Acción bactericida del antibiótico.....	145
7.2. - Efecto de la tonicidad del medio sobre la acción del antibiótico	151
7.3. - Efecto del antibiótico sobre células de <u>St. aureus</u> en reposo	154
7.4. - Efecto del cloranfenicol sobre la actividad del antibiótico estudiado	157
8. - Experiencias en animales	161
8.1. - Toxicidad para el ratón del antibiótico estudiado	161

8.2. - Efecto "in vivo" del antibiótico estudiado	162
DISCUSION	165
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFIA	183

INTRODUCCION

La primera descripción de una mixobacteria, productora de cuerpos fructificantes, se remonta al año 1892 en que Thaxter, mientras se dedicaba a la recolección de hongos en Nueva Inglaterra, describió la existencia de una serie de crecimientos de color anaranjado brillante que aparecían sobre las maderas, hongos y sustancias similares en descomposición y a los que incluyó en un género de hongos denominado Myxobacter, en razón de su aspecto mucoso (Thaxter, 1892).

A pesar del gran desarrollo de la Microbiología, los conocimientos sobre las mixobacterias, desde entonces hasta la fecha, han sido escasos y progresado relativamente poco si las comparamos con otros grupos debido quizás, como dice Stanier (1942), a que fueron estudiados principalmente por botánicos en vez de por microbiólogos y preferentemente desde un punto de vista morfológico más bien que como entidades biológicas y, de otra parte, a las dificultades en la aplicación de las técnicas microbiológicas modernas a su estudio debido al hecho de que, como regla general, no crecen de forma dispersa en medio líquido.

A pesar de todo fué Jahn (1915 y 1924) el primero que de una manera formal intentó la clasificación de las mixobacterias, incluyendo en este grupo a organismos con las siguientes características:

"bacilos vegetativos Gram negativos largos y finos, con pigmentos carotenoides, englobados en una capa mucosa y que producen cuerpos fructificantes, que contienen numerosas esporas o microquistes formados por bacilos acortados, o quistes dentro de los cuales se encuentran localizadas las esporas".

En 1942 la inclusión por Stanier de los géneros Cytophaga y Sporocytophaga, cuyas especies no producen cuerpos fructificantes, dentro de las mixobacterias hizo necesario eliminar la formación de tales estructuras como carácter específico de las mismas y enfocar la atención para definir este grupo hacia otros parámetros tales como la morfología de las células vegetativas, carencia de pared celular rígida, modo de locomoción, características de las colonias, formación y estructura de los microquistes, etc.

Ajustándose a estos parámetros o caracteres el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957, 7ª ed) incluía una revisión de Stanier sobre la clasificación de las mixobacterias, encuadrándolas en el Orden VIII, Myxobacterales, de la Clase Schizomycetes, con las siguientes características:

"Las células vegetativas son bacilos flexibles, poco refringentes, que muestran movimiento deslizante sobre las superficies sólidas y que se multiplican por fisión binaria transversal, produciendo colonias delgadas y planas que se

extienden rápidamente. Las células son activamente móviles en la periferia de la colonia, formada normalmente por grupos de 2-3 hasta varios cientos de individuos en forma de extensiones a manera de lenguas o islas separadas, cuya presencia basta para diagnosticar virtualmente el orden. Las células móviles pueden recubrir el sustrato con una capa delgada de mucílago sobre el cual reposan".

"Todas las mixobacterias, excepto los miembros del género Cytophaga, forman células en reposo. En la familia Myxococcaceae la célula en reposo es un cuerpo esférico u oval, la pared delgada y de una gran refringencia; en los restantes grupos es meramente una célula vegetativa acortada. Excepto en el género Sporocytophaga, las células en reposo nacen en/o sobre unas estructuras conocidas como cuerpos fructificantes. En el caso más sencillo los cuerpos fructificantes consisten en una masa uniforme de células en reposo que se mantienen unidas por el mucílago. Algunos grupos producen estructuras fructificantes más complejas: las células en reposo pueden estar englobadas en quistes y pueden sobresalir del sustrato mediante pedunculos sencillos o ramificados. Los cuerpos fructificantes son normalmente de colores brillantes y con frecuencia son lo suficientemente grandes como para ser observados a simple vista".

El problema de la clasificación de las mixobacterias a nivel de especie refleja exageradamente la clasifica -

ción de bacterias en ausencia de información esencial concerniente a sus propiedades fisiológicas y bioquímicas. La pigmentación, forma de los cuerpos, forma y dimensión de los microquistes, son casi los únicos parámetros o caracteres utilizados para la clasificación a nivel de especie.

Así nos encontramos que la movilidad por deslizamiento no es exclusiva de las mixobacterias. Tampoco lo es la formación de células resistentes. Hay que recurrir al uso de otros parámetros como experiencias nutritivas, relación G+C, hibridación del ADN, etc para la clasificación de especies. Esta idea parece tener un largo camino que recorrer en el caso de las mixobacterias.

Soriano (1947), sugirió que las mixobacterias no fructificantes (Cytophaga y Sporocytophaga) fueran separadas de las Myxobacterales y se unieran a otro grupo de bacterias deslizantes Gram negativas, incluidas en el orden Flexibacter.

Esta sugerencia de Soriano, recibió un apoyo experimental cuando, gracias a los trabajos de Mendel y Leadbetter (1965), y McCurdy y Wolf (1967) se demostró que mientras que el ADN de las mixobacterias no fructificantes tenía un contenido en G+C de 34-43 moles %, el ADN de organismos aparentemente muy dispares tales como Sorangium, Archangium, Podangium, Myxococcus y Chondromyces, pero todos ellos capaces de formar cuerpos fructificantes, presentan un contenido en G+C de 67-71 moles %.

La idea de Soriano se vió no solo apoyada sino -
refrendada por estos experimentos.

De acuerdo con ello, en la 8ª edición del Bergey's
Manual of Determinative Bacteriology (1974) los géneros Cyto
phaga y Sporocytophaga se han segregado de las mixobacterias,
quedando estas incluidas en el Orden I, Myxobacterales, del
Grupo 29, "Bacterias deslizantes", y con las siguientes caracte-
rísticas:

"Los bacilos unicelulares están englobados en una
capa de moco mas a menos gruesa; los bacilos son cilindricos
con los extremos afilados o romos. Se multiplican por fisión
binaria transversal. Muestran un movimiento deslizante lento
sobre las superficies sólidas o en la interfase aire-agua y ca-
recen de organos locomotores detectables. Gram negativas".

"Bajo condiciones apropiadas las células se agre-
gan para formar los cuerpos fructificantes constituidos de mo-
co y células, los cuales a menudo presentan colores brillan-
tes y dimensiones macroscópicas. Dentro de los cuerpos fruc-
tificantes, las células se transforman en células en reposo, -
llamadas mixósporas. En algunos géneros las mixósporas no-
son facilmente distinguibles de las células vegetativas; en --
otros son bacilos acortados o esferas refráctiles, encerra-
dos en una capsula y se conocen con el nombre de microquistes



Los cuerpos fructificantes pueden consistir o bien de una masa de moco y células o bien las mixósporas pueden estar incluidas en esporangios de dimensiones y forma características, los cuales pueden elevarse sobre el sustrato por un tallo simple o ramificado".

"Quimiorganotrófos: estrictamente aerobios, el metabolismo productor de energía es respiratorio nunca fermentativo. Producen enzimas capaces de hidrolizar macromoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, ésteres de ácidos grasos y varios polisacáridos. Muchos son capaces de lisar microorganismos eucarióticos y procarióticos. Carecen de pigmentos fotosintéticos pero producen pigmentos carotenoides y a menudo melanina".

"El contenido en el ADN de las bases G + C es de 67-71 moles % en todas las especies ensayadas".

Al margen de estas descripciones sistemáticas, - uno de los hechos más destacados de las mixobacterias es su capacidad para hidrolizar macromoléculas insolubles lo que les confiere un especial interés desde el punto de vista de su papel en la naturaleza, ya que las hace capaces de degradar - sustancias tan complejas y variadas como proteínas, almidones paredes celulares de bacterias, quitina, celulosa, agar, . . etc. y no solamente cuando dichas macromoléculas se encuentran aisladas, sino también cuando forman parte de estructuras de or

ganismos muertos, e incluso vivos.

Estos hechos, unidos a que las mixobacterias es tan presentes ubicuamente en todos los suelos normales y ma teriales de plantas en descomposición, hacen que estos organismos puedan ser considerados como "basureros" dentro del mundo microbiano, con la misión fundamental de degradar una serie de organismos muertos y detritus orgánicos insolubles y hacer así aprovechable sustancias cuya utilización es imposible para la mayoría de los restantes seres vivos.

Esta actividad trae como consecuencia una ac-ción beneficiosa en relación con la fertilidad de los suelos, ya que la lisis de las células libera una serie de elementos y compuestos que pueden ser utilizados tanto por la flora microbiana del suelo como por los organismos vivos. En este sentido la acción aparentemente perjudicial de M. xanthus por su efecto antagónico sobre Azotobacter (Callao et al, 1966) dis-minuyendo la capacidad de fijación de nitrógeno de los suelos puede, en definitiva, ser considerada como beneficiosa ya que permite la liberación de nitrógeno fijado, bajo la forma de --proteínas, y merced a la acción de las bacterias del ciclo del nitrógeno termina por pasar a nitratos asimilables por las --plantas.

Hasta muy recientemente se consideraba que la -degradación de esta variedad de macromoléculas se llevaba a cabo exclusivamente mediante la producción de enzimas extra-

celulares; sin embargo, la información que se tiene sobre los mismos, es relativamente escasa y a menudo imprecisa. De entre ellos se ha prestado una especial atención a los enzimas proteolíticos cuya producción es común a todas las mixobacterias, debido al hecho de que dicha capacidad proteolítica ha venido considerándose íntimamente ligada a la capacidad lítica que muestran la mayoría de estas bacterias frente a otros organismos, principalmente eubacterias. El tipo y número de microorganismos susceptibles de ser lisados solo tiene un interés marginal en esta Tesis, por lo que se prescinde de citar individualmente los distintos trabajos que tratan sobre el tema y se remite al lector a las revisiones de Stolp y Starr (1965), Dworkin (1966), Strominger y Ghuyssen (1967), así como los trabajos de Hüttermann y Kühlwein (1969), Hüttermann (1969), Harcke et al (1971), Haskå (1971) y Rodríguez Franco (1973) y a las referencias en ellos citadas.

Ahora bien, sobre el mecanismo por el que se lleva a cabo la lisis, es indudable que esta tiene que estar mediada por enzimas producidos por mixobacterias; sin embargo, la lisis no puede ser el fruto únicamente de los enzimas extracelulares, ya que, solo se ha podido demostrar la existencia de un sistema complejo de enzimas proteolíticos capaces de lisar bacterias Gram positivas y negativas muertas, y un sistema enzimático lítico capaz de actuar sobre el mucopé-

tido de paredes celulares de bacterias Gram positivas vivas, pero totalmente ineficaz frente a bacterias Gram negativas vivas.

En nuestro laboratorio (Rodríguez Franco, 1973) ha sido demostrada la presencia de enzimas epiteliales, con actividad lipolítica en M. xanthus. Esto explicaría el fracaso de los enzimas extracelulares a la hora de lisis a bacterias Gram negativas vivas, y a la exigencia de un contacto físico entre la mixobacteria y la otra célula bacteriana para que sea posible la lisis de esta última, ya que los citados enzimas extracelulares no podrían actuar, en tanto que los lípidos, tan abundantes en la pared celular de las bacterias Gram negativas no sean degradados por la acción de los enzimas epiteliales.

De acuerdo con lo anteriormente dicho, lo más probable es que la lisis de las bacterias Gram positivas y negativas sea el resultado de la acción separada o secuencial de enzimas epi y extracelulares, no pudiendo descartarse la posibilidad de que en otras mixobacterias el mecanismo de lisis sea distinto.

Hace algunos años que se formuló otra hipótesis bastante atractiva para explicar la lisis de bacterias Gram positivas y negativas vivas, consistente en suponer que las mixobacterias producen una o varias sustancias de naturaleza antibiótica capaces de matar a las bacterias y simultanea

mente modificar en alguna forma sus estructuras superficiales con lo que serian ya capaces de ejercer su acción los - enzimas extracelulares que consumarían la lisis. (Oxford y Singh, 1946; Oxford, 1947; Imšenetskiĵ y Kusjurina, 1951; Norén, 1953 a).

En la actualidad dicha hipótesis esta totalmente descartada, de una parte, porque dichos antibióticos serian sumamente lábiles o poco difusibles, ya que, salvo excepciones, no se ha podido demostrar su existencia en sobrenadantes exentos de células, y de otra, porque si bien se ha podido demostrar la producción de antibióticos por algunas mixobacterias, activos especialmente sobre bacterias Gram positivas, no parece existir relación alguna entre dicha producción y la lisis de eubacterias (Bender, 1962; Margalith, 1962; Norén y Raper, 1962; y Rodriguez Franco -- 1973).

No obstante, la comprobación de la citada hipótesis dió lugar a que se investigara la producción de antibióticos por mixobacterias por diversos autores y laboratorios, entre ellos el nuestro, lo que ha dado como resultado el que a lo largo de los últimos 30 años se haya comprobado que diversas razas de estas bacterias, como se expone a continuación, son productoras de sustancias antibióticas, aunque en algunos casos los datos sean contradictorios.



La capacidad de las mixobacterias para producir sustancias de naturaleza antibiótica, fué relatada por primera vez por Oxford (1947), quien demostró que los cultivos de una raza de M. virescens tenían actividad antibiótica; utilizando la inhibición del crecimiento de St. aureus, en cultivo líquido, como parámetro de actividad, demostró que el antibiótico aparecía al final de la fase de crecimiento exponencial y luego desaparecía cuando el cultivo era viejo. El antibiótico no tenía actividad frente a bacterias Gram negativas; sin embargo, todos los intentos para purificar el antibiótico fracasaron debido a su gran inestabilidad. Mas tarde Woods (1948) no pudo repetir las observaciones de Oxford.

Norén (1953b) tampoco pudo reproducir estos resultados frente a St. aureus, encontrando que M. virescens producía un antibiótico activo frente a Aerobacter aerogenes, pero no tenía efecto sobre St. aureus. Además encontró que una raza de Chondrococcus coralloides producía un antibiótico contra St. aureus y que tenía escasa actividad sobre A. aerogenes; el antibiótico era muy inestable.

Norén y Raper (1962), en una publicación posterior, contradijeron sus hallazgos. Informaron que una gran variedad de cuerpos fructificantes de mixobacterias (M. virescens, M. stipitatus, M. fulvus, M. lactis, Ch. lacti

cus y Ch. crocatus) producían antibióticos frente a un cierto número de bacterias Gram positivas pero no frente a bacterias Gram negativas. Concluyeron que, ya que las mixobacterias podían crecer sobre bacterias Gram negativas y lissarlas, la producción de un antibiótico frente al huésped no era un requisito previo para la lisis.

Kato (1955), tras una basta labor de investigación encaminada a la búsqueda de mixobacterias productoras de antibióticos, encontró dos razas de M. fulvus con capacidad de producción de sustancias antimicrobianas con actividad frente a bacterias Gram positivas y negativas, pero no frente a hongos y levaduras. Margalith (1962) fué incapaz de demostrar actividad antibiótica de M. fulvus frente a E. coli.

Kletter y Henis (1963) fueron incapaces de detectar actividad antibiótica frente a Aerobacter aerogenes y St. aureus en filtrados de cultivos exentos de células de M. fulvus y M. virescens.

Peterson, Gillespie y Cook (1965) encuentran una raza de Sorangium sp. capaz de inhibir el crecimiento de una gran variedad de microorganismos incluyendo bacterias Gram positivas y negativas, y varias especies de hongos y levaduras. El antibiótico se producía al final de la fase exponencial de crecimiento y se incrementaba su

producción durante la formación de mixósporas por inducción de los bacilos vegetativos con glicerol.

Dworkin (1966) afirma que las mixobacterias productoras de cuerpos fructificantes producen antibióticos activos frente a organismos Gram positivos, y posiblemente frente a algunos Gram negativos y virus.

Rodríguez Franco (1973) no pudo demostrar actividad antibiótica en sobrenadantes exentos de células de M. xanthus y otras especies por ella aislada, frente a bacterias Gram positivas y negativas.

Para Sudo y Dworkin (1973) la producción de antibióticos por mixobacterias está condicionada a un determinado estado de su ciclo de vida, es decir, durante la formación de mixósporas. Esto concuerda con Woodruff (1966) y Hurst (1969) en que la producción de antibióticos es una propiedad fundamental de la diferenciación celular.

Rosenberg et al. (1973) detectaron actividad antibiótica en cultivos de una raza de M. xanthus; el antibiótico se produce al final de la fase exponencial de crecimiento de la bacteria y es capaz de inhibir el crecimiento de algunas bacterias Gram positivas y negativas. El antibiótico tenía una actividad bactericida sobre cultivos de bacterias en crecimiento. Vaks et al. (1974) publican los detalles de la purificación

y su parcial caracterización química; el antibiótico es potente y muy resistente.

Nos encontramos, pues, con una serie de datos -- escasos y a menudo contradictorios en relación con la capacidad de producción de antibióticos por mixobacterias, que con las excepciones citadas en último lugar, en todo caso parece ser muy escasa y limitada en muchas ocasiones a estadios -- concretos de su ciclo de vida.

Por tanto se consideró sumamente interesante -- profundizar en el estudio de la producción de antibióticos por mixobacterias, por lo que, en el año 1973, se comenzó en -- nuestro laboratorio un amplio programa de investigación en -- el que de forma sistemática se estudió la capacidad de producción de antibióticos por las distintas razas de mixobacterias que fué posible aislar de los suelos de Granada. Fruto -- de este programa, fué el aislamiento de una raza, clasificada posteriormente como Myxococcus coralloides, que produce de una manera constante un antibiótico que, en principio, parecía tener una gran estabilidad y potencia, lo que hizo -- que nos animáramos a profundizar en el estudio del mismo, no sólo por el alto interés científico dentro del campo de la Microbiología, sino además con miras a una posible utilización del mismo en la práctica clínica, u otros campos de aplicación, -- cosa que en relación con las citadas mixobacterias está totalmente inexplorado.

En la presente Tesis Doctoral se exponen los trabajos realizados en relación con el citado antibiótico y que comprenden el estudio de las condiciones óptimas de cultivo que favorecen su producción; la extracción, purificación y propiedades del mismo; y , finalmente, el estudio de su espectro antibacteriano y modo de acción, así como su toxicidad y eficacia "in vivo".

MATERIAL Y METODOS

1. MICROORGANISMOS

Myxococcus coralloides

En todas las experiencias que se exponen en este trabajo se ha empleado una raza de M. coralloides aislada en nuestro Departamento según la técnica de Singh (1947) que se describe más adelante.

Esta raza fue caracterizada de acuerdo con las claves sistemáticas del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974).

Myxococcus coralloides D

Esta raza ha sido obtenida a partir de la anterior mediante la técnica que se reseña en el apartado correspondiente de resultados, capaz de crecer de forma dispersa en medio líquido.

Se ha utilizado en experiencias para relacionar la producción de antibiótico con el estado fisiológico de dicha mixobacteria.

Staphylococcus aureus

Ha sido empleada para los ensayos cuali y cuantitativos de actividad antibiótica. Se ha utilizado, además, para el aislamiento de mixobacterias.

Procedía de la colección de microorganismos de nuestro Departamento.

Escherichia coli

Empleado para el aislamiento de mixobacterias.

La raza empleada procedía, igualmente, de la colección de microorganismos de nuestro Departamento.

Para la determinación del espectro antibacteriano del antibiótico, se han utilizado las especies bacterianas que se especifican en el apartado correspondiente procedentes igualmente de nuestra colección y algunas otras suministradas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Granada.



2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medios para el aislamiento

Medio M-1. - Utilizado para la búsqueda de mixobacterias en suelo. Contiene E. coli vivo. Como soporte para las suspensiones de E. coli se usa un agar-salino base que responde a la siguiente composición:

Cloruro sódico	4.5g
Agar	20 g
Agua	1000 ml

Es aconsejable mezclar el medio muy bien antes de fundir en el autoclave. Este agar salino base se reparte en cajas de Petri, a las que se le añade una suspensión espesa de E. coli.

Medio M-2. - Utilizado para la detección de mixobacterias en suelo. Contiene St. aureus. La composición y modo de preparación es idéntica a la del medio M-1.

Medio M-3. - Responde a la misma composición que el medio M-1, salvo que al agar salino fundido se le añade E. coli (aproximadamente 2×10^{10} células/ml) previamente autoclavado. Se emplea para el aislamiento de mixobacterias una vez que estas han sido detectadas en los granos de suelo.

Agar-levadura. - Empleado con igual fin que el anterior, responde a la siguiente composición:

Levadura prensada de panadería	10 g
Agar	20 g
Agua	1000 ml
pH 7.2	

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

2.2. Medios de conservación

Agar común blando. - Utilizado para el crecimiento de las eubacterias empleadas y con la siguiente composición:

Peptona	10g.
Cloruro sódico	5g.
Extracto de carne Bovril	3g.
Agar	8g.
Agua	1000ml

El medio se fundió y esterilizó en el autoclave según las condiciones usuales.

Agar-levadura. - Se utiliza para el mantenimiento y conservación de M. coralloides. En este medio dicha mixobacteria crece produciendo abundantes cuerpos fructificantes, viables incluso después de varios meses. La composición de este medio se ha reseñado anteriormente.

Medio CT. - Empleado para el mantenimiento de M. coralloides D. En este medio dicha mixobacteria crece rápidamente de forma dispersa. Responde a la siguiente composición:

Casitone Difco	2%
Sulfato magnésico	0.1%
$\text{PO}_4\text{HK}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.01M pH 6.5

Para evitar la precipitación del sulfato magnésico, se añade asepticamente despues de que los otros componentes del medio han sido autoclavados.

2.3. Medios de crecimiento

Agar comun .- Se utilizó para el crecimiento y obtención de inóculos de masas de eubacterias. La composición del mismo solamente difiere del agar común blando reseñado anteriormente, en la cantidad de agar, que en este caso es del 2%.

Agar B/10 .- Empleado para el cultivo de M. lysodeikticus LA 100. Es el medio B/10 de Hüttermann (1969) algo modificado y con la siguiente composición:

Bacto-casitone Difco	1g
Extracto de carne Bovril	1g
Extracto de levadura	5g
Agar	20g
Agua	1000ml

pH 7.4; ajustado con una solución de KOH al 10%

Medio CTA. - Según Dworkin (1962) y cuya composición es idéntica al medio CT, adicionado de agar al 2%

Casitone Difco	1%
SO ₄ Mg	0.1%
PO ₄ HK ₂ -PO ₄ H ₂ K	0.01M pH 7.2
Agar	2%

Se utiliza para el crecimiento de M. coralloi-
des D. En este medio el M. coralloides D crece rápidamente de forma vegetativa, no produciendo mixósporas ni cuerpos fructificantes.

2.4. Medios para el estudio de la producción de antibiótico por "M. coralloides" .

Medio CGA .- Empleado para la detección de actividad antibiótica según el método de la inoculación central o en estria, y que responde a la siguiente composición:

Fosfato dipotásico	2g
Cloruro sódico	1g
Sulfato magnésico hidratado	100mg
Cloruro cálcico cristalizado	10mg
Sulfato de manganeso	1mg



Citrato férrico	3mg
Asparagina	2.5g
Casitone Difco	5g
Glucosa	10g
Agar	20g
Agua destilada	1000ml
pH 7.2	

Medio CG. - Empleado como medio de cultivo para la producción de antibiótico por M. coralloides. Su composición es idéntica al medio CGA pero sin agar y pH 6.5. La glucosa se añade asepticamente previa esterilización por filtración o autoclavada a 115° 20 min.

Medio M-A. - Es el medio N III B de Norén (1955) y con la siguiente composición:

Fosfato bipotásico	2g
Cloruro sódico	1g
Sulfato magnésico	0.1g
Cloruro cálcico	0.01g
Sulfato de manganeso	0.001g
Citrato férrico	0.003g
Hidrolizado ácido de la caseína (Difco)	5g
Asparagina	2.5g
Agua destilada	1000ml
pH 7.2	

Medio M-B. - Modificación del N III B de Norén (1955) por sustitución del hidrolizado ácido de la caseína por caseína a la misma concentración.

Medio M-C. - Modificación del medio M-A por sustitución del hidrolizado ácido de la caseína por caseína a la misma concentración.

Medio M-AG. - Igual que el medio M-A más glucosa al 1%

Medio M-BG . - Igual que el medio M-B más glucosa al 1%

Medio M-CG/7. - Idéntico al medio CG pero sin asparagina

2.5. Medios para la medida cuali y cuantitativa de actividad antibiótica

Medio "antibiotic medium -1". - Es un agar blando (BBL) y con la siguiente composición:

Gelytase TM peptona 6.0g

Tripticase TM peptona 4.0g

Extracto de levadura	3.0g
Extracto de carne	1.5g
Glucosa	1.0g
Agar	15.0g
pH 6.6	

Este medio no debe ser esterilizado hasta que esté bien disueltó.

Medio "antibiotic medium -2" .- Es un agar base (BBL), que responde a la siguiente composición:

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

2.6. Medios especiales

Agar almidón .- Empleado para la determinación cualitativa de la actividad amilásica de M.coralloides y con la siguiente composición:

Agar	2%
Almidón soluble	1%

Agar-esculina. - Utilizado para comprobar la capacidad de hidrólisis sobre la esculina del M. coralloides, y con la siguiente composición:

Agua de peptona	100ml
Esculina	0.1g
Citrato férrico	0.05g
Agar	2.0g

3. TECNICAS DE AISLAMIENTO Y CULTIVO

3. 1. Método de Singh (1947) para el aislamiento de mixobacterias

Cajas de Petri, conteniendo una capa base de agar salino, se recubren uniformemente con 0.3 ml por placa de una suspensión espesa de E. coli ó St. aureus procedentes de un cultivo de 24 horas; después de eliminado el exceso de agua por evaporación en la estufa de 37°, se depositan sobre la superficie debidamente espaciados, de 6 a 10 granos de suelo pasado por un tamiz de 2 mm de apertura de malla; las placas son incubadas a 28° durante 4 ó 6 días. Alrededor de los granos de tierra donde existen mixobacterias, se producen zonas de lisis de las células bacterianas y mas tarde aparecen los cuerpos fructificantes correspondientes, característica esta última la más llamativa de las mixobacterias.

Se tomaron muestras de los cuerpos fructificantes y células vegetativas, que por un lado se sembraron en placas con medio M-3 y agar levadura, y por otro se suspendieron en solución salina esteril y se diseminaron repetidas

veces en los mismos medios anteriores. Se volvieron a seleccionar colonias, que por sus características hacia sospechar de una mixobacteria, y tras asegurarnos de la ausencia de otros tipos de bacterias, consiguiendo tenerle en cultivo puro, se procedió a su identificación.

3.2. Conservación de "M. coralloides"

Se ha llevado a cabo por resiembras periódicas cada 15 días en tubos inclinados de agar levadura. Después de inoculados los tubos eran incubados a 28° durante 4 días y a continuación se conservaron en la oscuridad y a una temperatura de aproximadamente 4°.

Para la conservación de M. coralloides D, capaz de crecer de forma dispersa en medio líquido, se realiza por transferencias en medio líquido (CT).

3.3. Mantenimiento de las restantes bacterias empleadas

Se ha llevado a cabo por siembras en picadura en agar común blando; incubación a 37° y posterior conservación a 4°. Al igual que el M. coralloides fueron resemebrados cada 15 días.

3.4. Obtención de masa de eubacterias

Las eubacterias, utilizadas como sustrato alimenticio para M. coralloides, fueron obtenidas por cultivo en frascos de Roux de 1000 ml conteniendo 125 ml de agar común. La inoculación, cultivo y recolección se efectuaron según las técnicas ordinarias para estos casos.

Para la determinación del espectro bacteriano, - las eubacterias fueron obtenidas por cultivo en tubos de agar común inclinado, en fase exponencial de crecimiento, recogidos en solución salina estéril y dando una absorción de 0.5 midiendo a una D. O. de 650 nm.

Tanto para los ensayos sobre la producción de antibiótico por M. coralloides, como para las medidas cuantitativas del mismo se usó una raza de St. aureus que se adicionó al medio de cultivo a una concentración final de 4.8×10^8 cel/ml.

3.5. Obtención de inóculos de "M. coralloides"

La preparación de inóculos de M. coralloides, para la siembra de los distintos medios utilizados en las diferen

tes experiencias, sobre la producción de antibiótico y salvo en los casos en los que se especifique, se prepararon de la siguiente forma:

De tubos de agar levadura en donde M. coralloides crece produciendo abundantes cuerpos fructificantes, incubados a 28° durante 4 ó 5 días, se hizo una suspensión espesa en solución salina esteril (1 tubo de agar: 1 ml de solución salina). Con el fin de conseguir una buena homogeneización, las suspensiones de mixobacterias eran agitadas usando el mixo-tub, hasta conseguir la liberación de las mixósporas. Si bien este método no es totalmente eficiente para la buena obtención de una suspensión homogénea, es la única manera de conseguir inóculos uniformes.

Los inóculos de M. coralloides D, raza capaz de crecer de forma dispersa en medio líquido, empleados en la siembra de los medios utilizados para los estudios de morfogenésis y su relación con la aparición y producción de antibiótico, se hacían a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento incubados a 28° en agitación (200 vpm), tomando 1 ml e inoculando matraces erlenmeyer conteniendo 20 ml de medio de cultivo.

3.6. Condiciones de cultivo

Para los cultivos estáticos se utilizaron frascos

de Roux de 1000 ml conteniendo 125 ml de medio de cultivo; los frascos eran inoculados con 1.5 ml de una suspensión de M. coralloides obtenido como anteriormente se re seña.

Para la obtención de mayores cantidades de caldo, se usaron frascos de Roux de 4000 ml, conteniendo 250 ml de medio, siendo inoculados con 3 ml de una sus pensión de mixobacteria.

Los cultivos en agitación se realizaron en un agitador orbital (Gallenkamp) a 200 vpm. utilizando matra ces de 250 ml conteniendo 40 ml de medio de cultivo, inoculados con 0.5 ml de una suspensión de M. coralloides.

El periodo de incubación es variable dependiendo del tipo de experiencias realizadas, siendo inicialmente de 15 a 20 días para conocer el tiempo óptimo de producción de antibiótico por valoración de la actividad cada 24 horas y establecer diferencias según la modalidad de cultivo.

La técnica más usada fué la de agitación.

4. CONTROLES DE ACTIVIDAD ANTIBIOTICA

4.1. Ensayos sobre antagonismo bacteriano

Inicialmente fueron realizados por la técnica de siembra en estrias. En cajas de Petri de 10 x 20 cm, conteniendo CGA como medio de cultivo, se efectua una siembra en estria mediante un asa de platino impregnada de una suspensión de M. coralloides en solución salina esteril. Se incuban a 28º durante varios días y tras observar un crecimiento óptimo de la mixobacteria, a partir - del tercer día y hasta el sexto, se procede a la siembra en estrias perpendiculares a la anterior, a partir de sus pensiones de células vivas, de cada uno de los siguientes microorganismos prueba:

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Bacillus subtilis

Pseudomonas reptilivora

Micrococcus sp

Mycobacterium phlei

Las placas se incuban nuevamente a 28° y 37°, a fin de determinar posibles interferencias en la lectura - del halo de inhibición del crecimiento, dado que los microorganismos prueba tienen una temperatura óptima de crecimiento de 37° a la cual M. coralloides apenas si muestra crecimiento. El periodo de incubación es de dos días, realizando lecturas, a distintos tiempos, de las inhibiciones- del crecimiento de este microorganismo en las zonas próximas al M. coralloides.

Estas mismas experiencias se llevaron a cabo por inoculación central de M. coralloides hasta que apare cia una colonia gigante de dicha mixobacteria, procediéndose a continuación de idéntico modo y paralelamente a como se ha indicado anteriormente.

4. 2. Ensayos de actividad por el método de las diluciones seriadas

Se utilizó M-CG como medio de cultivo, con el fin de mantener las mismas condiciones nutritivas y evitar por consiguiente, interferencias de los componentes de los caldos de cultivo de la mixobacteria.

Para el ensayo de la actividad por el método

de las diluciones seriadas se utilizaron sobrenadantes de cultivo, exentos de células, de M. coralloides de 6 días de incubación a 28° en agitación, a los que se les midió su actividad. A partir de estos caldos de cultivo se prepararon las adecuadas diluciones, a las que previamente se les determinó su actividad. Los caldos de cultivo fueron esterilizados por filtración en membranas de Millipore de 0.45 μ de diámetro de poro. Se prepararon diluciones, en tubos de ensayo, del caldo bruto activo en el medio CG hasta tener un volumen total de 4 ml por tubo. El tubo que sirve de testigo únicamente contiene medio CG.

Todos los tubos se inocularon con una gota de una suspensión de St. aureus (aproximadamente 5×10^6 células/ml), en solución salina estéril. Se incubaron a 37° durante 24 horas e incluso se prolongó hasta las 48 horas.

4.3. Método de los pocillos. Grove y Randall (1955)

Para la realización de este método, teniendo en cuenta las recomendaciones de la S.M.E., se han mantenido constantes la cantidad y calidad del medio de cultivo, técnicas de siembra, concentración del inóculo, temperatura de incubación y lecturas. Todas estas son variables que influyen sobre el halo de inhibición y que por tanto deben ser tenidas en cuenta.

Se han utilizado placas de Petri de 20x10 mm y cilindros de acero inoxidable con un diámetro exterior de 8mm, un diámetro interior de 6 mm y una altura de 10 mm.

Además, se han utilizado placas de plástico (Nunc-bio) de 230x230 mm de tapa sin agujeros y por tanto de cierre hermético, lo que puede originar una excesiva condensación de humedad en el interior de la placa, que originaría problemas de lectura. Para evitar esta gran concentración de vapor de agua, es aconsejable hacer unos agujeros o bien no ajustar la tapadera.

4.4. Método de los discos Grove y Randall (1955)

En la realización de este método se han tenido en cuenta las mismas recomendaciones que para el método de los pocillos.

Los discos son de papel de cierta consistencia y de 6 mm de diámetro. El disco debe absorber una cantidad adecuada, aproximadamente de 0,02 ml; para ello se procede a la impregnación por inmersión hasta que éste se absorba totalmente y de modo uniforme. Es imprescindible que a la hora del manejo, el disco esté totalmente seco, por lo que los discos deben estar envasados en recipientes herméticos y no es aconsejable sacar los discos



del refrigerador y utilizarlos seguidamente, ya que a la temperatura ambiente, pueden tomar algo de humedad y dificultar la difusión, sobre todo cuando se usa extractos de antibiótico en disolventes orgánicos, por lo que hay - que tener la precaución de que antes de abrir el vial, donde estan los discos, éste haya tomado la temperatura de laboratorio, evitándose de este modo condensaciones de agua en el interior.

4.5. Preparación del microorganismo prueba

Se ha utilizado, como organismo ensayo, Sta-
phylococcus aureus. Se preparan suspensiones de dicho microorganismo de la manera usual, en solución salina-esteril, de forma que dichas suspensiones dan una absorncancia de 0.5 (equivalente a 2.7×10^8 células/ml) a 650 nm de D.O., medida en un fotocolorímetro Spectronic-20.

Tanto para el método de los pocillos como - para el de los discos la preparación del microorganismo ha sido idéntica.

4.6. Preparación de las placas

Para la preparación de las placas se ha se
guido el método de la doble capa.

En el caso de las placas de Petri de 20x10mm se adiciona primero 5 ml de medio "antibiotic medium 2" como capa base. Una vez solidificado el medio, se añade 2.5 ml de "antibiotic medium 1" previamente inoculado con 0.2 ml de una suspensión de St. aureus, preparada como antes se ha reseñado, mantenida a 45°.

Cuando se usan las placas de plástico Nuncbio, se procede de idéntico modo a como se ha indicado anteriormente, salvo que variando la cantidad de medio; en este caso, se adiciona primero una capa base de 110 ml de medio y una vez solidificado se le añade 50 ml del agar-blando, inoculado previamente con la cantidad correspondiente de la suspensión de St. aureus. Es importante tener en cuenta que las placas han de ser de fondo plano y estar en posición totalmente horizontal en el momento de ser preparadas, ya que variaciones en el espesor del agar puede afectar la sensibilidad del ensayo, así como la reproductibilidad de las zonas de inhibición.

Una vez preparadas las placas, se colocan - los pocillos sobre la superficie del medio; estos pocillos que son cilindros de acero inoxidable y de dimensiones dadas anteriormente, han de estar estériles. Las muestras se aplican a 6 gotas por pocillo mediante una pipeta Pasteur, de sección normalizada, después de que los sobrenadantes de cultivo han quedado exentos de células por centrifugación o filtración a través de membranas esterilizan

tes. En el caso de los discos de papel, una vez que estos han sido impregnados con los caldos de cultivo o soluciones de antibiótico y secados, son colocados sobre la superficie del medio de cultivo.

Antes de ser incubadas las placas, se deja un tiempo de predifusión, para que el antibiótico difunda alrededor del disco o pocillo, durante 4 horas a temperatura ambiente, conservando su posición horizontal evitando vibraciones y movimientos cuando se usan pocillos, ya que pueden provocar el derrame de la muestra depositada en los mismos. Transcurrido este tiempo, las placas se incuban a 37°, evitando el cierre hermético de las placas para impedir la excesiva humedad, como ya se ha indicado.

La lectura de los resultados, transcurridas 18 horas de incubación, se hace midiendo el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de St. aureus que destaca muy bien del resto del medio en el que, no habiendo llegado la difusión, persiste el crecimiento. Para mayor exactitud en las medidas se ha utilizado un calibrador.

Como control comparativo se ha usado, en algunos casos que se especifican, discos de Penicilina G sódica.

Si bien el método de los pocillos es bastante preciso, se eligió el sistema del uso de los discos de papel impregnados de cultivo sin separación previa de las células bac

terianas, aprovechando el hecho de que a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo prueba, 37°, apenas si crece la raza de M. coralloides utilizada, no habiendo interferencia en la lectura de los halos de inhibición que aparecen alrededor de los correspondientes discos.

Otra gran ventaja que ofrece el uso de los discos es a la hora de usar extractos purificados de antibiótico en disolventes orgánicos, ya que una vez impregnados los mismos, el disolvente se elimina fácilmente por evaporación a temperatura ambiente.

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

4.7. Bioautografía

Para la detección del antibiótico separado por cromatografía y electroforesis, se ha utilizado el método biológico, llamado bioautografía. En este método se valora la acción inhibidora del antibiótico sobre un microorganismo.

Para su realización se depositan sobre la su perficie de las placas, preparadas de igual modo que para la técnica de los cilindros y discos, tiras de papel de 0.5 a 1.0 cm de anchura cortadas en sentido de la marcha de la sustancia activa del cromatograma o electroforegrama, previamente secado para eliminar por evaporación la fase móvil o el tampón empleado durante el correspondiente desarrollo, que podría interferir sobre el crecimiento del mi croorganismo prueba.

Tanto el medio como las placas y microorganismos de ensayo utilizados en esta técnica, son los mismos que se han descrito anteriormente.



5. METODOS EMPLEADOS EN LA EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ANTIBIOTICO

5.1. Técnicas preliminares de extracción del antibiótico de los caldos de cultivo

En todas estas experiencias preliminares de extracción del antibiótico los caldos brutos activos, de cultivos de M. coralloides obtenidos tras seis días de incubación, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 20 min.- para separar las bacterias.

5.1.1. Extracción con disolventes orgánicos

Se llevó a cabo según la técnica convencional de extracción por agitación en embudo de decantación y separación de fases. A la fase orgánica se añadió aproximadamente un volumen igual de agua y a continuación se procedió a eliminar el disolvente por evaporación en vacío a 50° y adición simultánea de agua, hasta obtener una solución acuosa exenta de disolvente que posteriormente se

Llevó a pH 7 y se completó con agua hasta un volumen igual al de partida.

A estas fases resultantes se les determinó la actividad con el método de los discos de papel.

Al mismo tiempo se determinó el número óptimo de extracciones necesarias para conseguir una recuperación cuantitativa.

Se ensayaron diferentes disolventes a distinto pH:

Acetato de etilo	pH 3.7 y 9
n-Butanol	" "
Cloroformo	" "
Tetracloruro de carbono	" "
Alcohol amílico	" "
Eter etílico	" "
Eter de petróleo	" "

El pH se fijó mediante la adición de unas gotas de solución de ClH 1N y NaOH 1N.

Con los resultados obtenidos se eligió el disolvente más adecuado elaborándose un esquema de extracción a nivel preparativo.

5. 1. 2. Diálisis

Sobrenadantes de cultivo de M. coralloides fueron dializados frente a tampón fosfatos pH 7. 2 0. 02M utilizando tubos de diálisis. El tubo de diálisis se sumergió en un vaso de precipitados, con el citado tampón, que se mantuvo en agitación durante 24 horas a 4º.

Transcurrido este tiempo, se ensayó la actividad, tanto en los sobrenadantes dializados como en las aguas de diálisis, por el método de los discos de papel.

5. 1. 3. Adsorción sobre carbón activado

Se utilizó carbón activado Merck.

A los sobrenadantes exentos de células, se le adicionó carbón activo al 3% y la mezcla se mantuvo en agitación continua durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se filtró por papel y el carbón se lavó varias veces con agua destilada. Tanto el filtrado como las aguas de lavado se recogieron para su posterior ensayo.

Se ensayaron eluciones del carbón con ácido-clorhídrico 0. 1N, hidróxido sódico 0. 1N, alcohol alcalino 50%, alcohol ácido al 20%, acetona y otros disolventes or

gánicos, en caliente y a temperatura ambiente. Las soluciones ácidas y alcalinas fueron neutralizadas y llevadas con agua a un volumen igual al de partida, previa eliminación de los disolventes en los casos en que estos fueron utilizados.

5. 2. Concentración y aclaramiento de los caldos

Se llevó a cabo según las técnicas ordinarias y en las condiciones que se especifican en los apartados correspondientes del capítulo de resultados.

5. 3. Fraccionamiento por Sephadex

Se han empleado Sephadex G-100, G-25 y G-10, suministrados por la Pharmacia Fine Chemical de Upsala (Suecia). Las columnas utilizadas eran de 1 x 40 cm.

Montaje de la columna

A la cantidad adecuada de Sephadex, dispuesta en un matraz Kitasato, se añade un exceso de agua destilada y se deja estar en reposo un determinado periodo de

tiempo, variable según el tipo de Sephadex utilizado, a fin de conseguir una buena hidratación del mismo. Este proceso de hinchamiento puede abreviarse por calentamiento al baño maría. Una vez enfriada la mezcla se sometió a un vacío de 0.01 mm de mercurio, para eliminar y evitar la formación posterior de burbujas de aire.

Con el gel así preparado se llenó la columna, de dimensiones anteriormente citadas, según la técnica usual. Montada la columna, en posición vertical se enfrió a 4º y se le hizo pasar lentamente 500 ml de agua destilada para conseguir un equilibrado y empaquetado perfecto.

Aplicación de la muestra

Para evitar una dilución de la muestra y conseguir una distribución homogénea en la superficie del gel, se añadió 50 mg de sacarosa por ml de muestra, con objeto de aumentar su densidad. Esto permite que al añadir la muestra no haya que eliminar el exceso de eluyente y al tener una densidad mayor se deposite y distribuya sobre la superficie del gel; tras unos minutos se hizo penetrar, abriendo la columna con flujo lento, un volumen de eluyente doble que el de la muestra. Finalmente

se cerró la columna y se depositó con una pipeta un de terminado volumen de eluyente (agua destilada) y se co nectó al reservorio del mismo, cuidando de que en el li quido no queden burbujas de aire.

El desarrollo se llevó a cabo utilizando un flujo de 1 ml por minuto y recogiendo fracciones de 3 ml, empleando un colector automático de fracciones LKB (7.000 ultrorac). El sistema empleado para el fracciona miento es el del volumen fijo por contaje del número de gotas. La regulación del flujo se llevó a cabo mediante una bomba peristáltica LKB intercalada entre la colum na y el colector.

A las distintas fracciones obtenidas se les ensayó la actividad mediante la técnica de los díscos de papel.

5.4. Cromatografía de intercambio iónico

Se utilizaron resinas ácida (IR-120) y bási cas (IR-400, IR-45) intercambiadoras de iones. Antes de su utilización necesitan ser sometidas a un proceso de lavado. Primeramente se lavaron las resinas en vaso de precipitados con agua destilada y se dejaron en suspen sión durante 24 horas; se decantó el agua destilada y se

procedió al equilibrio de las resinas. Para ello se trató al ternativamente con soluciones de $\text{ClH } 2\text{N}$ y $\text{NaOH } 2\text{N}$, 3 ve ces, según que el tipo de resina sea básica o ácida, res pectivamente. Seguidamente se sometió a lavado con agua destilada, hasta que las aguas de lavado salieron con pH neutro. A continuación se dió el último tratamiento con NaOH ó ClH (al igual que antes) y se volvió a lavar con agua destilada hasta la neutralidad, dejando a las resinas en condiciones de uso.

Al final del proceso pueden aparecer "finos", que se eliminan por decantación, una vez sedimentada la resina.

Se usaron columnas de 1×30 cm, y en la par te inferior, sobre la llave de vidrio, se colocó lana de vi drio como soporte del lecho. La parte superior va conec tada al reservorio de eluyente. El llenado de la columna se hizo dejando caer lentamente por las paredes la sus pensión de resina con ayuda de una varilla de vidrio. Una vez alcanzada la altura correspondiente, se colocó un pa pel de filtro sobre la superficie de la resina y se dejó un exceso de agua destilada, de modo que no excediera de 2 cm de altura, sobre la superficie de la resina. Para empaquetar la columna se hizo pasar 500 ml de agua desti lada; la aplicación de la muestra se realizó mediante una pipeta

dejando caer la misma sobre la pared de la columna y con cuidado de no remover el lecho. El flujo para el drenado de la muestra ha de ser menor al utilizado en la elución.

Una vez que la muestra ha penetrado en la columna se hizo pasar un volumen de 50 ml de agua destilada a fin de lavar la columna eliminando el material no fijado. A continuación, se hizo pasar el eluyente. El flujo utilizado, fue del orden de 0.5 ml/min, recogiéndose fracciones de 10 ml que fueron neutralizadas y ensayadas mediante el uso de discos de papel.

El tipo de eluyente varia según el intercambiador iónico utilizado; así para la IR-120 se usó ClH 2N y NH₃ 1N; para la IRA-400 e IR-45 se usó NH₃ 5N.

5.5. Adsorción sobre ácido silícico

Se utilizó ácido silícico Sigma.

Para usos analíticos se usaron columnas de 30 cm de largo y 1 cm de diámetro. En la parte inferior de la columna, sobre la llave de vidrio, se colocó un trozo de lana de vidrio como soporte del lecho. La parte superior iba conectada a un reservorio del eluyente.

Para la preparación de las columnas y aplicación de las muestras se procedió del siguiente modo: a la cantidad adecuada de ácido silícico, se le añade un exceso de disolvente empleado posteriormente como eluyente. Se tiene en agitación continua hasta que se hayan eliminado las partículas de aire englobadas en el gel. Con el gel así preparado, se llenaron las columnas de las dimensiones antes citadas mediante las técnicas ordinarias.

La muestra se aplicó por medio de una pipeta con terminación capilar curvada y asegurando que la superficie no se agite durante la adición de la muestra. Durante la penetración de la muestra, el flujo debe ser menor al flujo utilizado en la elución.

Por último se hizo pasar el eluyente. En todos los pasos el flujo es controlado con la ayuda de la llave de vidrio situada en la parte inferior de la columna. Se utilizó un flujo de 1 ml/min, recogiendo fracciones de 3 ml a las que se les ensayó su actividad mediante el empleo de discos de papel.

6. ENSAYOS SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES DEL ANTIBIOTICO

6.1. Tratamientos con enzimas proteolíticas

Los enzimas utilizados fueron: Papaina (Sigma) y Proteasa (Sigma). La técnica seguida es común para ambos enzimas y consiste en lo siguiente: a tubos de ensayo - conteniendo soluciones del material activo se les añadía el enzima en la proporción 5 mg/ml. En otro tubo se prepara una solución del enzima (en tampón citrato-fosfatos 0.02M pH 7 para la proteasa y tampón fosfatos pH 6.2 0.02M para la papaina) que servirá como control o testigo. Los tubos - eran mantenidos a 30° (proteasa) o 25° (papaina) durante - 30-60 minutos.

La actividad antibiótica era ensayada según la técnica de los pocillos.

6.2. Cromatografía descendente

Se ensayó el comportamiento cromatográfico - del antibiótico en varios sistemas solventes:

Eter de petróleo-cloroformo	4:1 y 24:1
Eter de petróleo-benceno	24:1
Butanol-piridina-agua	12:3:5
Butanol-ác. acético-agua	12:3:5

Los desarrollos en éter de petróleo-cloroformo se hicieron preparativos empleando papel Whatman 3MM. En los demás casos se empleó Whatman 1MM cortado en tiras de anchura apropiada al número y volumen de las muestras.

Las dimensiones del papel es variable dependiendo de las muestras a ensayar y del tipo de ensayo, analítico o preparativo. A 9 cm de uno de los extremos se trazó la línea origen con lápiz de grafito; a 4 cm de los bordes se señalan trazos de 2 cm separados entre sí 3 cm; en estos trazos se depositan las muestras para los ensayos analíticos. En el caso de cromatografía preparativa las muestras se colocan a lo largo de 19 cm sobre el origen, equidistantes 3 cm de cada borde del papel.

Las muestras se colocan con micropipetas y con ayuda de "un secador de pelo".

Se utilizó una cubeta adaptada para la técnica descendente, y a tal efecto, en la parte superior va apoyada una navicilla en la que se encuentra el solvente de desarrollo. Se introduce el extremo del origen del papel en el

solvente, teniendo cuidado que la zona de depósito de las muestras quede ya en la parte suspendida del papel, y se coloca una varilla de vidrio sobre el extremo sumergido para mantenerlo fijo.

El tiempo de desarrollo es variable, dependiendo del sistema utilizado, y transcurrido el mismo se saca el cromatograma del tanque y se seca a temperatura ambiente. El secado se termina con corriente de aire, hasta la total eliminación del disolvente. Para la detección de la actividad se siguió la técnica de la bioautografía.

6.3. Electroforesis a distintos pHs

Se utilizó una cubeta "en tejado" capaz de albergar tiras de papel, (de 31 x 30 cm) Whatman 3MM y 1MM o Schleicher-Schüll según las pruebas sean preparativas o analíticas. La técnica utilizada es la descrita por López Gorgé (1966).

Los desarrollos electroforéticos del antibiótico se realizaron a distintos tiempos, voltajes y pH. El pH de los distintos tampones utilizados se ajustaron y comprobaron antes de su uso, mediante el pH-metro.

Los distintos tampones y pH utilizados fueron los siguientes:

Piridina-ác. acético-agua	(25-1-475)	pH 6.5
Piridina-ác. acético-agua	(3- 10-487)	pH 3.9
Acido acético N/4		pH 2.9
Solución de Bórax al 1%		pH 9.0

Los diferentes tiempos y voltajes usados se dan oportunamente en el capítulo correspondiente de resultados.

Los electroforegramas, una vez desarrollados, se secaban a 50° y en corriente de aire hasta la total eliminación del disolvente. Una vez secados se ensayaron por la técnica de la bioautografía.

6.4. Espectroscopia ultravioleta y visible

Para la determinación de los espectros de absorción del antibiótico purificado, en disolventes orgánicos, se ha empleado un espectrofotómetro Perkin-Elmer de doble haz, modelo DB GT equipado con escala lineal de densidades ópticas. El espectrofotómetro va acoplado a un registrador marca Servoscribe modelo 1 s haciéndose registro entre 800 nm y 190 nm. La velocidad de barrido del margen de longitud de onda fue de 60nm/min. haciéndose el registro a una velocidad de carta de 60mm/min.

Se utilizó el procedimiento de las diluciones,
comenzando por la solución pura concentrada.

7. EXPERIENCIAS EN ANIMALES

Como animales de experimentación se han utilizado ratones macho blancos, procedentes del "criadero de animales de experimentación" de la Universidad de Granada.

Antes de proceder a cualquier tipo de inoculación, los ratones deben tenerse en lotes de cinco o bien en jaulas independientes, dependiendo del tipo de experiencia, durante un periodo de tiempo mínimo de 5 - 7 días con la finalidad de que los animales se adapten a las nuevas condiciones ambientales; al hacer cualquier tipo de experiencia los ratones han de ser divididos en lotes lo más homogéneos posible en cuanto a peso y edad. La vía de inoculación es dependiente de la prueba a realizar.

Como experiencia preliminar es imprescindible comprobar la toxicidad del antibiótico y posteriormente, en caso de atoxicidad, determinar si el tratamiento con el antibiótico protege a los animales de la infección por microorganismos sensibles a la acción del mismo.

7. 1. Toxicidad para el ratón del antibiótico

Para comprobar la toxicidad del antibiótico purificado, se inyecta una disolución acuosa del mismo a lotes de 5 ratones y se comprueba que ninguno de ellos muera a las 48 horas.

Como vías de inoculación se usaron la vena de la cola y la intraperitoneal. La inyección en la vena de la cola ha de hacerse de modo que no exceda de 5 segundos con un volumen no superior a 0.1 c.c. Para favorecer la visibilidad de las venas es conveniente introducir momentos antes de la inoculación, la cola del ratón en un vaso con agua templada.

Por vía intraperitoneal, se inyecta un volumen no superior a 0.5 c.c., en el tejido celular subcutáneo de la región umbilical del animal con sumo cuidado de no lesionar el intestino.

Tanto por vía intravenosa como intraperitoneal, la dosis puede ser única o bien dosis repetidas, en días sucesivos.

Puede ocurrir que uno o mas ratones muera a las 48 horas y, en este caso, se debe repetir la experiencia. Si a las 48 horas no muere ningún animal del lo

te, se puede concluir que el antibiótico es atóxico.

7.2. Control de abscesos de "St. aureus" en ratones

Para comprobar el efecto del antibiótico sobre protección de animales a ser infectados, los ratones deben ser inoculados con bacterias que le sean patógenas y que estas sean sensibles a la acción del antibiótico.

Se inocularon subcutáneamente en el lomo de ratones, 0,05 ml de una suspensión de St. aureus de 7×10^9 cel/ml de un cultivo de 24 horas en agar común, mezclada con 25% de alúmina, para localizar la infección.

Los ratones se dividieron en dos lotes, lo más homogéneos posible, quedando un lote como testigo y el otro se trató con antibiótico, siendo las condiciones ambientales y el manejo experimental de los animales idénticos en los dos lotes. Los testigos recibieron una dosis diaria de 0.25 ml de agua destilada por vía intraperitoneal. Los tratados recibieron también, dosis diaria de 0.25 ml de una so-



lucción de antibiótico por idéntica vía que los testigos.

Transcurridos 6-10 días de inyecciones diarias, se anestesiaron a muerte los ratones con éter y se les levantó la piel, observándose la lesión aparecida. Esta se manifiesta por un absceso localizado practicamente de todos los vasos subcutáneos.

RESULTADOS

1. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO

En el transcurso de una serie de experiencias previas desarrolladas en nuestro laboratorio y en las que de una manera sistemática se investigó la capacidad de producción de antibióticos por mixobacterias presentes en suelos de Granada, se aisló una raza que produce un antibiótico, activo principalmente sobre bacterias Grampositivas.

De acuerdo con la 8ª edición del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (1974) dicha mixobacteria productora de antibiótico fué caracterizada como Myxococcus coralloides, por ajustarse a la descripción que de la misma se hace en dicho manual y que a continuación se transcribe:

"Las células vegetativas son bacilos ligeramente afilados de 0.5-0.8 (0.6) por 4-8 (6) μm . Los cuerpos fructificantes son duros no delicuescentes muy variables en forma, tamaño y color, que van de simples papilas (< 25 μm) escasamente visibles o túbulos erectos o ramificados reclinados sobre el sustrato a estructuras columnares erectas simples o ramificadas (20-30 por 50-20 μm), o bien pueden ser aplanados, ondulados y constreñidos por

debajo formando un tallo corto (25-40 μm); en otros casos es tan constituidos de masas irregulares coralinas de 300 μm de tamaño con lóbulos constreñidos y excrecencias parecidas a dedos. Pueden ser de color carne, rosa, naranja, naranja-rojizo o rojo tostado, según la raza. Cuando forman los cuerpos fructificantes sobre medios de agar a menudo se extienden introduciéndose a modo de raíces en el agar. Los microquistes son esféricos ópticamente densos o refráctiles, - 1.0 - 1.5 μm de diámetro".

"Las colonias sobre agar casitone-Mg⁺⁺ son planas, delgadas con líneas profundamente densas. El color coresponde al de los cuerpos fructificantes, los cuales están agrupados densamente en anillos concéntricos alrededor de una porción central. El crecimiento sobre un medio con E. coli es similar, pero menos pigmentado; la lisis que produce no es muy pronunciada, y la capa de agar puede ser alterada. - En cultivos viejos, algunas cepas producen un pigmento difusible de color marrón. El pH óptimo oscila de 7 a 7.5. Los límites de temperatura van de 18 a 37°, oscilando el óptimo entre 25 y 30°. Es sensible al cloranfenicol (10 μg), kanamici-na (10 μg) y estreptomycin (5 μg). "

En adición a lo expuesto, el M. coralloides se caracteriza también por hidrolizar el almidón pero no la esculina y ser oxidasa negativo.



2. PRODUCCION DE ANTIBIOTICO POR M. CORALLOIDES

2.1. Estudios preliminares

Antes de proceder a un estudio más a fondo del antibiótico producido por Myxococcus coralloides, se efectuaron una serie de experiencias previas, de tipo cualitativo o semicuantitativo encaminadas a la detección del antibiótico en medios de cultivo sólidos, por inhibición del crecimiento de bacterias de prueba una vez que el antibiótico ha difundido al medio de cultivo

Así mismo, la producción de antibiótico se confirmó posteriormente en sobrenadantes exentos de células obtenidos a partir de cultivos de M. coralloides en medios-líquidos.

A continuación se exponen los resultados obtenidos en las experiencias preliminares indicadas.

2.1.1. Producción de antibiótico en medio sólido

En todos los casos se ha usado CGA como medio

Tabla 12. - Inhibición del crecimiento de diferentes bacterias por el antibiótico producido por M. coralloides en medios sólidos.*

Tiempo incubación <u>M. coralloides</u> (días)	Tiempo lectura (horas)	Temperatura Incubación	Bacterias ensayadas					
			<u>St. aureus</u>	<u>E. coli</u>	<u>B. subtilis</u>	<u>Pseudomonas sp.</u>	<u>M. phlei</u>	<u>Micrococcus sp.</u>
3	17	28°	2.5	0	2	0	0	4
		37°	3	0	2	0	0	4
	41	28°	6	0	3	0	0	4
		37°	5	0	3	0	0	4
4	17	28°	10	0	8	0	0	6
		37°	8	0	7	0	0	5
	41	28°	11	0	5	0	0	8
		37°	8	0	3	0	0	6
5	17	28°	13	0	11	0	0	10
		37°	10	0	7	0	0	7
	41	28°	13	0	8	0	0	9
		37°	9	0	7	0	0	7
6	17	28°	15	0	11	0	0	11
		37°	11	0	10	0	0	9
	41	28°	14	0	10	0	0	10
		37°	10	0	9	0	0	7

* Las cifras expuestas en la tabla corresponden a la distancia en mm entre el límite del crecimiento bacteriano y el límite de la colonia de M. coralloides.

de cultivo.

Los resultados obtenidos fueron siempre homogéneos en todas las repeticiones efectuadas.

En la tabla 1, se muestra el efecto antagónico del antibiótico producido por M. coralloides, efectuado tanto por el método de la estria lateral como por el de la inoculación central de la mixobacteria, en placas incubadas a 28° y 37°, durante 3-6 días, e inoculadas posteriormente con las bacterias de prueba, según se indicó en el apartado correspondiente del capítulo anterior.

Como se desprende de la observación de la tabla, solamente hay efecto antagónico sobre el crecimiento de las bacterias Gram positivas, a excepción de M. phlei. No se detectó ningún efecto sobre las bacterias Gram negativas ensayadas.

2.1.2. Actividad antibiótica en filtrados procedentes de cultivos en medios líquidos

Para la demostración de la actividad antibiótica en medios líquidos se usaron sobrenadantes de cultivo, de M. coralloides incubado durante 6 días, exentos de células por filtración por membranas de Millipore de 0.45 mi-

cras de diámetro de poro. La técnica usada fué la de los po
cillos.

Los resultados obtenidos en esta experiencia se
exponen en la tabla 2.

Tabla 2. - Actividad antibiótica de sobrenadantes de cultivo
de M. coralloides.

Bacterias ensayadas	Díametro del halo de inhibición (X)
<u>E. coli</u>	---
<u>St. aureus</u>	+++
<u>B. subtilis</u>	++
<u>Pseudomonas reptilivora</u>	---
<u>M. phlei</u>	---
<u>M. lysodeikticus</u>	++

(X) +++ halos de inhibición de 15-25 mm de diámetro

++ " " " " 9-14 mm " "

--- ausencia de actividad

Los resultados corresponden a la media de varias experiencias. Como se observa, M. coralloides libera al medio de cultivo un antibiótico, que exhibe un espectro antibacteriano selectivo, actuando únicamente sobre bacterias Gram positivas, con excepción de M. phlei.

Estos resultados confirman las experiencias anteriores en medios sólidos.

El St. aureus es el microorganismo más sensible, por cuya razón fué seleccionado como organismo de prueba para todos los ensayos de actividad realizados en lo sucesivo.

2. 1. 3. - Sensibilidad de St. aureus frente al antibiótico

Una vez elegido el "St. aureus" como organismo prueba, se realizaron unas experiencias para determinar el grado de sensibilidad de dicha bacteria frente al antibiótico producido por M. coralloides.

Se llevó a cabo por la técnica descrita en el apartado correspondiente del capítulo de Métodos. Los sobrenadantes, de mixobacteria, exentos de células utilizados fueron esterilizados por filtración por membranas de Millipore de 0.45 micras de ϕ de poro.

Para facilitar la determinación del punto lími

te, se añadió a los tubos de ensayo, una vez hechas las diluciones y antes de añadir el St. aureus, una gota por tubo de púrpura de bromocresol, que serviría como indicador; el color violeta no indica crecimiento; el color amarillo, debido a la producción de ácidos, indica crecimiento.

Los resultados obtenidos de estas experiencias se exponen en la tabla 3.

Tabla 3. - Sensibilidad de St. aureus al antibiótico producido por M. coralloides, determinada por el método de la dilución seriada

Diluciones	COLOR	
	24 horas	48 horas
1/2	Violeta	Violeta
1/4	Violeta	Violeta
1/8	Violeta	Violeta
1/16	Violeta	Marrón
1/32	Marrón	Amarillo
1/64	Amarillo	Amarillo
1/128	Amarillo	Amarillo

Como testigo se inoculó un tubo con St. aureus que contenía indicador pero no caldo activo. A las doce horas el tubo-testigo estaba amarillo.

2. 2. Factores culturales que afectan su producción

Las experiencias preliminares descritas en el apartado anterior, demostraron que la raza de M. coralloides encontrada posee una fuerte capacidad de producción de antibiótico, especialmente activo frente a bacterias Gram positivas.

Desde el punto de vista cuantitativo era interesante estudiar si la composición del medio de cultivo influía sobre la producción de antibiótico. Esto nos llevó a polarizar la primera parte del presente trabajo al estudio de los factores culturales que influyen en su producción.

Para ello, se realizaron una serie de experiencias, que se describen a continuación, en las que se estudió el efecto ejercido, sobre la cantidad de antibiótico producido por M. coralloides, por los siguientes factores: composición del medio; modalidad de cultivo ; tiempo y temperatura de incubación y pH inicial del mismo.

2.2.1. Influencia de la composición del medio de cultivo sobre la producción de antibiótico

Los primeros trabajos sobre el estudio de los factores culturales que intervienen en la producción de antibiótico por M. coralloides iban encaminados a la búsqueda de un medio de cultivo apropiado para la producción del antibiótico y su posterior aislamiento y purificación. Además mediante la privación de ciertos sustratos se intentó determinar si la producción de antibiótico era afectada de algún modo por los mismos.

2.2.1.1. Composición del medio de cultivo

Las experiencias preliminares de producción de antibiótico por M. coralloides, se llevaron a cabo utilizando el medio N III B de Norén (1953 a), con hidrolizado ácido de la caseína (casaminoácidos) y asparagina como sustratos orgánicos. La experiencia demostró, sin embargo, que el M. coralloides crece pobremente en este medio y que la producción de antibiótico es escasa y tardía, obteniéndose actividades de 0.25 - 0.50 U / ml a los 8 días de cultivo. La sustitución de los casaminoácidos por caseína o casitone (hidrolizado enzimático -

co de la caseína) tuvo un efecto favorable sobre el crecimiento de M. coralloides, pero apenas si afectó la producción de antibiótico, ya que siguieron obteniéndose actividades similares a las citadas anteriormente, después de iguales períodos de incubación.

Los resultados de tales experiencias se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. - Efecto de caseína y de sus hidrolizados ácido (casaminoácidos) y enzimático (casitone) sobre la producción de antibióticos por M. coralloides, cultivado a 28° en agitación durante tiempos diferentes.

Tiempo de cultivo (días)	Actividad (unidades / ml)		
	Medio M-A (casaminoácidos)	Medio M-B (casitone)	Medio M-C (caseína)
4º	0	0	0
5º	0.1	0.1	0.1
6º	0.18	0.18	0.12
7º	0.25	0.25	0.25
8º	0.30	0.40	0.30
9º	0.50	0.50	0.40
10º	0.25	0.30	0.25

2. 2. 1. 2. Efecto de la adición de glucosa

Los datos existentes sobre el efecto de la adición de glucosa a los medios de cultivo de mixobacterias son contradictorios (Dworkin, 1966), algunos autores defienden que tiene un efecto favorable sobre el crecimiento de M. xanthus -- (Dworkin, 1962), negándolo más tarde (Watson y Dworkin, 1968) y aún sobre la producción de enzimas como han proclamado Hü ttermann y Kühlwein (1969) en el caso de Archangium violaceum. En relación con esto, Rodríguez Franco (1973) demostró que si bien los niveles de enzimas extracelulares de M. xanthus en ausencia o presencia de glucosa son similares, dichos niveles enzimáticos se mantienen altos durante más tiempo en presencia de glucosa.

No obstante, lo expuesto, se consideró conveniente comprobar la influencia de la adición de glucosa a los medios de cultivo sobre la producción de antibiótico, por lo que se realizó una serie de experiencias en las que se determinó la actividad antibiótica de los sobrenadantes de cultivo de M. coralloides en los medios M-A, M-B y M-C adicionados de glucosa al 1%. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 5.

Como puede observarse la adición de glucosa a los medios de cultivo afecta drásticamente la producción de antibiótico ya que se obtuvieron actividades hasta de un orden diez

Tabla 5. - Efecto de la adición de glucosa (1%) sobre la producción de antibiótico por M. coralloides en medios M-A, M-B y M-C.

Tiempo de cultivo	Actividad (U/ml)		
	Medio M-A	Medio M-B	Medio M-C
2º	0	1	2
3º	0.5	2	4
4º	1	3	5
5º	1	4	5.5
6º	0.5	4	5
7º	0	4	5.5

veces mayor, que las citadas anteriormente, a los 5-6 días de incubación, aún cuando no se observó diferencias apreciables en el crecimiento del M. coralloides.

Para comprobar qué concentración de glucosa es la óptima para la producción de antibiótico se realizaron unas experiencias en las que M. coralloides fué cultivado a 28º en agitación en matraces erlenmeyer de 250 ml con 40 ml de medio CG, con concentraciones de glucosa comprendidas entre 2.5 y 25 g/l.

Los resultados obtenidos se expresan en la ta-

bla 6 e indican que si bien dentro de los límites ensayados, la cantidad de glucosa que se adiciona al medio de cultivo no afecta sensiblemente la producción de antibiótico entre el 5º y 6º día de incubación, los mejores resultados se obtienen en conjunto con concentraciones de 10 g/l, por lo que esta fue la empleada en experiencias sucesivas.

Tabla 6. - Actividad antibiótica (U/ml) de los sobrenadantes de cultivo de M. coralloides en medio CG en función de la concentración de glucosa y tiempo de incubación.

Concentración de glucosa (g/l)	Tiempo de cultivo (días)					
	2º	3º	4º	5º	6º	7º
0 (Medio M-C)	0	0	0	0,1	0,12	0,25
2,5	0	0,5	2	3	4	3
5	0	1	3	4	5	5
7,5	1	2	4	5	5,5	5
10	2	4	5	5	5,5	5
15	1	3	5	5	5	5
20	2	3	5	5	5	5
25	2	4	4	5	5	5

2. 2. 1. 3. Efecto de otros hidratos de carbono

Demostrado el efecto estimulador de la glucosa sobre la producción de antibiótico por M. coralloides, se creyó conveniente comprobar el efecto de otros azúcares y polialcoholes. Para ello se realizaron unas experiencias similares a las anteriores, en las que la glucosa fué sustituida por igual concentración (10 g/l) de fructosa, lactosa, sorbitol o sacarosa.

Los resultados se exponen en la tabla 7 e indican que la sustitución de la glucosa por los hidratos de carbono ensayados no representan ninguna ventaja en relación con la producción de antibiótico.

Tabla 7. - Actividad antibiótica (U/ml) de sobrenadantes de cultivos de M. coralloides, en medio M-C añadido de diversos hidratos de carbono (10 g/l)

Tiempo de cultivo	Azucar				
	Glucosa	Fructosa	Lactosa	Sorbitol	Sacarosa
2º	2	-	-	-	-
3º	4	3	2	3	3
4º	5	4	4	4	4
5º	5	5	5	5	5
6º	5,5	5	5	4	5
7º	5	5	5	5	4

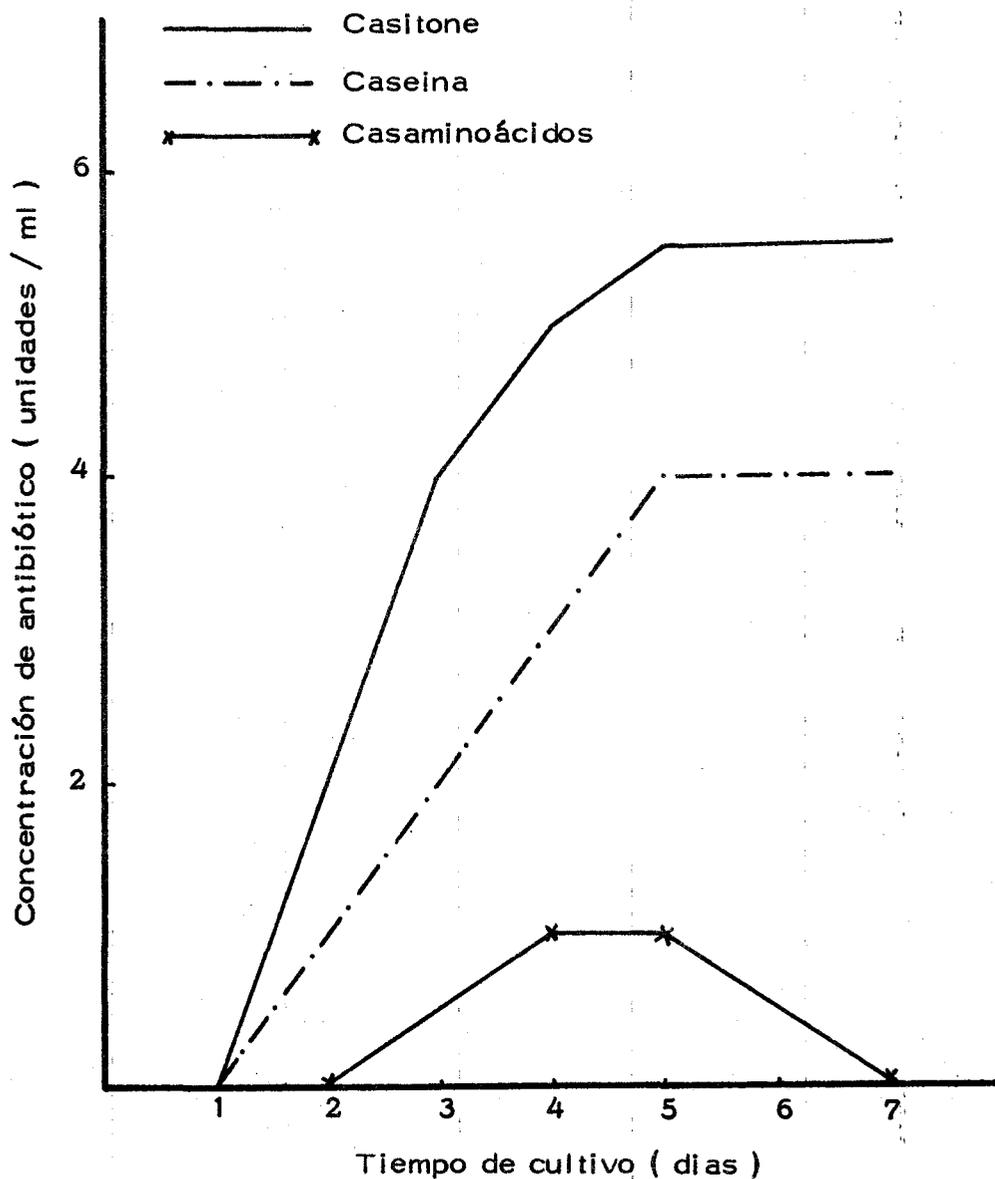
Admitido el efecto favorable de la glucosa, se consideró conveniente volver a ensayar en su presencia, la influencia de los distintos sustratos nitrogenados empleados sobre la producción de antibiótico.

2.2.1.4. Efecto de los sustratos nitrogenados

Se ensayaron los medios M-AG, M-BG y CG, que llevan respectivamente como sustratos capaces de afectar la producción de antibiótico, hidrolizado sólido de caseína (casaminoácidos), caseína (casitona) y caseína enzimática (casitone).

Las experiencias se llevaron a cabo cultivando el M. coralloides en agitación a 28°. La concentración a la que se usaron los sustratos nitrogenados fue de 5 g/l.

Los resultados se exponen en la gráfica 1. Como en las experiencias preliminares el empleo de casaminoácido, aún en presencia de glucosa, da lugar a un crecimiento muy pobre y la actividad antibiótica, a más de escasa, desaparece rápidamente de los caldos de cultivo. El empleo del casitone y caseína da lugar a un crecimiento similar, pero la actividad antibiótica alcanza valores bastante superiores en el primer caso, por lo que en todas las experiencias sucesivas se empleó dicho producto.



Gráfica 1. - Efecto de la caseína y de sus hidrolizados - ácido (casaminoácidos) y enzimático (casitone) sobre la producción de antibiótico por M. coralloides, cultivado a 28° en agitación y en función del tiempo.



2. 2. 1. 5. Efecto de la concentración de casitone

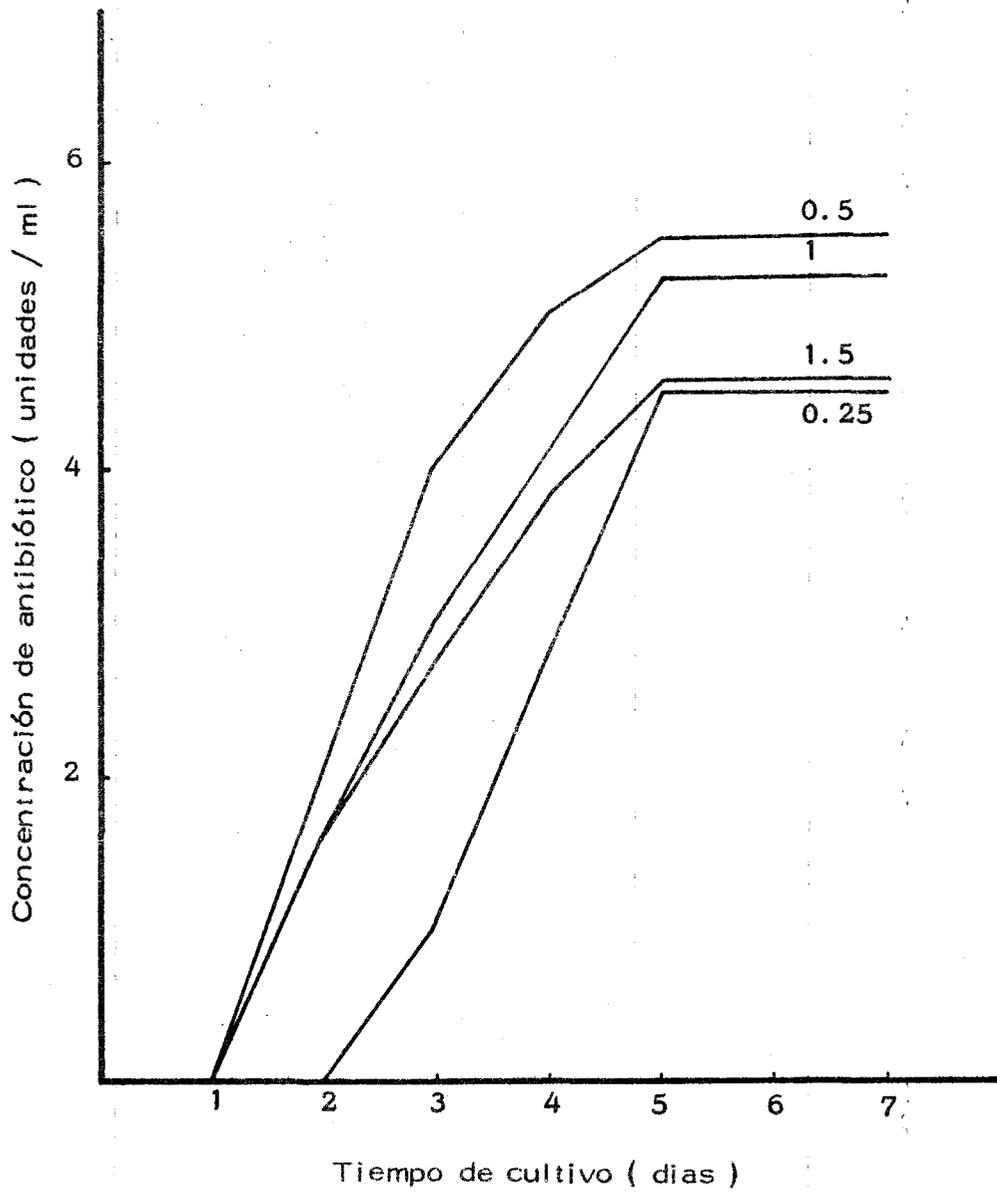
Para determinar la concentración de casitone óptima para la producción de antibiótico, el M. coralloi-
des fue cultivado, a 28° y en agitación, en medio CG con
concentraciones de casitone comprendidas entre 2.5 y 15
g / l. Los resultados de tales experiencias se expresan en
la gráfica 2 y muestran que, entre las ensayadas, la con-
centración óptima de casitone es la de 5 g/l.

Como complemento de la experiencia anterior
se comprobó la influencia de la otra fuente de nitrógeno,
asparagina, que de forma rutinaria se venía añadiendo al
medio CG.

2. 2. 1. 6. Efecto de la asparagina

Para ello se comparó la actividad antibiótica
de los sobrenadantes de cultivos de M. coralloides en me-
dio CG y en medio M-CG/7, carente de asparagina. Los re-
sultados se exponen en la tabla 8 e indican que la presen-
cia de asparagina no influye, prácticamente, sobre la acti-
vidad de los citados sobrenadantes.

No obstante, lo expuesto, se comprobó la in-
fluencia de concentraciones de asparagina superiores a las



Gráfica 2. - Actividad antibiótica de sobrenadantes de cultivos de M. coralloides, incubados a 28° con agitación, en función de la concentración de Casitone (%).

Tabla 8. -Efecto de la asparagina sobre la producción de an
tibiótico por M. coralloides

Tiempo de cultivo (días)	Actividad antibiótica (unidades / ml)	
	Medio CG	Medio M-CG/7
2º	1	1
3º	2	3
4º	4	3
5º	5	4
6º	5	5
7º	4	5

utilizadas normalmente (2.5 g/l) sobre la producción de an
tibiótico, para lo cual el M. coralloides fué cultivado a 28º
en medio CG con concentraciones de asparagina compren-
didas entre 2, 5 y 10 g/l.

Los resultados se expresan en la tabla 9 y -
confirman que la asparagina no influye en la producción ni
siquiera a concentraciones elevadas.

Tabla 9. - Actividad antibiótica (U/ml) de los sobrenadantes de cultivos de M. coralloides en función de la concentración de asparagina presente en el medio.

Tiempo de cultivo - (días)	Concentración de asparagina (g/l)						
	0	2.5	3	4	5	7	10
2º	1	0	0	0.5	0	0	0.5
3º	3	1	1	1	1	1	1
4º	3	3	2	3	3	2	1
5º	4	5	4	5	4	4	3
6º	5	4	5	5	5	5	5
7º	5	5	5	5	5	5	4

2.2.2. Modalidad de cultivo

En la Introducción se aludió a que la raza de M. coralloides empleada, como la generalidad de las mixobacterias, no crece de forma dispersa en medio líquido. En cultivos estáticos con gran relación superficie / volumen, crece en forma de velo continuo adherido al fondo del reci

piente, mientras que en agitación lo hace formando pequeñas bolitas que suelen aglomerarse en un anillo que queda pegado a las paredes.

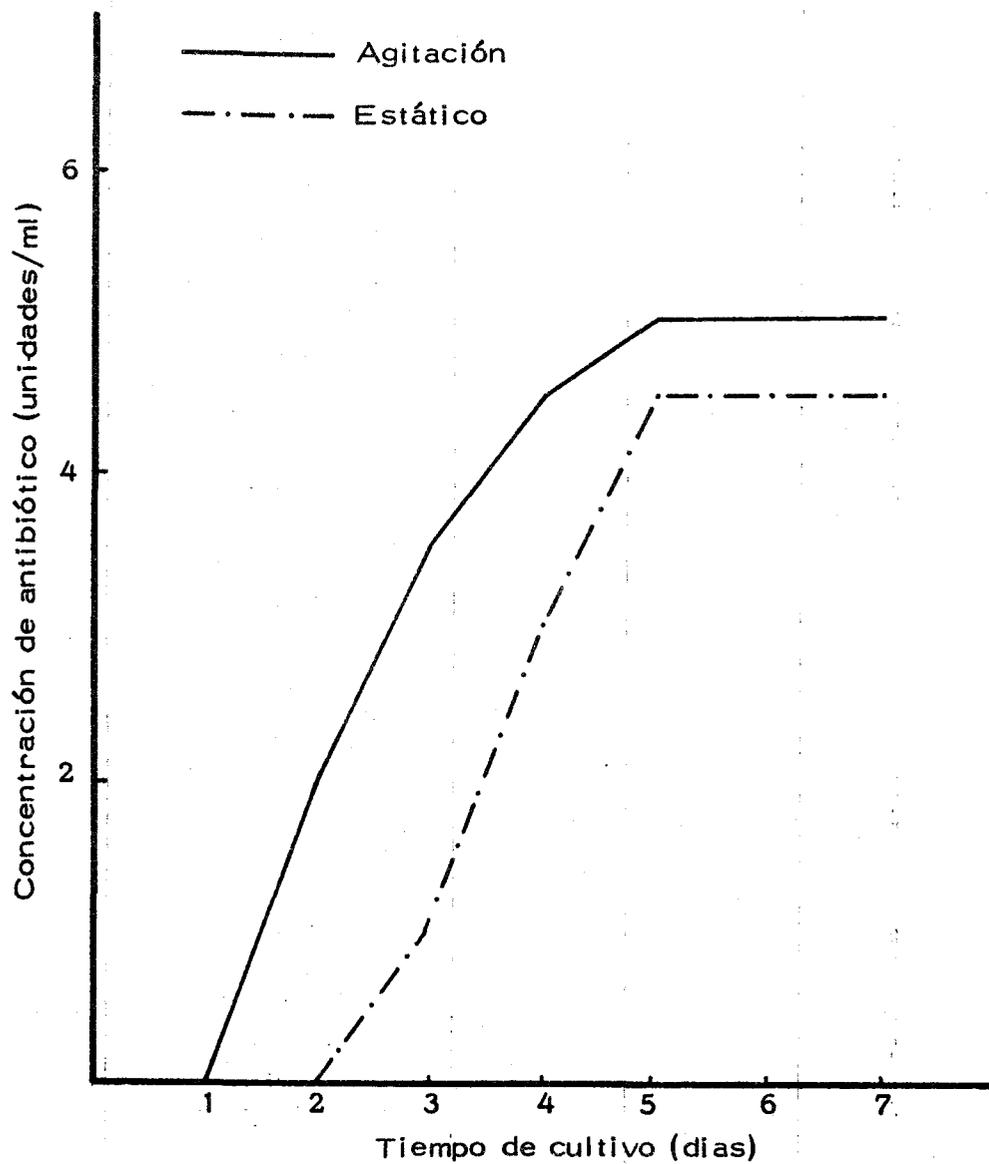
Aún cuando esta forma de crecimiento hace prácticamente imposible la determinación cuantitativa del mismo, pudo apreciarse que el crecimiento era ligeramente superior en cultivos estáticos, lo que hizo pensar que lógicamente la cantidad de antibiótico producido debería ser mayor cuando el M. coralloides se cultiva en dichas condiciones.

Con objeto de asegurar esta presunción y comprobar si la cantidad de antibiótico varía según sea una u otra modalidad de cultivo la empleada, se realizaron las experiencias oportunas encaminadas a la determinación cuantitativa de los niveles de actividad antibiótica de sobrenadantes de cultivos de M. coralloides en medios CG realizados por uno y otro procedimiento.

Los resultados se expresan en la gráfica 3 y muestran que en cultivos en agitación se inicia antes la producción de antibiótico y se alcanzan niveles ligeramente superiores, por lo que en experiencias sucesivas se empleó siempre esta modalidad.

2.2.3. Influencia del tiempo de incubación

A fin de determinar el tiempo de incubación en



Gráfica 3. - Actividad antibiótica de sobrenadantes de -- cultivos de M. coralloides, estáticos y con agitación, in cubados a 28°.

el que se alcanza un máximo de actividad, así como la evolución de la misma, se realizaron experiencias en las que el M. coralloides fue cultivado a lo largo de un período de tiempo de 20 días, determinándose a intervalos regulares de tiempo la actividad antibiótica.

En estas experiencias el M. coralloides fue cultivado simultáneamente de forma estática y en agitación, al objeto de comprobar definitivamente las diferencias ya observadas y fijar tiempos óptimos en cada caso.

En la tabla 10 se expresan los resultados de tales experiencias, pudiéndose observar que una vez producido el antibiótico, este se mantiene durante bastante tiempo en los caldos de cultivo, si bien los máximos de actividad se obtienen ya alrededor de los 6 días de incubación en las dos modalidades de cultivo.

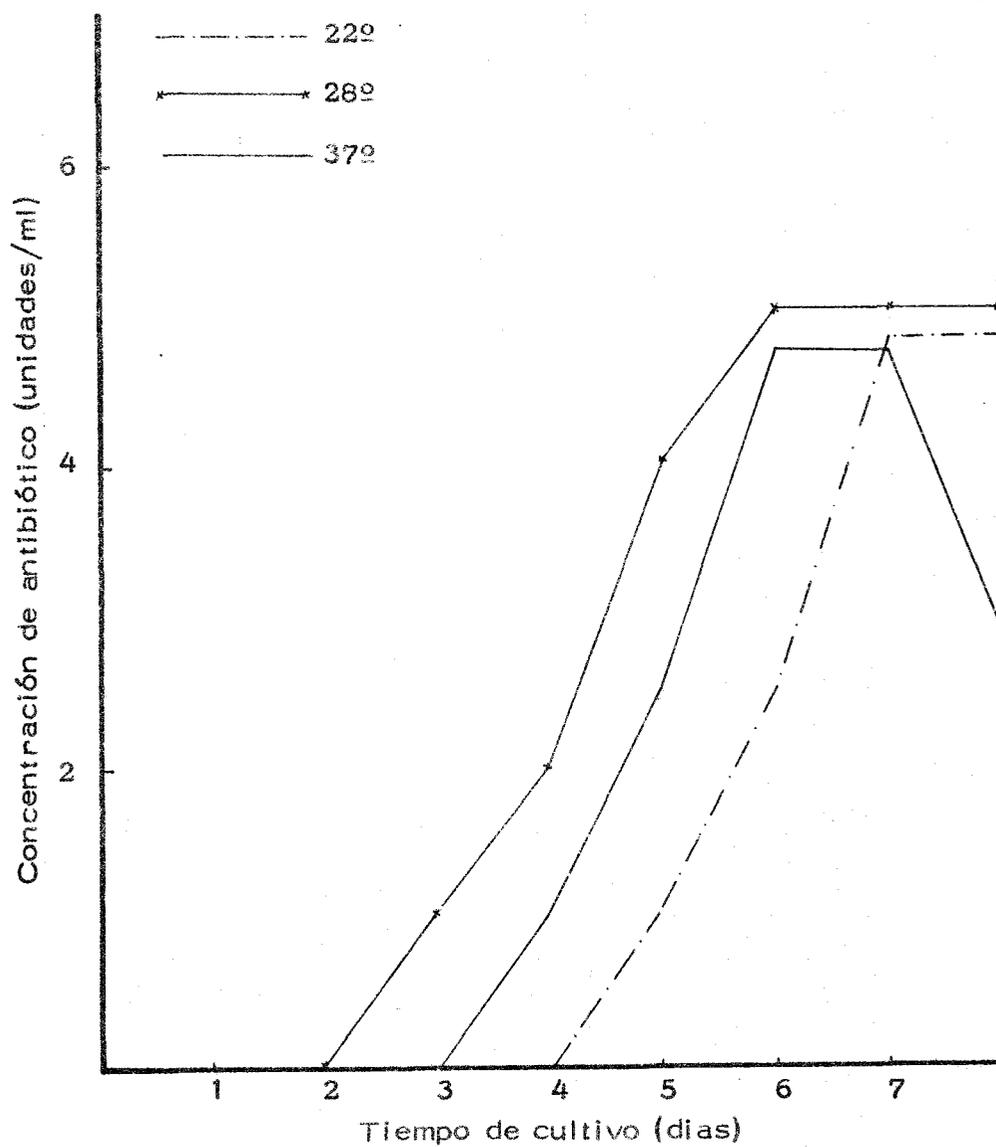
2.2.4. Influencia de la temperatura de incubación

En la gráfica 4 se muestran los resultados obtenidos en cultivos en agitación incubados a 22º, 28º y 37º. Como puede observarse los niveles máximos de actividad obtenidos son prácticamente los mismos, si bien el tiempo necesario para alcanzarlos es distinto y la estabilidad del an

Tabla 10. - Actividad antibiótica (U/ml) de sobrenadantes de cultivos estáticos y en agitación de M. coralloides, en función del tiempo de incubación.

Tiempo de incubación (días)	Actividad antibiótica	
	Agitación	Reposo
2	2	0
3	3	1
4	4	3
5	5	4
6	5,5	5
7	5,5	5
8	5	5
10	5,5	5
14	4	3
16	3	3
18	3	3
20	3	3

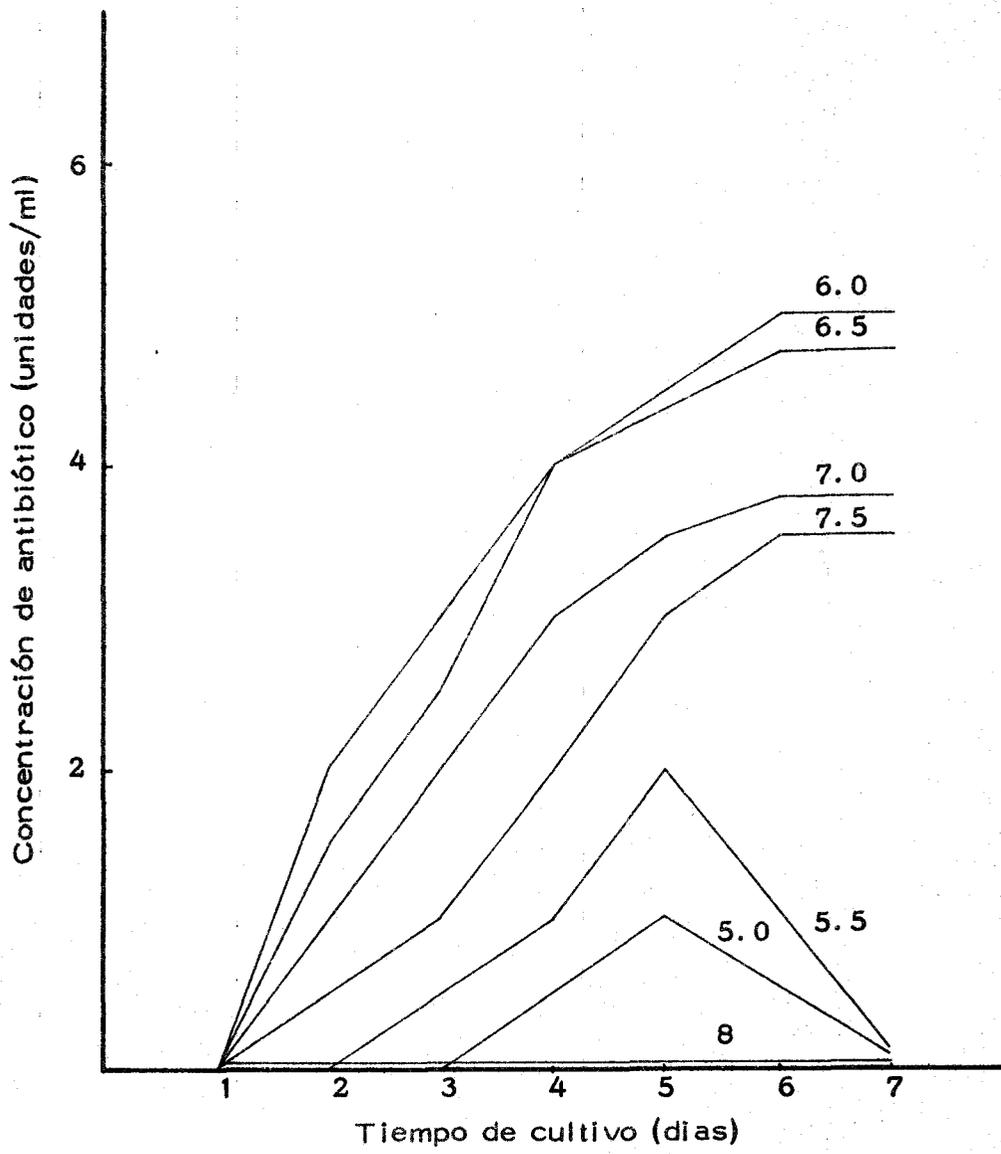
tibiótico producido se ve grandemente afectada cuando se cul-
tiva a 37°.



Gráfica 4. - Efecto de la temperatura sobre la producción de antibiótico por M. coralloides.

2.2.5. Influencia del pH inicial

En el caso que nos ocupa se determinó cultivando el Myxococcus coralloides en medio CG tamponado con $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H-PO}_4\text{HK}_2$, 0.01M a pH comprendidos entre 5 y 8. Los resultados obtenidos, que se expresan en la gráfica 5, muestran que el pH inicial óptimo para la producción de antibiótico es el de 6. A pH de 5 y a pH 8, no se detectó actividad ni tampoco crecimiento. Hay que hacer notar que cualquiera que sea el pH inicial, siempre que permita el crecimiento, sus valores aumentan progresivamente en el transcurso de la incubación, hasta alcanzar valores próximos a pH 8. Este aumento en el pH, no obstante, no guarda relación con la producción de antibiótico, sino que probablemente se debe a la acumulación de NH_4^+ en el medio debida a la desaminación de aminoácidos, como lo demuestra el hecho descrito más adelante, de que cuando se concentran los mostos por evaporación al vacío el pH desciende hasta cifras próximas a la neutralidad, sin que ello afecte a la actividad antibiótica de los medios concentrados.



Gráfica 5.- Efecto del pH sobre la producción de antibiótico por M. coralloides en función del tiempo de cultivo.

3. CRECIMIENTO DISPERSO

3. 1. Obtención de una raza de "M. coralloides" con crecimiento disperso

Como ya se aludió anteriormente M. coralloides, debido a su especial forma de crecimiento, cuando se cultiva en agitación en medio líquido crece formando pequeños grumos o bolitas, lo que impide relacionar la producción del antibiótico con las distintas etapas de su ciclo de vida. Es por ello por lo que se intentó obtener una raza de M. coralloides capaz de crecer de forma dispersa en medio líquido.

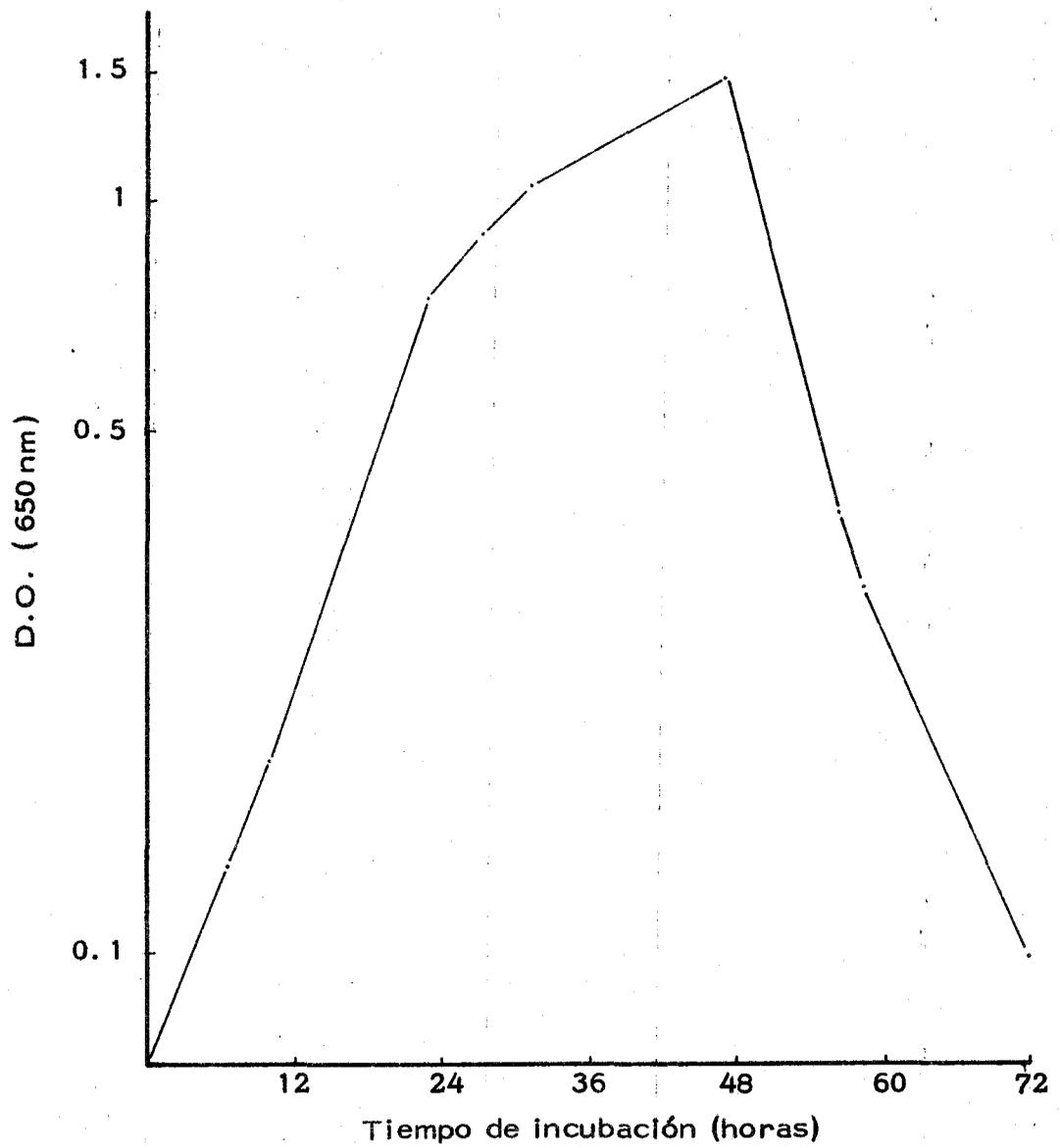
Para la obtención del crecimiento disperso de M. coralloides se ha seguido la técnica de Dworkin (1962), con ligeras modificaciones, y que a continuación se describe.

A partir de un cultivo en agitación a 28° de 24 horas en matraces erlenmeyer de 250 ml conteniendo 20 ml de medio CT, se efectuó una transferencia de 1 ml a medio nuevo, que se incubó el mismo tiempo y en idénticas condiciones. Esta operación se realizó diariamente durante apro

ximadamente 2 meses; a pesar de las numerosas transferencias realizadas, no se observó cambio apreciable en el cultivo, sin embargo la observación microscópica de los caldos de cultivo reveló la presencia de formas bacilares típicas aisladas de esta mixobacteria, por lo que se tomaron muestras de los mismos que se sembraron en placas de medio CTA a fin de seleccionar estas formas. Las placas de CTA se incubaron a 28° durante 4 ó 5 días; a partir de las zonas de crecimiento se efectuó una suspensión en solución salina esteril con la que se inoculó un matraz con medio CT, que se incubó en idénticas condiciones a las reseñadas más arriba. Se siguieron efectuando las transferencias diarias, a medio de cultivo nuevo, observándose una disminución progresiva en la formación de grumos o bolitas acompañado de un aumento de la turbidez del cultivo, hasta que finalmente, después de treinta transferencias, dejaron de aparecer los grumos.

Con la raza así obtenida, M. coralloides D, se realizaron las medidas turbidométricas oportunas a fin de establecer la curva de crecimiento correspondiente. Para las determinaciones turbidométricas de crecimiento microbiano se usó una longitud de onda de 650 nm en un Spectronic- 20, tomándose lecturas en absorbancia.

En la tabla 11 y gráfica 6 se muestra la evolución de la D.O. y curva de crecimiento del M. coralloides D en medio CT.



Gráfica 6. - Curva de crecimiento de M. coralloides D, en medio CT, a 28° y en agitación.

Tabla 11. - Evolución de la D.O. en cultivos de M. coralloi-
des en medio CT, incubados a 28° y en agitación.

Tiempo (horas)	Densidad óptica
0	0.07
7	0.13
10	0.18
23	0.75
27	0.9
31	1.05
47	1.5
56	0.39
58	0.31
72	0.1

3.2. Relación entre la producción de antibiótico y el estado fisiológico de "Myxococcus coralloides"

3.2.1. Crecimiento vegetativo

Se conocía que la actividad antibiótica era detec

tada a los dos días en cultivos en agitación y a los tres días en cultivos estáticos, sin embargo era imposible establecer una relación cuantitativa entre crecimiento y producción de antibiótico.

Con la obtención de una raza de M. coralloides capaz de crecer de forma dispersa en medio líquido, se podía establecer relación entre producción de antibiótico y estado fisiológico del M. coralloides. A tal fin se determinó la producción de antibiótico, a lo largo de la evolución del crecimiento vegetativo del M. coralloides D, mediante discos de papel impregnados de sobrenadantes de cultivo.

Como se observa en la tabla 12 y gráfica 7, el antibiótico fue producido durante la fase de crecimiento exponencial pero de manera principal al final de la misma, alcanzando un máximo 5 horas después de que se inicie la lisis bacteriana y manteniéndose un nivel constante a partir de ese momento.

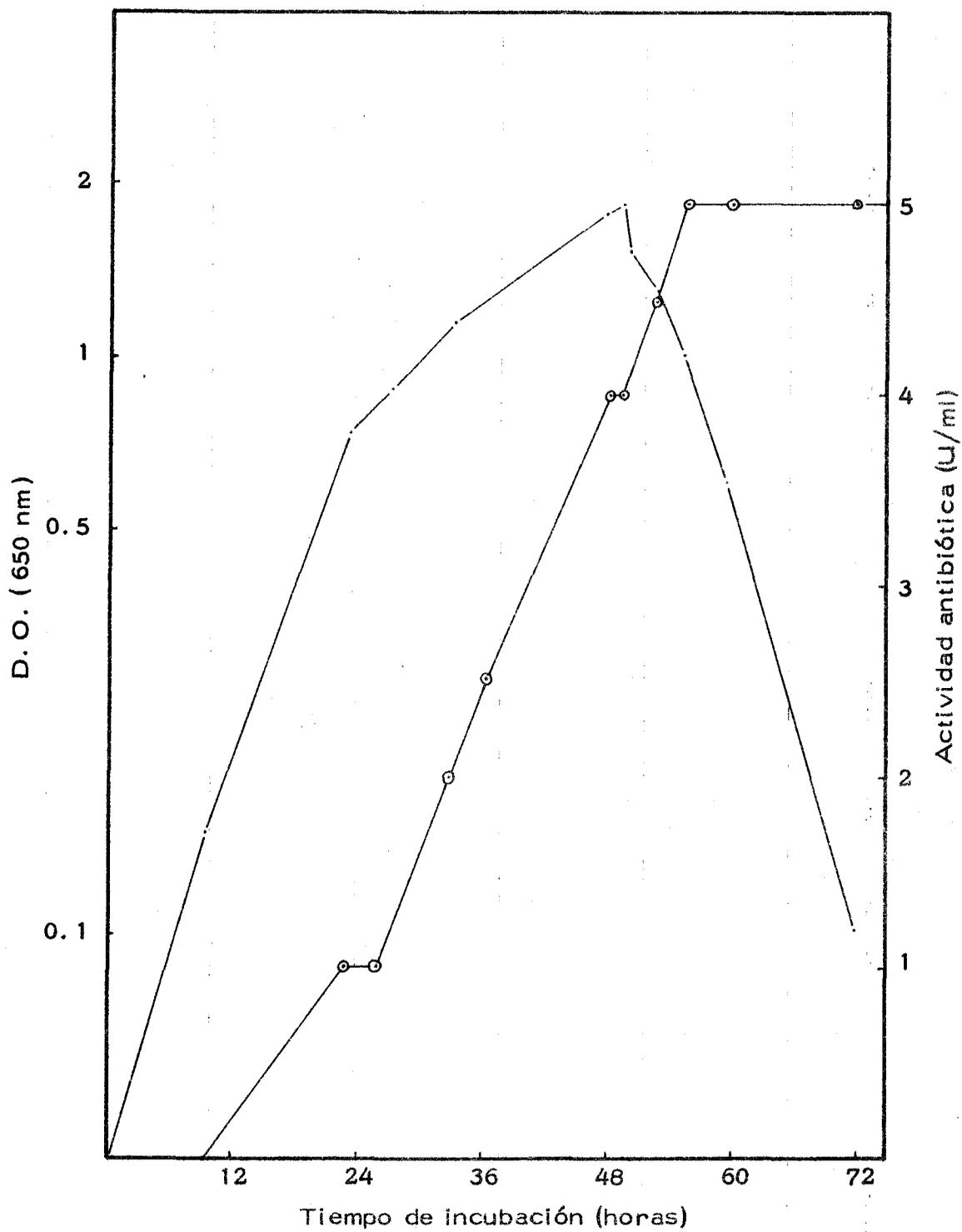
3.2.2. Estado de mixósporas

Como se ha visto anteriormente, el antibiótico se produce durante el crecimiento vegetativo del M. coralloides. Pero dado que el M. coralloides, como la generalidad de las mixobacterias posee un ciclo de vida, una de cuyas etapas

Tabla 12. - Producción de antibiótico por M. coralloides D en medio CG a 28° y en agitación

Tiempo (horas)	D. O.	Actividad antibiótico (U/ml)
0	0.04	0
9	0.15	0
23	0.75	1
27	0.88	1
33	1.15	2
36	1.22	2.5
48	1.8	4
49	1.82	4
50	1.5	4.5
53	1.3	5
55	1	5
59	0.6	5
71	0.2	5

comprende el paso de células vegetativas a formas de reposo o mixósporas que se disponen en los cuerpos fructificantes , se consideró interesante comprobar si en este proceso de di



Gráfica 7. - Producción de antibiótico por M. coralloides D en medio CG, a 28° y en agitación.

ferenciación, de forma similar a lo que ocurre en la esporulación de especies del género Bacillus, se continua o refuerza la producción de antibiótico.

Dado que, como ha sido expuesto, las células vegetativas en cultivos dispersos no llevan a cabo el proceso normal de diferenciación, fué necesario inducir la formación de mixósporas artificialmente mediante la adición de glicerina (Dworkin y Gibson, 1964).

Para ello las células procedentes de un cultivo en fase exponencial, se recogieron por centrifugación (15.000 xg durante 15 minutos a 4º), se lavaron por el mismo procedimiento con casitone 1% y SO_4Mg 0,1%, pH 6.5, y el sedimento obtenido se resuspendió en un volumen igual al del cultivo primitivo en la disolución antes indicada. La suspensión así obtenida se adicionó de glicerina 10M hasta conseguir una concentración final 0.5M, y se incubó a 28º en agitación continua, determinándose la evolución de la D.O. a lo largo de 48 horas.

En la tabla 13 se muestran los cambios de D.O. observándose como tras un descenso en la D.O. que alcanza hasta 5h. y que se interpreta corrientemente como debido a la disminución del tamaño celular, dicha D.O. experimenta un aumento acusado hasta estabilizarse a las 36h. Este aumento se corresponde con la etapa de diferenciación final en microquistes que lleva consigo un gran incremento en el índice de re-

fracción de las células. La observación microscópica confirmó que al final del proceso no se encuentran más que formas redondeadas típicas correspondientes a las mixósporas.

A lo largo de las 48 horas que duró el experimento, no se pudo detectar actividad antibiótica alguna, durante el proceso de diferenciación de células vegetativas a mixósporas.

Tabla 13. - Evolución de la D.O. en la inducción a mixósporas

Tiempo (horas)	D. O. (a)
0	0.138
0.25	0.115
0.5	0.110
0.75	0.115
1	0.110
1.5	0.105
2	0.10
2.75	0.090
4	0.08
5	0.07
6	0.12
12	1.0
24	1.45
36	1.52
48	1.52

(a) Medida en absorbancia a 650 nm.

4. EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ANTIBIOTICO

4.1. Estudios previos de extracción del antibiótico de los caldos de cultivo

4.1.1. Extracción con disolventes orgánicos

Los resultados de los ensayos de extracción del antibiótico con diferentes disolventes orgánicos, se indican en la tabla 14. La actividad antibiótica, ensayada según el método de los discos de papel, se expresa en forma de cruces, según la mayor o menor actividad de las fases, acuosa u orgánica de la extracción, comparada con la del testigo (++).

Como se deduce de la observación de la tabla 14, el antibiótico puede extraerse cuantitativamente de los caldos de cultivo con diferentes disolventes a distinto pH.

4.1.2. Adsorción sobre carbón activado

La sustancia activa de los caldos brutos es

Tabla 14. - Extracción del antibiótico con distintos disolventes a diferentes pHs.

Disolvente	pH ^b	Testigo ^a	Actividad relativa	
			F. acuosa	F. orgánica
n-butanol	2-3	+++	---	++
n-butanol	7	+++	---	+++
n-butanol	9	+++	---	+++
Alcohol amílico	2-3	+++	---	---
Alcohol amílico	9-10	+++	---	+++
Acetato de etilo	2-3	+++	---	++
Acetato de etilo	9-10	+++	+	+++
Tetracloruro de C.	2-3	+++	---	---
Tetracloruro de C.	9-10	+++	---	+++
Cloroformo	2-3	+++	+	++
Cloroformo	9-10	+++	---	+++
Eter etílico	2-3	+++	---	+
Eter etílico	9-10	+++	++	+++
Eter de petróleo	3	+++	++	---
Eter de petróleo	7	+++	++	+++
Eter de petróleo	9	+++	+++	---

a. - Caldo bruto activo usado en las diversas extracciones

b. - pH ajustado con NaOH(1N) y ClH(1N)

adsorbida fuertemente por el carbón activado, con decoloración del caldo, no eluyéndose con distintos disolventes orgánicos, ni con mezclas hidro-alcohólicas ácidas y básicas.

4. 1. 3. Diálisis

Las experiencias de diálisis, realizadas a 40° y con agitación, de los caldos activos frente a tampón pH 7. 2, mostraron que la sustancia activa dializa cuantitativamente a las 24 horas, encontrándose toda la actividad en las aguas de diálisis, mientras que el contenido del tubo de diálisis era inactivo.

De acuerdo con las experiencias preliminares de extracción, el antibiótico puede ser extraído de los caldos de cultivo mediante diversos disolventes orgánicos a distinto pH. De la observación de la tabla 14 se desprende que pueden existir dos sustancias activas ya que usando un mismo disolvente a un determinado pH, aparece actividad tanto en la fase acuosa como en la orgánica. A tal efecto se realizaron las experiencias oportunas de extracción combinada con distintos disolventes orgánicos.

Como resultado de tales experiencias, y posteriores estudios de electroforesis y cromatografía en papel, se pudo comprobar la existencia de una única sustancia activa.

Los diversos métodos usados para la extracción y purificación del antibiótico han sido descritos en Material y Métodos. De acuerdo con ellos, pasamos a ver los resultados.

4. 2. Concentración de los sobrenadantes

Se llevaron a cabo por evaporación a vacío en un Rotavapor-R (Buchi) a temperaturas comprendidas entre los 50-60°. Los sobrenadantes exentos de células y procedentes de cultivos de 6 a 7 días, se concentraron hasta un décimo del volumen primitivo. Los resultados obtenidos fueron que los concentrados aumentaban su actividad más o menos proporcionalmente al grado de concentración de los sobrenadantes. En este proceso de concentración, el pH de los sobrenadantes que originalmente es alrededor de 8, desciende a valores próximos a la neutralidad.

4. 3. Aclareamiento de los caldos

Si bien al concentrar los sobrenadantes de cultivo, no se observó la aparición de precipitado alguno, era lógico



suponer que sustancias del tipo de proteínas u otros compuestos presentes en el medio o procedentes del metabolismo celular podrían dificultar los siguientes pasos de extracción y purificación, por lo que, como paso previo a la extracción y purificación del antibiótico, se procedió a eliminar parte de las impurezas mediante precipitación con sulfato amónico, perclorato sódico y mezclas hidroalcohólicas.

4.3.1. Tratamiento con sulfato amónico

Se realizó en la forma habitual, empleando sulfato amónico Merck y operando a temperaturas comprendidas entre 0° y 4°; entre la adición del sulfato amónico y la recuperación de los precipitados se dejaron transcurrir 12 horas. El tanto por ciento de saturación de sulfato amónico usado fue de 25%, 50% y 75%.

Los precipitados fueron separados por centrifugación y disueltos en aproximadamente 1/5 del volumen primitivo de tampón fosfatos pH 7, 2.

Tanto al precipitado disuelto como al caldo se les midió la actividad mediante el uso de la técnica de los discos de papel. Los resultados obtenidos fueron decepcionantes, ya que si bien las muestras correspondientes a los precipitados nunca dieron actividad, los sobrenadantes mostraron uniformemente una actividad muy inferior a la original -

que mostraban antes de tratar con sulfato amónico.

No se insistió en este sistema de aclaramiento de los caldos concentrados ya que, como se verá mas adelante, - con el tratamiento con etanol, a parte de ser una técnica más simple, se obtuvieron mejores resultados.

4.3.2. Tratamiento con perclorato sódico

Los sobrenadantes concentrados fueron tratados con perclorato sódico 1M; la mezcla se mantuvo en baño de hielo, durante 1 hora aproximadamente, transcurrida la cual el sobrenadante era separado del precipitado formado por centrifugación. Tanto al sobrenadante como al precipitado, resuspendido en tampón fosfato pH 7.2, se les media la actividad - mediante el uso de discos de papel.

Los resultados obtenidos de tales experiencias fueron buenos, ya que el sobrenadante conservaba toda su actividad, mientras que el precipitado no tenia. De este modo se consegua aclarar los caldos sin perdida de actividad de los mismos.

4.3.3. Tratamiento con etanol

La precipitación de los caldos concentrados con 2 volúmenes de

etanol del 99-100%, dió un resultado excelente, dado que los precipitados, separados por centrifugación, no dieron actividad alguna, mientras que los sobrenadantes conservaron íntegramente la actividad mostrada por los caldos de partida, después de separado el etanol por evaporación al vacío.

Independientemente de los buenos resultados obtenidos mediante la precipitación directa con etanol, este tratamiento resultaba ser muy simple, por lo que se empleó como paso previo o punto de partida para ulteriores purificaciones.

4.4. Extracción con cloroformo

De la extracción con disolventes orgánicos a diferentes pH se dedujo, como ya se indicó anteriormente, que el uso de algunos de ellos daba como resultado un reparto de una única sustancia activa en las fases orgánica y acuosa. De todos los disolventes usados se eligió el cloroformo, por ser este el disolvente que mejor extraía el antibiótico.

Los caldos de cultivo obtenidos en volúmenes variables dependiendo del tipo de experiencia, previamente concentrados y aclarados, eran alcalinizados hasta un pH de 9, con NaOH 1N. La extracción se realiza en embudos de decantación, mediante tres tratamientos con cloroformo en proporción 1/3 del volumen inicial de caldo, en cada tratamiento. Du

rante la separación de fases en los embudos, la fase orgánica arrastra impurezas de caldo, por lo que dicha fase se recoge directamente sobre tubos de centrifuga, siendo centrifugados a 4.500 rpm durante 15 minutos. El disolvente retenido en la interfase, siempre presente a pesar del tratamiento citado, se recuperó en un 70% por sucesivas centrifugaciones.

Los resultados obtenidos de esta experiencia fueron excelentes ya que tras el tercer tratamiento, toda la actividad es extraída de los caldos.

Las fracciones clorofórmicas, así obtenidas, se concentraban a 45° en el rotavaporizador hasta un décimo del volumen primitivo; el extracto así concentrado presenta un ligero color amarillo-rosado.

4.5. Tratamiento con sulfato sódico anhidro

Para eliminar posibles restos de agua o humedad en las fracciones clorofórmicas, obtenidas en la forma anteriormente indicada, dichas fracciones clorofórmicas se trataron con sulfato sódico anhidro; posteriormente se filtraron por un papel de filtro previamente empapado con cloroformo anhidro, y el extracto clorofórmico se conservó en recipientes herméticos.

4.6. Adsorción sobre ácido silícico

La fracción orgánica obtenida por extracción del antibiótico de los caldos concentrados a pH 9 con cloroformo fue usada como material de partida para la adsorción del antibiótico en columnas de ácido silícico.

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 15 y gráfica 8.

Para usos preparativos se siguió la técnica de Vaks (1974), con ligeras modificaciones, procediéndose como a continuación se indica: un 2% (p/v) de ácido silícico se mezcla con el extracto clorofórmico activo, obtenido como anteriormente se ha indicado, y se mantiene en agitación continua en un vaso de precipitados. A continuación se filtra a vacío en embudo de placa filtrante con papel de filtro Whatman nº 1, hasta un estado de sequedad del ácido silícico, recogándose un sobrenadante decolorado y sin actividad. Posteriormente, el ácido silícico se trata al 4% con la mezcla 5% (v/v) etanol en cloroformo, durante 40 minutos en agitación continua. Finalmente por filtración a vacío, al igual que antes, se consigue recoger el sobrenadante que contiene toda la actividad.

Tabla 15. - Adsorción del antibiótico sobre ácido silícico.

Material de partida: 7 ml de extracto clorofór
mico.

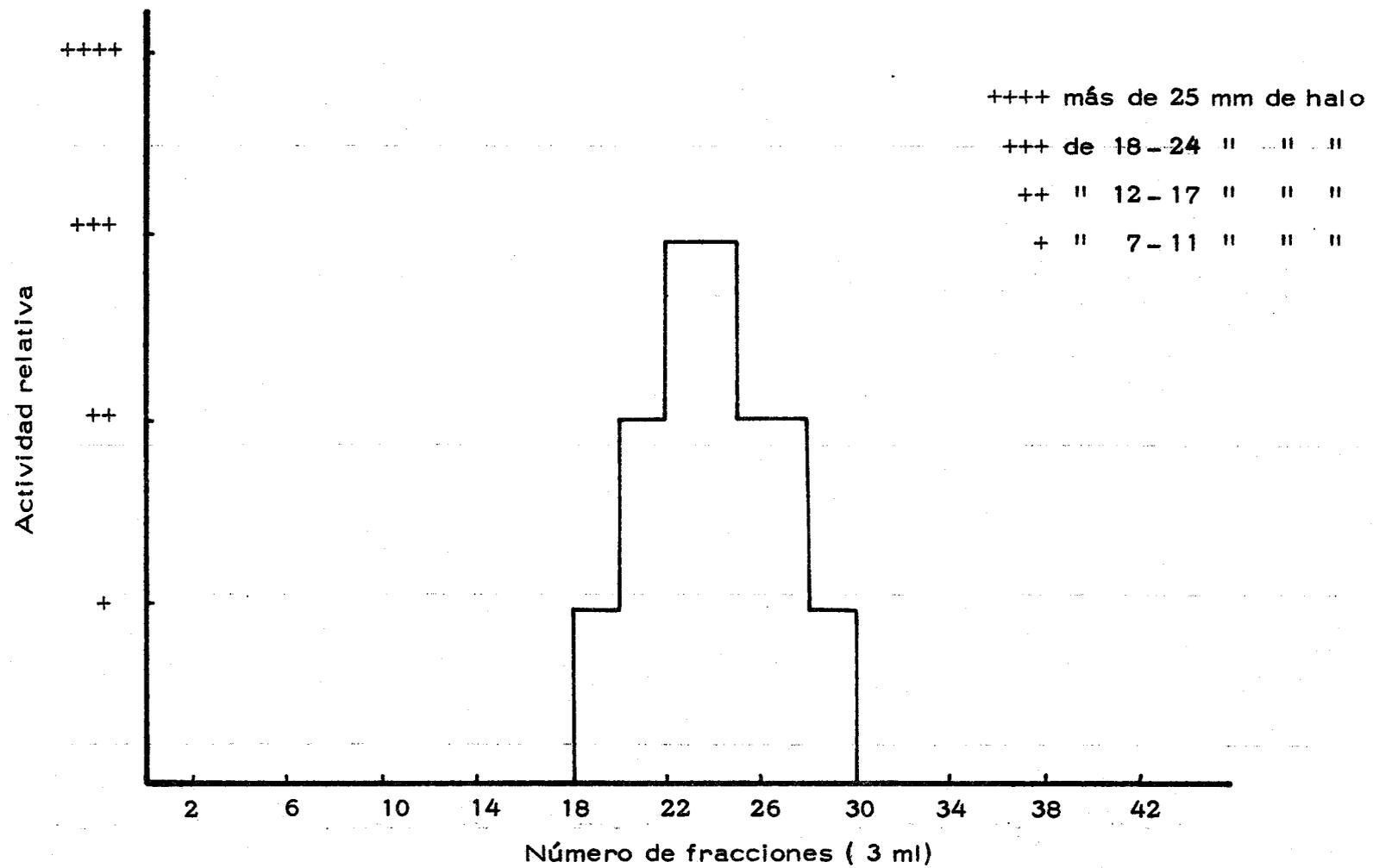
Columna de ácido silícico (1x40 cm)

Elución: 10% etanol en cloroformo

Volumen de las fracciones : 3 ml

Flujo : 1 ml/min.

Fracción	Actividad antibiótica relativa	Fracción	Actividad antibiótica relativa
1	-	25	+++
2	-	26	++
3	-	27	++
4	-	28	++
5	-	29	+
6	-	30	+
7	-	31	-
8	-	32	-
9	-	33	-
10	-	34	-
11	-	35	-
12	-	36	-
13	-	37	-
14	-	38	-
15	-	39	-
16	-	40	-
17	-	41-50	-
18	+	51-60	-
19	+	61-70	-
20	++	71-80	-
21	++	81-90	-
22	++	91-100	-
23	+++		
24	+++		



Gráfica 8. - Cromatografía en columna de ácido silícico del antibiótico

4.7. Otros métodos ensayados en la purificación del antibiótico

Se han empleado otros métodos de purificación mediante técnicas cromatográficas de intercambio iónico y filtración molecular por Sephadex.

4.7.1. Resinas

Los resultados obtenidos son contradictorios dado que la actividad era fijada tanto por resinas catiónicas como -- aniónicas, quedando los caldos de cultivo inactivados y decolorados. Esto unido a la falta de reproductibilidad de los resultados obtenidos, nos llevó a no insistir en la aplicación de esta técnica.

4.7.2. Filtración por Sephadex

Los resultados obtenidos en la filtración por Sephadex fueron poco alentadores, ya que la actividad siempre aparecía en el frente de la elución, independientemente del tipo de gel utilizado. A la vista de estos resultados, se desechó el uso de este método en la purificación del antibiótico

4.8. Extracción preparativa y esquema de purificación

Con todos los datos proporcionados por las extracciones indicadas en los apartados correspondientes, se elaboró un esquema de extracción preparativa.

Para estas experiencias eran usados cultivos de M. coralloides en matraces de seis litros conteniendo cinco litros de medio a 28° durante seis días con aireación y formación de espuma controladas. Como antiespumante se usó silicona. La oxigenación se mantuvo constante a lo largo del cultivo mediante una "bomba de pecera". Para asegurar la esterilidad, se usaron filtros de Millipore a la entrada y salida del aire. Además dicho matraz tenía salida directa y regulada del caldo, a fin de poder tomar muestras del caldo de cultivo y seguir su evolución.

Los caldos de cultivo obtenidos de varios matraces, en idénticas condiciones a las anteriores, se centrifugaron a flujo continuo a 14.000 rpm en centrifuga MSE, para separar las bacterias.

Los sobrenadantes exentos de células se concentraron a vacío en un Rotavapor-R (Buchi) hasta un volumen aproximadamente un décimo del volumen primitivo.

Este volumen previamente enfriado a 4° se aclara con dos volúmenes de etanol en la forma que ya se indicó. El precipitado es separado por filtración con papel de filtro.

El sobrenadante, filtrado, se alcaliniza con - NaOH 1N hasta pH 9 y se extrae 3 veces con cloroformo en la proporción de 1/3 de volumen por volumen de caldo. Desechada la fase acuosa, la fase orgánica y la interfase (aprovechable en un 70%) se reúnen.

La fase clorofórmica previamente tratada con sulfato sódico anhidro, para eliminar posibles restos de agua, se mezcla con ácido silícico en proporción 2% (p/v) y la mezcla se mantiene durante 30 minutos en agitación - continua. Por filtración a vacío se separa el sobrenadante sin actividad del ácido silícico, el cual se eluye con 5% de etanol en cloroformo en la proporción ya indicada en el apartado correspondiente. Tras la elución y posterior filtración, el antibiótico se obtenía en la fase clorofórmica.

En la figura 1 se esquematiza dicho proceso.

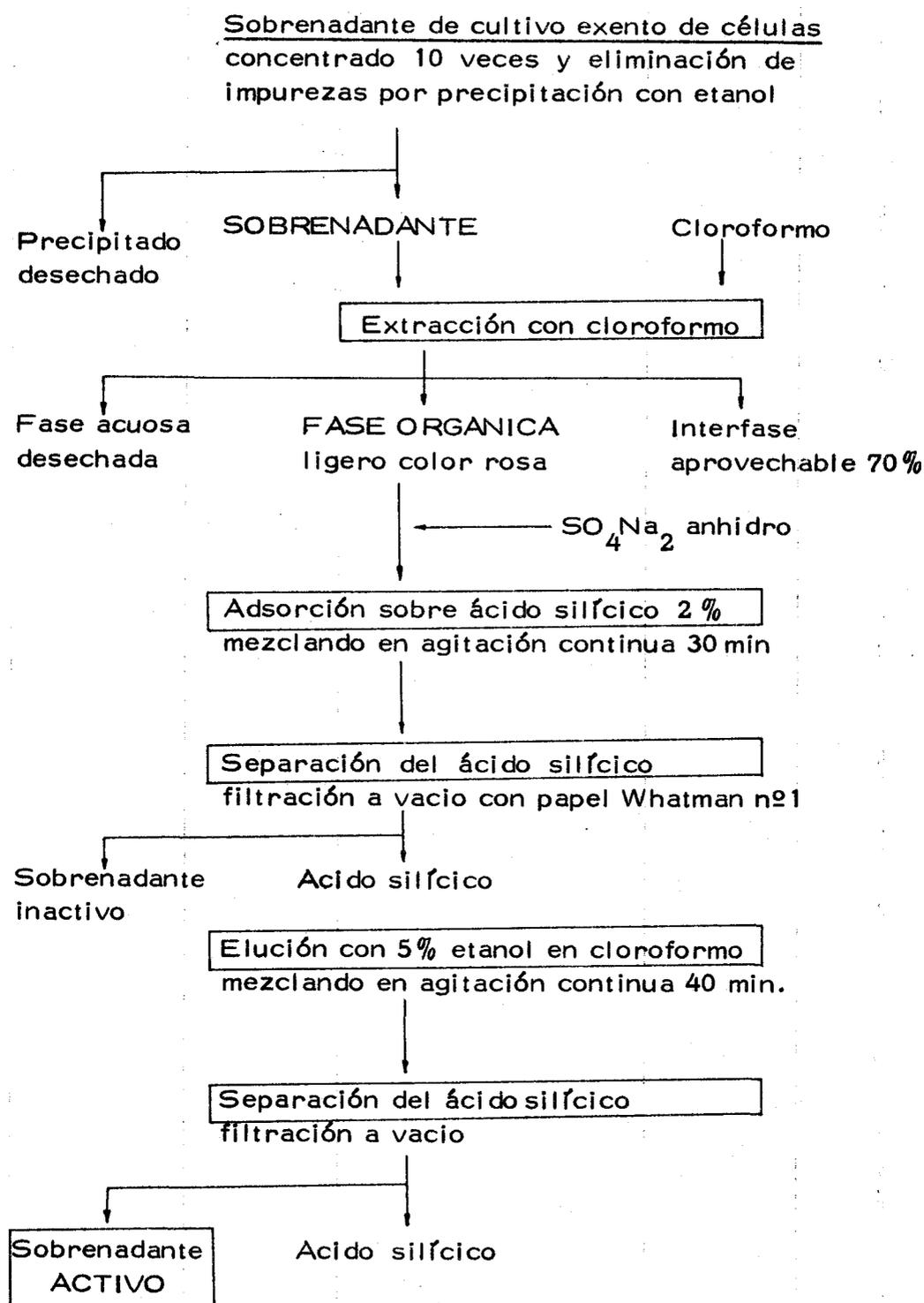


Figura 1. - Esquema de extracción y purificación del antibiótico producido por M. coralloides.

5. ESTUDIOS SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES DEL ANTI-BIOTICO

Para los ensayos de estabilidad a distintas temperaturas y pHs, así como para los tratamientos con enzimas proteolíticas, se ha partido de extractos purificados en agua destilada, cuyo pH estaba próximo a la neutralidad, a los que correspondía una actividad antibiótica de 10 unidades/ml. Los ensayos se han realizado por el método de los pocillos.

5.1. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad

En la tabla 16 se esquematizan los resultados de los ensayos de la influencia de la temperatura sobre la estabilidad del antibiótico realizados a distintos tiempos. Como puede observarse a temperaturas de 60° es termoestable para todos los tiempos ensayados. A temperaturas superiores, 100° y 120°, se observa una pérdida de actividad a medida que aumenta el tiempo del tratamiento.

Para comprobar el efecto de las bajas temperaturas sobre la estabilidad del antibiótico, éste fue congelado a -18° durante 1, 2, 3 y 4 días. Tras estos tratamientos, y descongelación brusca, se probó actividad por el método de los pocillos.

llos . Los resultados obtenidos indican que el antibiótico es es-
 tabla a las bajas temperaturas, al menos en los tiempos ensaya-
 dos, comparado con los controles mantenidos a temperatura am-
 biente.

Tabla 16. - Estabilidad del antibiótico a distintas temperaturas
 en función del tiempo.*

Tiempo (minutos)	Temperaturas		
	60°	100°	120°
0	10	10	10
20	10	10	10
30	10	5	5
60	10	5	1

* Las cifras expresan actividad antibiótica de las muestras en
 U/ml.

5.2. Efecto del pH sobre la estabilidad

En la tabla 17 se indican los resultados obtenidos-
 en los ensayos de estabilidad, a temperatura ambiente, del an-
 tibiótico sometido a diferentes pHs, durante distintos tiempos .

Como se observa el antibiótico soporta muy bien pH alcalinos y neutros, mientras que a pH ácidos, si bien es relativamente estable, hay una pérdida de actividad, cuando el experimento se prolonga mas de 6 horas.

Tabla 17. - Estabilidad del antibiótico a diferentes pH en función del tiempo. Actividad antibiótica expresada en unidades / ml.

Tiempo (horas)	Citrato		Fosfatos		Tris	
	pH3	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
0	10	10	10	10	10	10
6	10	10	9	10	10	10
10	8	9	10	10	10	10
24	5	8	10	10	10	10
48	1	6	8	10	10	10
72	0	3	9	10	10	10

Para comprobar el efecto combinado de la temperatura y pH en función del tiempo, sobre la estabilidad del antibiótico producido por M. coralloides, se realizaron las pruebas oportunas a tal fin.



En la tabla 18 se esquematizan los resultados de los ensayos de termoestabilidad realizados con el antibiótico a distintos pH y diferentes tiempos.

Tabla 18. - Ensayos de termoestabilidad del antibiótico a distintos pH. Actividad antibiótica expresada en unidades / ml.

	Tiempos (minutos)	Temperaturas		
		60°	100°	120°
pH3	10	10	10	0
	20	10	1	0
	30	10	0	0
pH7	10	10	10	10
	20	10	10	10
	30	10	5	5
pH9	10	10	5	0
	20	10	1	0
	30	10	0	0

Como se observa a temperatura de 60° el antibiótico soporta todos los pH ensayados. A 100° soporta bien un pH de 7; a pH extremos es muy lábil a medida que aumenta el

tiempo de tratamiento. A 120° únicamente soporta pH neutro y tratamientos cortos.

5.3. Tratamiento con enzimas proteolíticas

En la tabla 19 se exponen los resultados del tratamiento del antibiótico con los enzimas pronasa y papaina, según la técnica de los pocillos.

Tabla 19. - Tratamientos con enzimas proteolíticas. Actividad antibiótica en unidades/ml

Tiempo (minutos)	Pronasa	Papaina
0	10	10
30	10	10
60	10	10

De estos resultados se deduce que el antibiótico es resistente a la acción de los enzimas proteolíticos ensayados.

5.4. Comportamiento electroforético del antibiótico

La fracción de antibiótico purificado, obtenido por la desorción del ácido silícico, se concentra a vacío hasta un décimo de su volumen y se ensaya su comportamiento electroforético.

A pH 6.5 y 9 el antibiótico muestra una movilidad electroforética hacia el ánodo (6 cm.), emigrando más en el mismo tiempo a pH 9 (9 cm.).

A pH 2.7 y 4 el antibiótico no posee movilidad electroforética.

A fin de visualizar la zona activa, localizada bioautográficamente en el electroforegrama, se intentó someter a los mismos a distintos reveladores (vapores del iodo y ninhidrina), dando resultados negativos.

La actividad antibiótica en el electroforegrama no se visualiza con lámparas de ultravioleta de 254 y 360 nm así como tampoco a simple vista.

En todos los casos sólo se observó una única zona con actividad.

5.5. Cromatografía descendente

Cuando se ensaya el comportamiento cromatográfico del antibiótico en el sistema Butanol: Piridina: Agua

(12:3:5) según la técnica descendente, seguido de bioautografía del cromatograma, se observa que la actividad co rre con el frente del solvente.

Cuando el solvente es Butanol: Acido acético: Agua (12:3:5) la actividad se sitúa a pocos centímetros del frente del solvente, dando valores de R_f del orden de 0.9

En los sistemas Eter de petróleo: Cloroformo (4:1) y Eter de petróleo: Cloroformo (24:1) la actividad tie ne una movilidad cromatográfica más baja, dando R_f de 0.23 y 0.13 respectivamente.

En el sistema Eter de Petróleo: Benceno (25:1) aparecen R_f de 0.83.

En todos los casos sólo se observó una única zona con actividad.

5.6. Espectro ultravioleta

En la figura 2 se muestra el espectro de absorción en el ultravioleta de una solución en etanol del antibiótico purificado. Como se observa, aparece un máximo de absorción a 300 nm. El antibiótico no absorbe en el visible.

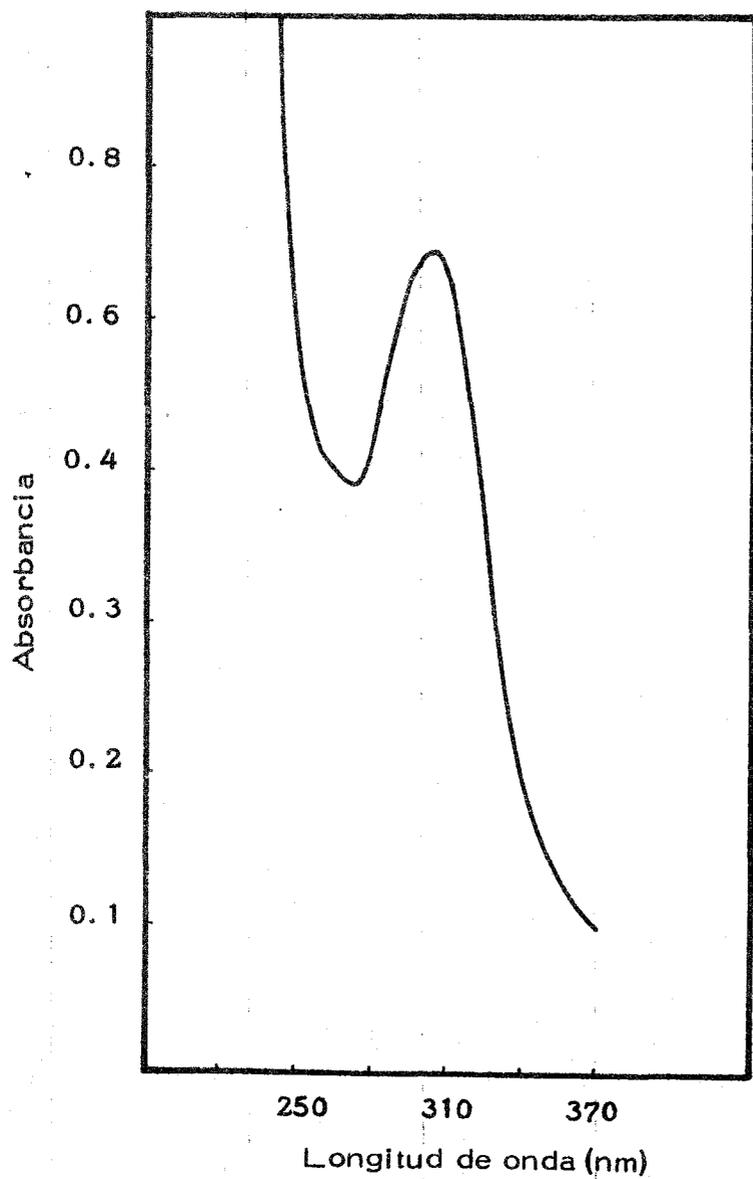


Figura 2. - Espectro U.V. del antibiótico purificado.

6. ESPECTRO DE ACCION DEL ANTIBIOTICO

Como ya se aludió en el apartado correspondiente de experiencias preliminares (tabla 1) M. coralloides segrega al medio de cultivo una sustancia de naturaleza antibiótica activa frente a bacterias Gram positivas.

A fin de comprobar el efecto antimicrobiano del antibiótico purificado, al mismo tiempo que se ampliaba el número de microorganismos a ensayar, se usaron discos de distintas concentraciones de antibiótico. Así mismo, para completar el espectro antibacteriano se han usado algunas razas hospitalarias suministradas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina (Granada.)

6. 1. Espectro antibacteriano

En la tabla 20 se muestra el espectro de acción del antibiótico purificado sobre distintos microorganismos. Como puede observarse, el antibiótico purificado, muestra actividad sobre bacterias Gram positivas, con las excepciones de Mycobacterium phlei y Nocardia corallina, y cocos -

Gram negativos tales como neiserias. No se detectó actividad alguna sobre levaduras.

6.2. Comprobación de la no resistencia cruzada con otros antibióticos

Para comprobar si existía resistencia cruzada con otros antibióticos, se emplearon varias razas de St. aureus patógenos, procedentes del Departamento de Microbiología de Medicina (Granada) que son resistentes a varios antibióticos. En la tabla 21 se exponen los resultados de esta experiencia, observándose cómo el antibiótico producido por M. coralloides es activo sobre bacterias que poseen resistencia a varios antibióticos, no observándose, portanto, resistencia cruzada en los mismos.

Tabla 20. - Espectro de acción del antibiótico producido por M. coraloides

Organismos	Antibiótico (U)			Penicilina
	2	10	+ de 10	5 U
<u>Pseudomonas reptilivora</u>	0	0	0	0
<u>Rhizobium meliloti</u>	0	0	0	0
<u>Escherichia coli</u>	0	0	0	0
<u>Citrobacter intermedius (b)</u>	0	0	0	0
<u>Salmonella tiphymurium</u>	0	0	0	0
<u>Salmonella schottmuelleri</u>	0	0	0	0
<u>Klebsiella pneumonie</u>	0	0	0	0
<u>Neisseria sp.</u>	0	0	9	0
<u>Micrococcus luteus (Sarcina lutea)</u>	10	16	20	20
<u>Micrococcus luteus (M. lysodeikticus)</u>	9	12	35	34
<u>Micrococcus sp.</u>	9	20	25	27
<u>Staphylococcus aureus</u>	12	23	29	20
<u>Streptococcus faecalis</u>	9	15	18	19
<u>Bacillus subtilis</u>	0	14	18	20
<u>Bacillus cereus</u>	0	9	13	0
<u>Bacillus megaterium</u>	0	11	18	17
<u>Arthrobacter globiformis</u>	9	18	34	15
<u>Mycobacterium phlei</u>	0	0	0	0
<u>Nocardia corallina</u>	0	0	0	0
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	0	0	0	0
<u>Torula utilis</u>	0	0	0	0

Resultados expresados en milímetros de diámetro del halo

Tabla 21. - Comprobación de la no resistencia cruzada con otros antibióticos.

Antibióticos	Contenido por disco	<u>razas de Staphylococcus aureus</u>		
		A	B	C
Penicilina	10U	0	0	0
Ampicilina	10 µg	0	0	0
Cefalosporina	30 µg	0	2	2
Estreptomina	10 µg	0	1	0
Cloxacilina	10 µg	0	2	2
Trimetropin-S	50 µg	0	2	1
Tetraciclina	30 µg	0	2	1
Sulfamidas	150 µg	2	2	0
Eritromicina	15 µg	0	2	2
Gentamicina	10 µg	1	1	2
Antibiótico <u>M. coralloides</u>	5 U	2	2	2

0, 1 y 2 corresponde a la zona de inhibición del crecimiento - (variando los milímetros, según el tipo de antibiótico) respondiendo a resistente, intermedio y sensible, respectivamente.

A, B y C: razas hospitalarias de St. aureus que muestran resistencia a varios antibióticos.

7. MODO DE ACCION

7.1. Acción bactericida del antibiótico

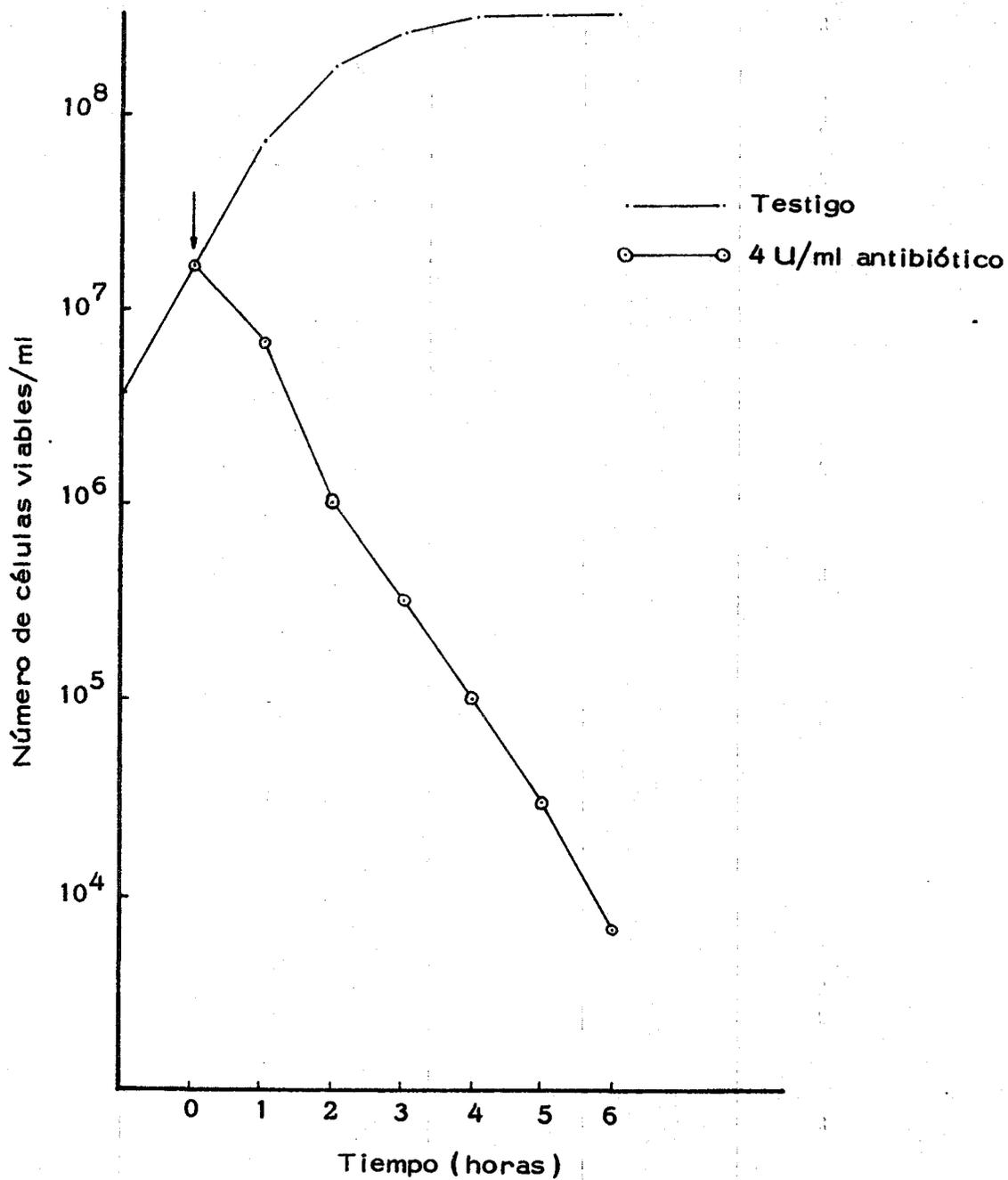
A fin de determinar el efecto del antibiótico sobre la viabilidad de St. aureus, se realizaron unas experiencias en las que a cultivos de St. aureus en fase exponencial de crecimiento se le añadió antibiótico a una concentración final de 4 unidades / ml, determinando, a partir de este momento D.O. y número de células viables por ml a intervalos de una hora, durante un periodo total de seis.

Simultaneamente se realizaron las mismas determinaciones en testigos sin antibiótico.

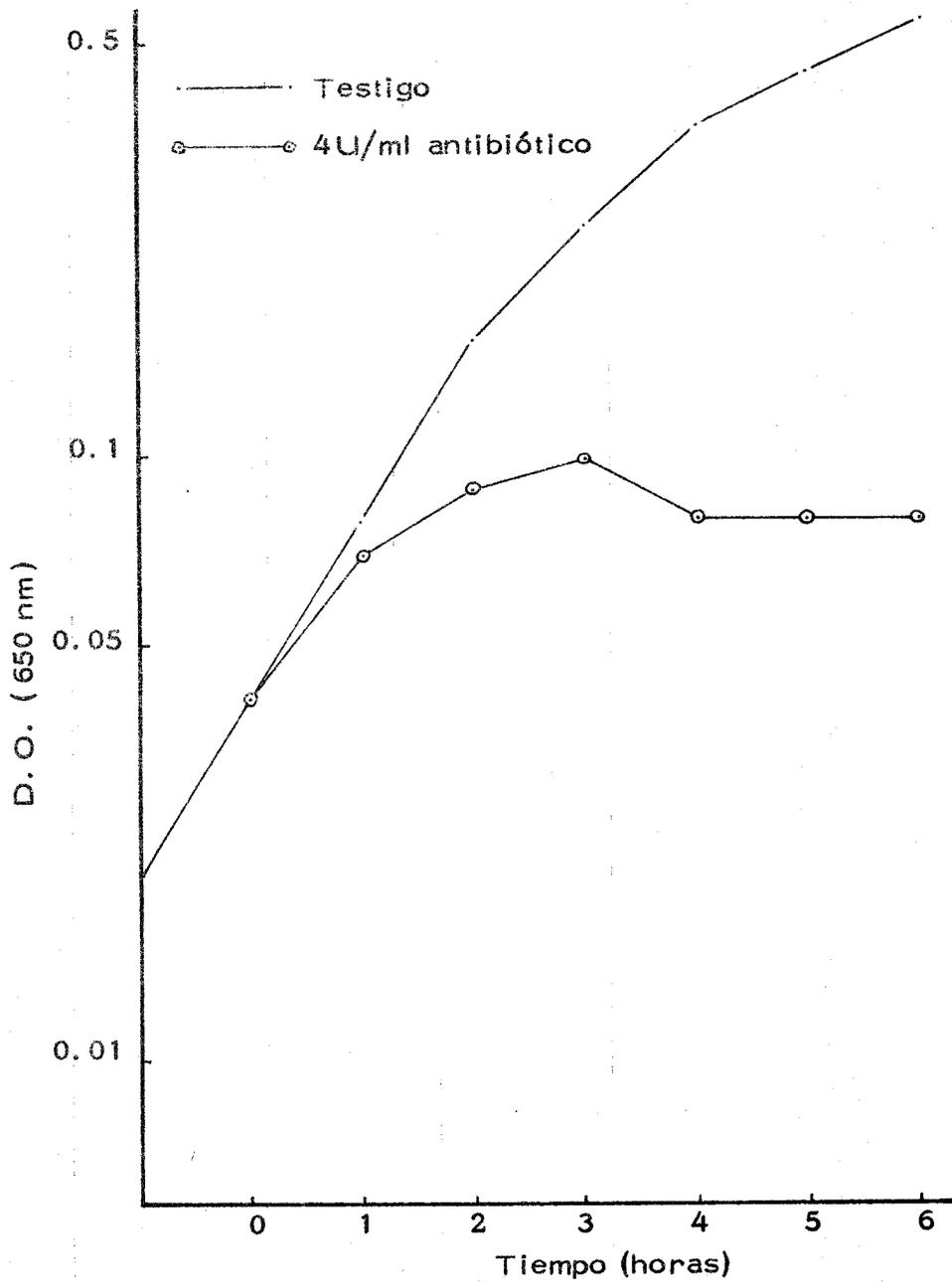
Los resultados se exponen en la tabla 22 y gráficas 9 y 10, y de ellos se deduce que el antibiótico tiene un claro efecto bactericida sobre el St. aureus en fase de crecimiento exponencial, aún cuando en el periodo de tiempo que duró el experimento no se observó lisis celular apreciable.

Tabla 22. - Efecto de la adición de antibiótico sobre la evolución de la D.O. y del número de células viables de cultivos de St. aureus en fase de crecimiento exponencial.

Tiempo (horas)	D. O.		Nº de células viables/ml	
	Testigo	4U antibiótico	4U antibiótico	Testigo
0	0.04	0.04	1.6×10^7	1.6×10^7
1	0.08	0.07	6.5×10^6	7×10^7
2	0.16	0.09	1×10^6	1.5×10^8
3	0.25	0.1	3.2×10^5	2.5×10^8
4	0.36	0.08	1×10^5	3×10^8
5	0.44	0.08	3×10^4	3.1×10^8
6	0.55	0.08	7×10^3	3.1×10^8



Gráfica 9. - Efecto del antibiótico sobre la viabilidad de St. aureus. La flecha indica la adición del antibiótico (tiempo cero).



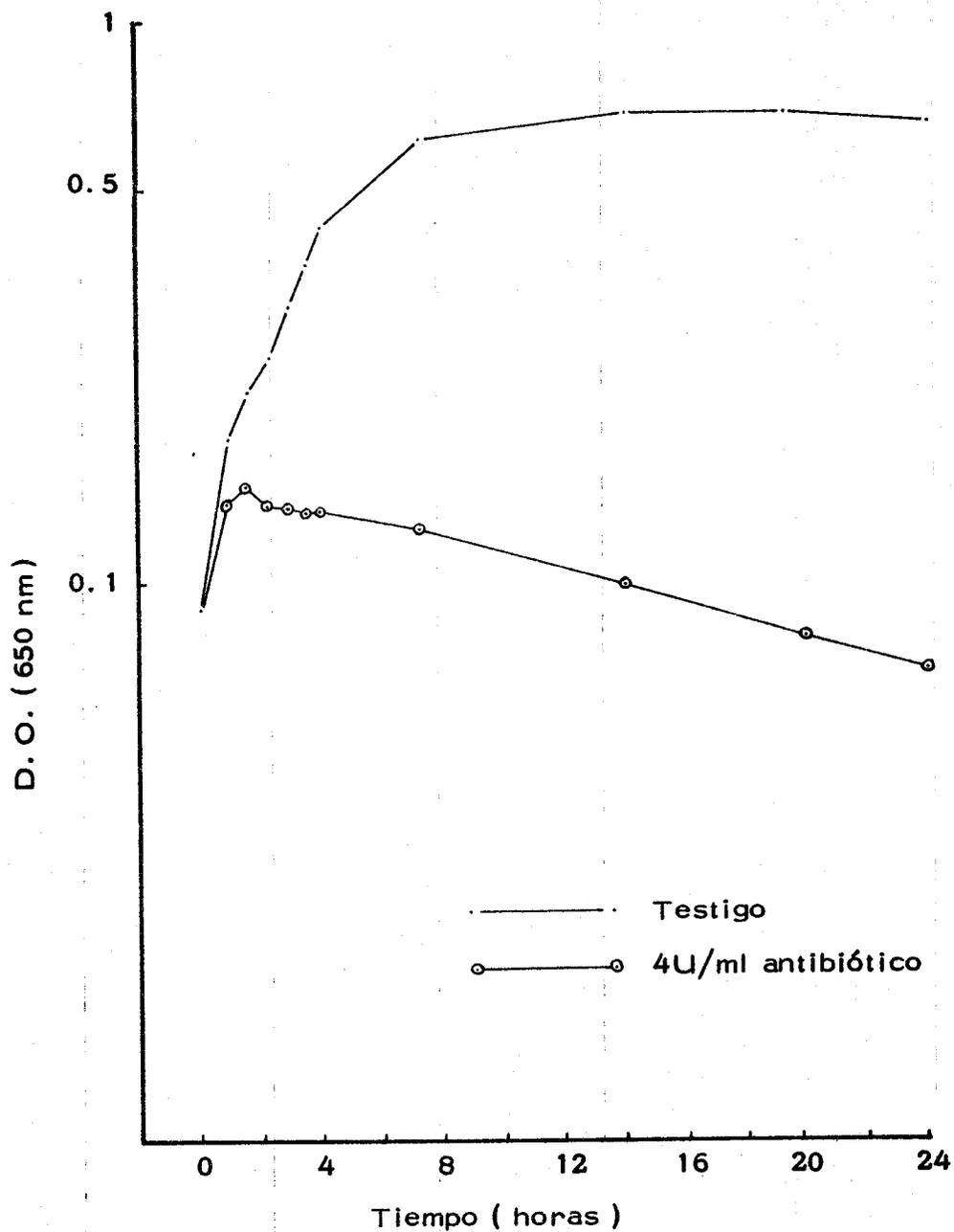
Gráfica 10. - Efectos de la adición de antibiótico (4U/ml) sobre la evolución de la D.O. de cultivos de St. aureus

Al objeto de comprobar este último extremo se realizó una nueva experiencia, idéntica a la anterior, pero en la que se siguió la evolución de la D.O. a lo largo de un periodo de incubación de 24 horas.

Los resultados se expresan en la tabla 23 y gráfica 11 e indican que a partir de 6-7 horas de incubación tiene lugar una lisis exponencial del cultivo si bien la pendiente de la gráfica es muy baja.

Tabla 23. -Evolución de la densidad óptica en cultivos de St. aureus adicionados de antibiótico.

Tiempo (horas)	Testigo	4U antibiótico
0	0.09	0.09
0.8	0.18	0.140
1.5	0.22	0.149
2.15	0.25	0.137
2.80	0.31	0.137
3.35	0.37	0.133
3.95	0.43	0.133
7.30	0.61	0.125
14	0.69	0.10
20	0.69	0.08
24	0.68	0.07



Gráfica 11. - Efectos de la adición de antibiótico - (4U/ml) sobre la evolución de la D.O. de cultivos de St. aureus



7.2. Efecto de la tonicidad del medio sobre la acción del antibiótico

Se comprobó siguiendo la evolución de la D.O. en cultivos en fase exponencial de St. aureus en presencia del antibiótico (4U/ml) en dos medios de cultivo con las siguientes características:

Medio hipertónico, con respecto al normal: Medio MC con sacarosa 0,5M y SO_4Mg 0,1M.

Medio hipotónico, con respecto al normal: casitone al 0,5% en agua destilada.

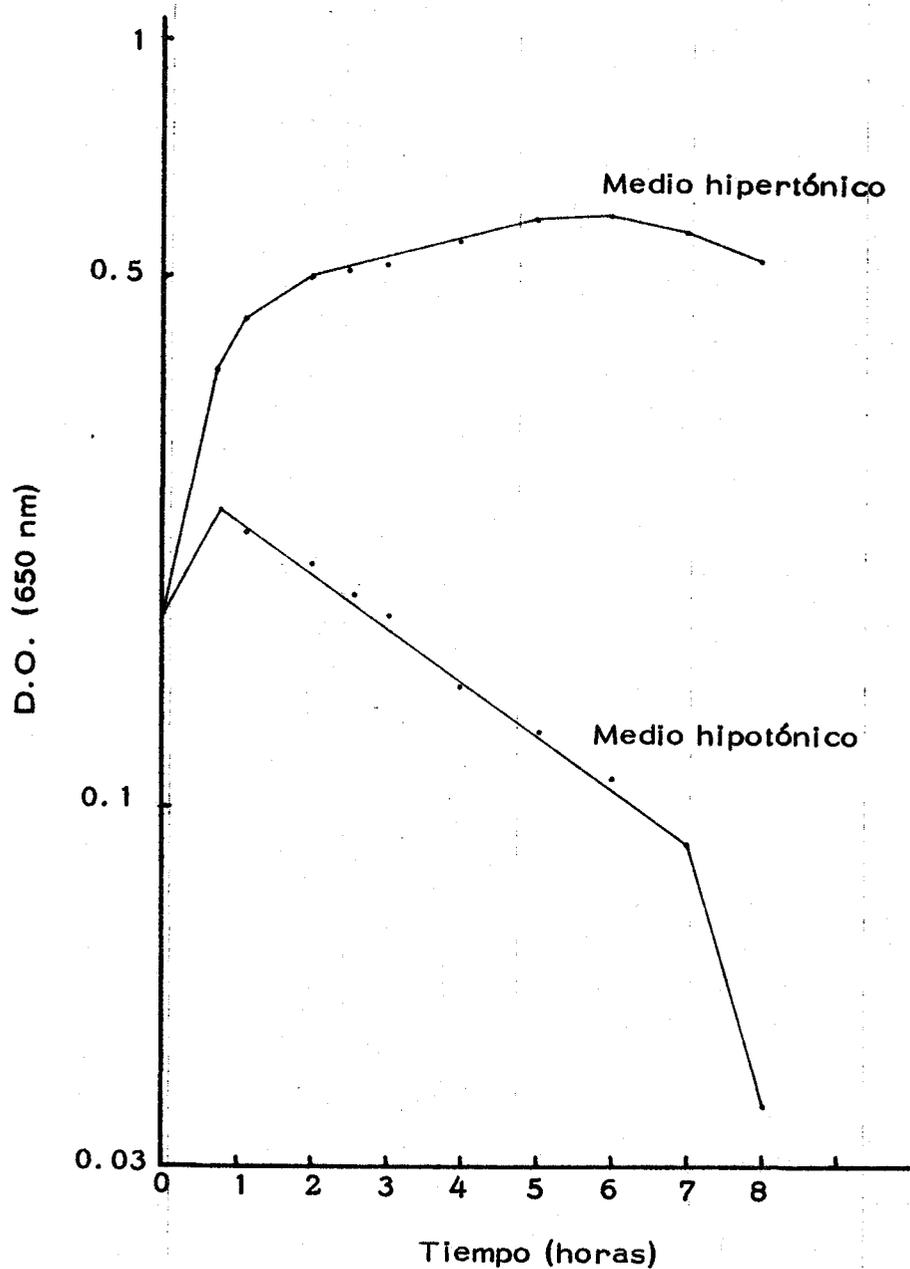
El antibiótico se añadió a los dos cultivos - cuando estos alcanzaron una D.O. de 0,18.

Los resultados expuestos en la tabla 24 y gráfica 12 muestran que el St. aureus no solamente no muere, sino que sigue creciendo en el medio hipertónico, mientras que, por el contrario, se lisa rápidamente en el medio ba baja tonicidad.

Tabla 24. - Evolución de la D.O. de cultivos en fase exponencial de St. aureus en medios con distinta tonicidad añadidos del antibiótico (4 U/ml).

Tiempo. (horas)	Medio * hipotónico	Medio * hipertónico
0	0, 18	0, 18
0, 75	0, 25	0, 38
1, 15	0, 23	0, 44
2	0, 21	0, 49
3	0, 18	0, 52
4	0, 145	0, 56
5	0, 13	0, 6
6	0, 1	0, 6
7	0. 08	0, 57
8	0, 04	0, 52

* veáse el texto



Gráfica 12. - Evolución de la D.O. de cultivos en fase exponencial de St. aureus en medios - con distinta tonicidad añadidos del antibiótico (4U/ml)

7.3. Efecto del antibiótico sobre células de "St. aureus" en reposo

Células de St. aureus procedentes de un cultivo en fase estacionaria fueron recogidas y lavadas con solución salina estéril y a continuación suspendidas en el tampón Tris-ClH, 0.02M, pH 7, a una concentración aproximada de 10^7 células/ml.

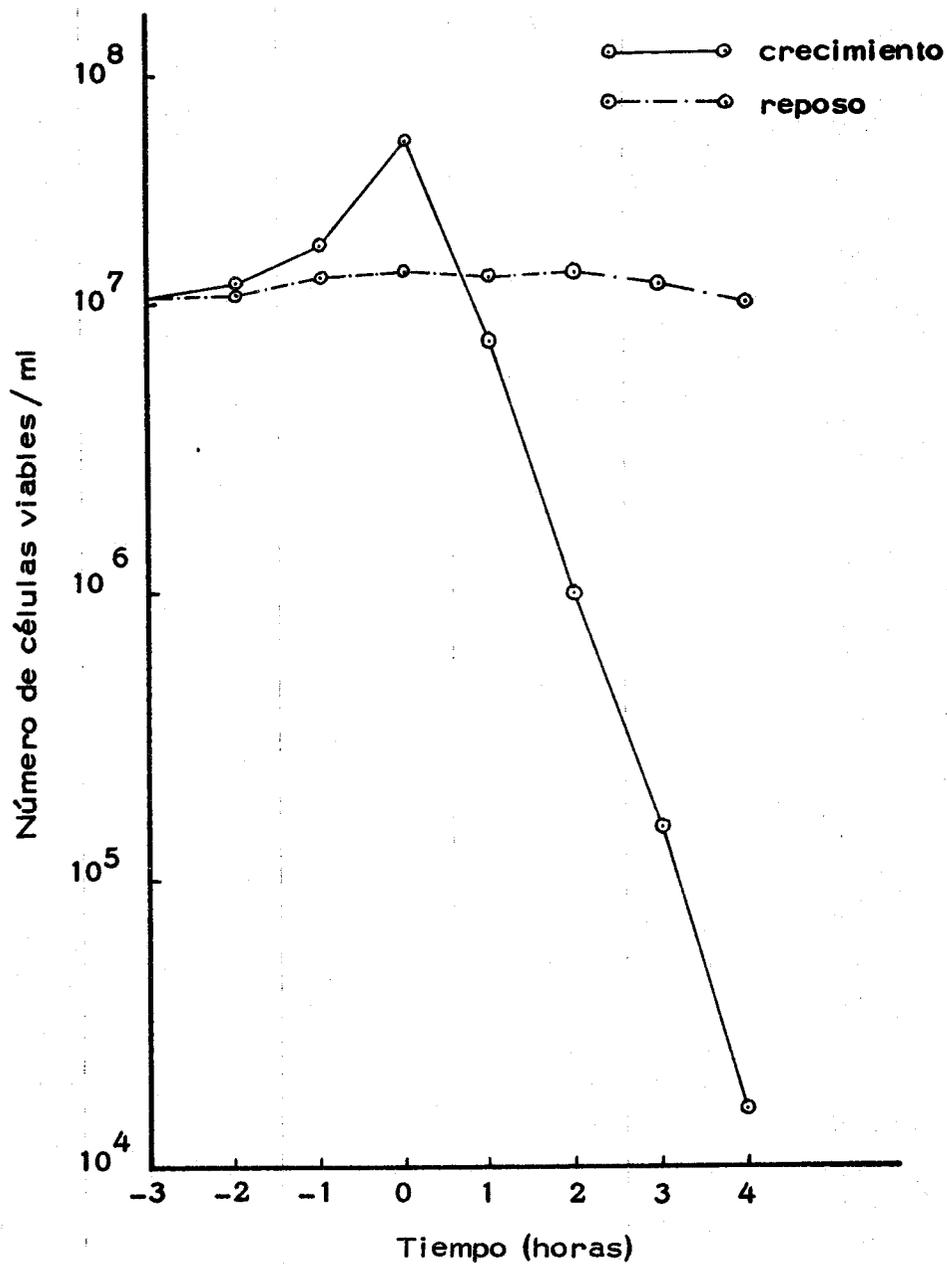
Tras incubación a 37° en agitación durante tres horas se añadió el antibiótico a una concentración final de 4 U/ml (tiempo cero), prolongando la incubación durante 4 horas más. A efectos comparativos se llevó a cabo otra experiencia idéntica, salvo que las células fueron resuspendidas en medio M-C en lugar de solución salina. En los dos casos se determinó el número de células viables por ml a intervalos de una hora.

Los resultados se expresan en la tabla 25 y gráfica 13 e indican que el antibiótico carece de efecto bactericida sobre células sensibles en reposo.

Tabla 25. - Estudio comparativo del efecto bactericida ejercido por el antibiótico sobre células de St. aureus en reposo, suspendidas en tampón Tris-ClH, y en crecimiento sobre medio M-C.

Tiempo * (horas)	Número de células viables/ ml	
	células en crecimiento	células en reposo
-3	1.1×10^7	1.1×10^7
-2	1.2×10^7	1.1×10^7
-1	1.6×10^7	1.25×10^7
0	3.7×10^7	1.3×10^7
1	7.5×10^6	1.25×10^7
2	1×10^6	1.3×10^7
3	1.5×10^5	1.2×10^7
4	1.6×10^4	1.0×10^7

* El tiempo 0 corresponde al momento en que se añadió el antibiótico (4 U/ml).



Gráfica 13. - Efecto comparativo ejercido por el antibiótico sobre células de St. aureus en reposo, suspendidas en tampón Tris-ClH, y en crecimiento, sobre medio M-C.

7.4. Efecto del cloranfenicol sobre la actividad del antibiótico estudiado

Como complemento de la experiencia anterior se efectuó otra consistente en comprobar si un antibiótico con efecto bacteriostático sobre el St. aureus interfiere la acción del antibiótico ensayado.

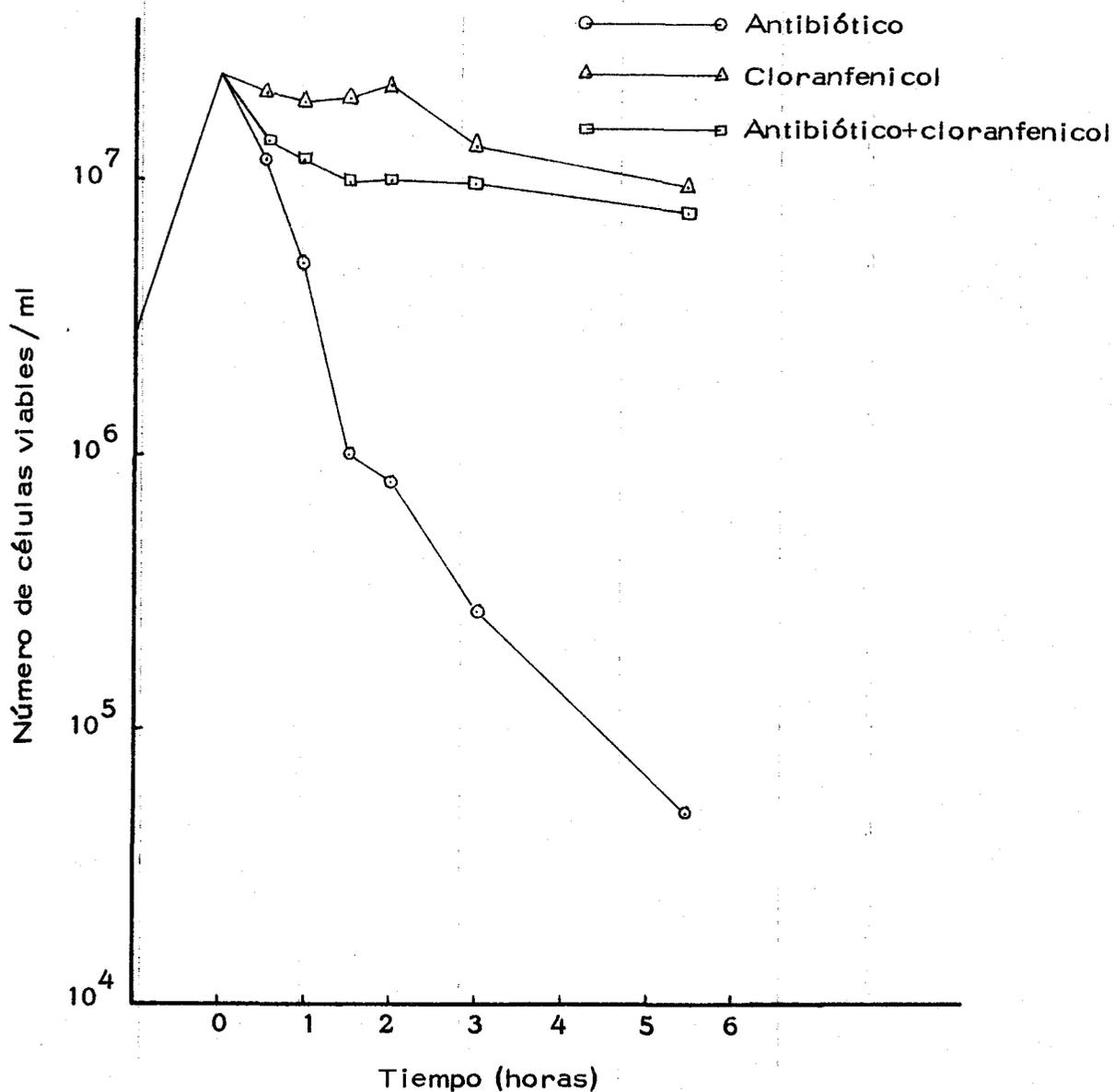
El antibiótico elegido fué el cloranfenicol y la experiencia se llevó a cabo partiendo de un cultivo en fase exponencial de St. aureus sobre medio M-C con una concentración de células viables de $2,84 \times 10^6$ cel/ml. El citado cultivo se dividió en tres lotes iguales, y al cabo de una hora de incubación adicional se añadió a uno de ellos cloranfenicol a la concentración final de 25 µg/ml; a otro 4 U/ml del antibiótico; finalmente, al tercero se añadió una mezcla de cloranfenicol y del antibiótico estudiado, a las mismas concentraciones indicadas anteriormente. Los cultivos se continuaron incubando durante 5,5 horas más, determinándose en los tres casos la concentración de células viables a lo largo de dicha incubación.

Los resultados se exponen en la tabla 26 y gráfica 14, y confirman los obtenidos en la experiencia anterior, es decir, que el antibiótico ensayado solo es activo sobre células en crecimiento.

Tabla 26. - Evolución del número de células viables por ml en cultivos de St. aureus sobre medio M-C en presencia de cloranfenicol, del antibiótico ensayado y de ambos.

Tiempo* (horas)	Cloranfenicol (25 µg / ml)	Antibiótico (4 U/ml)	Cloranfenicol (25 µg/ ml) + antibiótico (4 U / ml)
-1	2.84×10^6	2.84×10^6	2.84×10^6
0	2.6×10^7	2.58×10^7	2.56×10^7
0.5	2.21×10^7	1.2×10^7	1.41×10^7
1	1.96×10^7	5×10^6	1.26×10^7
1.5	2.01×10^7	1.01×10^6	1.01×10^7
2	2.24×10^7	8.02×10^5	1.06×10^7
3	1.36×10^7	2.7×10^5	9.9×10^6
5.5	9.87×10^6	5×10^4	7.8×10^6

* El tiempo 0 corresponde al momento en que se adicionan los antibióticos.



Gráfica 14. - Evolución del número de células viables por ml en cultivos de St.aureus sobre medio M-C en presencia de cloranfenicol, del antibiótico ensayado y de ambos.

8. EXPERIENCIAS " IN VIVO "

8. 1. Toxicidad para el ratón del antibiótico estudiado

Como se indicó en Material y Métodos, a lotes de cinco ratones machos de peso aproximado 20 g, se les inyectó una sola dosis, en la vena de la cola, con un volumen de 0,05 ml, de una solución acuosa de antibiótico, equivalente a 100 unidades. Todos los ratones soportaron perfectamente la dosis citada.

Para la inyección por vía intraperitoneal, se procedió de idéntico modo, salvo que el volumen de las dosis fue de 0.5 ml. Los resultados fueron idénticos a los de la experiencia anterior.

A la vista de estos resultados se realizó otra experiencia en la que se administró, por vía intraperitoneal, a un lote de cinco ratones 3 dosis de 100 unidades de antibiótico a intervalos de 24 horas. El resultado de esta experiencia fue positivo ya que a las 48 horas de practicada la última inyección, todos los ratones vivían no observándose ningún tipo de síntomas que indicaran alteración o trastorno fisiológico.

8.2. Efecto "in vivo" del antibiótico estudiado

Se llevó a cabo observando el efecto producido por la administración del antibiótico sobre la evolución de abscesos provocados en ratones mediante la administración por vía subcutánea de una mezcla de St. aureus y alúmina, de acuerdo con la técnica detallada en el capítulo anterior.

Se utilizaron dos lotes de 5 ratones, uno de los cuales se dejó como testigo, administrándose a cada uno de los componentes del otro, una dosis diaria de 500 unidades del antibiótico por vía intraperitoneal durante 7 días. Al cabo de este tiempo, tanto los ratones testigo como los tratados fueron anestesiados a muerte con éter, observándose, de acuerdo con la técnica descrita, el tamaño y vascularización de los abscesos.

Los resultados de esta experiencia se muestran en la figura 3 y, aunque los abscesos fueron en todos los casos reducidos, se observó una clara diferencia entre los correspondientes a ratones tratados y sin tratar.

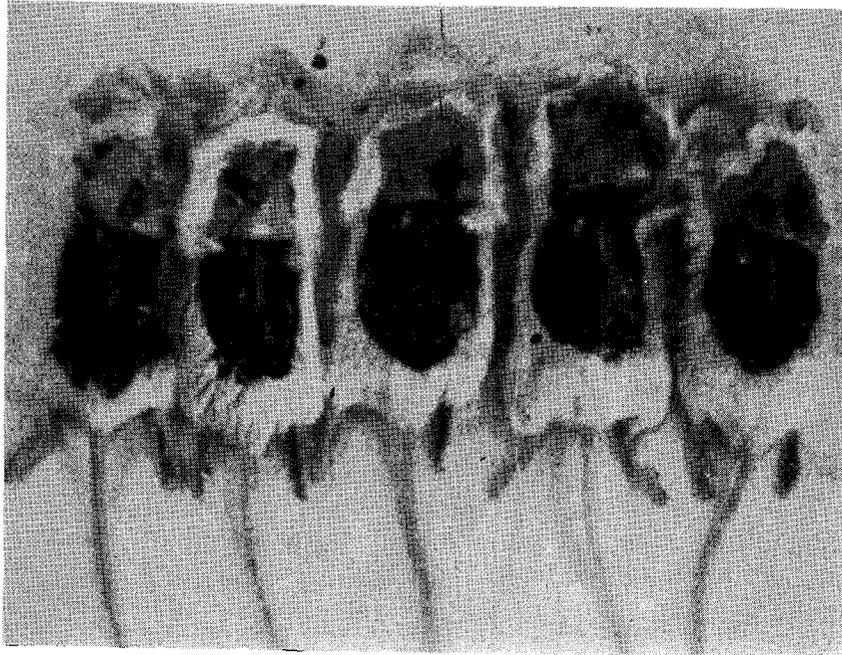


Figura 3.- Control de abscesos inducidos por St. aureus en ratones por acción del antibiótico. Arriba, lote testigo; abajo, lote tratado con antibiótico.

DISCUSION

A lo largo del capítulo anterior se ha ido comentando e interpretando los resultados obtenidos en todas las experiencias realizadas, por lo que el presente capítulo es simplemente un resumen de lo ya expuesto con anterioridad.

En primer lugar, hay que hacer resaltar que M. coralloides produce un antibiótico de una manera constante, siempre que las condiciones de cultivo permitan su desarrollo. No obstante, desde un punto de vista cuantitativo, la cantidad de antibiótico producido esta influenciada en mayor o menor grado, según los casos, por los distintos factores que afectan el crecimiento bacteriano. Entre dichos factores la composición del medio de cultivo tiene una influencia decisiva sobre la cantidad del antibiótico producido. Partiendo del hecho de que todos aquellos factores nutritivos que limitan el crecimiento tienen, como es lógico, un efecto negativo sobre la producción de antibiótico, como son la naturaleza y la concentración de los sustratos nitrogenados a expensas de los cuales crecen las mixobacterias, destaca el hecho de que en presencia de glucosa u otros monosacáridos, a concentración del 1% o superiores, incrementa enormemente dicha producción hasta el punto que a igualdad de sustratos nitrogenados

los sobrenadantes de los cultivos muestran una actividad 10-12 veces mayor que en su ausencia.

Este hecho es un tanto sorprendente dado que, según viene siendo admitido, los azúcares no son utilizados por las mixobacterias ni afectan su crecimiento, hecho este último que se ha podido comprobar en los trabajos expuestos con anterioridad. No obstante, dado que en algunas de estas bacterias, han sido detectadas actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo glucídico, cabe suponer que o bien la glucosa y los restantes azúcares ensayados son utilizados - por el M. coralloides y como consecuencia de ello, al hacer menos necesaria la utilización de algunos aminoácidos utilizados normalmente como nutrientes, se favorece la desviación del metabolismo de los mismos hacia una vía secundaria que desemboca en la producción de antibiótico, o bien los azúcares citados actúan como precursores del antibiótico producido lo que naturalmente incrementaría grandemente su producción.

En relación con los sustratos nitrogenados, estos no afectan grandemente la producción de antibiótico en tanto no limiten, como queda indicado, el crecimiento de M. coralloides; no obstante, como puede observarse en las experiencias correspondientes, los resultados óptimos se obtienen cuando se emplean como fuentes de carbono y nitrógeno un hidrolizado enzimático de la caseína (casitone Difco) a la concentración del 0.5%.

Por lo que respecta a la asparagina, que se aña de de forma rutinaria a todos los medios empleados en el cultivo de mixobacterias, hemos podido comprobar claramente que su presencia en una amplia gama de concentraciones no afecta en absoluto la producción de antibiótico y el crecimiento de M. coralloides. En relación con los restantes componentes del medio, sales minerales, ha podido comprobarse que el M. coralloides crece perfectamente y produce antibiótico en un medio que, a más de los nutrientes ya indicados, lleve solamente sulfato magnésico y fosfato, posiblemente por que los restantes requerimientos de nutrientes inorgánicos son satisfechos por las pequeñas cantidades de los mismos presentes en los macronutrientes, existentes en el agua y restantes componentes del medio.

Teniendo en cuenta, en adición a lo expuesto, que el pH inicial del medio de cultivo tiene una marcada influencia sobre el crecimiento del M. coralloides y producción del antibiótico de manera que ambos son óptimos a pH 6, el medio de cultivo que consideramos como óptimo para la producción de antibiótico por M. coralloides es el siguiente:

Casitone	5g
Sulfato magnésico	1g
Glucosa	10g
Tampón fosfato pH 6, 0.01M	1000 ml

Por lo que respecta a la temperatura de cultivo óptima para la producción del antibiótico, los resultados obtenidos indican que tanto a 22º, 28º y 37º se obtienen prácticamente los mismos niveles de actividad, si bien cuando se emplean temperaturas de 22º los niveles máximos de antibiótico se obtienen, como es lógico dada la menor velocidad de crecimiento, 24 horas más tarde que en los otros dos casos. Cuando se emplean temperaturas de 37º la actividad de los sobrenadantes desciende rápidamente a partir de las 24 horas de haberse alcanzado el máximo. Todo ello nos hace concluir que, la temperatura más adecuada para la producción del antibiótico es la de 28º.

En cuanto al tiempo, los niveles máximos, en las condiciones antes citadas, se alcanzan al 6º día, permaneciendo después estacionarios durante semanas.

Finalmente la modalidad de cultivo, en agitación o reposo, afecta poco la producción de antibiótico; no obstante, como en los cultivos en agitación los niveles máximos se alcanzan más rápidamente y son ligeramente superiores que en reposo, hemos adoptado dicha modalidad de cultivo ya que, aparte de las razones citadas, facilita la obtención de volúmenes grandes de sobrenadantes activos.

Todos los resultados discutidos hasta el momento se llevaron a cabo con la raza silvestre de M. coralloides que, como todas las mixobacterias, no crece de forma disper

sa en medios líquidos, lo que hacía imposible relacionar la producción del antibiótico con las fases de crecimiento de la bacteria o con las distintas etapas de su ciclo de vida.

Para poder llevar a cabo este tipo de estudios fue necesario, por tanto, obtener una raza de M. coralloides que diera lugar a un crecimiento disperso, tal como había sido conseguido con otras mixobacterias por diferentes autores (Loebeck y Klein, 1956; Holt, 1960; Dworkin, 1962; Chase 1965; Haská y Norén, 1967; Reichenbach y Kleining, 1971).

Las técnicas empleadas en la obtención de la citada raza han sido expuestas en los apartados correspondientes, y aquí sólo resta destacar el resultado positivo obtenido, que ha permitido disponer de una raza que designamos como Myxococcus coralloides D que crece, en los medios empleados, en forma dispersa.

El ciclo de vida de esta raza está drásticamente alterado de tal forma que, como puede observarse (gráfica 6), tras una etapa de crecimiento típicamente exponencial no existe una fase estacionaria ni mucho menos diferenciación a mixósporas, sino que bruscamente el cultivo entra en una fase de lisis exponencial a la terminación del crecimiento logarítmico.

En cualquier forma, durante el transcurso de

la citada fase de crecimiento exponencial, la producción de antibiótico alcanza los mismos niveles que los máximos obtenidos con la raza silvestre, niveles que se mantienen constantes durante el periodo de lisis, por lo que en principio, llegamos a la conclusión de que al menos el grueso del antibiótico se produce durante la fase de desarrollo vegetativo. Para confirmar esta conclusión se efectuaron experiencias en las que se estudió la posible producción de antibiótico durante el proceso de diferenciación del crecimiento de células vegetativas a mixósporas. Como queda dicho el M. coralloides D no produce mixósporas de forma espontánea en el medio utilizado pero, sin embargo, como sucede con otras mixobacterias (Dworkin, 1962), puede inducirse la citada diferenciación mediante la adición al medio de glicerina, a la concentración adecuada.

Realizadas las experiencias correspondientes se puede afirmar, que en el transcurso de la diferenciación de las células vegetativas a mixósporas, no se produce antibiótico en forma detectable, por lo que reafirmamos la conclusión a que se había llegado, de que el M. coralloides sólo produce antibiótico en la fase de crecimiento vegetativo.

Aunque sin constituir un objetivo primario de esta memoria, ha sido necesario poner a punto técnicas adecuadas para la extracción, concentración y purificación del antibiótico, como paso previo para poder estudiar con ciertas garantías sus propiedades y modo de acción ; a -

tal fin, y como queda expuesto en el capítulo anterior, se ha ensayado la extracción del antibiótico por distintos disolventes orgánicos a diferentes pH y la adsorción del mismo por diferentes materiales y su posterior elución. Se ha elaborado un esquema, que se expone en la pagina 132, en el que se combina la concentración de los sobrenadantes al vacío, la eliminación de impurezas mediante tratamientos con etanol, la extracción con cloroformo a pH alcalino y la adsorción de los extractos por ácido silícico y posterior elución con una mezcla de etanol en cloroformo. De este modo, se consigue preparaciones de antibiótico altamente purificadas, como lo demuestra el hecho de que no muestren más que un solo pico de absorción a 300 nm a lo largo de todo el espectro ultravioleta y visible, y que en el revelado de los electroforegramas y cromatogramas, no se detecte la presencia de otras sustancias fuera de la que posee actividad antibiótica.

Dado que el objeto de estos estudios, como queda indicado, fué el disponer de preparaciones lo más puras posible del antibiótico estudiado, no se han tenido en cuenta los aspectos cuantitativos del procedimiento de extracción por lo que aun cuando se puede afirmar, que la actividad total que se recupera es menor que la que existe en los sobrenadantes de los cultivos, no se puede aportar por el momento ningún dato objetivo sobre el rendimiento del proceso de purificación empleado.

Disponiendo ya de extractos con el grado de purificación antes citado, se han estudiado algunas de las propiedades fisicoquímicas del antibiótico producido por M. coralloides: resistencia a agentes fisicoquímicos y comportamiento electroforético y cromatográfico.

En relación con la temperatura, los extractos-purificados del antibiótico resisten, sin pérdida aparente de actividad, tratamientos a 60° durante una hora y a 100° y 120° durante 20 minutos, siempre que el pH sea neutro. Igualmente se ha podido comprobar que las congelaciones y descongelaciones sucesivas no afectan en absoluto su actividad. Aún cuando no se ha realizado ninguna experiencia específica, se ha podido comprobar que los extractos purificados conservados a la temperatura ambiente y pH neutro, conservan su actividad varios meses después de su preparación.

Por lo que respecta al pH, el antibiótico ha demostrado ser igualmente resistente a variaciones extremas del mismo; concretamente no se advierte pérdida de actividad cuando se conserva durante 6 horas a temperatura ambiente, a pH comprendido entre 3 y 9. A pH alcalino, 7-9, no se ha detectado pérdida de actividad después de 3 días, igualmente, a la temperatura ambiente. Así mismo, los extractos conservan toda su actividad cuando se incuban a 60° durante 30 minutos. A pH 7 como, ya ha sido indicado ante

riormente, resiste tratamientos de 100° y 120° durante 20 minutos. Y, finalmente, a pH 9, hay una pérdida de actividad a temperaturas de 100° o más grados, aunque el tratamiento sea corto. Aun cuando las experiencias de extracción y su espectro ultravioleta parecían descartar la naturaleza peptídica del antibiótico producido por M. coralloides se ha querido comprobar ese extremo, mediante observación del efecto ejercido por enzimas proteolíticos sobre su actividad; en ningún caso, los citados enzimas originan pérdida de actividad, al menos en las condiciones detalladas, por lo que sin ser concluyente aboga a favor de lo anteriormente indicado.

La electroforesis del antibiótico purificado en papel, de acuerdo con las técnicas descritas, parece indicar que la actividad antibiótica reside en un solo tipo de sustancia que emigra hacia el ánodo a pH superiores a 4, lo que indica un punto isoeléctrico acusadamente bajo. Igualmente la cromatografía en papel, utilizando varios sistemas solventes, muestra aparentemente la existencia de un sólo tipo de sustancia con actividad antibiótica. Aunque ninguna de las dos pruebas son excluyentes, los resultados de las mismas nos lleva a considerar que el M. coralloides produce un solo tipo de sustancia con actividad antibiótica.

El espectro de acción del antibiótico purificado coincide con lo ya observado en las pruebas directas de



antagonismo entre M. coralloides y diversas bacterias. Con excepción de las pertenecientes al orden Actinomycetales, todas las bacterias Gram positivas probadas son sensibles a la acción del antibiótico; por el contrario, las bacterias Gram negativas no se afectan por el mismo, con excepción de una especie del género Neisseria, cuyo crecimiento es inhibido, si bien, a concentraciones elevadas. El antibiótico es totalmente inactivo frente a levaduras.

En cuanto a su efecto sobre las bacterias sensibles, los ensayos efectuados sobre Staphylococcus aureus muestran una actividad de tipo claramente bactericida, que comienza a hacerse patente en las condiciones ensayadas, una hora después de la adición del antibiótico; por el contrario, la detención del crecimiento no es inmediata, ya que este no se detiene hasta pasadas 3 horas de la adición del antibiótico. La muerte de las bacterias sensibles a su acción, va acompañada de una lisis de las mismas que, como se muestra en la gráfica 11, comienza a las 4 horas de añadir el antibiótico y sigue un curso exponencial, si bien la pendiente de la gráfica correspondiente no es muy acentuada.

Tanto el efecto bactericida como el lítico está grandemente influenciado por la tonicidad del medio en que se llevan a cabo las experiencias. En medios hipertónicos, con respecto a los normalmente utilizados, no solamente no tiene lugar el fenómeno de lisis, sino que las bacterias sen

sibles continúan su crecimiento en forma prácticamente idéntica a la de los testigos sin antibiótico. Por el contrario, en medios hipotónicos, una hora después de añadido el antibiótico, se produce una lisis exponencial y rápida que lleva prácticamente al aclaramiento total del cultivo.

Finalmente, se ha comprobado, la acción del antibiótico sobre células en reposo y sobre células cuyo crecimiento ha sido detenido mediante la adición simultánea de cloxacilina. En ambos casos el antibiótico es totalmente inefectivo, lo que indica, que solo actúa sobre células en crecimiento.

El conjunto de las experiencias descritas nos lleva a la conclusión de que el antibiótico interfiere con la biosíntesis del mucopéptido de la pared de las bacterias sensibles, ya que al igual que ocurre en el caso de las penicilinas, cefalosporinas y otros, el efecto bactericida es consecuencia de la lisis de los protoplastos o esferoplastos resultantes en el proceso de división, debido al desequilibrio osmótico existente entre el exterior e interior de la célula.

Por último, se han realizado estudios sobre el efecto "in vivo" del antibiótico purificado. Se ha comprobado su toxicidad para el ratón y aun cuando, las experiencias realizadas deben ser completadas, todo parece indicar que es atóxico o de muy baja toxicidad, cosa de otra parte lógica si como se ha expuesto anteriormente, actúa a nivel de la síntesis del mucopéptido. Se han realizado estudios preliminares

del efecto "in vivo" sobre bacterias, concretamente estudiando la protección que confiere al ratón en relación con la formación de abscesos producidos por inoculación subcutánea de St. aureus en mezcla con alúmina; como en el caso anterior, los resultados no son concluyentes, dado el escaso número de experiencias realizadas, pero parece indicar que al igual que "in vitro" es efectivo sobre la citada bacteria.

Resumiendo todo lo anteriormente expuesto en esta Discusión, se puede afirmar por tanto, que el M. coralloides produce un antibiótico en cantidades bastante notables, susceptible de ser extraído y purificado fácilmente, con una enorme resistencia a los agentes físicos y químicos, y un efecto antibacteriano y modo de acción similar al de la penicilina, y que en principio parece ser atóxico y efectivo "in vivo". - Creemos que el citado antibiótico puede ser de gran utilidad en la práctica clínica de confirmarse su efecto "in vivo" sobre todo, teniendo en cuenta que, no muestra resistencia cruzada con las penicilinas y cefalosporinas, tal como se desprende de las experiencias citadas.

CONCLUSIONES



1. - Se ha aislado una raza de M. coralloides que, siempre que las condiciones de cultivo permiten su desarrollo, produce de manera constante un antibiótico que se acumula en el medio.
2. - La cantidad de antibiótico producido está afectada decisivamente por la composición del medio de cultivo, en especial por la presencia de glucosa, y, en menor escala, por las restantes condiciones culturales: pH, temperatura, etc., habiéndose fijado las condiciones óptimas que permiten su máxima producción.
3. - La biosíntesis del antibiótico sólo tiene lugar durante el crecimiento vegetativo del M. coralloides, coincidiendo la máxima actividad de los sobrenadantes de cultivos con el final de la fase de crecimiento logarítmico, y no detectándose producción alguna durante el proceso de diferenciación de las células vegetativas a mixósporas.
4. - El antibiótico producido muestra una marcada resistencia al calor, condiciones extremas de acidez y alcalinidad, así como a tratamientos con enzimas proteolíticas, lo que le permite su fácil concentración y purificación en condiciones muy diversas.
5. - Con excepción de las especies del orden Actinomycetales, el antibiótico es activo frente a todas las bacte-

rias Gram positivas ensayadas y algunas Gram negativas (Neisseria sp.), no mostrando resistencia cruzada con una gran variedad de otros antibióticos.

6. - El antibiótico ejerce un efecto bactericida y lítico sobre las bacterias sensibles a su acción, pero exclusivamente cuando éstas se encuentran en fase de crecimiento, siendo totalmente inactivo sobre células en reposo o cuyo crecimiento ha sido detenido por la acción de otro antibiótico bacteriostático. Igualmente es inactivo sobre células en crecimiento en medios con una tonicidad elevada.
7. - Provisionalmente, se concluye que el antibiótico estudiado debe ^{ter}inferir con alguna de las etapas de la biosíntesis del mucopéptido de la pared celular de las células sensibles.
8. - El antibiótico producido por el M. coralloides parece ser atóxico y activo "in vivo", como se desprende de los estudios preliminares efectuados en ratón.

BIBLIOGRAFIA



- BENDER, H. 1962. "Untersuchungen über Myxococcus xanthus.
I. Bildungsbedingungen, Isolierung und Eigenschaften seines bakteriolytischen Enzymsystems".
Arch. Mikrobiol. 43, 262-279.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.
7ª edición. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1967.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.
8ª edición. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1974.
- CALLAO, V., ALVARADO, R., SEDANO, A., OLIVARES, J. y MONTROYA, E. 1966. "Efecto antagónico del Myxococcus xanthus sobre los Azotobacter". Microbiol. Españ. 19, 45.
- CHASE, J. M., 1965. "Nutrition of some aquatic myxobacteria".
Master's Thesis. University of Washington. Seattle, Wash.
- DONAIRE, J. P. 1971. "Aislamiento, purificación y caracterización de un polipéptido capaz de prevenir la formación de abscesos inducidos por Staphylococcus aureus en ratón". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- DWORKIN, M. 1962. "Nutritional requirements for vegetative growth of Myxococcus xanthus". J. Bacteriol. 84 250-257.
- DWORKIN, M. 1966. "Biology of the myxobacteria". Ann. Rev. Microbiol. 20, 75-106.



- DWORKIN. M. and GIBSON, S. M. 1964 "A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcyts in Myxococcus xanthus". Science 146, 243-244.
- GROVE. D. C. and RANDALL. W. A. 1955 " Assay methods of antibiotics. A laboratory manual . Medical Encyclopedia. Inc. New York.
- HARCKE. E., HÜTTERMANN. A. and KÜHLWEIN. H. 1971. "Studies on lytic activities of Chondrococcus coralloides (Myxobacteriales). I. Purification and some properties of the bacteriolytic and proteolytic activity". Arch. Mikrobiol. 77, 86-95.
- HASKÅ. G. and NORÉN. B. 1967 "Growth and enzyme activity of Myxococcus virescens in liquid medium". Physiol. Plant. 20, 851-861.
- HOLT. J. G. 1960 "The nature of the slime of Myxococcus xanthus" Thesis Purdue University.
- HURST. A. 1969. "In the bacterial spore. (G. W. Gould and A. Hurst. eds). p. 167. Academic Press. London.
- HÜTTERMANN. A. 1969. "Studies on a bacteriolytic enzyme of Archangium violaceum (Myxobacteriales). I. Partial - purification and properties on the enzyme!" Arch. Mikrobiol. 67, 306-317.
- HÜTTERMANN. A. and KÜHLWEIN. H. 1959" Über ein bakteriolytisches enzym von Archangium violaceum(Myxobacteriales). II. Messungen in vivo". Arch. Microbiol. 65, 105-114.

- IMŠENETSKIJ, A. A. and KUSJURINA, L. A. 1951. "Bacterio-
tropic microorganisms (On evolution of saprophy-
tism and parasitism). Microbiology. 20, 3-12.
- JAHN, E. 1915. "Krytogamenflora der Mark Brandenburg". -
V Heft. 1, 187.
- JAHN, E. 1924. "Beitrage zur botanischen Protistologie. I.
Die Polyangiden". Leipzig.
- KATO, H. 1955. "Notes on myxobacteria". Ecol. Rev, 14, 25-28.
- KLETTER, B. and HENIS, Y. 1963. "Comparative studies on
the growth of myxobacteria on bacterial suspen-
sions". Can. J. Microbiol. 9, 557-584.
- LOEBECK, M. E. and H. P. KLEIN. 1956. "Substrates for Myxo-
coccus virescens with special reference to eu-
bacterial fractions". J. Gen. Microbiol. 14, 281-289.
- LOPEZ GORGE, J., MONTEOLIVA, M. y MAYOR, F. 1967. -
"Identificación electroforético-cromatográfica de
una serie de compuestos nitrogenados de interés
bioquímico". Anales de la Real Sociedad Españo-
la de Física y Química. 4, 465-478.
- MARGALITH, P. 1962. "Bacteriolytic principles of Myxococcus
fulvus". Nature 196, 1335-1336.
- MCCURDY, H. D. Jr. y WOLF, S. 1967a. "Studies on the taxonomy
of fruiting Myxobacterales". Bacteriol. Proc. p. 39
- MCCURDY, H. D. Jr. y WOLF, S. 1967b. "Deoxyribonucleic acid
base compositions of fruiting Myxobacterales. Can.
J. Microbiol. 13, 1707.

- MENDEL. M. y LEADBETTER. E. R. 1965 "Deoxyribonucleic acid base composition of myxobacteria". *J. Bacteriol.* 90, 1795.
- NOREN. B. 1953a . "Studies on the myxobacteria. II. Bacteriolytic activity". *Sven. Botan. Tidskr.* 47. 309-332.
- NOREN. B. 1953b . "On the production of antibiotics by myxobacteria". *Sven . Botan. Tidskr.* 49, 282-294.
- NOREN. B. 1955 . "Studies on myxobacteria. III. Organic -- factors in nutrition". *Botan. Nat.* 108, 81-134.
- NOREN. B. and RAPER. K. B. 1962 "Antibiotic activity of myxobacteria in relation to their bacteriolytic capacity". *J. Bacteriol.* 84, 157-162.
- OXFORD. A. and SINGH. B. N. 1946. "Factors contributing - to the bacteriolytic effect of species of Myxococcus upon viable eubacteria. *Nature*, 158, 645.
- OXFORD. A. E. 1947. "Observations concerning the growth - and metabolic activities of myxococci in a simple protein-free liquid medium". *J. Bacteriol.* 53, - 129-138.
- PETERSON. E. A. , GILLESPIE. D. C. and COOK. F. D. 1966. "A wide spectrum antibiotic produced by a species of Sorangium". *Can. J. Microbiol.* 12 . 221-230.
- REICHENBACH. H. and KLEINING. H. 1971. " The carotenoids of Myxococcus xanthus". *Arch. Mikrobiol.* 76. 364-380.

- RODRIGUEZ FRANCO. C. 1973. "Estudio de los enzimas extracelulares y epiteliales producidos por el Myxococcus xanthus" Tesis Doctorales. Universidad de Granada (31).
- ROSENBERG. E. VAKS. B. and ZUCKERBERG. A. 1973. - "Bactericidal action of an antibiotic produced by Myxococcus xanthus". Antimicrob. Ag. Chemother. 4, 507-513.
- SING. B. N. 1947. "Myxobacteria in soils and compost, their distribution, number and lytic action on bacteria". J. Gen. Microbiol. 1, 1-10.
- SORIANO. S. 1947 "The flexibacterales and their systematic position". Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 12, 215.
- STANIER. R. Y. 1942. "The Cytophaga group: a contribution to the biology of myxobacteria". Bact. Rev. 6, 143.
- STOLP. H. and STARR. M. P. 1965. "Bacteriolysis". Ann. Rev. Microbiol. 19, 79-104.
- STROMINGER. J. L. and GHUYSEN. J. M. 1967. "Mechanisms of enzymatic bacteriolysis (cell wall of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or specific peptidases). Science. 156, 213-22.
- SUDO. S. Z. and DWORKIN. M. 1973. "Comparative biology on procaryotic resting cells". Adv. Microbiol. Physiol. 9, 153-224.

- THAXTER. R. 1892. "On the myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes". Bot. Gaz. 17, 389.
- VAKS. B., ZUCKERBER. G and ROSENBERG. E. 1974. "Purification and partial characterization of an antibiotic produced by Myxococcus xanthus". Can. J. Microbiol. 20, 155-161.
- WATSON. B. I. and DWORKIN. M. 1968. "Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of Myxococcus xanthus". J. Bacteriol. 96 , 1465-1473.
- WOODS. N. A., 1948. "Studies on the myxobacteria" (Master's thesis. Univ. of Washington. Seattle. Wash.
- WOODRUFF. H. E. 1966. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 16, 22.



Biblioteca Universitaria de Granada



01080069