

2/94

94

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO DE LOS ENZIMAS EXTRACELULARES Y EPICELULARES
PRODUCIDOS POR EL MYXOCOCCUS XANTHUS

CARMEN RODRIGUEZ FRANCO

30

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1973

R = 24.560

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
Facultad de Ciencias
Universidad de
Granada



ESTUDIO DE LOS ENZIMAS EXTRACELULARES Y EPICELULA-
RES PRODUCIDOS POR EL MYXOCOCCUS XANTHUS.

Carmen Rodríguez Franco

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
ENTRADA
Fecha 30 JUN. 1973
Número 2.764

"ESTUDIO DE LOS ENZIMAS EXTRACELULARES Y EPICELULARES PRODUCIDOS POR EL MYXOCOCCUS XANTHUS"

MEMORIA presentada para aspirar al Grado
de Doctor en Ciencias por la Licenciada Da
Carmen Rodríguez Franco.

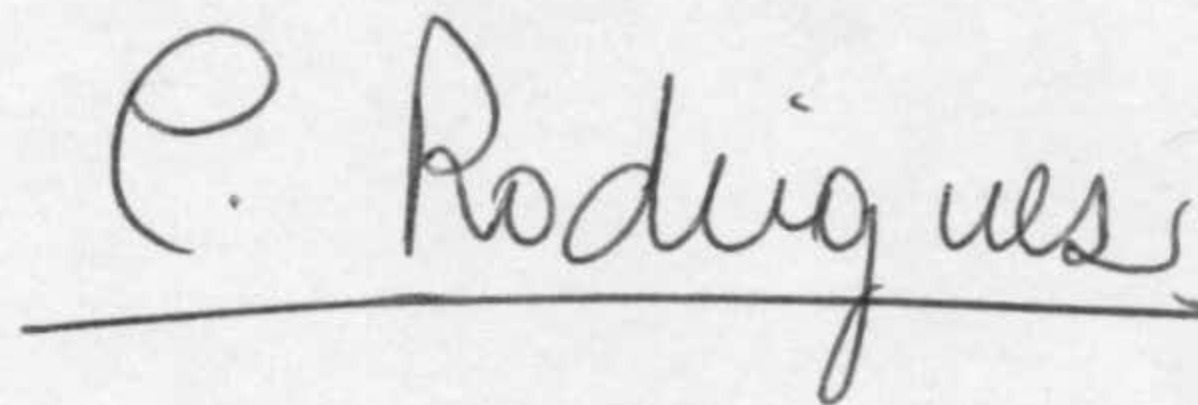
PROF. Dr. D. ENRIQUE MONTOYA GOMEZ

DIRECTOR DE TESIS



LICENCIADA Da CARMEN RODRIGUEZ FRANCO

Aspirante al Grado de Doctor en Ciencias.



Granada, Julio 1973

El presente trabajo ha sido realizado en los Departamentos de Microbiología de las Facultades de Ciencias de las Universidades de Sevilla y Granada, durante los años 1968 - 1973.

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

Mi agradecimiento

Al Director de esta Tesis Doctoral, Prof. Dr. Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, por su constante orientación y ayuda en la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. Recalde Martínez, Director de la Estación Experimental del Zaidín, del C.S.I.C. y al Prof. Dr. Losada Villasante, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sevilla, por haberme cedido amablemente sus instalaciones.

Al Dr. Olivares Pascual, Investigador Científico del C.S.I.C. y al Dr. López Gorgé, Investigador Científico del C.S.I.C., por sus consejos en temas de su especialidad.

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

INDICE

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION	7
MATERIAL Y METODOS	28
1. - Microorganismos	28
2. - Medios de cultivo	29
2.1. - Medios de conservación	29
2.2. - Medios de crecimiento	30
2.3. - Medios empleados en la investigación de enzi- mas producidos por el <u>M. xanthus</u>	30
2.4. - Medios especiales	31
3. - Técnicas de aislamiento y cultivo	33
3.1. - Método de Sing para el aislamiento de mixobac- terias	33
3.2. - Conservación del <u>M. xanthus</u>	33
3.3. - Mantenimiento de las eubacterias empleadas	33
3.4. - Obtención de masas de eubacterias	33
3.5. - Obtención de inóculos de <u>M. xanthus</u>	34
3.6. - Cultivos en agitación de <u>M. xanthus</u>	34
3.7. - Cultivos estáticos de <u>M. xanthus</u>	35
4. - Técnicas empleadas en la determinación de actividades enzimáticas	35
4.1. - Determinación cualitativa de la actividad lítica del <u>M. xanthus</u> sobre bacterias vivas	35
4.2. - Determinación semicuantitativa de la actividad proteolítica	36
4.3. - Determinación semicuantitativa de la actividad lítica sobre células muertas	36
4.4. - Determinación cualitativa de la actividad amilá- sica	37

4.5. - Determinación cualitativa de actividades lipolíticas 37

4.6. - Determinación cuantitativa de la actividad lítica sobre bacterias muertas 37

 4.6.1. - Actividad lítica sobre P. mirabilis. 37

 4.6.2. - Actividad lítica sobre M. lysodeikticus desecado con acetona. 38

4.7. - Determinación cuantitativa de la actividad lítica sobre bacterias vivas 38

4.8. - Determinación cuantitativa de la actividad proteolítica 39

4.9. - Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica 40

 4.9.1. - Metodo de Gomori. 40

 4.9.2. - Método de Huggins y Lapidés 41

 4.9.3. - Método de Willstätter et al. 42

4.10. - Determinación de proteínas totales 43

5. - Métodos empleados en la extracción, separación y purificación de los diversos enzimas ensayados 43

 5.1. - Obtención, concentración y purificación de enzimas extracelulares 43

 5.1.1. - Precipitación fraccionada con sulfato amónico 43

 5.1.2. - Precipitación con acetona 43

 5.1.3. - Fraccionamiento en columnas de Sephadex. 44

 5.1.3.1. - Filtración con flujo normal 44

 5.1.3.2. - Filtración con flujo invertido 45

 5.1.4. - Fraccionamiento con resinas intercambiadoras de iones 46

 5.2. - Extracción, concentración y purificación de enzimas epicelulares. 47

 5.3. - Electroforesis en geles de poliacrilamida. 48

 5.4. - Revelado en geles de poliacrilamida de proteínas con actividades enzimáticas 51

	<u>Pág.</u>
5.4.1. - Actividad esterásica	51
5.4.2. - Actividad proteolítica	52
6. - Determinación de la capacidad de producción de antibió- ticos por el <u>M. xanthus</u>	52
6.1. - Método de Norén y Raper.	52
6.2. - Técnica sobre papel celofán	52
6.3. - Técnica fundada en el recuento de células via- bles	53
EXPERIENCIAS Y RESULTADOS	55
1. - Estudios preliminares sobre los enzimas producidos por el <u>M. xanthus</u>	57
1.1. - Actividad proteolítica	57
1.2. - Actividad lítica sobre bacterias vivas	58
1.2.1. - Actividad en medios sólidos	58
1.2.2. - Actividad en filtrados procedentes de - cultivos en medios líquidos	59
1.3. - Actividad lítica sobre bacterias muertas por el calor	59
1.3.1. - Actividad en medios sólidos	60
1.3.2. - Actividad en filtrados procedentes de - cultivos en medios líquidos	60
1.4. - Actividad amilásica	61
1.5. - Actividad lipolítica	61
2. - Enzimas proteolíticos y bacteriolíticos extracelulares	62
2.1. - Factores culturales que afectan su producción	63
2.1.1. - Modalidad de cultivo	63
2.1.2. - Tiempo de cultivo	65
2.1.3. - Composición del medio de cultivo.	71
2.1.3.1. - Efecto de la concentración - de caseína	72
2.1.3.2. - Efecto de la adición de gluco- sa	73

	<u>Pág.</u>
2.2. - Fraccionamiento y caracterización de los enzimas proteolíticos y líticos extracelulares	74
2.2.1. - Concentración de los sobrenadantes.	75
2.2.2. - Purificación por salado con sulfato amónico	76
2.2.3. - Purificación por precipitación fraccionada con acetona	78
2.2.4. - Fraccionamiento sobre DEAE-celulosa	80
2.2.5. - Fraccionamiento sobre Sephadex G-200	85
2.2.6. - Fraccionamiento por electroforesis en geles de poliacrilamida	87
3. - Enzimas epicelulares	90
3.1. - Obtención de suspensiones celulares homogéneas	90
3.2. - Factores culturales que afectan su producción	90
3.2.1. - Tiempo de cultivo	91
3.2.2. - Medios de cultivo	92
3.3. - Extracción de enzimas epicelulares	92
3.3.1. - Extracción con agentes tensoactivos	93
3.3.2. - Extracción con n-butanol	96
3.4. - Comprobación de la actividad lipásica de los extractos frente a otros sustratos distintos del Tween 20	97
3.5. - Fraccionamiento y caracterización de los enzimas epicelulares	98
3.5.1. - Precipitación fraccionada con acetona	98
3.5.2. - Fraccionamiento con DEAE-celulosa	99
3.5.3. - Fraccionamiento en columna de Sephadex	102
3.5.4. - Fraccionamiento por electroforesis en geles de poliacrilamida	103
3.5.4.1. - Revelado de proteínas con actividad lipásica frente a Tween 20	105
3.5.4.2. - Revelado de proteínas con actividad esterásica frente a α -naftilacetato ,	106

	<u>Pág.</u>
3.5.4.3. - Revelado de proteínas con actividad proteolítica . . .	107
4. - Estudios del efecto lítico de los enzimas extracelulares y epicelulares del <u>M. xanthus</u> sobre bacterias vivas	107
4.1. - Observación de la lisis de bacterias vivas por disminución de la densidad óptica	108
4.2. - Observación de la lisis de bacterias vivas marcadas con P ³² mediante medida de la radioactividad liberada	108
4.2.1. - Marcado de las células	109
4.2.2. - Realización de las experiencias	109
4.2.3. - Ensayos realizados y resultados	110
5. - Producción de antibióticos por el <u>M. xanthus</u>	113
DISCUSION	115
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFIA	133

INTRODUCCION

En 1892 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 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).

Esta puede ser considerada como la primera descripción de una mixobacteria productora de cuerpos fructificantes. Desde entonces hasta la fecha, y a pesar del gran desarrollo de la Microbiología, los conocimientos sobre mixobacterias han progresado relativamente poco en comparación con los referentes a otros grupos quizás, como dice Stanier (1942), debido 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.

La primera clasificación formal de las mixobacterias corresponde a Jahn (1915, 1924), que englobó en este grupo a organismos con los siguientes caracteres: bacilos vegetativos Gram negativos - largos y finos, con pigmentos carotenoides, englobados en una capa de mucosa y que producen cuerpos fructificantes, que contienen numerosas "esporas" o quistes formadas por bacilos acortados o quistes, dentro de los cuales se encuentran localizadas las "esporas".

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

De acuerdo con ello, el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957) incluye una revisión de Stanier sobre la clasificación de las mixobacterias y encuadra a éstas en el Orden VIII, Myxobacteriales, de la clase Schizomycetes, con las siguientes carac-

terísticas:

"Las células vegetativas son bacilos flexibles, poco refringentes, que muestran movimiento deslizante sobre 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, de 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 pedúnculos 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".

Al margen de esta descripción que se ha transcrito —algunos de cuyos caracteres están todavía hoy sometidos a litigio— y dejando aparte los géneros Cytophaga y Sporocytophaga, se puede definir más simplemente el grupo, de acuerdo con Dworkin (1966), como -- compuesto por organismos procarióticos, no fotosintéticos —es decir bacterias— Gram negativos y con las siguientes características principales:

a) Células móviles, pero cuyo movimiento no se lleva a cabo por flagelos sino por deslizamiento de los bacilos vegetativos sobre la superficie de sustratos sólidos.

b) Organismos que presentan un ciclo de vida que comprende la agregación celular de los bacilos vegetativos, seguida de una formación de cuerpos fructificantes. Dentro de los citados cuerpos, las células vegetativas pasan a un estado de reposo por conversión a microquistes o inclusión dentro de macroquistes.

c) Finalmente, y como carácter más importante desde el punto de vista de esta Tesis, todas las mixobacterias son invariablemente capaces de hidrolizar macromoléculas insolubles.

Esta última característica citada es la que confiere a las mixobacterias 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 organismos muertos, e incluso de organismos vivos, como se dirá al examinar la capacidad bacteriolítica de estas bacterias.

Estos hechos, unido a que las mixobacterias están presentes ubicuamente en todos los suelos normales y materiales de plantas en descomposición, hacen que los organismos que se estudian en el presente trabajo puedan ser considerados como unos verdaderos "basureros" dentro del mundo microbiano, con la misión fundamental de degradar una serie de organismos muertos y detritus orgánicos y hacer así aprovechables sustancias cuya utilización es imposible para la mayoría de los restantes seres vivos.

Hasta el momento presente se consideraba que la degradación de esta gran variedad de macromoléculas se lleva a cabo mediante la producción de enzimas extracelulares capaces de degradarlas en sus componentes simples, utilizables ya por las propias mixobacterias u otros microorganismos presentes en su habitat natural.

La información que se tiene, sin embargo, sobre la naturaleza y modo de acción de tales enzimas extracelulares es relativamente escasa y a menudo imprecisa. En la mayoría de los casos, la existencia de tales enzimas se ha deducido simplemente de la capacidad mayor o menor de las distintas mixobacterias para crecer en

medios en las que las citadas macromoléculas constituían la única fuente de carbono o nitrógeno o de ensayos semicuantitativos sobre la solubilización de las mismas cuando se incorporan al medio en que se hacen crecer. Tal es el caso por ejemplo de la utilización de la celulosa por algunas mixobacterias productoras de cuerpos fructificantes (Imsencki y Solntzeva, 1937; Krzemienicwski y Siveryn, 1937; Mishustin, 1938) o pertenecientes a los géneros Cytophaga o Sporocytophaga (Stanier, 1942; Clermont-Beaugiraud et al., 1970); la de ADN y ARN por M. virescens (Norén, 1955 a); agar (Beebe, 1943; Oetker, et al., 1953; Shilo, 1970); almidón por especies de la familia Myxococcaceae (Jahn, 1939; Solntzeva, 1940; Beebe, 1943; Kühlwein, 1950; Oetker, 1953; Clark, 1954); glucógeno por M. fulvus (Solntzeva, 1940) y M. xanthus (Dworkin, 1962); quitina por Cytophaga (Ensign y Wolfe, 1965; Okafor, 1967); mananos y xilanos (Clermont-Beaugiraud, et al., 1970); etc.

Diferente es el caso en lo tocante a enzimas proteolíticos cuya producción es común a todas las mixobacterias y que son capaces de atacar desde proteínas tan difícilmente degradables como las queratinas de las plumas o lanas (Morris, 1969) a otras tan simples como la albumina (Ensign y Wolfe, 1965) y gelatina (Harcke, et al., 1971), pasando por cromoproteidos como la hemoglobina (Gillespie y Cook, 1965) o fosfoproteidos como la caseína (Haská y Norén, 1967; Whitaker, et al., 1965; etc.).

La razón de que los enzimas proteolíticos extracelulares hayan sido estudiados algo más a fondo que los restantes deriva del hecho de que, desde antiguo y como luego se detallará, la capacidad proteolítica de las mixobacterias ha venido considerándose íntimamente ligada con la capacidad lítica que muestran la mayoría de estas bacterias frente a otros microorganismos, característica ésta la más llamativa de las mixobacterias y a la que han prestado una mayor atención los autores que se han ocupado del estudio fisiológico de las mismas. Hasta tal punto es cierto lo anteriormente dicho, que incluso se ha propuesto (Singh, 1947) dividir las mixobacterias en dos grandes grupos: aquéllas capaces de llevar a cabo una descomposición parcial o total de la celulosa y aquéllas otras capaces de atacar células muertas o vivas de bacterias y desarrollarse normalmente cuando estas células constituyen su único alimento.

Singh propuso para este segundo grupo el término de "mixobacterias bacteriolíticas", aunque hay que hacer notar que su acción lítica no se detiene a nivel de las bacterias, sino que alcanza hongos filamentosos y levaduras (Margalith, 1962; Hüttermann, 1969), algas verde-azuladas (Shilo, 1970) e incluso nemátodos (Katznelson et al., 1964).

Aunque la separación de las mixobacterias en los dos grupos citados no es especialmente afortunada ya que ambos se solapan, de manera que muchas bacterias celulolíticas son también bacteriolíticas y viceversa, el hecho de que se haya propuesto, dá idea de la importancia que se concede a la capacidad lítica de las mixobacterias y lo mucho que dicho carácter ha llamado la atención, como queda dicho, de los diversos autores.

La demostración de la capacidad de las mixobacterias para lisar otras bacterias y crecer a expensas de sus productos de degradación se remonta a 1913, fecha en que Pinoy (1913) describió cómo una raza de Chondromyces crocatus era capaz de lisar y crecer sobre una suspensión espesa de un Micrococcus sp. Desde entonces y hasta la fecha se ha podido demostrar que las mixobacterias, como conjunto, son capaces de lisar un enorme número de otros microorganismos, tanto vivos como muertos.

El tipo y número de los microorganismos susceptibles de ser lisados sólo tienen un interés marginal en esta Tesis, por lo que se prescinde de citar individualmente los distintos trabajos que tratan del tema y se remite al lector a las revisiones de Stolp y Starr (1965), Dworkin (1966), Strominger y Ghuysen (1967); así como a los trabajos de Hüttermann et al. (Hüttermann, 1969; Hüttermann y Kühlwein, 1969; Harcke, Hüttermann y Hühlwein, 1971) y Haská (1971) y a las referencias en ellos citadas.

Baste decir que, dejando aparte su acción sobre otros organismos, las mixobacterias son capaces de lisar una enorme variedad de eubacterias tanto Gram positivas como negativas y no sólomente muertas sino vivas, hasta el punto de que el método que da mejor resultado a la hora de aislar mixobacterias consiste en depositar partículas de suelo u otro material adecuado sobre placas con un agar mineral base sobre el que se ha extendido una suspensión espesa de --

eubacterias intactas (Singh, 1947), ya que ha sido demostrado que crecen y fructifican mejor en presencia de células vivas.

En las condiciones citadas las mixobacterias originan el crecimiento y fructificación característicos del Orden, originando al mismo tiempo un halo de lisis en las eubacterias empleadas como sustrato. Halo de lisis que en la mayoría de los casos coincide exactamente con el de crecimiento de la mixobacteria, lo que está de acuerdo con el hecho demostrado (Oetker, 1953; Norén, 1960 a) de que para que una mixobacteria pueda lisar "in vivo" a una eubacteria, especialmente Gram negativa, es necesario que exista un contacto físico entre ambas.

¿Cual es el mecanismo por el que se lleva a cabo la lisis de las eubacterias?. Indudablemente tiene que estar mediada por enzimas producidos por las mixobacterias, capaces de destruir la pared celular de las bacterias y posteriormente disgregar el citoplasma de las mismas.

Ahora bien, los esfuerzos hechos para demostrar la presencia de enzimas líticos en sobrenadantes de cultivos de mixobacterias no sólo han dado escaso fruto sino que a menudo se contradicen unos a otros, debido quizás a que las condiciones en que se han llevado a cabo los cultivos de mixobacterias y los ensayos de las actividades enzimáticas de los sobrenadantes, así como el estado fisiológico de las eubacterias empleadas en las pruebas de bacteriolisis, han sido generalmente muy diferentes de unos autores a otros.

Aún cuando al hablar de la mixobacteria -M. xanthus- sobre la que se han llevado a cabo los trabajos que constituyen esta Tesis, se volverá a insistir sobre lo conocido hasta el momento acerca de los enzimas encontrados en los sobrenadantes de sus cultivos, conviene citar aquí que la acción lítica de los mismos es totalmente distinta según se prueben frente a bacterias Gram negativas o positivas.

En el caso de bacterias Gram negativas vivas, los efectos líticos de los sobrenadantes han sido uniformemente nulos (Dworkin, 1966), ya que aunque Norén (1960 b), afirmó haber demostrado la existencia de una lisina, en concentrados de sobrenadantes de M. virescens, activa frente a células intactas de Aerobacter aerogenes,

su afirmación es muy dudosa, dadas las condiciones, que se describirán más tarde, en que llevó a cabo sus ensayos.

Lo que no ofrece duda, en cambio, es que los sobrenadantes de mixobacterias son capaces de producir la lisis de bacterias Gram negativas muertas por diversos procedimientos: autoclavado (Singh, 1947; Oxford, 1947; Norén, 1953 a, 1955 b y 1960 b; Bender, 1962), congelación y calentamiento (Norén, 1960 b), tratamientos con EDTA (Gillespie y Cook, 1965), tratamientos con butanol (Bender, 1962), etc. Esta capacidad ha llevado a hablar de la existencia en los sobrenadantes de un factor o factores líticos de la pared celular de bacterias Gram negativas. No obstante, como se da la circunstancia, de una parte, que todos los tratamientos citados originan alteraciones más o menos profundas en la pared celular y, de otra, que los sobrenadantes de las mixobacterias poseen, como hemos ya citado, una fuerte acción proteolítica, ha surgido la duda de si realmente las mixobacterias producen lisinas activas frente a estas bacterias o bien la lisis de las mismas es una consecuencia de la acción de las proteasas al actuar sobre las células ya alteradas. Las experiencias de Margalith (1962), que demuestran una perfecta correlación entre las actividades proteolíticas y líticas del M. fulvus sobre células Gram negativas autoclavadas parecen confirmar esta idea.

En relación con bacterias Gram positivas, los resultados son algo más alentadores, ya que, a más de un sistema de enzimas proteolíticos, se ha podido demostrar la presencia de lisinas, fácilmente separables y diferenciables de las primeras, que destruyen el mucopéptido de la pared celular bacteriana. No obstante, el número de mixobacterias estudiadas en que se ha demostrado la existencia de lisinas es muy limitado. Dejando aparte los casos del M. xanthus y M. virescens de que luego se hablará más detalladamente, Ensign y Wolfe (1965 y 1966) encontraron un exoenzima en cultivos de Cytophaga sp. capaz de lisar paredes celulares y células vivas de Arthrobacter crystallopoietes; igualmente, Gillespie y Cook (1965) encontraron que una raza de Sorangium sp. producía un enzima capaz de lisar igualmente células intactas o calentadas de Arthrobacter; y más recientemente, se ha descrito un exoenzima producido por Archangium violaceum (Hüttermann y Kühlwein, 1969; Hüttermann, 1969) y otro por Chondrococcus coralloides, (Harcke et al., 1971), ambos activos frente a células de Micrococcus lysodeikticus muertas por el calor y desecadas.

En todos los casos las lisinas parecen actuar a nivel del mucopéptido de la pared celular de las bacterias atacadas, con una acción amidásica en el caso del enzima producido por Cytophaga (Ensing y Wolfe, 1965) y del tipo de la lisozima en los restantes casos descritos.

Resumiendo todo lo anteriormente expuesto, se encuentra que diferentes mixobacterias producen exoenzimas con acción proteolítica, a más de un sistema enzimático lítico capaz de actuar sobre el mucopéptido de las paredes celulares bacterianas, totalmente ineficaz frente a bacterias Gram negativas y activo frente algunas Gram positivas.

Esto deja prácticamente en pie la pregunta que se planteaba anteriormente de cómo las mixobacterias son capaces de lisar "in vivo" todo tipo de eubacterias intactas.

Una hipótesis propuesta consiste en suponer que las mixobacterias producen una o varias sustancias de naturaleza antibiótica capaces de matar a las eubacterias y simultáneamente modificar sus estructuras externas, con lo cual sería ya posible la acción de lisinas y proteasas que consumarían la lisis (Margalith, 1962; Norén, 1953 b). Ahora bien, si esto fuera así habría que suponer que dichos antibióticos serían sumamente lábiles o poco difusibles, ya que no son capaces de ejercer su hipotética acción en los sobrenadantes.

De otra parte, aunque se ha podido demostrar la producción de antibióticos por algunas mixobacterias, activos especialmente frente a Gram positivas (Norén, 1953 b; Norén y Raper, 1962) no parece existir relación alguna entre dicha producción y la lisis de eubacterias (Bender, 1962; Margalith, 1962; Norén y Raper, 1962). Esta hipótesis, por tanto, está hoy día desechada.

Mucho más probable es la hipótesis que atribuye la lisis bacteriana a la acción conjunta de los enzimas hasta ahora citados y de una o varias lipasas, cuya presencia no ha sido demostrada hasta ahora en los cultivos de ninguna mixobacteria (Dworkin, 1966; -- Harcke et al., 1971). La hipótesis se basa en una serie de pruebas indirectas: en los casos antes citados en los que ha sido posible demostrar la presencia de lisinas en los sobrenadantes, éstas sólo son

activas frente a bacterias que presentan en su pared un mínimo de material lipídico (Hart y Zahler, 1966; Harcke, et al., 1971; Haská, 1971) como sucede en el caso del Micrococcus lysodeikticus, cuya red de mucopéptidos carece por ello de protección frente al ataque de las citadas lisinas; por el contrario, en otras bacterias, especialmente en el caso de Gram negativas, la red de mucopéptido está protegida por una matriz compuesta fundamentalmente de lipoproteínas y lipopolisacáridos, por lo que es totalmente lógico que, al menos dicha matriz esté parcial o totalmente alterada, no puedan actuar las lisinas sobre el mucopéptido y, en consecuencia, las bacterias no sean afectadas por los exoenzimas hasta ahora demostrados. El hecho de que cuando los lípidos complejos de la pared celular de bacterias Gram negativas se descomponen y extraen por tratamiento con butanol (Bender, 1962) los exoenzimas sean ya capaces de originar la lisis de las citadas bacterias, aboga en favor de esta hipótesis.

Ahora bien, como ha quedado dicho, hasta el momento no ha podido ser demostrada actividad lipásica alguna en cultivos de mixobacterias. Para obviar esta dificultad en relación con la hipótesis que se está exponiendo, Harcke et al. (1971), suponen que las hipotéticas lipasas son sumamente inestables y, por tanto, no se pueden demostrar en los sobrenadantes, o bien, que las mismas sólo se producen cuando el contacto físico de la mixobacteria con un sustrato sólido -que ellos identifican con el agar de los medios artificiales- desreprime su producción.

Las explicaciones, como puede verse, son un poco rebuscadas y, por supuesto, no soportadas por ningún hecho experimental.

Mucho más lógico -y en esta dirección se ha proyectado el plan de trabajo de esta Tesis- es suponer que, supuesto que está demostrado, como se ha dicho, (Oetker, 1953; Norén, 1960 a) que para que una mixobacteria pueda lisar "in vivo" a otra bacteria, especialmente Gram negativa, es necesario que exista contacto físico entre ambas, la bacteriolisis es el resultado de la acción conjunta de dos tipos de enzimas: unos, epicelulares, no difusibles en el medio que iniciarían el ataque de las células bacterianas intactas y otros, los extracelulares ya descritos, que llevarían a término la lisis de las mismas. Esto explicaría, como ha sugerido Dworkin (1966), la ausencia de lipasas en los sobrenadantes al estar unidas a estructuras celulares.

Como quiera que sea, es indudable que el mecanismo por el cual las mixobacterias lisan las eubacterias vivas, salvo en los casos excepcionales que se han citado, dista mucho de estar aclarado o lo que es lo mismo: los enzimas que intervienen en dicha lisis y en la utilización de los productos liberados en la misma apenas se conocen.

Por tanto, el estudio de tales enzimas presenta un alto interés científico dentro del campo de la Microbiología y es por ello que los trabajos que constituyen esta Tesis Doctoral han sido planteados para contribuir, en la medida de lo posible, al esclarecimiento de los problemas que se han expuesto.

Como organismo objeto de estudio se ha elegido el M. xanthus, de una parte, porque es una de las mixobacterias más frecuentemente encontradas en el suelo y, de otra, porque la mayoría de los últimos trabajos sobre las actividades líticas de las mixobacterias han sido llevados a cabo sobre esta especie o la muy emparentada M. virescens. Independientemente de ello, se poseía ya cierta experiencia en nuestro laboratorio sobre esta mixobacteria desde los trabajos de Callao et al. (1966) sobre el efecto de su presencia en suelos sobre los fijadores aerobios de nitrógeno no simbióticos.

De acuerdo con el Bergey's Manual el M. xanthus se encuadra dentro del género Myxococcus, perteneciente a la familia Myxococcaceae, caracterizado por presentar microquistes esféricos con una pared bien diferenciada, no englobados en macroquistes, pero agrupados para dar cuerpos fructificantes bien diferenciados y deliquescentes. Dentro del citado género, el M. xanthus se diferencia por presentar microquistes con un diámetro de unas 2 μ , agrupados en cuerpos fructificantes sin tallo y de un color naranja brillante. En cuanto a su habitat se describe como estiércoles donde existen células bacterianas en descomposición; no obstante, nosotros lo hemos aislado sistemáticamente de todos los suelos de la región andaluza que se han ensayado.

De acuerdo con la citada clave sistemática, la única diferencia con el M. virescens reside en que los cuerpos fructificantes de este último son de color amarillo, por lo que realmente, en tanto no existan otros criterios de diferenciación, se pueden considerar como

variedades de una misma especie, diferentes sólomente en lo tocante a la naturaleza de los pigmentos carotenoides presentes en sus células.

En relación con los enzimas extracelulares producidos por M. xanthus y M. virescens, todos los autores que a continuación se citan están de acuerdo en considerar que están constituidos al menos por la mezcla de un componente proteolítico y un factor lítico de la pared celular de las eubacterias.

Norén (1960 b) fué el primer autor que se interesó por los efectos líticos de sobrenadantes de M. virescens sobre células intactas y muertas por diferentes procedimientos, llegando a la conclusión que, aunque la actividad primaria de los citados sobrenadantes o de sus fraccionados era proteolítica, también poseían una cierta acción bacteriolítica sobre células intactas de A. aerogenes y B. subtilis. No obstante, se consideran sus resultados francamente dudosos, ya que la citada actividad lítica sobre células intactas sólo era detectable al cabo de varios días (30 % de disminución de la turbidez de las suspensiones a los 5 días y 50 % a los 8 días), tiempo en el que es perfectamente lógico que tengan lugar fenómenos espontáneos de muerte y autólisis. La acción lítica sobre células autoclavadas o muertas por congelación y calentamiento sí muestran, en cambio, una correlación perfecta con la actividad proteolítica de los sobrenadantes. Norén, por tanto, propuso que la lisis de las bacterias intactas se debía a una primera alteración de la pared celular por un factor lítico, seguida de la acción de los enzimas proteolíticos.

Bender (1962) caracterizó en los sobrenadantes de M. xanthus dos actividades enzimáticas con características proteolítica y lítica, respectivamente, y a más de determinar su producción en relación con el medio de cultivo, edad del mismo, temperatura, pH, etc. determinó los efectos de ambos sistemas enzimáticos sobre bacterias Gram negativas, denaturalizadas por el calor, así como sobre Gram positivas y negativas vivas, llegando a la conclusión de que lisaban las Gram positivas casi por completo, a diferencia de lo que ocurría con Gram negativas que necesitaban para ello ser autoclavadas o bien desprovistas de lipoproteínas mediante tratamientos con butanol. Una vez más, se encontró al lado de una actividad proteolítica perfectamente demostrada, otra lítica dudosa sobre células intactas, ya que es aleatorio que los microorganismos empleados en las deter

minaciones -B. subtilis tratado con azul alciano durante 30 minutos a 40°- fueran viables.

Es de hacer notar que, de acuerdo con Bender, la supuesta lisina no liberaba N - acetilaminoazúcares a partir de paredes celulares bacterianas, por lo que llegó a la conclusión de que se trataba de un enzima de tipo distinto a la lisozima.

En 1966, sin embargo, Hart y Zahler trabajando con sobrenadantes de la raza FBa de M. xanthus lograron no sólo demostrar una actividad proteolítica y otra lítica, sino también separarlas parcialmente por filtración en geles. La lisina aislada por los citados autores sólo fué activa sobre bacterias vivas Gram positivas sensibles a la acción de la lisozima -M. lysodeikticus, S. lutea y B. subtilis, en orden decreciente- y en presencia de paredes celulares de M. lysodeikticus liberó N -acetilaminoazúcares al igual que ésta. Como en los casos anteriores, los autores consideraron que a la hora de la lisis es fundamental la acción de la lisina sobre el mucopéptido y que la o las proteasas sólo intervienen en la desintegración posterior del citoplasma bacteriano.

Haská y Norén (1967) han insistido en la búsqueda de enzimas líticos, activos frente a Gram negativas, en sobrenadantes de M. virescens, pero sin resultado alguno, ya que sólo consiguieron poner de manifiesto una intensa actividad proteolítica y la consecuente acción lítica sobre células autoclavadas.

Finalmente, y para completar esta breve revisión -el material bibliográfico disponible sobre el tema es muy escaso- debe citarse que, a más de unas notas preliminares de Sudo y Dworkin (1968 y 1970) en la que estudian la separación de los enzimas líticos de sobrenadantes de M. xanthus, Haská y Stahl (1971) han demostrado también la existencia en sobrenadantes de M. virescens de una lisina capaz de lisar células vivas de M. lysodeikticus, diferenciable de las proteasas usuales porque su aparición en los medios es anterior a la de estas últimas. Igualmente, Haská (1971) ha conseguido separar y purificar claramente a partir de sobrenadantes de M. xanthus, por precipitación fraccionada con acetona y cromatografía en columna de carboximetilcelulosa, otra lisina con el mismo tipo de acción que la descrita por Hart y Zahler (1966) y a la que atribuye el mismo papel ya citado.

Así pues y de acuerdo con lo expuesto, se encuentra, resumiendo los trabajos efectuados hasta la fecha sobre M. xanthus y M. virescens, que parece demostrado que en los sobrenadantes de sus cultivos puede demostrarse un sistema lítico, al parecer constituido por un enzima con un tipo de acción muy parecido al de la lisozima, capaz de originar la lisis de bacterias Gram positivas intactas -aunque sólomente de aquéllas sensibles a la lisozima- y un sistema proteolítico, al parecer complejo (Haská, 1971), que sería el responsable de la desintegración del citoplasma en células en las que su pared celular estuviera previamente alterada por la citada lisina. Si se admiten los resultados de Bender (1962) habría que añadir al sistema lítico otra lisina de tipo distinto a la lisozima.

En cuanto al hecho de la ausencia total en sobrenadantes de actividad lítica frente a bacterias Gram negativas y frente a aquéllas otras Gram positivas no sensibles a la acción de la lisozima, todos los autores citados la atribuyen a que las restantes estructuras de la pared celular que poseen estas bacterias impiden a la lisina ponerse en contacto con el mucopéptido y, por tanto, bloquean su acción, a menos de que dichas estructuras estén más o menos profundamente alteradas por la acción de los agentes físicos o químicos citados.

Dado que en la naturaleza, ésto no ocurre así y que como ya se ha citado antes para las mixobacterias en general, el M. xanthus es capaz de lisar perfectamente bacterias Gram positivas y negativas y crecer exclusivamente a expensas de los productos liberados en dicha lisis, es indudable que la citada bacteria debe de producir no sólo los enzimas descritos hasta la fecha, sino en adición, todos los necesarios para que sea posible la lisis completa de todos los tipos de eubacterias sobre las cuales es activa.

Así pues, se ha creído interesante, como se dijo anteriormente, contribuir al esclarecimiento de este problema mediante un estudio de los distintos enzimas producidos por el M. xanthus, con determinación de su actividad y de la posible contribución de cada uno de ellos a los fenómenos de lisis bacteriana.

Como se verá en el capítulo de experiencias y resultados, el problema se ha abordado desde dos puntos de vista fundamentales:

- a) Estudio de los enzimas extracelulares demostrables en sobrenadantes de cultivos de M. xanthus; y
- b) Demostración y estudio de posibles enzimas epicelulares unidos a estructuras externas del M. xanthus y no difusibles, por tanto, en el medio.

En relación con la primera parte del trabajo, se han estudiado las actividades proteolíticas, líticas, lipolíticas y amilolíticas de los sobrenadantes, desde un punto de vista cuali o semicuantitativo en unos casos, y cuantitativamente por lo que respecta a las actividades proteolíticas y líticas.

Se ha estudiado, igualmente, la influencia de las condiciones de cultivo y de los diferentes sustratos presentes en el mismo sobre la producción de los dos sistemas enzimáticos citados y, finalmente, se han separado y purificado las distintas proteínas con actividades enzimáticas del tipo indicado.

En cuanto a la segunda parte, se ha tratado con éxito de poner de manifiesto enzimas unidos a estructuras del M. xanthus mediante diversos procedimientos de extracción; se ha determinado el tipo de actividad enzimática que poseen y se han separado y purificado, al menos parcialmente.

Como colofón de estas dos partes fundamentales, se han estudiado los efectos de los enzimas extraídos, sobre bacterias Gram positivas y negativas vivas, habiéndose obtenido resultados francamente alentadores, que pueden constituir un punto de partida muy adecuado para futuras investigaciones en relación con el problema del mecanismo de la acción lítica de las mixobacterias.

Finalmente, y aunque no entraba de lleno en el tema de esta Tesis, se ha determinado, con resultados negativos, la posible producción de antibióticos por el M. xanthus, por si éstos pudieran influir de alguna manera sobre los procesos de lisis.

Mycobacterium xenopus

En todas las experimentaciones que se exponen en este trabajo hemos empleado una raza de M. xenopus aislada en nuestro laboratorio mediante la técnica de King (1957) que se describe más adelante.

En esta raza, al igual que las restantes aisladas en nuestro laboratorio y que se describen a continuación, las características de acuerdo con las claves sistemáticas del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957).

Bacteriología

Empleado para el aislamiento de micobacterias y detección de las actividades lípicas del M. xenopus.

MATERIAL Y METODOS

Atopobacter aerogenes

Empleado para el aislamiento de micobacterias y detección de las actividades lípicas del M. xenopus.

La raza fue aislada, al igual que en el caso anterior, de heces humanas.

Staphylococcus aureus

No se empleó para la detección de las actividades lípicas del M. xenopus y fue aislado a partir de un cultivo humano.

Patente de invención

Empleado igualmente para la detección de las actividades lípicas.

1. - MICROORGANISMOS.

Myxococcus xanthus

En todas las experiencias que se exponen en este trabajo hemos empleado una raza de M. xanthus aislada en nuestro laboratorio mediante la técnica de Sing (1947) que se describe más adelante.

Esta raza, al igual que las restantes aisladas en nuestro laboratorio y que se describen a continuación, fué caracterizada de acuerdo con las claves sistemáticas del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957).

Escherichia coli

Empleado para el aislamiento de mixobacterias y detección de las actividades líticas del M. xanthus.

Se ha utilizado una raza aislada en nuestro laboratorio a partir de heces fecales humanas.

Aerobacter aerogenes

Empleado para el aislamiento de mixobacterias y detección de actividades líticas del M. xanthus.

La raza fué aislada, al igual que en el caso anterior, de heces humanas.

Staphylococcus aureus

Ha sido empleado para la detección de las actividades líticas del M. xanthus y fué aislado a partir de un forúnculo humano.

Proteus mirabilis

Empleado igualmente para la detección de las actividades líti-

cas del M. xanthus, procede de la colección de microorganismos de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, Granada.

Micrococcus lysodeikticus La 1000

Ha sido empleado para el mismo objeto que las dos eubacterias anteriormente citadas y nos fué suministrado por el "International Center for Information on and Distribution of Type - Cultures". Lausanne.

Bacillus subtilis

Ha sido empleado con el mismo objeto que los anteriores y procede de la colección de microorganismos de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, Granada.

2. - MEDIOS DE CULTIVO.

2.1. - Medios de conservación.

Agar común blando. - Utilizado para el crecimiento de las eubacterias empleadas, responde a la siguiente composición:

peptona	10 g
cloruro sódico	5 g
extracto de carne Bovril	3 g
agar	8 g
agua del grifo	1000 ml
pH 7.2	

Como en todos los casos que siguen, el medio se esterilizó al autoclave en las condiciones usuales.

Agar levadura. - Empleado para el mantenimiento y conservación del M. xanthus, responde a la siguiente composición:

levadura prensada de panadería	10 g
agar	20 g
agua	1000 ml
pH 7,2	

En este medio el M. xanthus crece rápidamente produciendo abundantes cuerpos fructificantes, viables incluso después de seis meses.

2.2. - Medios de crecimiento.

Agar común. - Empleado para el crecimiento y obtención de masas de eubacterias. 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 del M. lysodeikticus La 1000. Es el medio B/10 de Hüttermann (1969) algo modificado y con la siguiente composición:

bacto - casitone Difco	1 g
extracto de carne Bovril	1 g
extracto de levadura	5 g
glucosa	10 g
agar	20 g
agua	1000 ml

pH 7,4; ajustado con una solución de KOH al 10 %.

Medio para la obtención de inóculos de M. xanthus. - Se empleó el mismo agar - levadura descrito anteriormente.

2.3. - Medios empleados en la investigación de los enzimas producidos por el M. xanthus.

Medio M - 1. - Suspensión de células lavadas de A. aerogenes o P. mirabilis en solución salina estéril a concentración de 2×10^{10} células/ml.

Medio M - 2. - Idéntico al anterior pero autoclavado a 120° durante 20 minutos.

Medio M - 3. - Es el medio N III B de Norén (1955, a) con la siguiente composición:

fosfato dipotásico	2 g
cloruro sódico	1 g
sulfato magnésico hidratado	100 mg
cloruro cálcico cristalizado	10 mg
sulfato de manganeso	1 mg
cittrato férrico	3 mg
asparagina	2,5 g
hidrolizado ácido de caseina (Difco)	5 g
agua	1000 ml

pH 7,2

Medio M - 4. - Modificación del medio N III B de Norén (1955, a) por sustitución del hidrolizado ácido de caseina por caseina (Doesder) a la misma concentración.

Medio M - 5. - Modificación del medio M - 3 por sustitución del hidrolizado ácido de caseina por peptona al 2 %.

Medio M - 6. - Modificación del medio M - 3 por sustitución del hidrolizado ácido de caseina por hidrolizado enzimático (Casitone, Difco) a la misma concentración.

Medio M - 7. - Igual al medio M - 4 pero añadido de 1×10^{10} células/ml de P. mirabilis antes de someterlo a la esterilización.

Medio M - 8. - Igual al medio M - 4 pero complementado con células de St. aureus a la misma concentración y condiciones que en el caso del medio M - 7.

Medio M - 9. - Igual al medio M - 7 más glucosa al 1 %.

2.4. - Medios especiales.

Agar - salino base. - Empleado en el aislamiento del M. xanthus y como soporte para suspensiones de las eubacterias frente a las que se ha ensayado la actividad lítica del M. xanthus por la técnica de Norén (1964) que se describe a continuación. También ha sido utilizado en las determinaciones de la producción de antibióticos por el M. xanthus. Sólo difiere del anterior en que carece de caseina.

Agar - caseina. - Empleado para la determinación semicuantita-

tiva de la actividad proteolítica del M. xanthus y con la siguiente composición:

fosfato sódico dibásico	2 g
cloruro sódico	1 g
sulfato magnésico hidratado	100 mg
cloruro cálcico cristalizado	10 mg
sulfato de manganeso	1 mg
cittrato férrico	3 mg
caseína	10 g
agar	20 g
agua	1000 ml

pH 7,2

Agar - caseína - eubacterias. - Empleado para la determinación semicuantitativa de la actividad lítica del M. xanthus sobre eubacterias muertas por el calor, y de la siguiente composición:

bacterias húmedas procedentes de un cultivo de 24 horas	1 g
Agar - caseína	1000 ml

pH 7,2

Las bacterias se mezclaron homogéneamente con el agar previamente fundido, y a continuación, el medio fué autoclavado en la forma usual.

Agar común con P³². - Utilizado para la obtención de eubacterias con el citado marcador, se preparó añadiendo al agar común la cantidad apropiada de fosfato sódico marcado con P³² hasta obtener en el medio la concentración de 0,25 μ C/ml.

Agar B/10 con P³². - Empleado con el mismo fin que el anterior en el caso de células marcadas de M. lysodeikticus La 1000.

Agar - aceite de oliva. - Empleado para la determinación cualitativa de la actividad lipolítica del M. xanthus:

agar - levadura	100 ml
aceite de oliva neutro	2,5 ml

Para la preparación de este medio el aceite de oliva se esteriliza previamente a 115° durante 20 minutos y se añade en la proporción indicada al agar levadura, fundido y mantenido a 45°; el aceite se emulsiona en el medio por agitación vigorosa y la mezcla se vierte en cajas de Petri que se enfrían rápidamente para evitar al máximo el que se rompa la emulsión.

Agar - almidón. - Empleado para la determinación cualitativa de la actividad amilásica del M. xanthus, se preparó suplementando el agar levadura con un 1 % de almidón soluble.

3. - TECNICAS DE AISLAMIENTO Y CULTIVO.

3.1. - Método de Sing (1947) para el aislamiento de mixobacterias.

Empleado para el aislamiento del M. xanthus utilizado en este trabajo, se lleva a cabo de la siguiente manera:

Cajas de Petri conteniendo una capa de agar - salino base se recubren uniformemente con 0,3 ml de una suspensión espesa de A. aerogenes, procedentes de un cultivo de 24 horas; después de eliminado el exceso de agua por evaporación en la estufa a 37°, se depositan en la superficie, debidamente espaciados, diez granos de suelo pasado por un tamiz de 2 mm de apertura de malla, incubados a continuación a 28° durante 4 - 6 días. Alrededor de los granos de tierra donde existen mixobacterias se producen zonas de lisis de las células bacterianas y posteriormente aparecen los cuerpos fructificantes correspondientes.

En nuestro caso, se tomaron muestras de los cuerpos fructificantes y células vegetativas que por sus características hacían sospechar la presencia de M. xanthus, se suspendieron en solución salina estéril y se diseminaron repetidas veces en agar - levadura. Se volvieron a seleccionar las colonias con las características de M. xanthus y después de asegurarnos de la ausencia de otros tipos de bacterias se procedió a confirmar su identidad.

3.2. - Conservación del Myxococcus xanthus.

Se ha realizado por siembras periódicas cada 15 días en tubos inclinados de agar-levadura. Después de inoculados los tubos se incubaron 3 días a 28° y a continuación se conservaron en la oscuridad a una temperatura aproximadamente de 10°.

3.3. - Mantenimiento de las eubacterias empleadas.

Se ha llevado a cabo por siembras en picadura en agar-común blando; incubación a 37° y posterior conservación a 10° en la oscuridad. Al igual que el M.xanthus fueron resembradas cada 15 días.

3.4. - Obtención de masas de eubacterias.

Las eubacterias, utilizadas tanto como sustrato alimenticio para el M. xanthus como para las determinaciones enzimáticas que se describirán posteriormente, fueron obtenidas normalmente por cultivo en frascos de Roux de 1000 ml, conteniendo 125 ml de agar-común. La inoculación, el cultivo y recolección se efectuaron por las técnicas ordinarias excepto en algunos casos que oportunamente se especificarán.

3.5. - Obtención de inóculos de M. xanthus.

Los inóculos de M. xanthus empleados en la siembra de los medios utilizados para la obtención de los diversos enzimas ensayados se prepararon de la manera siguiente:

Se partió de cultivos de M. xanthus en tubos de agar-levadura, incubados a 28° durante 3 - 4 días, en estos tubos el M. xanthus se presenta en plena fructificación y se hizo una suspensión espesa y homogénea en solución salina estéril (1 tubo agar: 1 ml de solución salina). Es importante el conseguir una buena homogeneización, para dispersar las células vegetativas y producir la disgregación de los cuerpos fructificantes a fin de conseguir la liberación de los microquistes.

3.6. - Cultivos en agitación de M. xanthus.

Los cultivos en agitación fueron realizados en matraces Erlen

meyer de 250 ml conteniendo 40 ml de medio. Los matraces fueron inoculados con 0,3 ml de una suspensión de M. xanthus e incubados a 28° con agitación continua.

El tiempo de incubación varió con el tipo de experiencias y -- vendrá señalado en el capítulo de resultados.

3.7. - Cultivos estáticos de M. xanthus.

Los cultivos estáticos fueron realizados en frascos de Roux de 1000 ml, conteniendo 125 ml de medio; fueron inoculados con 1 ml del inóculo de M. xanthus y se incubaron a 28°, durante un tiempo variable según la experiencia.

Esta técnica de cultivo ha sido, prácticamente, la única utilizada, ya que de una parte, la raza de M. xanthus empleada no crece en forma dispersa en medios líquidos y, de otra, los niveles de todo tipo de actividades enzimáticas ensayadas fué siempre superior, como se expondrá en su momento, en cultivos de este tipo.

4. - TECNICAS EMPLEADAS EN LA DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

4.1. - Determinación cualitativa de la actividad lítica del M. xanthus sobre bacterias vivas.

Esta técnica fué utilizada para la medida del poder lítico del M. xanthus frente a distintas eubacterias vivas.

Se llevó a cabo de acuerdo con el método de Norén (1964):

Sobre la superficie de cajas de Petri conteniendo una capa de agar-salino base se trazan dos estrías, de un tamaño aproximado - cada una de 40 x 4 mm, mediante un asa de platino impregnada con una suspensión de células vivas de cada una de las eubacterias a ensayar; y posteriormente se deposita hacia la mitad de cada estría - - 0,01 ml de una suspensión de M. xanthus; las cajas se incuban 4 días a 28°. Transcurrido este tiempo puede medirse la longitud de la zona producida por el M. xanthus frente a las distintas eubacterias.

Una variante del método, introducida por nosotros, consiste en recubrir uniformemente la superficie de las placas con una suspensión espesa de células vivas de la eubacteria ensayada en cada caso y, después de eliminar el exceso de agua, depositar sobre ella 3 ó 4 "confetti" de papel de filtro de 4 mm de diámetro, impregnados -- con una suspensión de M. xanthus obtenida de la forma ya reseñada. Se incuban a 28° durante 4 días y el diámetro del halo de lisis producido alrededor de los "confetti" se toma como índice del mayor o menor poder lítico del M. xanthus frente a las eubacterias en cuestión.

4.2. - Determinación semicuantitativa de la actividad proteolítica.

Ha sido empleada para la medida de la actividad proteolítica del M. xanthus utilizando caseína como sustrato nitrogenado.

Para llevar a cabo esta determinación se montó un método consistente en lo siguiente:

A cajas de Petri de 100 mm de diámetro conteniendo una capa de agar-salino base se añaden 10 ml de agar-caseína. Después de solidificado el agar, las placas se secan en la estufa y a continuación se depositan sobre la superficie del agar-caseína 3-4 "confetti" de 4 mm de diámetro impregnados con una suspensión de M. xanthus, - incubándose a continuación las placas durante 4 días a 28°. Al cabo de este tiempo se mide el diámetro en mm de la zona de crecimiento del M. xanthus y a continuación se tratan las placas con una solución de cloruro mercúrico (cloruro mercúrico 15 g; ácido clorhídrico concentrado 20 ml; agua destilada 100 ml) para investigar la hidrólisis de la caseína (Harrigan y McCance, 1968).

La caseína no hidrolizada precipita con este reactivo, por lo que el diámetro en milímetros de los halos transparentes alrededor de los "confetti" se toma como índice de la actividad proteolítica.

4.3. - Determinación semicuantitativa de la actividad lítica sobre células muertas.

Se llevó a cabo sobre agar-caseína-eubacterias y empleando la misma técnica descrita para el caso anterior.

4.4. - Determinación cualitativa de la actividad amilásica.

Se llevó a cabo en placas de agar almidón, inoculadas con M. xanthus, por el mismo procedimiento usado en el caso anterior y revelando la hidrólisis del almidón por el tratamiento usual con solución de Lugol.

4.5. - Determinación cualitativa de actividades lipolíticas.

Para la investigación cualitativa de actividades lipolíticas de cultivos de M. xanthus se empleó la técnica descrita por Harrigan y McCance (1968) utilizando agar-aceite de oliva y revelando el ácido oleico liberado mediante impregnación del agar con una solución saturada de sulfato de cobre y posterior lavado con agua corriente para eliminar el exceso de reactivo. Las zonas en que ha tenido lugar una esterificación de la grasa aparecen teñidas en un color verde azulado, correspondiente a la sal de cobre del ácido graso liberado.

4.6. - Determinación cuantitativa de la actividad lítica sobre bacterias muertas.

Las determinaciones de la actividad lítica de los sobrenadantes de cultivos de M. xanthus, fracciones de los mismos o extractos de células del citado microorganismo, se llevaron a cabo sobre células autoclavadas de Proteus mirabilis, y sobre células de Micrococcus lysodeikticus desecadas con acetona, de acuerdo con las siguientes técnicas:

4.6.1. - Actividad lítica sobre P. mirabilis autoclavado. - Se empleó el método de Haská y Norén (1967), para lo cual se prepararon suspensiones de P. mirabilis en tampón Tris-ClH, 0,025 M pH 7,5, que se ajustaron a una densidad óptica (DO) de 0.7, medida a 430 nm y frente a un blanco de agua destilada, y posteriormente se autoclavaron a 120° durante 20 minutos. Las suspensiones así preparadas se mantienen estables durante 15 días cuando se conservan en nevera entre 5° y 10°. Para efectuar los ensayos, 1 ml de la preparación enzimática se mezcló con 9 ml de la suspensión de células -- descritas, previamente calentadas a 30°. La (DO) a 430 nm de la mezcla se determinó inmediatamente -tiempo cero- y después de cinco

minutos de incubación a 30°, tomando en ambos casos como blanco agua destilada.

La actividad lítica de la muestra problema se expresó en $(DO)^{-1}$ por minuto y por ml de muestra, y la actividad específica en $(DO)^{-1}$ por minuto y por mg de proteína de la muestra.

4.6.2. - Actividad lítica sobre *M. lysodeikticus* desecado con acetona. - Se empleó el método de Hüttermann (1969), para lo cual se prepararon suspensiones de células de *M. lysodeikticus* desecadas a la acetona (Sigma) en tampón Tris ClH, 0,025 M, pH 7,5 a concentración de 25 mg de células secas por 100 ml de tampón. Para efectuar los ensayos las preparaciones enzimáticas problemas y las suspensiones de células antes citadas -ambas calentadas previamente a 37°- se mezclaron en proporción 1:2. Se procedió a continuación como en el caso anterior, sin más modificaciones que las que afectan a la temperatura de incubación que fué en este caso de 37°, la longitud de onda empleada para medir la (DO) que fué de 530 nm y el intervalo entre las lecturas fué de tres minutos en lugar de cinco.

La actividad lítica se expresó en las mismas unidades que en el caso anterior.

4.7. - Determinación cuantitativa de la actividad lítica sobre bacterias vivas.

La determinación de la actividad lítica de los sobrenadantes de cultivos de *M. xanthus*, de extractos de células del citado microorganismo, o mezclas de ambos sobre bacterias vivas, se llevó a cabo mediante un método original basado en la medida de la radioactividad liberada por las citadas preparaciones enzimáticas al actuar sobre células vivas de *M. lysodeikticus* La 1000, *St. aureus* y *P. mirabilis* crecidas en Agar B/10 o Agar común con P³², según los casos.

La técnica se describe detalladamente en el capítulo siguiente. Para la medida de la radioactividad se utilizó un equipo Philips para la medida de emisores beta, habiendo utilizado un tubo GM con ventana de mica y espesor de 1,5 mg/cm².

4.8. - Determinación cuantitativa de la actividad

proteolítica.

Se lleva a cabo en todos los casos por el método de Haskå y Norén (1967) que a continuación se expone:

Sustrato y preparación del mismo:

Se utilizó caseína según Hammarsten libre de vitaminas de la casa Difco.

La solución de caseína se preparó suspendiendo 6 g de la misma en 100 ml de NaOH 0,05 N e hirviendo la suspensión durante 10 minutos. A la solución fría se añadieron 7,5 ml de mertiolato al 0,1 %, se ajustó a un pH de 7,5 y se añadió agua destilada hasta un total de 300 ml.

Medida de la actividad:

0,5 ml de la solución de caseína se mezclan con 0,5 ml de tampón fosfato 0,2 M a pH 7,5 y 1 ml de la preparación enzimática problema, la mezcla se incuba a 37° durante 20 minutos y transcurrido este tiempo se detiene la reacción añadiendo 6 ml de ácido tricloroacético al 5 % y, después de 30 minutos en reposo, se filtra.

La concentración de los productos originados en la hidrólisis enzimática (calculados como tirosina) se determina midiendo el color formado en presencia de reactivo de fenol: a 1 ml del filtrado se le añaden 5 ml de NaOH 0,4 M y 1,2 ml del reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu (producto comercial de la casa Analema diluido con dos volúmenes de agua). Transcurridos dos minutos se efectúa la lectura en un fotolorímetro Spectronic 20 a 655 nm.

Los blancos se preparan mediante la misma técnica a partir de filtrados de mezclas adicionados de ácido tricloroacético antes de la preparación enzimática.

La actividad se expresó en \bar{u} por ml o por mg de proteínas: una unidad de actividad proteolítica se designó como la cantidad de enzima que libera un miliequivalente (181 mg) de tirosina por minuto utilizando caseína como sustrato.

La curva patrón se preparó empleando soluciones de tirosina -

(Merck) a concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.9. - Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica.

Se ha llevado a cabo por los siguientes tres procedimientos de acuerdo con la distinta naturaleza del sustrato empleado.

4.9.1. - Método de Gomori (1945).

Sustrato y preparación del mismo:

Se mezclan 100 ml de acetato sódico 0,2 N con 50 ml de Tween 20 (Analema) y 100 ml de agua destilada. El pH de la mezcla es aproximadamente de 7.

Este sustrato se puede utilizar durante una semana, aunque el pH va descendiendo gradualmente con el consiguiente incremento en los valores de los blancos.

Medida de la actividad:

5 ml de sustrato se mezclan con 1 ml de la preparación enzimática a ensayar y se incuban en baño maría a 25°. Transcurridos 9 minutos se añaden unas gotas de fenolftaleína (0,1 % en alcohol de 96°) y la mezcla se valora con NaOH 0,02 N, añadida de forma que se alcance el punto final a los 10 minutos exactos de haber mezclado el sustrato con la preparación enzimática.

En cada prueba se incluyen dos blancos que se incuban y valoran en la forma antes citada; uno consistente en la mezcla de 5 ml de agua destilada y 1 ml de la preparación enzimática y otro en la de 5 ml de sustrato con 1 ml de agua destilada.

La diferencia obtenida entre la cantidad de álcali consumido por el problema y la suma de los valores correspondientes a los dos blancos se toma como medida de la actividad lipolítica: 100 unidades de actividad lipásica por cada ml de NaOH 0,02 N consumida.

La actividad se expresó en todos los casos como unidades por

ml de muestra o mg de proteína de la misma.

Como puede observarse hemos modificado la técnica original en el sentido de utilizar como indicador fenolftaleína en lugar de rojo fenol, ya que la experiencia nos ha demostrado que en el primero se visualiza mejor el punto de neutralización.

4.9.2. - Método de Huggins y Lapidés (1955). - Empleado cuando se utilizó el p-nitrofenilacetato. Se utilizó preferentemente para el ensayo de preparaciones con actividades enzimáticas bajas, ya que el p-nitrofenol liberado tiene gran capacidad de coloración lo que aumenta mucho la sensibilidad. No obstante, ha sido utilizado muy raramente por nosotros, ya que realmente lo que se miden con él son actividades esterásicas.

Sustrato y preparación del mismo:

Se disuelven 63 mg de p-nitrofenilacetato (Sigma) en 10 ml de metanol.

Esta solución madre conservada en nevera es estable durante una semana aproximadamente. Inmediatamente antes de cada determinación se prepara la solución de sustrato añadiendo lentamente 1 ml de la solución madre de p-nitrofenilacetato a 100 ml de agua destilada; la adición de la solución madre debe ir acompañada de agitación fuerte para evitar la precipitación del sustrato.

Medida de la actividad:

1 ml de la preparación enzimática se mezcla con 2 ml de tampón fosfato 0,067 M pH 7,0 y 5 ml de agua destilada. La mezcla se efectúa directamente en los tubos del Spectronic 20 donde se va a efectuar la lectura. Los tubos se colocan en baño maría a 25° y transcurrido 1 minuto se les añade a cada uno 2 ml del sustrato. A los 20 minutos se efectúa la lectura en el Spectronic 20 a 400 nm.

Los blancos se preparan de igual forma con la preparación enzimática inactivada por el calor.

La curva patrón se realiza con p-nitrofenol disuelto en tampón fosfato 0,067 M a concentraciones de 0,1 μ M a 1 μ M por ml.

A partir de la curva patrón se determina la cantidad de p-nitrofenol liberado por el enzima y el valor obtenido se multiplica por el factor de dilución de la muestra. La unidad de actividad esterásica se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ M de p-nitrofenol en las condiciones anteriormente expuestas.

4.9.3.- Método de Willstätter et al. (1923). - Se empleó para medir la actividad lipolítica de las preparaciones cuando se utilizaron como sustratos aceite de oliva o lípidos de bacterias Gram negativas.

Sustrato y preparación del mismo:

En 1 litro de agua destilada se suspenden 10 g de alcohol polivinílico, se mezclan bien por agitación y se añaden 5 ml de ClH 0,1 N. La mezcla se calienta de 75° a 85° hasta disolución total (aproximadamente una hora). Se enfría, se filtra y se lleva al pH deseado con NaOH 0,1 N.

A la cantidad apropiada de solución de alcohol polivinílico, se añade aceite de oliva o lípidos bacterianos hasta alcanzar una concentración de 0,1 M y la mezcla se emulsiona por sonicación en un desintegrador M.S.E. durante 20 minutos a 20 Kciclos (Soucek et al. 1970).

Los lípidos bacterianos se obtuvieron a partir de suspensiones de E. coli, procedentes de cultivos de 24 horas, mediante extracción con 2,5 volúmenes de n-butanol durante 18 horas en agitación continua, centrifugación a 5.000 x g durante 30 minutos, recogida de la capa de butanol y eliminación posterior del mismo al vacío.

Para la medida de la actividad lipolítica se mezclan 10 ml de sustrato emulsionado, 5 ml de tampón de McIlvaine (Dawson et al., 1969) y 5 ml de la preparación enzimática. La mezcla se incuba 4 horas a 37° con agitación continua. Al final del período de incubación se añaden 30 ml de una solución de alcohol-acetona (v:v) para detener la reacción enzimática y romper la emulsión. Se añaden unas gotas de fenolftaleina y se valora con NaOH 0,05 N.

Los blancos se preparan y valoran de igual forma, pero con la solución enzimática inactiva por el calor.

La diferencia obtenida entre el álcali consumido por el problema y por el blanco se toma como medida de la actividad: 250 unidades de actividad lipásica por ml de NaOH 0,05 N consumida.

4.10. - Determinación de proteínas totales.

Todas las determinaciones de proteínas se han efectuado por el método de Lowry et al. (1951), usando como patrón albúmina bovina (Sigma).

5. - METODOS EMPLEADOS EN LA EXTRACCION, SEPARACION Y PURIFICACION DE LOS DIVERSOS ENZIMAS ENSAYADOS.

En este capítulo sólo se describen las técnicas utilizadas en la extracción, separación y purificación de los enzimas extracelulares presentes en los sobrenadantes de los cultivos de M. xanthus obtenidos en las condiciones que se especifican en el capítulo de resultados, ya que la extracción y caracterización de los enzimas epiteliales, por constituir parte principal de las conclusiones de esta Tesis estimamos que deben ser incluidos en el capítulo de resultados, excepto lo referente a su separación en columnas de Sephadex o DEAE-celulosa y geles de poliacrilamida, en los que se han seguido las técnicas comunes que se describen en este capítulo.

5.1. - Obtención, concentración y purificación de enzimas extracelulares.

En todos los casos se ha partido de sobrenadantes por centrifugación de los cultivos de M. xanthus a 5.000 x g durante 20 minutos. A partir de este momento todas las manipulaciones posteriores se llevaron a cabo a una temperatura comprendida entre 0° y 5°.

5.1.1. - Precipitación fraccionada con sulfato amónico. - Se llevó a cabo de acuerdo con la técnica ordinaria y en las condiciones que se precisan en el capítulo de resultados.

5.1.2. - Precipitación con acetona. - Se llevó a cabo de acuerdo con la técnica de Hüttermann (1969) empleada por este autor para la purificación de los enzimas extracelulares producidos por Archangium violaceum y consistente en lo siguiente:

A un volumen de sobrenadante enfriado a 4º se añaden lentamente y con agitación continua dos volúmenes de acetona, previamente enfriada a -25º, y la mezcla se deja en reposo durante una noche cuidando de que la temperatura no exceda de 4º. El precipitado resultante se separa por centrifugación a 23.000 x g durante 15 minutos y se disuelve en tampón Tris-ClH (0,025 M, pH 7,5); la parte del precipitado no disuelta se elimina por centrifugación durante 1 hora a 23.000 x g y el sobrenadante que contiene los enzimas extracelulares precipitados no desnaturalizados, se sometió directamente a un fraccionamiento en columna o bien, en algunas ocasiones, se sometió previamente a una precipitación fraccionada, en las condiciones señaladas, con acetona al 30, 50 y 66 por ciento (v:v).

5.1.3. - Fraccionamiento en columnas de Sephadex. - Se utilizó Sephadex G-200 de Pharmacia Fine Chemical y columnas de 100 x 25 también de Pharmacia Fine Chemicals. En el fraccionamiento se emplearon dos métodos de separación: filtración en columna con flujo normal y filtración en columna con flujo invertido.

5.1.3.1. - Filtración con flujo normal.

Preparación de las columnas. - A la cantidad adecuada de Sephadex G-200 dispuesta en un matraz Kitasato, se añadió un exceso del tampón empleado posteriormente como eluyente. La mezcla se sometió a un tratamiento al baño maría hirviente durante 5 horas, al objeto de asegurar una buena hidratación del Sephadex, y a continuación después de enfriada, se sometió a un vacío de 0,01 mm de mercurio para eliminar, en lo posible, los gases englobados o disueltos en el gel.

Con el gel así preparado, se llenaron las columnas de las dimensiones antes citadas mediante las técnicas ordinarias. Una vez preparada la columna se enfría a 4º antes de su utilización.

Aplicación de la muestra. - Con objeto de evitar en lo posible la dilución de la muestra y al mismo tiempo conseguir una distribución homogénea en capa fina sobre la superficie del gel, se añadieron 50 mg de sacarosa por ml de muestra al objeto de aumentar su densidad; ésto permite añadirla a la columna, sin que haya que eliminar la capa de eluyente existente sobre la misma, ya que la muestra al ser de

densidad mucho mayor se deposita y distribuye rápidamente sobre la superficie del gel. Se esperan unos minutos para que, como hemos dicho, la muestra se deposite y distribuya bien sobre el Sephadex y a continuación se hace penetrar en el mismo abriendo la columna y recogiendo con el flujo muy lento un volumen ligeramente superior al de muestra depositada. Se vuelve a cerrar la columna, se llena completamente con el eluyente y se une al reservorio del mismo, cuidando de que en estas operaciones no queden incluidas en el líquido burbujas de aire.

El reservorio del eluyente y el tubo de salida se colocan de manera que entre el nivel del líquido en el primero y el punto de salida de la columna haya una diferencia de altura de 10 cm, al objeto de evitar el empaquetamiento progresivo del Sephadex.

El desarrollo del fraccionamiento se llevó a cabo utilizando un flujo de 0,5 ml por minuto y recogiendo fracciones de 7 ml mediante el uso de un colector automático LKB (7.000 Ultrarac). Para controlar la marcha del fraccionamiento y la terminación del mismo se utilizó un sistema UVICOR (LKB) que de manera continua va marcando las variaciones en la absorbancia a 280 nm de eluato que se va depositando en cada tubo.

5.1.3.2. - Filtración con flujo invertido. - En este caso se añadieron a la columna dos adaptadores de flujo de Pharmacia Fine Chemicals. Uno de ellos se coloca en el extremo inferior de la columna antes de proceder a su llenado y el otro en la parte superior se ajusta exactamente a la superficie del Sephadex una vez que se ha llenado la columna y conseguido un empaquetamiento homogéneo.

El tubo de teflón en que termina el adaptador de la parte inferior de la columna se conecta a una bomba peristáltica LKB (Vario perpex) y termina en el depósito de eluyente, mientras que el correspondiente al adaptador de la parte superior, como en el caso anterior, se conecta a un sistema UVICOR que a su vez termina en el colector automático de fracciones.

Para la introducción de la muestra basta detener la bomba peristáltica, sacar el extremo del tubo de teflón del reservorio, introducirle en el recipiente que la contiene, volver a poner en marcha la

bomba hasta absorber el volumen deseado y previa parada y nueva puesta en marcha se introduce nuevamente el tubo de teflón en el reservorio eluyente y se procede a desarrollar el fraccionamiento. Como en el caso anterior el flujo fué de 0,5 ml por minuto, y las fracciones recogidas de 7 ml.

Este método junto a una mayor facilidad de manejo presenta la ventaja de mantener un flujo más constante -ya que éste no se altera por las variaciones de nivel del eluyente en el reservorio- y -- además evita en mayor grado un empaquetamiento excesivo del gel.

5.1.4. - Fraccionamiento con resinas intercambiadoras de iones. - La resina utilizada fué DEAE-celulosa y en el fraccionamiento se siguió la técnica de López-Gorgé y Monteoliva (1966) -- que se describe a continuación:

Preparación de la DEAE-celulosa

Esta resina antes de su utilización necesita ser sometida a un proceso de lavado y equilibrio. Para ello se lava con 15 volúmenes de ClH 0,05 N por volumen de DEAE-celulosa durante 30 minutos con agitación. Transcurrido este tiempo se somete a un lavado con agua destilada hasta que los líquidos de lavado salgan con pH neutro. A -- continuación, se trata con 15 volúmenes de NaOH 0,05 N durante --- otros 30 minutos y se vuelve a lavar con agua destilada hasta que los líquidos salgan con pH neutro. Se suspende en exceso del líquido de -- elución inicial, se agita vigorosamente, y se coloca en una probeta -- para quitar "los finos". Esta operación consiste en dejar sedimentar la celulosa durante un tiempo determinado -doble número en minutos a la altura en centímetros que alcance la celulosa en la probeta- y -- decantar el sobrenadante donde quedan "los finos" que dificultarían -- el flujo de la columna. La suspensión de DEAE-celulosa así obtenida se utiliza para el llenado de la columna.

La misma resina puede utilizarse varias veces si previamente se somete al proceso de lavado y equilibrio que se acaba de describir.

Preparación de la columna. - Se utilizan columnas de 500 x 30 mm provistas en su parte inferior y superior de ajustes esmerilados. Al extremo inferior se ajusta a esmeril una pequeña pieza en --

la cual se han introducido unas perlas de vidrio. Dicha pieza se conecta por su extremo con un tubo de teflón por donde se recogerán las diferentes fracciones eluidas. La suspensión de celulosa se va agregando a la columna lentamente ayudado de una varilla de vidrio. Se debe conseguir una columna DEAE-celulosa uniformemente sedimentada y siempre con una capa líquida de unos 5 cm encima de la superficie de la resina.

Aplicación de la muestra. - La muestra se aplica siguiendo la misma técnica descrita para las columnas de Sephadex con flujo normal.

Fraccionamiento. - Según las distintas experiencias, la elución de la columna se llevó a cabo con gradientes de pH o fuerza iónica, conseguidos de acuerdo con la siguiente técnica:

A la parte superior de la columna se acopla mediante el esmerilado un embudo de decantación que alojará a la solución base de elución y que sirve al mismo tiempo de recipiente de mezcla con la solución gradiente. A su vez, la solución gradiente fluye lentamente de un recipiente cerrado acoplado lateralmente al embudo de decantación. Una varilla de vidrio unida a un motor llega al embudo consiguiendo una homogeneidad total de la mezcla en todo momento.

En todos los casos, y como se ha descrito, el eluato, previo paso por el sistema de UVICORD, se lleva al colector de fracciones automático. En estas técnicas de fraccionamiento por resinas el flujo fué de 1 ml por minuto y las fracciones recogidas de 5 ó 6 ml cada una.

5.2. - Extracción, concentración y purificación de enzimas epicelulares.

Dado que la demostración, extracción y purificación de los enzimas epicelulares del M. xanthus, constituyen parte fundamental de esta Tesis, incluimos la descripción de los métodos empleados en el siguiente capítulo.

5.3. - Electroforesis en gel de acrilamida.

Ha sido seguida la técnica de la "electroforesis en disco" de Ornstein y Davis (1964) que a continuación se expone:

Preparación de la solución de poliacrilamida para la gelificación:

En todas las experiencias se han utilizado geles a una concentración del 7,5 % de acrilamida utilizando una mezcla de acrilamida (95 %) y N-N-metil-bis-acrilamida(Bis)(5 %).

Para la preparación de dicha mezcla se pesan, en un mismo pesasustancias, 1,7860 g de acrilamida y 0,0940 g de Bis que se disuelven con agitación en 25 ml de tampón tris-ClH 377 mM pH 8.9. Cuando se ha llegado a la disolución total de ambas sustancias se adicionan 75 μ l de β -dimetilaminopropionitrilo (DMP), se filtra y se añade 1 ml de una solución de persulfato amónico al 7 % en tampón tris-ClH 377 mM pH 8.9. De acuerdo con Ornstein y Davis (1964), se ha empleado el sistema discontinuo de tampones, ésto es, el tampón del gel es distinto al que se utiliza en el tanque de electroforesis, siendo el primero el ya citado tris-ClH 377 mM pH 8.9 y el segundo glicocola 38 mM valorado a pH 8.2 con la solución de tris.

Preparación y llenado de los tubos para la gelificación:

Se utilizan tubos de 75 mm de longitud y 5,5 mm de diámetro interior. Es muy importante que los tubos se preparen con suma precisión para que todas las secciones sean iguales y puedan ofrecer resultados reproducibles.

Para el llenado de los tubos con la solución de gel y su posterior polimerización, se colocan perpendicularmente en una gradilla que lleva adosados en su base unos discos de goma de caucho, donde los tubos se ajustan perfectamente quedando así el extremo inferior cerrado.

La solución de poliacrilamida, preparada como acabamos de decir, se añade a cada tubo. Estos, deben quedar llenos a igual altura y para ello se marcan todos a 10 mm del borde superior.

Posteriormente, se adicionan a cada tubo unas gotas de tampón tris-ClH para formar una capa de algunos mm de espesor; su función es doble, excluir el aire que podría inhibir la gelificación en la parte superior de los tubos, y, proporcionar a los geles una superficie plana por suprimir el menisco.

La operación de llenado de los tubos debe realizarse antes de los primeros 10 minutos después de la adición del DMP y persulfato amónico a la mezcla de acrilamida y Bis.

Aparato de electroforesis y colocación de los tubos:

El aparato de electroforesis consta de un cilindro hueco que lleva adosado en sus dos extremos dos tanques reservorios para el tampón y que poseen cada uno un electrodo de platino. Los tubos con el gel se disponen verticalmente entre ambos reservorios, de forma que sus extremos queden sumergidos en el tampón. El reservorio superior consta de ocho orificios de goma de caucho.

Los tubos se quitan uno a uno de la gradilla que los contenía y, previa eliminación del tampón que llevaban, se colocan desde abajo hacia arriba dentro de cada orificio del reservorio superior.

El reservorio inferior se llena hasta una altura adecuada (siempre cubriendo el hilo de platino) con tampón de glicocola 38 mM pH 8.2, se le adosa el cilindro y se coloca el extremo final de los tubos.

Una vez los tubos están colocados entre los dos reservorios, el reservorio superior se llena igualmente con tampón de glicocola 38 mM pH 8.2.

Aplicación de la muestra y electroforesis:

La cantidad óptima de proteínas y el volumen máximo que se puede colocar en cada tubo es de 20 μ g y 50 μ l, respectivamente.

La muestra, previa adición de sacarosa al 10 % para aumentar la densidad, se coloca dentro de cada tubo con la ayuda de una microjeringa, procurando quede uniformemente repartida por toda la superficie del gel y sin introducir la aguja en el mismo.

Uno de los tubos en todas las electroforesis se llena con 2 μ l de un suero que va adicionado de azul de bromofenol; este tubo sirve como control para el tiempo de electroforesis, ya que se dá por terminada cuando la banda más avanzada quede muy próxima al extremo inferior del tubo.

Una vez se han colocado todas las muestras, el aparato de electroforesis se lleva a 0° - 4°, donde se conectan los electrodos a la correspondiente fuente de alimentación. El reservorio superior es utilizado como cátodo y el inferior como ánodo. Se comienza haciendo pasar una corriente eléctrica de una intensidad de 1 mA/tubo durante los primeros 15 minutos, para después subir a 5 mA/tubo manteniendo este nivel constante por una hora y 45 minutos. Durante los primeros 15 minutos la muestra penetra en el gel.

Separación de los geles de los tubos que los contenían:

Los distintos componentes en que ha sido separada la muestra problema tienen que ser visualizados incubando los geles en distintas soluciones como veremos a continuación. Para ello, los geles se transfieren a tubos de hemolisis; este paso debe efectuarse en seguida de haber terminado la electroforesis para impedir la difusión de los componentes en el gel. Se opera de la manera siguiente: el extremo de una microjeringa cargada con agua destilada se coloca entre el vidrio y el gel. Con la mano derecha se va descargando el agua e introduciendo más la microjeringa, a la vez que con la mano izquierda se va girando el tubo de vidrio. Se efectúan varios giros, el gel se deja resbalar y se introduce en el tubo de hemolisis (10 x 100 mm).

Revelado de proteínas en los geles:

Una vez dispuestos los geles dentro de los tubos de hemolisis, algunos de ellos, fueron teñidos para las proteínas.

Para ello se utilizó una solución de negro amido 10 B de la siguiente composición:

negro amido 10 B	0,2 g
solución de ácido acético al 7 % en agua destilada....	100 ml

Una vez disuelto el negro amido en el ácido acético, se filtra la solución y se guarda para su uso en frascos topacio.

Se añaden 4 ml de la solución de negro amido a cada tubo, se deja estar 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo comienza la decoloración con una solución de ácido acético al 7 % en agua destilada. Esta operación se efectúa por repetidos lavados y va acompañada de una agitación continua. A los tres días aproximadamente, el líquido de lavado es incoloro y pueden distinguirse las bandas de proteínas de un color azul oscuro resaltando sobre el fondo blanquecino del gel.

Los geles pueden conservarse en la solución de ácido acético varios días.

5.4. - Revelado en geles de acrilamida de proteínas con actividades enzimáticas.

5.4.1. - Actividad esterásica. - Se han utilizado dos sustratos distintos: Tween 20 y α -naftil-acetato, pero dado que el revelado con Tween 20, se considera como método original, se reseñará en el capítulo de Experiencias y Resultados.

Revelado con α -naftilacetato:

Se siguió la técnica descrita por Lloyd et al. (1971).

La solución de α -naftilacetato se preparó de la forma siguiente:

tampón tris-maleico 0,1 M pH 6.5	100 ml
α -naftilacetato al 1 % en acetona-agua (v/v).....	2 ml
fast blue B salt. Gurr	0,2 g

Esta solución se prepara para cada determinación, debido a la gran facilidad con que se desprende libremente el α -naftol. Los geles se incuban con dicha solución dos horas a temperatura ambiente, pasado este tiempo se lavan y conservan con una solución de ácido acético al 7 % en agua destilada.

La aparición de bandas de color rojo oscuro, debidas a la --
acumulación del α -naftol liberado en la hidrólisis, denotan la pre--
sencia de actividad esterásica.

En algunos casos, que oportunamente se indicarán, el tam--
pón tris-maleico fué sustituido por tampón tris-ClH 0,1 M a pH que
varió desde 7 a 8.5.

5.4.2. - Actividad proteolítica. - Se reveló mediante
un método original, basado en el empleado por Millner y Massie --
(1969) para tiras de acetato de celulosa, que se describirá en el ca--
pítulo siguiente.

6. - DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE PRODUCCION DE - ANTIBIOTICOS POR EL MYXOCOCUS XANTHUS.

6.1. - Método de Norén y Raper (1962).

Este método consiste en esencia en cubrir una sección de una
caja de Petri, conteniendo un agar salino base, con una suspensión -
espesa de células vivas de A. aerogenes; inocular el M. xanthus en
varios puntos y cuando dicha bacteria haya lisado por completo todas
las células de A. aerogenes adicionar caldo glucosado a la parte de
la placa no cubierta por el M. xanthus, y una vez adsorbido aquél, --
inocular las distintas eubacterias en estrias perpendiculares al fren--
te del M. xanthus.

6.2. - Técnica sobre papel celofán.

Con objeto de evitar la invasión de las estrias de eubacterias
por el M. xanthus, como ocurre muy frecuentemente en el método an--
terior, se ha puesto a punto la siguiente técnica original:

Sobre la superficie de un agar M-7, contenido en una caja de
Petri, se coloca una hoja de papel celofán estéril, procurando quede
perfectamente adherido a la superficie del agar; a continuación, la -
mitad de la placa se inocular masivamente con el M. xanthus, y des--
pués de una incubación apropiada para conseguir un crecimiento y --

fructificación adecuado del M. xanthus sobre la hoja de papel celofán, es separado de ésta, y se practican sobre la superficie del medio -- siembras en estrias de las eubacterias de prueba en sentido perpendicular al límite de crecimiento del M. xanthus.

6.3. - Técnica fundada en el recuento de células viables.

Dado que como diremos en el capítulo de resultados no se -- consiguió demostrar actividad antibiótica frente a ninguna de las eubacterias de prueba por los dos métodos citados anteriormente, se -- puso a punto un último método consistente en depositar sobre la su-- superficie de un agar salino base una capa uniforme de las distintas eu-- bacterias; inocular a continuación el M. xanthus en el centro de la -- placa, y una vez que el halo de crecimiento y lisis alcanza unos 20 -- mm de diámetro, contar el número de células viables por unidad de superficie en puntos próximos y remotos al límite de crecimiento del M. xanthus. La idea que ha inspirado este método consiste en supo-- ner que si el M. xanthus produce alguna sustancia con efecto bacteri-- cida, evidentemente el número de células viables en la proximidad -- del halo debe ser menor que en puntos alejados del mismo.

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS

1. - ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LOS ENZIMAS PRODUCIDOS POR EL M. XANTHUS.

Antes de proceder a un estudio más a fondo de los enzimas extracelulares producidos por el M. xanthus, o al menos de los más interesantes, se efectuaron una serie de estudios previos de tipo cualitativo o semicuantitativo en medios de cultivo sólidos añadidos de diferentes macromoléculas o de células bacterianas, al objeto de observar si éstas eran hidrolizadas o lisadas, respectivamente, por células en crecimiento del M. xanthus y si la citada hidrólisis o lisis estaba circunscrita estrictamente a los límites de las colonias o por lo contrario excedían de los mismos, lo que sería indicio seguro de -- producción de enzimas difusibles en el medio activo sobre los distintos sustratos.

Los resultados obtenidos se confirmaron posteriormente determinando los diferentes tipos de actividades, detectadas por estos procedimientos, en sobrenadantes exentos de células obtenidas a partir de cultivos de M. xanthus en medios líquidos.

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

1.1. - Actividad proteolítica.

En todos los casos se ha empleado caseína como sustrato para la determinación de esta actividad.

En medios sólidos la actividad se determinó por el medio indicado en el apartado 4.2. del capítulo anterior.

Los resultados obtenidos fueron uniformemente constantes en todas las repeticiones efectuadas, bajo las condiciones standard especificadas:

Diámetro del halo de crecimiento (media de 10 experiencias):
20 mm. \pm 0,2.

Diámetro del halo de hidrólisis de la caseína (media de 10 experiencias): 26 mm. \pm 0,2.

Como se desprende de estos resultados el M. xanthus produce uno o varios enzimas extracelulares, activos sobre la caseína. La diferencia en el diámetro de los halos hace pensar "a priori" que él o los citados enzimas se producen en cantidad abundante y difunden fácilmente en el medio.

La demostración de la misma actividad en cultivos en medio líquido, exentos de células por filtración por membranas Millipore de 0,45 μ de diámetro de poro, confirmó los resultados anteriormente expuestos. Aún cuando, como se describirá más tarde, la concentración de enzimas se afecta grandemente por las condiciones culturales, se llegaron a alcanzar cifras de 120×10^{-6} u/ml de actividad proteolítica en filtrados de cultivos de seis días a 28° en medio M-4.

Esto indica, igualmente, la gran capacidad de producción de estos enzimas por la raza empleada.

1. 2. - Actividad lítica sobre bacterias vivas.

1. 2. 1. - Actividad en medios sólidos. - Se llevó a cabo por las técnicas de Norén (1964) y la original descritas en apartado 4.1 del capítulo anterior. Como bacterias de prueba se emplearon las siguientes: E. coli, A. aerogenes, P. mirabilis, M. lysodeikticus, S. aureus y B. subtilis.

Los resultados obtenidos por una y otra técnica se exponen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Actividad lítica del M. xanthus sobre bacterias vivas, determinadas por técnica de Norén.

Bacterias	Longitud de estría lisada (mm) $\#$
<u>E. coli</u>	30
<u>A. aerogenes</u>	23
<u>P. mirabilis</u>	31
<u>M. lysodeikticus</u>	38
<u>S. aureus</u>	33
<u>B. subtilis</u>	36

$\#$ Los resultados son la media de dos experiencias.

Tabla 2. Actividad lítica del M. xanthus, determinada por el método original, sobre bacterias vivas.

<u>Bacterias</u>	<u>Diámetro del halo de crecimiento (mm)*</u>	<u>Diámetro del halo de lisis (mm)*</u>
<u>E. coli</u>	26	26
<u>A. aerogenes</u>	20	20
<u>P. mirabilis</u>	26	26
<u>M. lysodeikticus</u>	33	35
<u>S. aureus</u>	30	30
<u>B. subtilis</u>	31	31

* Los resultados son la media de dos experiencias.

Estos resultados demuestran, al parecer, que el M. xanthus no produce enzimas extracelulares capaces de lisar bacterias, salvo en el caso del M. lysodeikticus en que se aprecia una ligera diferencia entre el halo de lisis y el de crecimiento.

1.2.2. - Actividad en filtrados procedentes de cultivos en medios líquidos. - Como en el caso de la actividad proteolítica, se emplearon filtrados de cultivos -incubados 4 días a 28°- exentos de células, utilizando como sustrato suspensiones, con una D. O. de -- 0'7 a 430 nm, en tampón Tris ClH 0'025 M. pH 7,5, de las mismas bacterias ensayadas en medio sólido. La técnica seguida para detectar la lisis bacteriana fué la misma descrita en el apartado 4.6.1 de los Métodos para el caso de bacterias muertas por el calor.

Con excepción del caso del M. lyso'eikticus, en el que como se describirá más adelante se aprecia una ligera disminución de la D. O., los resultados fueron uniformemente negativos aún prolongando el tiempo de incubación durante varias horas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en medios sólidos.

1.3. - Actividad lítica sobre bacterias muertas por el calor.

1.3.1. - Actividad en medios sólidos. - Se llevó a cabo por la misma técnica original empleada para determinar la actividad proteolítica descrita en el apartado 4.3 del capítulo de Métodos. Las bacterias sobre las que se comprobó esta acción fueron A. aerogenes, P. mirabilis, S. aureus, B. subtilis y M. lysodeikticus. Después de 4 días de incubación a 28°, se determinó el diámetro de los halos de crecimiento del M. xanthus, de lisis y, tras el tratamiento ya indicado, de hidrólisis de la caseína.

Los resultados obtenidos en estas experiencias se exponen en la Tabla 3, en la que se comparan los diámetros de los halos de crecimiento, de bacteriolisis y de hidrólisis de la caseína.

Tabla 3. Comparación entre la actividad lítica sobre bacterias muertas por el calor y la actividad proteolítica de cultivos de M. xanthus en medio agar-caseína-eubacterias.

Bacterias incorporadas al medio	Diámetro del halo de crecimiento (mm)*	Diámetro del halo de bacteriolisis (mm)*	Diámetro del halo de proteólisis (mm)*
<u>A. aerogenes</u>	20	27	27
<u>P. mirabilis</u>	22	35	36
<u>M. lysodeikticus</u>	32	39	37
<u>S. aureus</u>	28	32	32
<u>B. subtilis</u>	30	37	36

* Los resultados son la media de dos experiencias.

Los resultados expuestos, aparte de mostrar que el M. xanthus presenta una gran actividad lítica extracelular sobre bacterias muertas por el calor, parecen indicar que existe relación muy estrecha entre la misma y la actividad proteolítica; solamente en el caso del M. lysodeikticus y B. subtilis los halos de bacteriolisis superaron ligeramente en tamaño a los de hidrólisis de la caseína.

1.3.2. - Actividad en filtrados procedentes de cultivos en medios líquidos. - Se emplearon, como en los restantes casos descri-

tos, filtrados exentos de células y como sustratos suspensiones de bacterias muertas por el calor, que en el caso de estas experiencias preliminares fueron: E. coli, P. mirabilis, S. aureus, M. lysodeikticus y B. subtilis. Las técnicas empleadas en la preparación de las suspensiones y ensayo de la actividad fueron las descritas en el apartado 4.6.1 de los Métodos.

Con excepción del caso del S. aureus, en que se obtuvieron -- siempre resultados negativos, todas las bacterias ensayadas fueron lisadas por los sobrenadantes empleados. La intensidad de la lisis varió según las bacterias empleadas: en el caso de las bacterias -- Gram positivas se alcanzaron valores medios de 48×10^{-3} u/ml -- mientras que en el de Gram negativas se llegaron a alcanzar cifras de 120×10^{-3} u/ml. Los sobrenadantes empleados demostraron ser activos igualmente frente a suspensiones de M. lysodeikticus desecadas a la acetona, cuando se ensayaron por la técnica descrita en el apartado 4.6.3. Los valores fueron ligeramente superiores a los obtenidos cuando se emplearon suspensiones autoclavadas de esta bacteria.

1.4. - Actividad amilásica.

Cajas de Petri con agar-almidón fueron inoculadas en varios puntos con una suspensión de M. xanthus, por la técnica descrita en el apartado 4.4 del capítulo anterior.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

diámetro del halo de crecimiento (media de 2 experiencias) 16 mm
diámetro del halo de la hidrólisis del almidón (") 18 mm

Estos resultados indican el M. xanthus produce un enzima extracelular con actividad amilásica, si bien, al parecer, en escasa cantidad.

1.5. - Actividad lipolítica.

Para su valoración en medios sólidos se utilizó la técnica des-

crita en el apartado 4.5 de los Métodos.

Los resultados obtenidos siempre fueron homogéneos y demostraron la presencia de un precipitado de la sal de cobre del ácido oleico circunscrito exclusivamente a la zona de crecimiento del M. xanthus. Es decir, esta bacteria produce uno o varios enzimas lipolíticos que al parecer no son difusibles en el medio sino que están unidos a estructuras de la bacteria.

Para confirmar los resultados obtenidos, células lavadas de M. xanthus procedentes de un cultivo de cinco días, se pusieron en contacto a 25° con una solución de Tween 20 al 20 % en acetato sódico 0,2 M durante 30 minutos, al cabo de los cuales la mezcla se centrifugó y en el sobrenadante se valoró el ácido liberado con NaOH 0,02 N. Se incluyeron los blancos adecuados de sustrato y suspensión celular y los resultados obtenidos demostraron igualmente que las células de M. xanthus poseen una fuerte actividad lipolítica. Todas las pruebas realizadas para poner de manifiesto esta misma actividad en sobrenadante exentos de células fueron negativas.

2. ENZIMAS PROTEOLITICOS Y BACTERIOLITICOS EXTRACELULARES.

Las experiencias preliminares, descritas en el apartado anterior, demostraron la gran capacidad proteolítica y bacteriolítica ejercida por el M. xanthus merced a la producción de enzimas extracelulares. Estos resultados junto con los antecedentes bibliográficos, descritos en la Introducción, llevaron a polarizar la parte del presente trabajo referente a enzimas extracelulares al estudio de los enzimas responsables de los citados fenómenos aún a sabiendas de que con toda certeza el M. xanthus produce otros enzimas extracelulares, tal como la amilasa, y a descrita, y otros cuya presencia se deduce, como se verá más adelante, de las experiencias de separación en geles de poliacrilamida y que en experiencias actualmente en curso se están tratando de identificar y separar.

De acuerdo con ello, en este apartado se describen las experiencias realizadas para un mejor conocimiento de los enzimas citados, que incluyen en primer lugar el estudio de los factores cultura-

les que influyen en su producción y su fraccionamiento y caracterización.

2.1. - Factores culturales que afectan su producción.

En esta serie de experiencias se trató de determinar la influencia que sobre las actividades lítica y proteolítica tiene la manera de ser cultivado el M. xanthus; la distinta actividad que presentan los sobrenadantes en relación con el tiempo de cultivo; y finalmente, el efecto que sobre la producción de enzimas proteolíticos y líticos ejerce la distinta composición de los medios de cultivo. En todos los casos, la actividad proteolítica de los sobrenadantes exentos de células se determinó usando caseína como sustrato, de acuerdo con la técnica de Haskā y Norén (1967), descrita en el apartado 4.8 del capítulo anterior. En cuanto a la actividad lítica se determinó igualmente en todos los casos, por la técnica de los autores antes citados, descrita en el apartado 4.6.1 y utilizando células autoclavadas de P. mirabilis como sustrato.

2.1.1. - Modalidad de cultivo. - Como ya se ha citado, la raza de M. xanthus empleada en este trabajo no crece en medio líquido en forma dispersa. Este hecho fué comprobado en experiencias preliminares que mostraron que, cualquiera que fuera el medio de cultivo empleado, la mixobacteria crecía en agitación en forma de pequeños grumos o bolitas y que la fructificación tenía lugar muy tempranamente en estas condiciones. En cultivos estáticos en frascos de Roux, por el contrario, crecía en forma de un velo continuo y grueso sobre la superficie del líquido, y la fructificación era más tardía.

Aún cuando no se hicieron determinaciones cuantitativas, el crecimiento era apreciablemente mayor en este último caso.

Estas experiencias previas hicieron pensar a "priori" que, lógicamente, la cantidad de enzimas producidos debería ser mayor cuando el M. xanthus se cultiva en frascos de Roux.

No obstante y al objeto de asegurar esta presunción, se lle-

varon a cabo una serie de experiencias en las que se determinaron cuantitativamente los niveles de enzimas proteolíticas y líticas en sobrenadantes obtenidos de cultivos de M. xanthus crecido en diversos medios y de acuerdo con las modalidades de cultivo citadas. -- Los medios empleados en estas experiencias fueron los M-1, M-2, M-3 y M-4, y arbitrariamente se eligió como tiempo de incubación a 28° el de 72 horas. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4. - Actividades proteolítica y lítica de sobrenadantes de cultivos de M. xanthus en agitación y en frascos de Roux.

Medios empleados	Actividad proteolítica* (u/ml x 10 ⁶)		Actividad lítica* (u/ml x 10 ³)	
	Agitación frascos Roux		Agitación frascos Roux	
M-1	0	0	0	0
M-2	18	5	0	0
M-3	6	6,2	0	3
M-4	65	37	23	12

Incubación: 72 horas a 28°.

* Los resultados obtenidos son la media de tres experiencias.

En principio, estos resultados parecen contradecir la presunción antes expuesta, ya que los niveles más altos de actividades proteolítica y lítica, en los casos que dieron positivos, correspondieron a los cultivos en agitación. No obstante, teniendo en cuenta lo anteriormente dicho en relación con el tiempo en que se inicia la fructificación según la modalidad de cultivo, sería posible que esta mayor actividad de los cultivos en agitación fuera sólo fruto de que se alcance en ellos antes que en los cultivos estáticos determinado estado fisiológico de las células, coincidente con una máxima producción de enzimas.

Para comprobar si efectivamente ésto es así, se determinaron

los niveles de enzimas en ambos tipos de cultivo en función del tiempo de incubación. Se utilizó para ello medio M-4 que, de acuerdo con los resultados anteriores, es aquél en que se obtienen mayores actividades y unos tiempos de incubación de 72, 120 y 168 horas. Los resultados se exponen en la Tabla 5 y demuestran que, como era de esperar en los cultivos en frascos de Roux se obtienen mayores niveles de enzimas.

Tabla 5. - Actividades proteolítica y lítica de sobrenadantes de cultivos de M. xanthus, incubados a 28° durante distintos tiempos, en agitación y en frascos de Roux.

Tiempo cultivo (horas)	Actividad proteolítica* (u/ml x 10 ⁶)		Actividad lítica* (u/ml x 10 ³)	
	Agitación frascos Roux		Agitación frascos Roux	
72	68	38	25	14
120	30	120	10	39
168	19	112	4	78

* Los resultados obtenidos son la media de tres experiencias.

2.1.2. - Tiempo de cultivo. - Una vez conocida, según se acaba de ver, qué modalidad de cultivo era la aconsejable, se procedió a determinar el tiempo de cultivo óptimo para la producción máxima de los enzimas estudiados.

Se eligió para ello el medio M-4, y se realizaron una serie de experiencias en las que el M. xanthus fué cultivado a lo largo de un período de tiempo de 240 horas, determinándose a intervalos regulares las actividades proteolítica y lítica.

En estas experiencias el M. xanthus fué cultivado simultáneamente en agitación y en frascos de Roux. Se utilizaron las dos modalidades de cultivo al objeto de fijar definitivamente las diferencias y calcular los tiempos óptimos de cultivo en cada caso. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 6 y las gráficas 1 y 2.

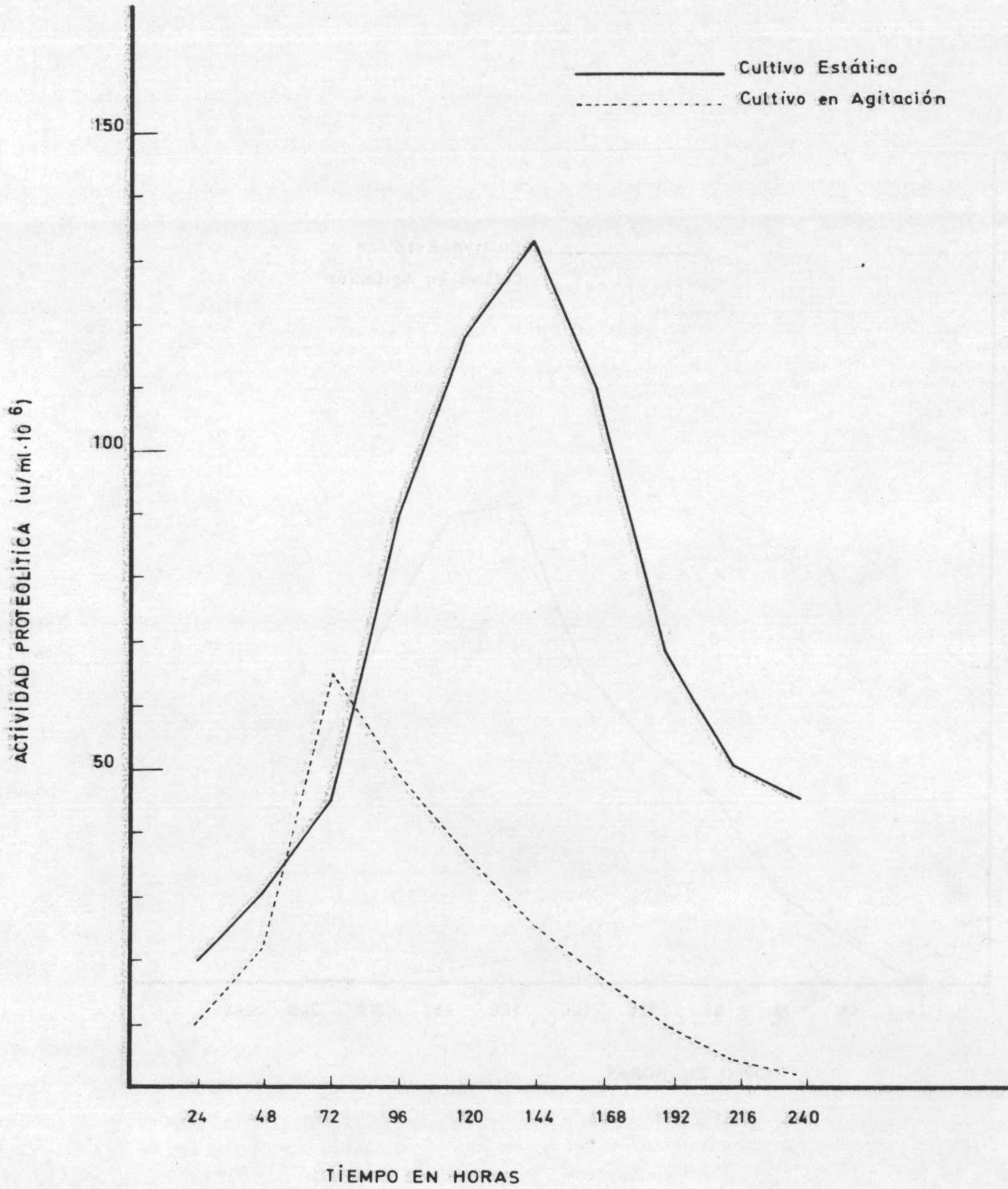
Tabla 6. - Actividades proteolítica y lítica de sobrenadantes de cultivos de M. xanthus, incubados a 28° en agitación y frascos de Roux en medio M-4, en función del tiempo de cultivo.

Tiempo cultivo (horas)	Actividad proteolítica** (u/ml x 10 ⁶)		Actividad lítica** (u/ml x 10 ³)	
	Agitación frascos Roux		Agitación frascos Roux	
48	22	31	8,3	7
72	65	37	23	12
96	50	90	17	29
120	27	118	7,3	37
144	24	133	4	50
168	18	110	2	76
192	10	69	1	74
216	4	51	0	55
240	2	46	0	32

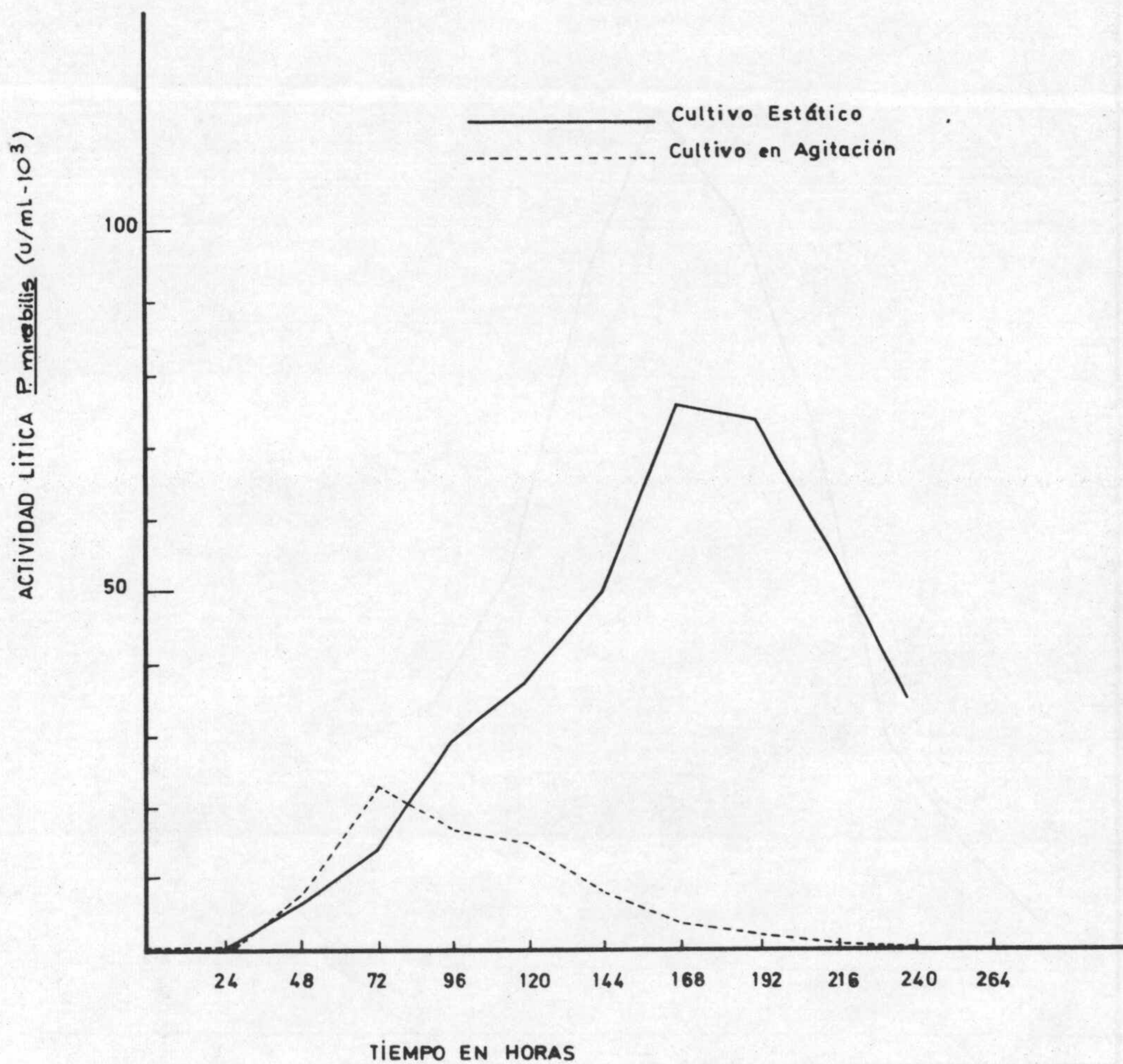
** Los resultados son la media de tres experiencias.

Estos resultados indican que para los cultivos en agitación el tiempo óptimo de incubación es de 72 horas tanto para la actividad proteolítica como para la actividad lítica, y que para los cultivos estáticos el tiempo óptimo de incubación es de 144 horas para la actividad proteolítica y de 168 horas para la actividad lítica.

GRAFICA Nº 1 ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE SOBREVIVIENTES DE CULTIVOS DE M. xanthus INCUBADOS A 28° EN AGITACION Y EN FRASCOS ROUX EN MEDIO DE M-4, Y EN FUNCION DEL TIEMPO DE CULTIVO.



GRAFICA N°2 ACTIVIDAD LITICA DE SOBREVIVIENTES DE CULTIVOS DE *M. xanthus*,
INCUBADOS A 28° EN AGITACION Y FRASCOS ROUX EN MEDIO M-4, EN
FUNCION DEL TIEMPO DE CULTIVO.



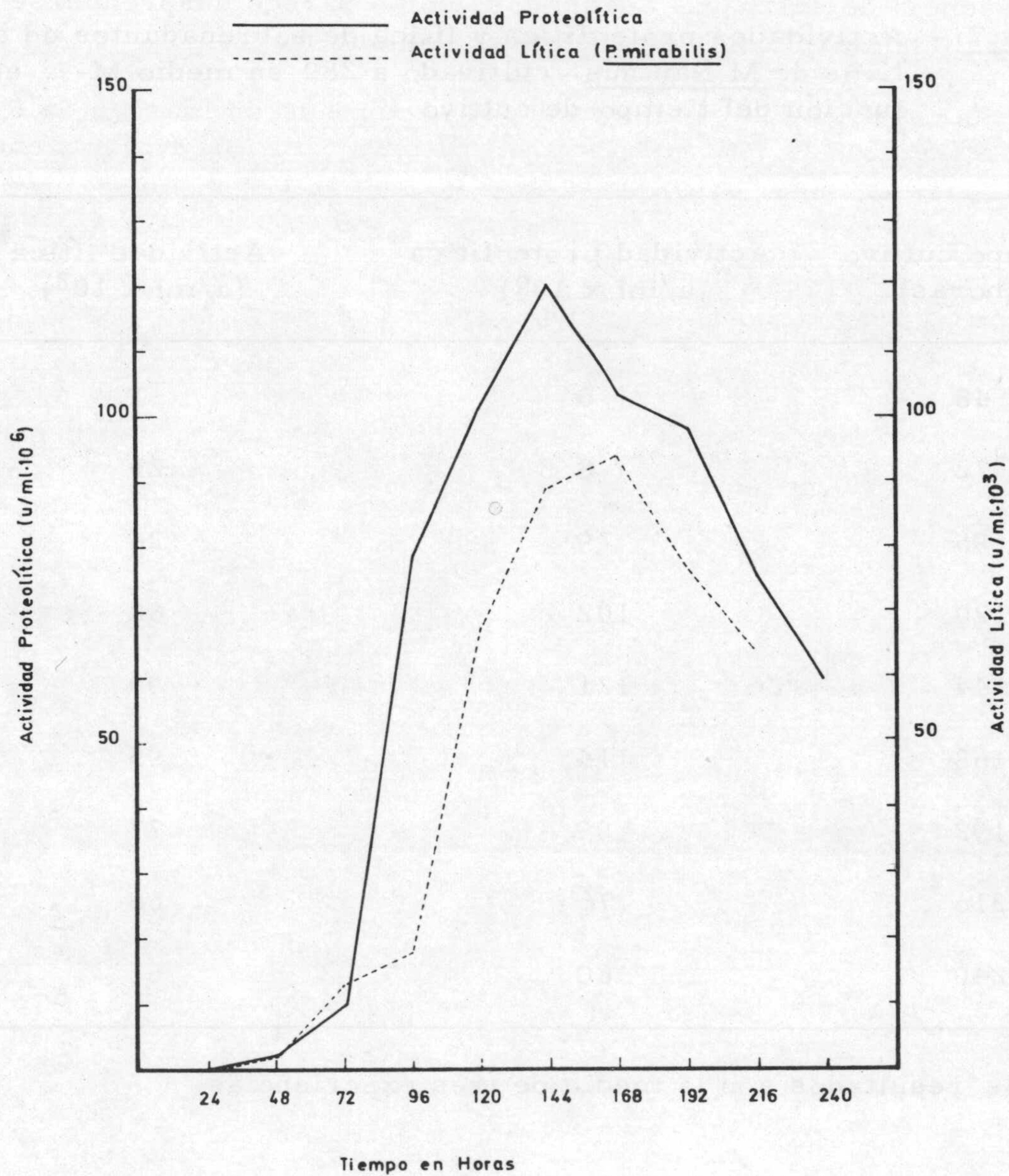
Para confirmar la diferencia encontrada en el tiempo óptimo de incubación, entre la actividad proteolítica y la actividad lítica, en la modalidad de cultivo estático, el M. xanthus fué cultivado en medio M-7 en frascos de Roux. Los resultados se expresan en la Tabla 7 y la Gráfica 3 y corroboran lo que se acaba de decir, a pesar de que el medio fué ligeramente diferente del empleado en la experiencia anterior.

Tabla 7. - Actividades proteolítica y lítica de sobrenadantes de cultivos de M. xanthus, cultivado a 28° en medio M-7, en función del tiempo de cultivo.

Tiempo cultivo (horas)	Actividad proteolítica [⌘] (u/ml x 10 ⁶)	Actividad lítica [⌘] (u/ml x 10 ³)
48	0	1
72	8,8	25
96	79	26
120	102	68
144	121	90
168	114	95
192	99	77
216	76	66
240	60	61

⌘ Los resultados son la media de tres experiencias.

GRAFICA N°3 ACTIVIDADES PROTEOLITICA Y LITICA DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE M. xanthus, CULTIVADOS A 28° EN MEDIO DE M-7, EN FUNCION DEL TIEMPO DE CULTIVO.



2.1.3. - Composición del medio de cultivo. - Una vez conocidas las condiciones óptimas en relación con la modalidad y tiempo de cultivo sobre la producción de los enzimas estudiados, se pasó a estudiar la influencia que ejerce sobre la misma la composición del medio de cultivo. El objeto principal de esta serie de experiencias -aparte de buscar un medio apropiado para los estudios posteriores de aislamiento y purificación de enzimas- fué el determinar si los enzimas estudiados son constitutivos o bien se inducen en presencia de sustratos adecuados, como parece desprenderse de los resultados expuestos en los apartados anteriores.

Se llevaron a cabo cultivando el M. xanthus en frascos de Roux y determinando las actividades proteolítica y lítica de los sobrenadantes por las técnicas descritas; el tiempo de incubación fué de 144 horas, cuando se determinó la actividad proteolítica y de 168 en el caso de la lítica.

Se ensayaron los medios M-1 al M-8 que llevan, respectivamente, como sustratos capaces de afectar la producción de enzimas, células vivas de P. mirabilis, células autoclavadas de la misma bacteria, hidrolizado ácido de caseína más asparagina, caseína, peptona, hidrolizado enzimático de caseína más asparagina, caseína más células autoclavadas de P. mirabilis y caseína más células autoclavadas de S. aureus.

Los resultados se exponen en la Tabla 8 e indican que sólo en los medios que llevan caseína se obtienen valores altos de actividades proteolítica y lítica, y que la combinación caseína más bacterias autoclavadas es la que da lugar a valores más altos.

Tabla 8. - Actividades proteolítica y lítica de sobrenadantes de cultivos de M. xanthus de acuerdo con la naturaleza del medio de cultivo.

Medio de cultivo	Actividad proteolítica [⌘] (u/ml x 10 ⁶)	Actividad lítica [⌘] (u/ml x 10 ³)
M-1	0	0
M-2	0	0
M-3	6,5	3,5
M-4	122	88
M-5	5,5	1,2
M-6	7	2
M-7	114	95
M-8	137	102

⌘ Los resultados son la media de tres experiencias.

El tiempo de incubación a 28° fué de 144 horas en las determinaciones de actividad proteolítica y 168 en el caso de la lítica.

2.1.3.1. - Efecto de la concentración de caseína. - Para comprobar qué concentración de caseína es la óptima para la producción de los enzimas, se realizaron experiencias en las que el M. xanthus fué cultivado a 28° en frascos de Roux sobre medios M-4 y M-7 en concentraciones de caseína comprendidas entre el 0,1 y 2 %, durante 144 o 168 horas como en la experiencia anterior. Los resultados se expresan en la Tabla 9 e indican que las distintas con-

centraciones de caseina empleadas no originan grandes diferencias en las actividades medidas.

Tabla 9. - Actividades proteolítica y lítica de sobrenadantes de cultivos de M. xanthus en función de la concentración de caseina presente en el medio.

Concentración caseina (g %)	Actividad proteolítica [⊗] (u/ml x 10 ⁶)		Actividad lítica [⊗] (u/ml x 10 ³)	
	Medio M-4	Medio M-7	Medio M-4	Medio M-7
0,10	123	75	71	73
0,25	126	123	76	73
0,50	133	121	76	90
0,75	126	129	88	90
1	118	88	88	98
2	120	80	61	91

⊗ Los resultados son la media de tres experiencias.

El tiempo de incubación fué de 144 horas en las determinaciones de actividad proteolítica y de 168 horas en el caso de la lítica.

2.1.3.2. - Efecto de la adición de glucosa. - Aún cuando 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 del M. xanthus (Dworkin, 1962) y aún sobre -

la producción de enzimas como han proclamado Hütterman y Kühlwein (1969) en el caso del Archangium violaceum. Estos antecedentes llevaron a realizar experiencias en las que se determinaron las actividades proteolítica y lítica de sobrenadantes de cultivos de M. xanthus en medio M-7 adicionado de glucosa al 1 %.

Los resultados obtenidos en dos experiencias de este tipo indican, que, si bien los niveles de enzimas demostrados son similares a los que se alcanzan en ausencia de glucosa, éstos se mantienen altos durante mucho más tiempo; hasta el punto de que a los diez días de incubación sólo se experimenta un descenso de aproximadamente un 45 % en el caso de la actividad proteolítica y de un 30 por ciento en el caso de la lítica.

Como variante de estas experiencias, se realizaron otras dos en las que se añadió al medio un 1 % de glucosa y pasados tres días de incubación se volvió a restaurar esta concentración mediante la adición de la cantidad adecuada de solución concentrada esteril de glucosa. Los resultados fueron en este caso todavía más llamativos, ya que la actividad proteolítica a los 10 días de cultivo sólo sufrió un descenso sobre el máximo del 32 % y la lítica del 24 %.

En ambos tipos de experiencias se observó un crecimiento abundante y un retraso en la fructificación.

Es de hacer notar que la glucosa inicial se esterilizó juntamente con el medio.

2.2. - Fraccionamiento y caracterización de los enzimas proteolíticos y líticos extracelulares.

En el apartado anterior se han expuesto los factores que afectan a la producción de enzimas líticos y proteolíticos considerados en bloque. Ahora bien, aún cuando de las experiencias preliminares en medios sólidos expuestos en el apartado 1.3.1 de este capítulo, parece deducirse que la actividad lítica sobre las células muertas va muy estrechamente ligada a la proteolítica, el hecho de que el tiempo óptimo en que se alcanzan los valores más elevados de actividad sea distinto en uno u otro caso (apartado 2.1.2 de este

capítulo), lleva a pensar, en principio, que las actividades lítica y proteolítica sean debidas a dos enzimas o sistemas de enzimas diferentes. De otra parte no es lógico que un efecto tan complejo como la lisis de una bacteria, cuya pared está formada por diversas estructuras de composición química distinta, sea consecuencia de la acción de un sólo enzima. De acuerdo con ello se proyectaron una serie de experiencias encaminadas a poner de manifiesto si en los sobrenadantes de M. xanthus existen enzimas distintos responsables de las actividades lítica y proteolítica, respectivamente, y a determinar si dentro de cada grupo existen igualmente, enzimas distintos.

Para ello, y tras algunas pruebas de concentración de los enzimas existentes en los sobrenadantes, se llevaron a cabo experiencias de fraccionamiento por precipitación con sulfato amónico y acetona, por separación en columnas de DEAE-celulosa y Sephadex G-200. Por último, también se han efectuado fraccionamientos en geles de poliacrilamida.

2.2.1. - Concentración de los sobrenadantes. - Se llevó a cabo por evaporación al vacío y por ultrafiltración.

En el primer caso la concentración se llevó a cabo en un Rotovapor R (Büchi) a temperaturas comprendidas entre los 15º y 20º. Los sobrenadantes exentos de células y procedentes de cultivos de 6-7 días se concentraron hasta un quinto o un décimo de su volumen primitivo, en dos lotes de experiencias distintas. Los resultados fueron decepcionantes, ya que en el caso de la actividad lítica los concentrados dieron valores incluso inferiores a los de los sobrenadantes y en el caso de la actividad proteolítica si bien los valores aumentaron ligeramente, dicho aumento fué en todos los casos muy inferior al que debería obtenerse de acuerdo con la concentración efectuada. Los concentrados, de otra parte, aparecían precipitados, por lo que se abandonó este método de concentración por considerar que las condiciones descritas originan la desnaturalización de los enzimas estudiados.

En cuanto a la concentración por ultrafiltración se llevó a cabo en un aparato de ultrafiltración Sartorius, con membranas

de nitrato de celulosa de un diámetro de poro de 10-15 nm.

La ultrafiltración se llevó a cabo a 4º y se logró concentrar los sobrenadantes hasta 1/20 de su volumen primitivo. A la hora de medir la actividad se encontró sin embargo, que al igual que en el caso anterior las actividades lítica y proteolítica eran inferiores en los concentrados que en los sobrenadantes de cultivos, a pesar de que en los filtrados no se pudo poner de manifiesto ninguna de las dos actividades, lo que indicaba el correcto funcionamiento de la ultrafiltración.

Vistos los resultados expuestos y ante la imposibilidad de efectuar concentraciones por liofilización, debido a no disponer de los aparatos adecuados, se abandonaron los intentos de concentración de los enzimas extracelulares presentes en los sobrenadantes y se procedió a su purificación directa a partir de éstos.

2.2.2. - Purificación por salado con sulfato amónico. - Se realizó en la forma habitual, empleando sulfato amónico Merck y operando a temperaturas comprendidas entre 0º y 4º; entre la adición del sulfato amónico y la recuperación de los precipitados se dejaron transcurrir cuatro horas.

Primeramente se llevó a cabo una concentración de los enzimas extracelulares mediante precipitación de los sobrenadantes de los cultivos a un 80 % de saturación de sulfato amónico. El precipitado, separado por centrifugación se disolvió en aproximadamente un quinto del volumen primitivo de tampón tris-ClH 0,025 M, pH 7,5, y la solución después de eliminado por centrifugación el precipitado no disuelto, se desalinizó pasándola a través de una columna de 400 x 20 mm. de Sephadex G-25 previamente equilibrada con el mismo tampón, que fué también el empleado para la elución. En el eluato así obtenido se determinaron la concentración de proteínas, así como las actividades proteolítica y lítica frente a células autoclavadas de P. mirabilis.

A partir de la solución antes citada se efectuó un fraccionamiento por el mismo procedimiento, recogiendo los precipitados obtenidos a un 50 por ciento de saturación de sulfato amónico y entre un 50 y 80 por ciento. Los precipitados fueron recogidos y ma-

nipulados tal como queda descrito y en las soluciones finales se efectuaron las mismas determinaciones antes citadas.

Los resultados obtenidos en estas experiencias de purificación se exponen en las Tablas 10 y 11 e indican que, aunque se obtiene un gran aumento en la actividad específica, hay, de una parte, una gran pérdida en la actividad total, y, de otra, no se consigue separar los dos tipos de actividades ensayadas. Por estas razones, y aunque es posible que efectuando el fraccionamiento entre márgenes más estrechos de saturación de sulfato amónico puedan conseguirse mejores resultados, no se insistió en este sistema de fraccionamiento y purificación ya que con la precipitación mediante acetona, aparte de ser una técnica mucho más simple, se obtuvieron mejores resultados.

Tabla 10. - Purificación de los enzimas proteolíticos extracelulares del M. xanthus mediante precipitación con sulfato amónico *

% saturación de sulfato amónico	Volumen (ml)	Actividad (u/ml x 10 ⁶)	Actividad total	Actividad específica
0 (sobrenadante)	2.085	114,7	231.449,5	229,4
80	370	142,8	52.836	2.856
(0-50)	100	150	15.000	3.000
(0-80)	55	95	5.225	4.750

* Los resultados son la media de tres experiencias.

Tabla 11. - Purificación de los enzimas líticos extracelulares del M. xanthus mediante precipitación con sulfato amónico**

% saturación de sulfato amónico	Volumen (ml)	Actividad (u/ml x 10 ³)	Actividad total	Actividad específica
0 (sobrenadante)	2.085	75,5	157.417,5	151
80	370	118	43.660	2.360
(0-50)	100	110,5	11.050	2.210
(0-80)	55	83	4.565	4.150

** Los resultados son la media de tres experiencias.

2.2.3. - Purificación por precipitación fraccionada con acetona. - Se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita en el apartado 5.1.2. de los Métodos.

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 12 para la actividad proteolítica y en la Tabla 13 para la actividad lítica frente a células autoclavadas de P. mirabilis.

Como en el caso anterior de precipitación con sulfato amónico, tampoco con la precipitación fraccionada con acetona se consigue una separación clara de las actividades lítica y proteolítica, si bien esta última parece concentrarse en la fracción obtenida al 33,3 % de acetona y la primera en la que precipita entre el 50 y 66,6 %.

En cuanto al rendimiento, si bien la actividad específica lograda en ambos tipos de enzimas fué inferior a la obtenida por precipitación con sulfato amónico, la pérdida en actividad fué bastante menor, por lo que, aunque también se abandonó este método de fraccionamiento, la fracción obtenida por precipitación directa de los sobrenadantes con dos volúmenes de acetona (66,6 %) fué empleada como punto de partida para ulteriores purificaciones.

Tabla 12. - Purificación de los enzimas proteolíticos extracelulares del M. xanthus por precipitación fraccionada con acetona*

% acetona (v/v)	Volumen (ml)	Actividad (u/ml x 10 ⁶)	Actividad total	Actividad específica
0 (sobrenadante)	1.450	103	149.350	135
66,6 (0 - 33,3)	245	315,3	77.248,5	1.433
(33,3 - 50)	50	117,78	5.889	2.265
(50 - 66,6)	50	129,22	6.461	1.656
	50	393,4	19.670	1.710

* Los resultados son la media de tres experiencias.

Tabla 13. - Purificación de los enzimas líticos extracelulares del M. xanthus por precipitación fraccionada con acetona*

% acetona (v/v)	Volumen (ml)	Actividad (u/ml x 10 ³)	Actividad total	Actividad específica
0 (sobrenadante)	1.450	69,9	101.355	92
66,6 (0 - 33,3)	245	218,5	53.532,5	993
(33,3 - 50)	50	30,4	1.520	700
(50 - 66,6)	50	31,2	1.560	400
	50	322	16.100	1.400

* Los resultados son la media de tres experiencias.

2.2.4. - Fraccionamiento sobre DEAE-celulosa. - Se llevó a cabo utilizando como material de partida la solución que resulta de disolver en tampón Tris-ClH 0,025 M, pH 7,5, el precipitado obtenido al añadir a los sobrenadantes dos volúmenes de acetona en las condiciones antes señaladas.

Se utilizaron columnas de 30 mm de diámetro y 300 mm de longitud y un volumen de muestra entre 5 y 6 ml. La elución se llevó a cabo mediante dos variantes: a) fuerza iónica constante y gradiente de pH entre 8,6 y 5; y b) pH constante (7,8) y gradiente de fuerza iónica entre soluciones de fosfato 0,025 M y 0,2 M.

Los resultados se exponen en las tablas 14 y 15 y en las gráficas 4 y 5 e indican que las actividades proteolítica y lítica (frente a P. mirabilis) son dos actividades enzimáticas distintas, separables por esta técnica. En el transcurso de estas experiencias se comenzó a valorar también la actividad lítica de las fracciones frente a M. lysodeikticus (Tabla 15, Gráfica 5) que corresponde, igualmente a una actividad enzimática distinta de las anteriores.

Tabla 13. - Purificación de las enzimas líticas extracelulares del M. xanthus por precipitación fraccionada con acetona.

Actividad específica	Actividad total	Actividad (u/ml x 10 ⁻³)	Volumen (ml)	% acetona (v/v)
82	11,355	5,450	50	0
993	3,552	2,450	50	50,0
100	1,520	30,4	50	(0 - 33,3)
400	1,560	31,2	50	(33,3 - 50)
1400	10,100	32,5	50	(50 - 100,0)

* Los resultados son la media de tres experiencias.

Tabla 14. - Fraccionamiento de los enzimas extracelulares en columna de DEAE-celulosa. Elución en gradiente de pH. Material de partida: 5,5 ml de muestra con una concentración de proteínas de 2,2 mg/ml.

Condiciones de elución: Gradiente de pH entre tampón de fosfato 0,025 M, pH 8 y tampón de fosfato 0,025 M, pH 5.
Volumen de las fracciones recogidas: 5 ml:

Fracción (nº)	Actividad lítica (u/ml x 10 ³)	Actividad proteolítica (u/ml x 10 ⁶)	Proteínas (µg/ml)
18	-	-	-
19	-	2	4
20	-	6	10
21	2	10,5	17,5
22	15	27	51,5
23	30	56	95
24	55	70	122,5
25	67	79,5	136,5
26	71	65	130
27	75	53	117,5
28	90	44	79
29	79	27,5	62,5
30	56	20	49
31	41	16	41
32	33	5,2	38,5
33	27	4,5	38
34	15	3,9	33
35	15	2,1	26,5
36	16	1,7	23,5
37	11	1	16
38	6	1	14
39	-	-	12
40	-	-	-

GRAFICA Nº 4 FRACIONAMIENTO DE LOS ENZIMAS EXTRACELULARES EN COLUMNA DE DEAE - CELULOSA. ELUCION EN GRADIENTE DE P.H.

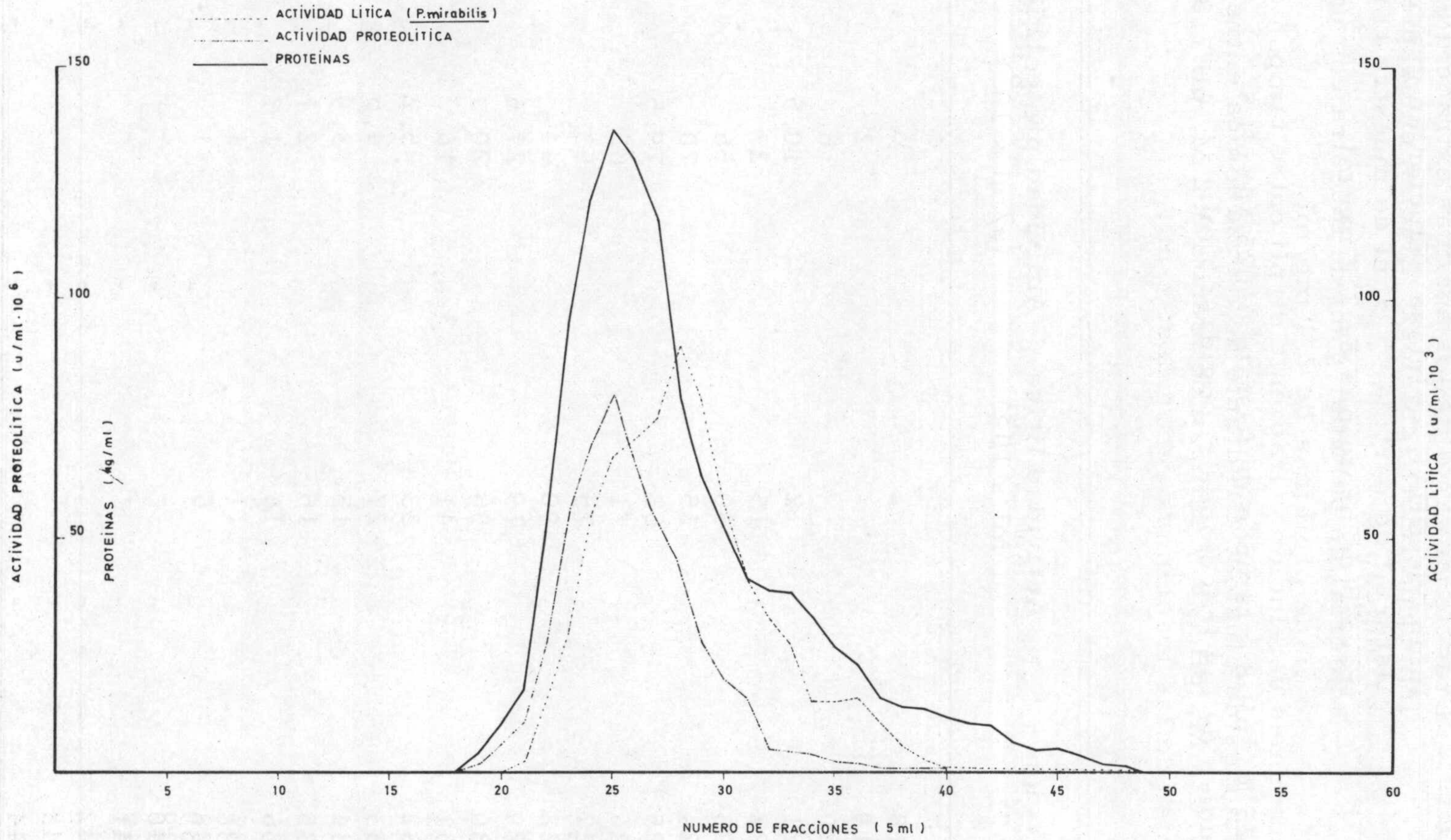


Tabla 15. - Fraccionamiento de los enzimas extracelulares en columna de DEAE-celulosa. Elución en gradiente de fuerza iónica.

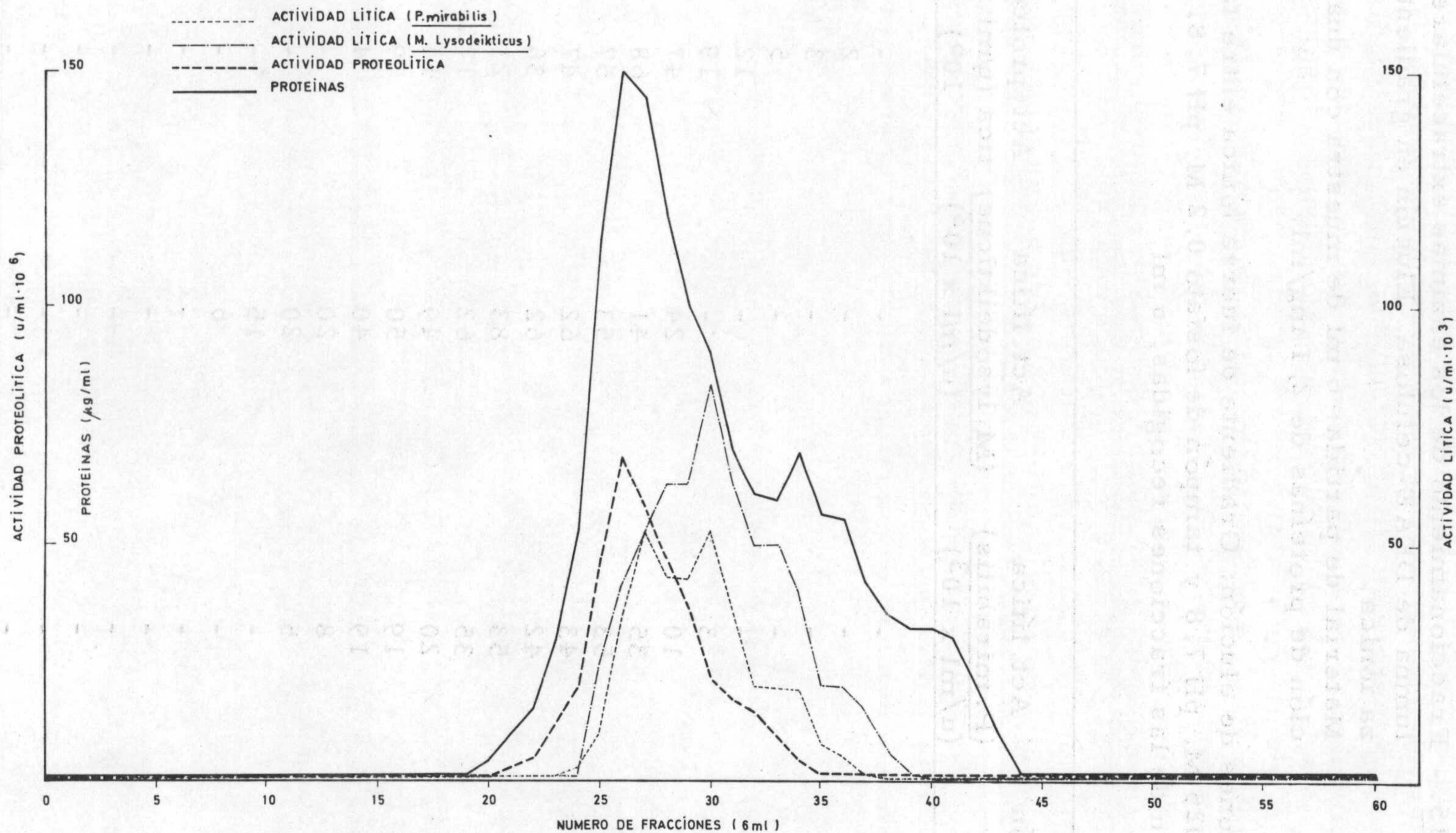
Material de partida: 6 ml de muestra con una concentración de proteínas de 2,1 mg/ml.

Condiciones de elución: Gradiente de fuerza iónica entre tampón fosfato 0,025 M, pH 7,8 y tampón de fosfato 0,2 M, pH 7,8.

Volumen de las fracciones recogidas: 6 ml.

Fracción (nº)	Act. lítica (<i>P. mirabilis</i>) (u/ml x 10 ³)	Act. lítica (<i>M. lysodeikticus</i>) (u/ml x 10 ³)	Act. proteolítica (u/ml x 10 ⁶)	Proteínas (µg/ml)
19	-	-	-	-
20	-	-	2	4
21	-	-	3	10
22	-	-	5	15
23	-	-	12	30
24	3	-	19	53
25	10	24	47	114
26	35	41	68	150
27	53	53	57	145
28	43	62	47	120
29	42	62	36	100
30	53	83	21	90
31	35	62	17	70
32	20	49	14	60
33	19	50	9	59
34	19	40	4	58
35	8	20	-	56
36	5	20	-	55
37	-	15	-	42
38	-	6	-	35
39	-	-	-	32
40	-	-	-	32
41	-	-	-	30
42	-	-	-	20
43	-	-	-	10
44	-	-	-	-

GRAFICA N° 5 FRACCIONAMIENTO DE LOS ENZIMAS EXTRACELULARES EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA.
ELUCION EN GRADIENTE DE FUERZA IONICA.



2.2.5. - Fraccionamiento sobre Sephadex G-200. - Se utilizó el mismo material de partida que en el caso del fraccionamiento en columnas de DEAE-celulosa.

Con las dos modalidades de flujo, normal e invertido, se obtuvieron resultados prácticamente iguales, son los que se expresan en la Tabla 16 y en la Gráfica 6, que corresponden a la media de cuatro experiencias.

Como puede observarse, mediante este procedimiento se han podido separar dos fracciones con actividad proteolítica, una de las cuales incluye toda la actividad lítica frente a P. mirabilis de la muestra, y una ligera actividad frente a M. lysodeikticus. Finalmente también se ha podido poner de manifiesto una tercera fracción, independiente de las anteriores, que muestra exclusivamente actividad lítica frente al M. lysodeikticus.

Tabla 16. - Fraccionamiento de los enzimas extracelulares en columna de Sephadex G-200.

Material de partida: 15 ml de muestra con una concentración de proteínas de 3,9 mg/ml.

Columna: Sephadex G-200 de 1000 mm de longitud y 25 mm de diámetro.

Condiciones de elución: tampón de fosfato 0,025 M, pH 7,5.

Volumen de las fracciones recogidas: 7 ml.

Fracción (nº)	Act. lítica (<u>P. mirabilis</u>) (u/ml x 10 ³)	Act. lítica (<u>M. lysodeikticus</u>) (u/ml x 10 ³)	Act. proteolítica (u/ml x 10 ⁶)	Proteínas (µg/ml)
18	-	-	-	6
19	-	-	-	13
20	-	-	-	17
21	-	-	-	33
22	4	10	6	49
23	8	18	8	83
24	10	20	10	77

Tabla 16. - (continuación)

Fracción (nº)	Act. lítica (<i>P. mirabilis</i>) (u/ml x 10 ³)	Act. lítica (<i>M. lysodeikticus</i>) (u/ml x 10 ³)	Act. proteolítica (u/ml x 10 ⁶)	Proteínas (µg/ml)
25	10	22	12	66
26	10	21	25	57
27	20	12	37	53
28	20	14	56	60
29	20	11,5	77	74
30	21	9,5	96	95
31	21	12	108	118
32	22	16	112	131
33	22	19	121	139
34	23	18	116	144
35	23	17	112	136
36	23	22	91	137
37	32	17	90	139
38	47	22	88	152
39	69	27	85	151
40	84,5	36,5	83	153
41	119	42,4	84	155
42	140	49,5	83	140
43	169	57	97	150
44	200	69,5	99	155
45	239	68	108	153
46	283	57	110	140
47	313	52	112	126
48	331	38,5	110	124
49	315	27	107	124
50	265	33	91	143
51	203	19	78	154
52	165	17,5	66	169
53	158	57,5	50	186
54	112	70	47	185
55	93	116,5	35	176
56	74	134	26	173
57	64	173,5	24	162
58	43	140	24	151

Tabla 16. - (continuación)

Fracción (nº)	Act. lítica (<i>P. mirabilis</i>) (u/ml x 10 ³)	Act. lítica (<i>M. lysodeikticus</i>) (u/ml x 10 ³)	Act. proteolítica (u/ml x 10 ⁶)	Proteínas (µg/ml)
59	38	95	15	138
60	25	68,5	10	138
61	15	56,5	7	120
62	10	32	3	109
63	5	27	1	87
64	-	25	-	59
65	-	20	-	53
66	-	10	-	34
67	-	5	-	15
68	-	-	-	9
69	-	-	-	3
70	-	-	-	-

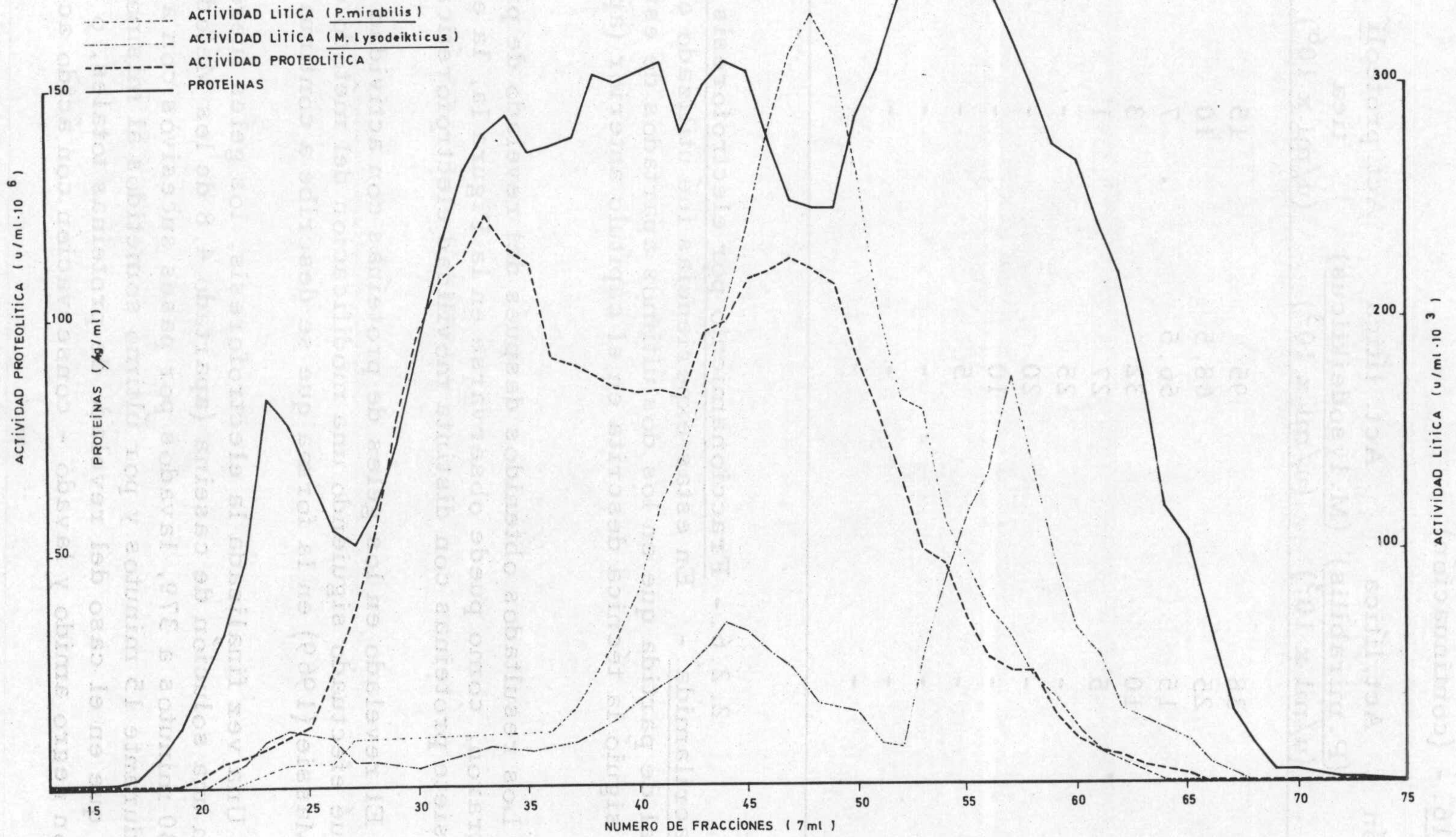
2.2.6. - Fraccionamiento por electroforesis en geles de poliacrilamida. - En estas experiencias fué utilizado el mismo material de partida que en los dos últimos apartados de este capítulo y se siguió la técnica descrita en el capítulo anterior (apartado 5.3).

Los resultados obtenidos después del revelado de proteínas demostraron, como puede observarse en la Figura Ia, la existencia de siete proteínas con distinta movilidad electroforética.

El revelado en los geles de proteínas con actividad proteolítica fué efectuado siguiendo una modificación del método de Millner y Massie (1969) en la forma que se describe a continuación:

Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron incubados con una solución de caseína (apartado 4.8 de los Métodos) durante 30 minutos a 37º, lavados por pases sucesivos con agua destilada durante 15 minutos y por último sometidos al mismo tratamiento que en el caso del revelado de proteínas totales, o sea, tinción con negro amido y lavado - conservación con ácido acético al 7%.

GRAFICA N°6 FRACCIONAMIENTO DE LOS EUZIMAS EXTRACELULARES EN COLUMNA DE SEPHADEX G-200.



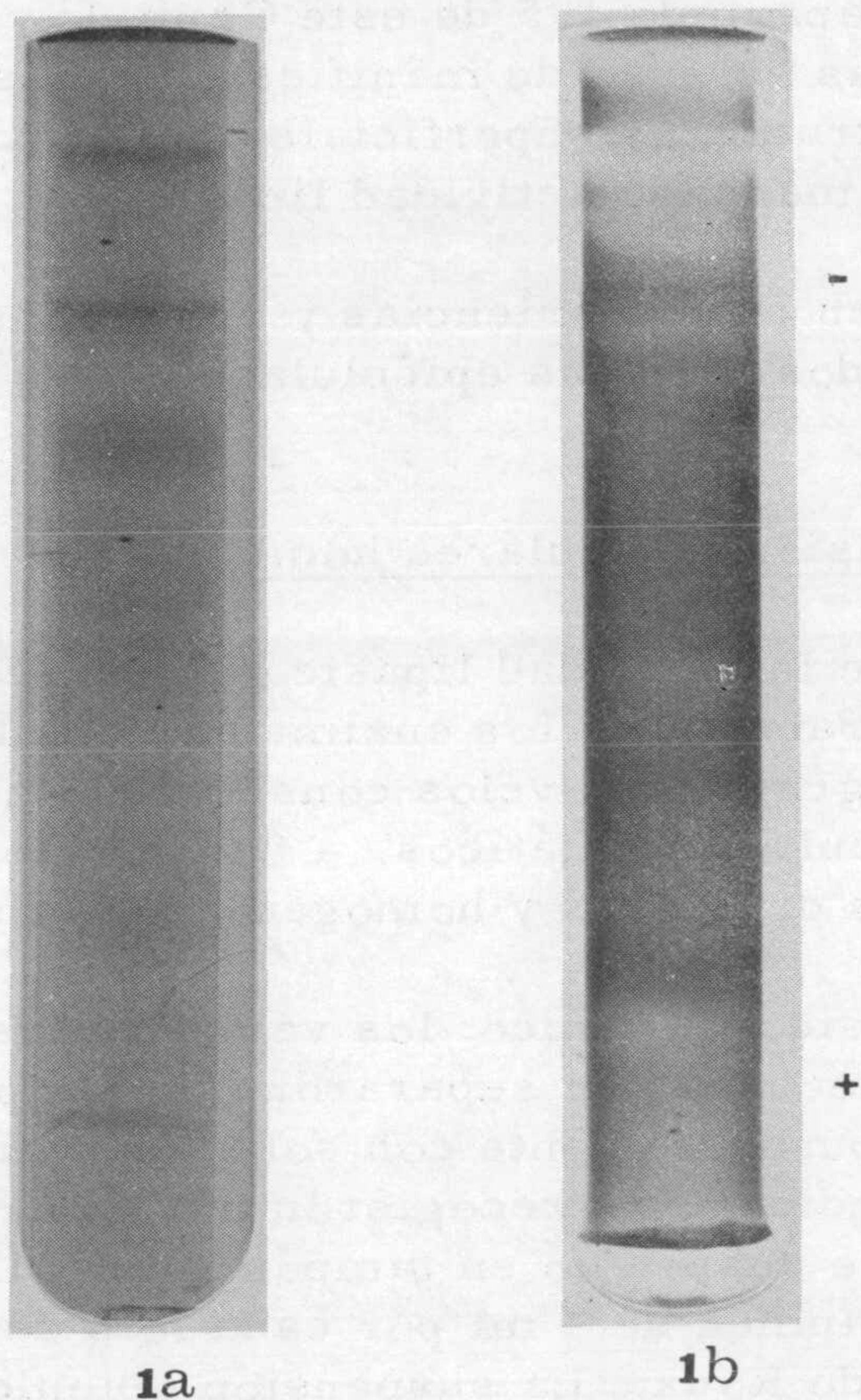


Fig. 1. - Electroforesis en geles de poliacrilamida de una preparación de enzimas extracelulares. 1.a: revelado de proteínas. 1.b: revelado de enzimas con actividad proteolítica.

La existencia de proteínas con actividad proteolítica viene puesta de manifiesto por la aparición de áreas claras, como resultado de la hidrólisis de la caseína, en contraste con el color azul intenso que toma el resto del gel.

Los resultados obtenidos, que pueden observarse en la figura 1.b confirman, de una parte la existencia ya demostrada de enzimas proteolíticos extracelulares, pero al mismo tiempo indican que el sistema de enzimas proteolíticos es mucho más que lo que deducía en las experiencias de fraccionamiento en columna de DEAE-celulosa o Sephadex, ya que como puede observarse se aprecian claramente un mínimo de ocho proteínas que emigran con distinta velocidad en el campo electroforético dotadas de actividad proteolítica.

La sensibilidad del método empleado para revelar dicha actividad queda demostrada por el hecho de que puede poner de manifiesto actividad proteolítica de proteínas presentes en tan escasa cantidad que no pueden observarse con el revelado normal.

3. - ENZIMAS EPICELULARES.

Tal como se mostró en el apartado 1.5 de este Capítulo, en las experiencias previas realizadas se puso de manifiesto la existencia de enzimas unidos a las estructuras superficiales del M. xanthus dotados, al parecer, de una marcada actividad lipásica.

En este apartado se exponen las experiencias y resultados obtenidos en el estudio de los citados enzimas epicelulares.

3.1. - Obtención de suspensiones celulares homogéneas.

Tanto para la valoración de la actividad lipásica de suspensiones celulares como para la extracción de los enzimas epicelulares, fué necesario proceder a disgregar los velos consistentes que forma el M. xanthus al crecer en cultivos estáticos, a fin de obtener suspensiones celulares lo más dispersas y homogéneas posibles.

El tratamiento seguido ha sido mecánico: los velos, provenientes de cultivos en un medio adecuado, se separaron por simple filtración por papel, se lavaron abundantemente con solución salina y finalmente, después de resuspendidos, se recogieron por centrifugación. El sedimento obtenido se suspendió en tampón Tris-ClH 0,025 M, pH 7,5, utilizando un volumen de 4 ml por cada lote de células provenientes de un frasco de Roux. La suspensión obtenida se dispersó, en frío, en un homogenizador de cuchillas, a 25.000 r.p.m. durante dos minutos.

3.2. - Factores culturales que afectan su producción.

Se ha estudiado la influencia que ejerce el tiempo de cultivo y la naturaleza de los medios sobre la actividad lipásica de las suspensiones celulares. Como en casos anteriores la modalidad de cultivo utilizada fué la de cultivos estáticos en frascos de Roux; la actividad lipásica se determinó en todas las ocasiones por la técnica de Gomori (1945).

3.2.1. - Tiempo de cultivo, - Las experiencias se llevaron a cabo sembrando con la misma cantidad de inóculo 10 -- frascos de Roux, conteniendo 125 ml de medio M-4, que se incubaron a 28°. Cada 24 horas se recogieron las células provenientes de un frasco de Roux y se determinó su actividad lipásica, expresándose los resultados en unidades totales por frasco de Roux. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 17 y muestran que el máximo de actividad se obtiene a las 120 horas de incubación, momento que, como se ha expuesto en otras ocasiones, coincide con el inicio de la fructificación. Aún en el caso extremo de tiempos de cultivo de 240 horas, no pudo demostrarse actividad lipásica apreciable en los sobrenadantes exentos de células.

Tabla 17. - Influencia del tiempo de cultivo sobre la actividad lipásica de las células de M. xanthus.*

Tiempo de cultivo (horas)	Actividad lipásica (unidades totales)**
24	--
48	--
72	688
96	3700
120	4371
144	2650
168	1375
192	1140
216	780
240	528

* Los resultados son la media de dos experiencias.

** Véase explicación en el texto.

3.2.2. - Medios de cultivo. - Se ensayaron los medios M-4, M-5, M-6 y M-7. Como en el caso anterior los frascos de Roux se sembraron con la misma cantidad de inóculo y se incubaron a 28°. El tiempo de incubación fué de 120 horas.

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 18. Como en la experiencia anterior, se expresan en unidades totales por frasco de Roux y muestran que a diferencia de lo que ocurre con los enzimas extracelulares, la actividad lipásica de las células no viene afectada apreciablemente por la naturaleza del medio en que crecen, por lo que debe ser considerada como debida a enzimas constitutivos.

Tabla 18. - Actividad lipásica de células de M. xanthus obtenidas en diferentes medios de cultivo[⊗].

Medios	Actividad lipásica (unidades totales) ^{⊗ ⊗}
M-4	3.520
M-5	3.639
M-6	3.511
M-7	3.700

⊗ Los resultados son la media de dos experiencias.

⊗⊗ Véase explicación en el texto.

3.3. - Extracción de enzimas epicelulares.

Como paso previo a su purificación y fraccionamiento fué necesario proceder a la extracción de los enzimas epicelulares, mediante tratamientos con diversos agentes químicos. Como material de partida se emplearon en todos los casos suspensiones homogéneas en solución salina de células lavadas de M. xanthus, obteni-

das a partir de cultivos de 120 horas en medio M-7.

A partir de cada frasco de Roux con 125 ml de medio se obtuvieron 4 ml de suspensión de células.

3.3.1. - Extracción con agentes tensoactivos. - En las experiencias preliminares (1.5) realizadas para la demostración de los enzimas epicelulares, pudo observarse que en los sobrenadantes obtenidos después de someter a centrifugación la mezcla de células de M. xanthus y Tween 20, empleada para la valoración de la actividad lipolítica de aquéllas, seguía produciéndose liberación de ácidos, lo que indicaba que los enzimas responsables de la esterificación del Tween 20, presentes en las estructuras superficiales del M. xanthus, seguían ejerciendo su acción y por consiguiente habían sido extraídas por el sustrato empleado en el ensayo (Tween 20 al 10 % en acetato sódico 0,5 M).

Esta observación llevó a proyectar la extracción de los enzimas epicelulares lipolíticos mediante tratamientos con el citado detergente para lo cual se montaron una serie de experiencias encaminadas a mostrar, de una parte, el tiempo óptimo en el que se conseguía extraer un máximo de actividad y, de otra, la concentración más adecuada para el mismo fin.

El tiempo óptimo de extracción se determinó usando como solución extractora Tween 20 al 10 % en acetato sódico 0,5 M. Se emplearon 5 volúmenes de la solución de Tween por cada uno de suspensión celular y el proceso se llevó a 40 con agitación continua. Finalizada la extracción, la mezcla se centrifugó a 20.000 xg durante 20 minutos en centrífuga refrigerada; el sobrenadante fué recogido y dializado en nevera frente a tampón Tris-ClH 0,025 M, pH 7,5, adicionado de cloruro sódico al 0,85 %; ensayándose finalmente su actividad por la técnica de Gomori (1945).

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 19 y demuestran que la máxima actividad de los extractos se logra empleando un tiempo de seis horas.

Tabla 19. - Actividad lipásica de extractos obtenidos por tratamiento de células de M. xanthus con Tween 20 (10 % en acetato sódico 0,5 M) durante diversos tiempos.

Horas	Actividad lipásica de los extractos [⌘] (unidades totales)
1	915
2	1575
4	1840
6	2320
8	2125
10	1630
12	1540
14	1200

⌘ Material de partida para cada extracción: 2 ml de suspensión de células con una actividad lipásica total de 2450 unidades.

Estos resultados sin embargo es posible que no sean reflejo exacto de la realidad, ya que, como el Tween 20 es al mismo tiempo sustrato de los enzimas que se extraen, a medida que se aumenta el tiempo de extracción la acidez del medio aumenta, con lo que es muy probable que parte de los enzimas extraídos se vayan inactivando.

En cuanto a la concentración óptima de Tween 20, se determinó fijando un tiempo de extracción de 6 horas y variando la concentración de Tween 20, en acetato sódico 0,5 M, desde 0 % a 35 %. Los resultados se exponen en la Tabla 20, y muestran que la máxima actividad de los extractos se obtiene empleando Tween 20 al 30 %. Llama la atención que la actividad total de los extractos es mayor en varios casos que la mostrada por el material celular de partida. Se atribuyen estos resultados al hecho de que en los extractos los enzimas, al encontrarse en solución, pueden ponerse más fácilmente en contacto con el sustrato que cuando se encuentran unidos a estructu-

ras celulares y englobadas además en la matriz mucosa propia de las mixobacterias.

Tabla 20. - Influencia de la concentración de Tween 20, sobre la extracción de lipasas epicelulares de M. xanthus.

Tween 20 % (v/v)	Actividad lipásica de los extractos ^{**} (unidades totales)
0	630
5	1.240
10	1.580
15	1.610
20	2.070
25	3.380
30	3.510
35	550

^{**} Material de partida para cada extracción: 2 ml de suspensión de células con una actividad lipásica total de 1.960 unidades.

Al objeto de evitar los inconvenientes derivados del hecho de que el agente empleado para la extracción es al mismo tiempo sustrato de los enzimas extraídos, se estudió el empleo de otras sustancias tensoactivas: dodecilsulfato sódico y desoxicolato sódico. Igualmente, dado que la solución de acetato sódico 0,5 M demostró poseer cierta capacidad de extracción (Tabla 20, 0 % de Tween 20), se pensó que empleado a más altas concentraciones pudiera ser buen agente extractor. Las experiencias realizadas en este sentido, cuyos resultados se exponen en la Tabla 21, muestran, sin embargo, que los resultados obtenidos fueron siempre inferiores a los logrados con el Tween 20.

Tabla 21. - Actividad lipásica de los extractos obtenidos a partir de células de M. xanthus por tratamiento con diversos agentes químicos.

Agentes empleados		Actividad lipásica de los extractos [⌘] (unidades totales)
Acetato sódico	0,5 M	745
	1 M	324
Dodecilsulfato sódico	0,1 %	1.350
	0,3 %	1.080
	0,5 %	584
Desoxicolato sódico	10 %	745
	20 %	632
Tween 20	10 %	1.875

⌘ Material de partida para cada extracción: 2 ml de suspensión de células con una actividad lipásica total de 2.340 unidades.

Finalmente ha de hacerse notar que a pesar de que la concentración óptima de Tween 20 para la extracción fué del 30 %, el empleo de concentraciones superiores al 10 % resulta engorroso debido a su gran viscosidad, por lo que, aún a sabiendas de que se pierde aproximadamente un 100 % de actividad, se emplearon concentraciones del 10 % para la obtención de los extractos que se utilizaron en manipulaciones posteriores.

3.3.2. - Extracción con n-butanol. - El hecho de que los enzimas epicelulares con actividad lipásica puedan ser extraídos con detergentes de las células donde se encuentran localizados, hizo sospechar que formarían parte de estructuras lipoproteínicas presentes en la pared celular. Efectivamente, tratando los extractos, ligeramente opalinos, obtenidos por extracción con Tween 20 con n-butanol (Morton, 1955) se pudieron obtener soluciones acuosas perfectamente transparentes dotadas de la misma actividad lipásica,

mientras que la fase butanólica dejó por evaporación un residuo, in soluble en agua y soluble en cambio en disolventes orgánicos, pro- pio de lípidos.

Se pensó entonces en aplicar la técnica de Morton a la extrac ción directa de los enzimas epicelulares a partir de las células y di sociados ya del componente lipídico. La aplicación de la citada téc- nica para este fin se llevó a cabo como sigue:

Un volumen de suspensión de células se mezcló con cinco vo- lúmenes de acetato sódico 0,5 M y a la suspensión así obtenida se - añadió un 30 % de su volumen de n-butanol. La adición de n-butanol se hizo en agitación continua y gota a gota, de manera que se tardó 15 minutos en la adición del volumen total; terminada la adición se mantuvo la mezcla en agitación otros 30 minutos, al cabo de los cua- les se centrifugó a 20.000 xg durante 20 minutos, recogiendo la fa- se acuosa que se dializó frente a tampón Tris-ClH 0,025 M, pH 7,5, añadido de cloruro sódico al 0,85 %, para eliminar el butanol disuel- to. Todas las manipulaciones citadas se llevaron a cabo entre 0º y 4º.

La actividad lipásica de los extractos obtenidos por este pro- cedimiento (unidades totales) fué del mismo orden que la obtenida en tratamientos con Tween 20 al 10 %.

3.4. - Comprobación de la actividad lipásica de los extrac- tos frente a otros sustratos distintos del Tween 20.

La técnica de Gomori (1945) empleada hasta el momento en la determinación de la actividad lipásica de los enzimas epicelula- res extraídos, demuestra indudablemente que éstos son capaces de hidrolizar los esteres del ácido laurico pero no indica si son capa- ces de esterificar, igualmente lípidos del tipo de las grasas verdade- ras o triglicéridos y otros más complejos aún como son los lípidos de la pared celular de las bacterias.

Para aclarar este punto se comprobó la actividad lipolítica de los extractos obtenidos por tratamiento con Tween 20 al 10 % y n-butanol, frente a aceite de oliva y lípidos procedentes de bacte--

rias Gram negativas, de acuerdo con las técnicas descritas en el -- apartado 4.9.3 del capítulo anterior.

En relación con el aceite de oliva, la actividad lipásica de -- los extractos fué prácticamente igual a la demostrada por la técnica de Gomori (1945) frente a Tween 20, lo que confirma la existencia -- de verdaderas lipasas entre los enzimas epicelulares.

En cuanto a su acción sobre los lípidos bacterianos, un con- -- junto de cuatro experiencias realizadas por la técnica de Willstätter et al (1923), puso de manifiesto que los enzimas epicelulares eran -- igualmente activos frente a este sustrato, si bien la actividad fué -- solamente de un 26,7 % que la mostrada frente a Tween 20.

3.5. - Fraccionamiento y caracterización de los enzimas -- epicelulares.

Todas las experiencias expuestas en este apartado fueron lle -- vadas a cabo sobre extractos obtenidos por tratamiento directo de -- las células con n-butanol o con Tween 20 al 10 %. Ocasionalmente -- se utilizaron extractos obtenidos por tratamiento con n-butanol de -- los obtenidos con Tween 20.

3.5.1. - Precipitación fraccionada con acetona. - Se -- llevó a cabo añadiendo a los extractos, mantenidos entre 0º y 4º, un volumen igual de acetona (50 % acetona, v/v), previamente enfriada a -25º. La mezcla, mantenida a 0º se dejó en reposo durante 3 ho -- ras, al cabo de las cuales el precipitado formado se recogió por -- centrifugación, se disolvió en tampón Tris-ClH 0,025 M, pH 7,5, -- añadido de cloruro sódico al 0,85 %, se dializó frente a este mismo disolvente para eliminar los residuos de acetona y finalmente se pro -- cedió a valorar la actividad lipásica y el contenido en proteínas en -- la fracción obtenida (fracción 50 %).

Al sobrenadante procedente de la centrifugación se añadió un volumen igual de acetona (66,6 % de acetona, v/v) y operando exac -- tamente igual que como se ha descrito anteriormente se obtuvo una segunda fracción (fracción 66,6 %) en la que se determinó igualmen --

te actividad lipásica y contenido en proteínas.

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 22 y muestran que, prácticamente, todas las proteínas con actividad lipásica se recogen en la fracción 66,6 %. De acuerdo con ello, todas las experiencias posteriores de fraccionamiento y purificación se llevaron a cabo partiendo de la citada fracción.

Tabla 22. - Purificación mediante precipitación fraccionada con acetona, de las lipasas epicelulares de M. xanthus. *.

Etapa	Volumen (ml)	Actividad (u/ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad total	Actividad específica
Extracto células	48	98	1,7	4.704	57,6
Fracción 50% **	10	93	1,7	930	54,6
Fracción 66,6% ***	10	373	3,2	3.730	116,5

* Los resultados obtenidos son la media de 4 experiencias.

*** Véase explicación en el texto.

3.5.2. - Fraccionamiento con DEAE-celulosa. - Se llevó a cabo a partir de la fracción 66,6 % obtenida por precipitación con acetona. Se utilizaron columnas de 15 mm de diámetro y 150 mm de longitud, y volúmenes de muestra de 6 ml. La elución se llevó a cabo a fuerza iónica constante y gradiente de pH entre 8 y 5 y, alternativamente a pH constante (pH 8) y gradiente de fuerza iónica entre soluciones de cloruro sódico 0,025 M y 1 M. En los dos casos, la casi totalidad de la actividad se concentró en un sólo pico, no habiéndose conseguido, por tanto, por este procedimiento demostrar la existencia de fracciones proteínicas distintas dotadas con actividad lipásica.

En la Tabla 23 y la Gráfica 7, se muestran los resultados de una de las experiencias citadas.

Tabla 23. - Fraccionamiento en columna de DEAE-celulosa de las lipasas epicelulares de M. xanthus.

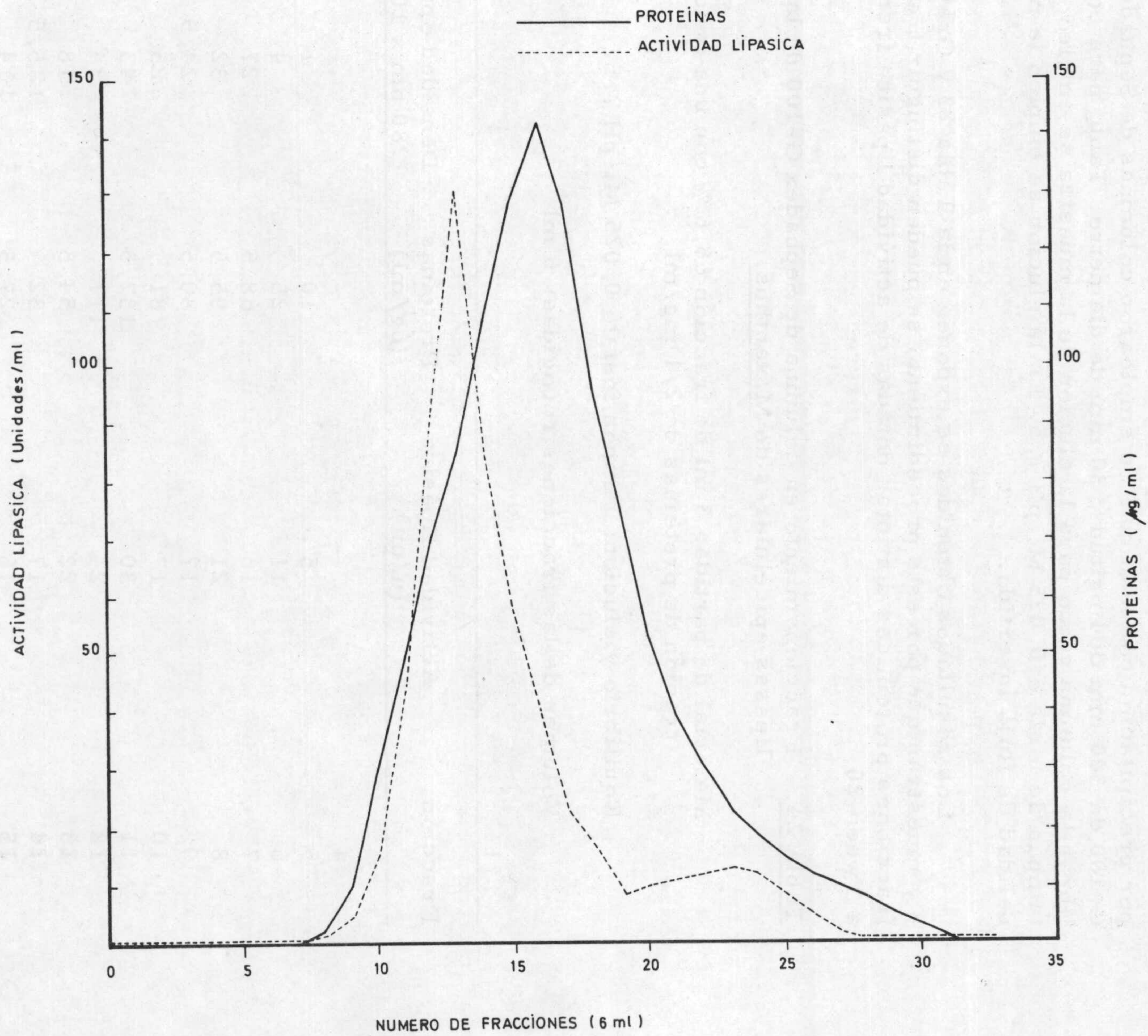
Material de partida: 4 ml de fracción 66,6 % con una concentración de proteínas de 1,81 mg/ml.

Condiciones de elución: Gradiente de fuerza iónica entre tampón de fosfato 0,025 M, pH 8, en cloruro sódico 0,025 M y tampón fosfato 0,025 M, pH 8, en cloruro sódico 1 M.

Volumen de las fracciones recogidas: 6 ml.

Fracciones	Actividad lipásica (unidades/ml)	Proteínas µg/ml
7	-	-
8	2	3
9	5	11
10	16	30
11	45	50
12	90	70
13	130	85
14	85	108
15	58	128
16	40	142
17	23	128
18	17	96
19	8	75
20	10	53
21	11	39
22	12	31
23	13	23
24	12	19
25	8	15
26	5	12
27	2	10
28	-	8
29	-	5
30	-	3
31	-	-

GRAFICA N° 7. FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA DE LAS LIPASAS EPICELULARES DEL *M. xanthus*.



3.5.3. - Fraccionamiento en columna de Sephadex. -

Se llevó a cabo igualmente, a partir de la fracción 66,6 % obtenida por precipitación con acetona. Se emplearon columnas de Sephadex G-100 de 300 mm de longitud y 30 mm de diámetro. Tanto para equilibrar la columna como para la elución de la muestra se empleó -- tampón de fosfato 0,025 M, pH 7,5. En la elución se empleó la modalidad de flujo invertido.

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 23 y Gráfica 8 y muestran que por este procedimiento se pueden distinguir tres - fracciones proteínicas distintas dotadas de actividad lipásica frente a Tween 20.

Tabla 24. - Fraccionamiento en columna de Sephadex G-100 de las - lipasas epicelulares de M. xanthus.

Material de partida: 3 ml de fracción 66,6 % con una concentración de proteínas de 2,1 mg/ml.

Equilibrio y elución: tampón fosfato 0,025 M, pH 7,5.

Volumen de las fracciones recogidas: 6 ml.

Fracción	Actividad lipásica (u/ml)	Proteínas (μ g/ml)	Densidad óptica (280 nm x 100)
4	-	-	-
5	5	10	1
6	11	25	4
7	16	68,5	27
8	21	95,5	32
9	17	80,5	24,5
10	17	81	25
11	30	137,5	43
12	24	111	34
13	22	54,5	18
14	17	32	5,5
15	16	27,5	4

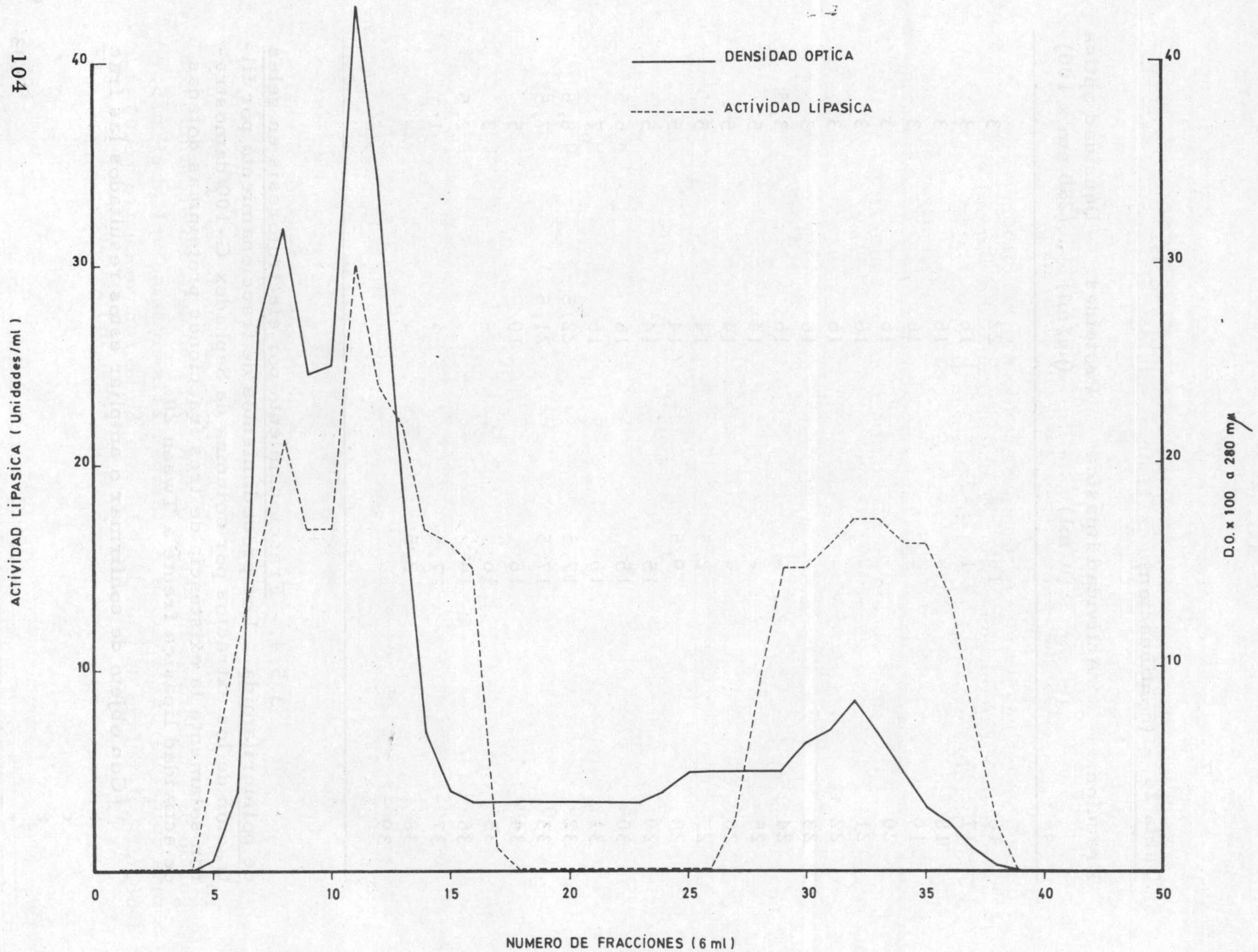
Tabla 24. - (continuación)

Fracción	Actividad lipásica (u/ml)	Proteínas (μg/ml)	Densidad óptica (280 nm x 100)
16	15	22	3
17	1	16	3
18	-	16	3
19	-	16	3
20	-	16	3
21	-	16	3
22	-	16	3
23	-	16	3
24	-	16	3,5
25	-	14	5
26	-	14	5
27	2,5	14	5
28	9,5	14	5
29	15	14	5
30	15	16	6,5
31	16	16	7
32	17,5	22,5	8,5
33	17,5	21,5	7,5
34	16	10	5
35	16	-	3
36	14	-	2,5
37	7,5	-	1
38	2,5	-	-
39	-	-	-

3.5.4. - Fraccionamiento por electroforesis en geles de poliacrilamida. - Los procedimientos de fraccionamiento por filtración de los extractos por columna de Sephadex G-100 demostraron solamente la existencia de tres fracciones proteínicas dotadas de actividad lipásica frente a Tween 20.

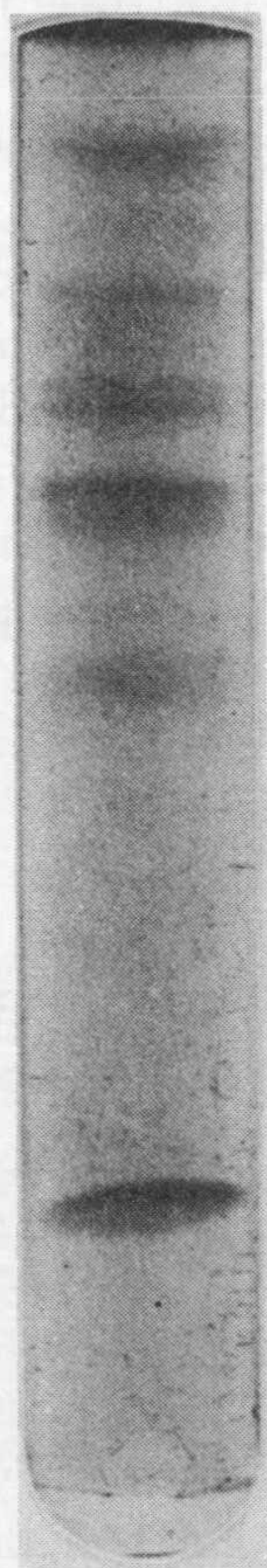
Con objeto de confirmar o ampliar estos resultados las frac

GRAFICA N.º 8 FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA DE SEPHADEX G-100 DE LAS LIPASAS EPICELULARES DE M. xanthus.



ciones 66,6 % se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida, de acuerdo con las técnicas descritas en el apartado 5.3 del capítulo anterior.

Los resultados obtenidos después del revelado de proteínas demostraron, como puede observarse en la figura 2, de un mínimo de 10 proteínas con distinta movilidad electroforética.



3.5.4.1. - Revelado de proteínas con actividad lipásica frente a Tween 20. - Al objeto de observar las proteínas que, entre las 10 anteriormente citadas, mostraban actividad lipásica frente a Tween 20, se utilizó el siguiente método original de revelado.

Después de terminada la electroforesis, los geles se incubaron a la temperatura ambiente durante dos horas en presencia de una solución al 10 % de Tween 20, bien en tampón Tris-maleico 0,1 M, pH 6,5, o bien en tampón Tris-ClH 0,1 M, pH 8. En ambos casos, se añadió a la solución de Tween 20 una pequeña cantidad de cloruro cálcico (10 gotas del CaCl_2 al 1 % por cada 100 ml de solución).

En los casos en que el revelado se realizó a pH 8, los geles no sufrieron ningún tratamiento previo. Por el contrario, cuando el ensayo se realizó a pH 6,5, fué necesario primero bajar el pH de los geles al nivel indicado, lo que se logró lavándolos durante una hora, en agitación continua con tampón Tris-maleico 0,1 M pH 6,5; -

Fig. 2. - Electroforesis en gel de poliacrilamida de enzimas epiteliales (fracción 66,6 %). Revelado de proteínas.

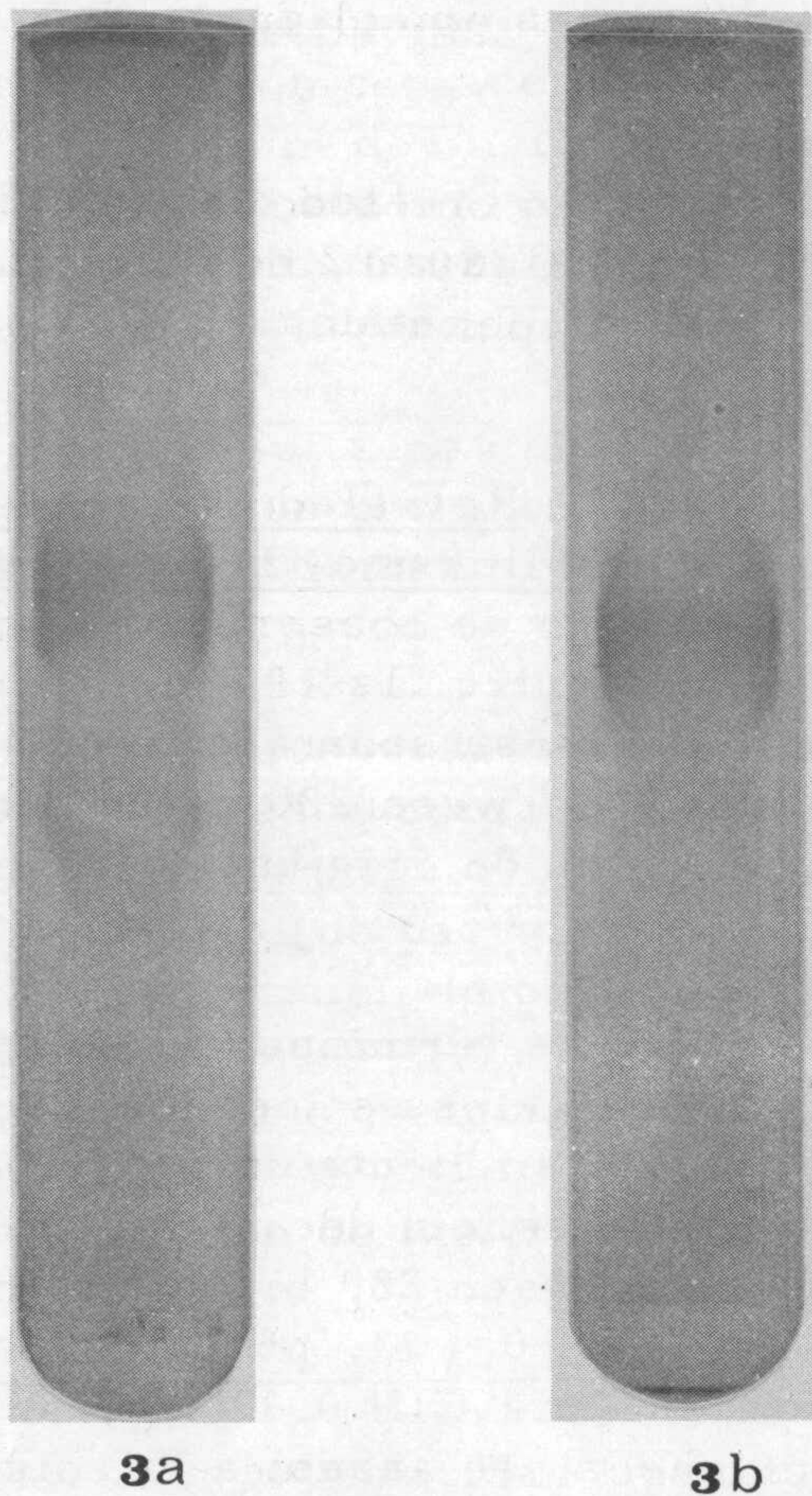


Fig. 3. - Electroforesis en geles de poli-acrilamida de enzimas epiteliales (fracción 66,6 %). Revelado de proteínas con actividad lipásica frente a Tween 20.

3. a: pH 6,5. 3. b: pH 8.

En los dos primeros casos el pH de los geles se rebajó al nivel adecuado como en la experiencia anterior.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos en dos experiencias típicas de revelado por este método a pH 6,5 y 8, respectivamente. a pH 6,5 aparecen solamente dos bandas, en contraste con

La presencia de -- proteínas dotadas de -- actividad lipásica frente a Tween 20, a uno y otro pH, fué detectada por la aparición de bandas opacas correspondientes al depósito de la sal del ácido láurico originado en la esterificación del Tween 20.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, donde a pH 6,5 aparecen tres bandas correspondientes a otras tantas proteínas con actividad lipásica, en tanto que a pH 8 sólo dos de ellas siguen mostrando la citada actividad.

3.5.4.2. - Revelado de proteínas con actividad esterásica frente a α -naftilacetato. - Se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita en el apartado 5.4.1 del capítulo anterior, y a pH 6,5, 7 y 8. En los dos prime-

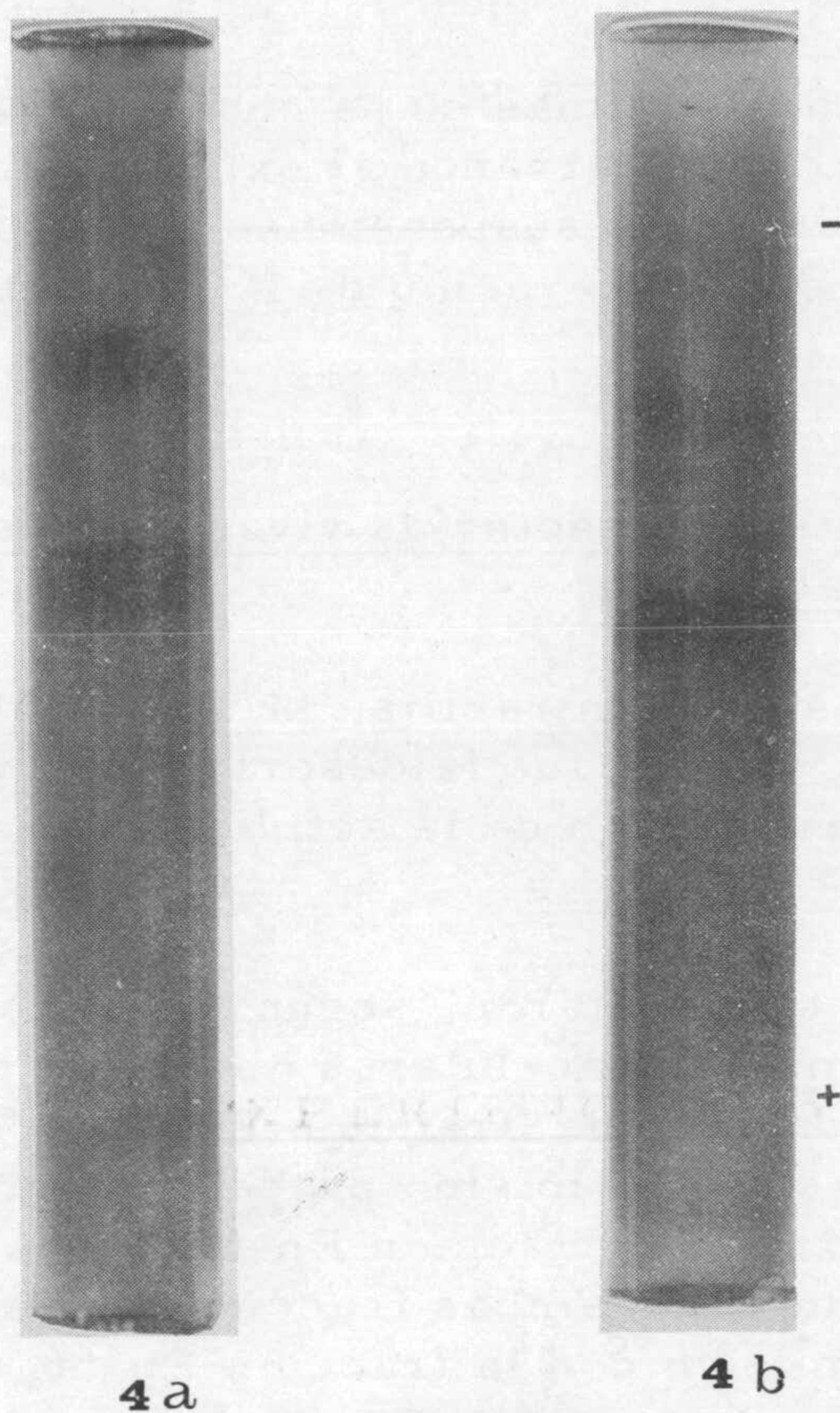


Fig. 4. - Electroforesis en geles de poliacrilamida de enzimas epicelulares (fracción 6,66 %). Revelado de proteínas con actividad esterase frente a α -naftilacetato. 4.a: pH 6,5. 4.b: pH 8.

4. - ESTUDIOS DEL EFECTO LITICO DE LOS ENZIMAS EXTRACELULARES Y EPICELULARES DEL M. XANTHUS SOBRE BACTERIAS VIVAS.

Como parte final de este trabajo de Tesis Doctoral, se ha ensayado si los enzimas extracelulares y epicelulares estudiados, actuando separada o conjuntamente mostraban algún efecto lítico sobre

las cuatro que pueden ser observadas en el revelado llevado a -- pH 8.

3.5.4.3. - Revelado de proteínas con actividad proteolítica. - Se siguió la misma técnica empleada en el caso de los enzimas extracelulares. Los resultados obtenidos fueron uniformemente negativos, tal como cabía esperar -- por los resultados también negativos que se obtuvieron cuando, en experiencias previas, se investigó la actividad proteolítica de los extractos con enzimas epicelulares frente a caseína.

las bacterias vivas.

El efecto lítico de los citados enzimas se ha ensayado por dos procedimientos, uno, el clásico, observando si existe disminución de la densidad óptica en las diversas suspensiones bacterianas tratadas, y otro, original, midiendo la liberación de P^{32} a partir de bacterias marcadas.

4. 1. - Observación de la lisis de bacterias vivas por disminución de la densidad óptica.

Se emplearon suspensiones de P. mirabilis, M. lysodeikticus, S. aureus y B. subtilis. La técnica seguida fué la descrita en el capítulo anterior (4. 6. 1) para la determinación de la actividad lítica -- frente a células autoclavadas de P. mirabilis.

Las suspensiones celulares se trataron, según la técnica -- descrita, con la fracción de enzimas extracelulares obtenidas por -- precipitación con dos volúmenes de acetona (fracción Ex-66, 6 %), -- los enzimas epicelulares obtenidos por el mismo procedimiento a -- partir de los correspondientes extractos (fracción Ep-66, 6 %), así -- como con mezclas volumen a volumen de ambas fracciones. Tam-- bién se ensayó el efecto del tratamiento con la fracción Ep-66, 6 % -- seguido de lavado y tratamiento con la fracción Ex-66, 6 %.

Los resultados fueron francamente desalentadores. Solamen-- te en el caso del M. lysodeikticus se obtuvieron resultados positivos, -- aunque bajos, y sólo en tratamientos con la fracción Ex-66, 6 %. En -- los restantes casos no se apreció disminución apreciable de la D. O. -- durante el tiempo de incubación indicado en la técnica empleada. So-- lamente cuando el tiempo de incubación se prolongó durante 24 horas -- pudo apreciarse cierto grado de lisis en las restantes bacterias, pe-- ro dado el tiempo transcurrido no se puede conceder validez a estos -- resultados, ya que pueden ser el resultado de fenómenos de autólisis.

4. 2. - Observación de la lisis de bacterias vivas marcadas con P^{32} mediante medida de la radioactividad liberada.

A la vista de los resultados prácticamente negativos obtenidos por el procedimiento anterior, se pensó en la utilización de un método más sensible que permitiese detectar la lisis celular, caso de producirse ésta, en un tiempo en el que no interfiriesen los fenómenos de autólisis. A tal fin se pensó en incorporar a la bacteria un elemento radioactivo, fácilmente detectable cuando fuese liberado al medio, debido al efecto lítico de los enzimas ensayados sobre las células marcadas. El elemento radioactivo empleado fué el P^{32} y las bacterias sobre las que se efectuaron los ensayos fueron en principio el M. lysodeikticus, S. aureus y P. mirabilis; posteriormente y dadas las dificultades prácticas que planteaba la experimentación simultánea sobre tres tipos de bacterias, solamente se completaron las experiencias con P. mirabilis y M. lysodeikticus.

4.2.1. - Marcado de las células. - Se llevó a cabo cultivando las bacterias en presencia de P^{32} a la concentración de 0,25 $\mu C/ml$ y añadido al medio en forma de fosfato; los medios empleados fueron agar común en el caso de P. mirabilis y agar B/10 en el caso del M. lysodeikticus. En ambos casos los cultivos se incubaron a 37° durante 18 horas, transcurridas las cuales las células fueron recogidas con solución salina estéril y lavadas por centrifugación con la citada solución hasta que no se detectó radioactividad en los sobrenadantes; normalmente bastan 3 lavados para conseguir este objetivo. Las células lavadas fueron finalmente suspendidas en tampón Tris-ClH 0,025 M, pH 7,5 y diluídas hasta que se obtuvo una opacidad semejante a la utilizada en la determinación de la actividad lítica frente a P. mirabilis (apartado 4.6.1 del capítulo anterior).

4.2.2. - Realización de las experiencias. - 2 ml de la suspensión de células marcadas se mezclaron con un volumen igual de tampón Tris-ClH 0,025 M, pH 7,5, conteniendo la preparación enzimática a ensayar. La mezcla fué incubada a 37° durante dos horas al cabo de las cuales se centrifugó a 5.000 xg durante 20 minutos. En cada caso se tomaron 2 ml de sobrenadante que, después de evaporados hasta sequedad fueron utilizados para la medida del P^{32} liberado.

Dado que durante el tiempo de incubación y centrifugación de

be existir un paso al medio de parte de los fosfatos solubles existentes en el interior de la célula, en todas las experiencias realizadas se incluyeron blancos, en los que las preparaciones enzimáticas -- fueron sustituidas por 2 ml de tampón Tris-ClH 0,025 M, pH 7,5 y que se manipularon exactamente igual que las muestras problema.

4.2.3. - Ensayos realizados y resultados. - Las preparaciones enzimáticas ensayadas fueron las siguientes:

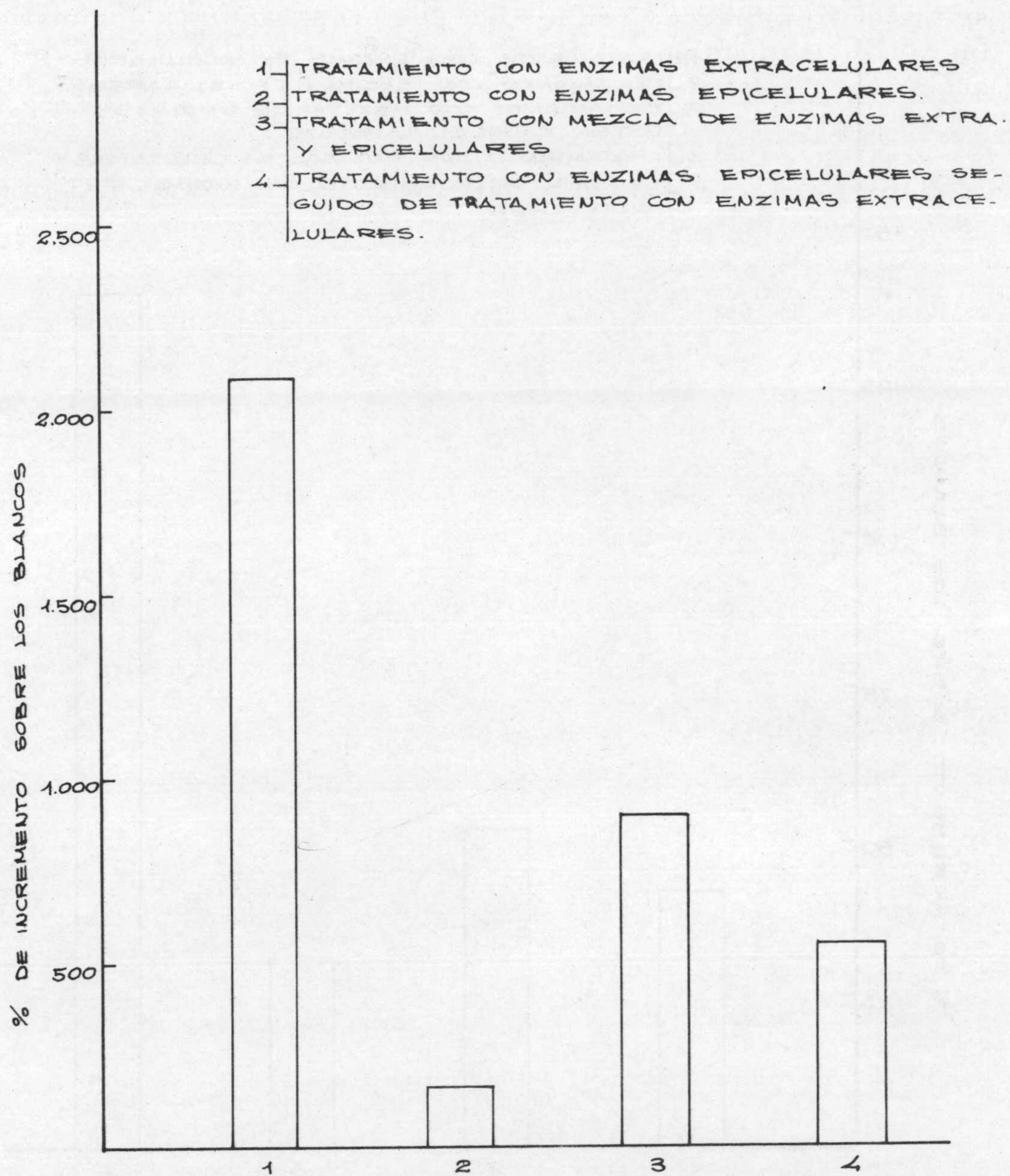
- I : 1 ml de tampón Tris-ClH 0,025 M, pH 7,5 añadido de 1 ml de fracción Ex-66,6 % disuelta en el mismo tampón.
- II : 1 ml de tampón añadido de 1 ml de fracción Ep-66,6 % - disuelta igual que la anterior.
- III : 1 ml de fracción Ex-66,6 % más 1 ml de fracción Ep-66,6 %, disueltas ambas en el tampón citado.

Finalmente, se realizó un cuarto ensayo en el que las células se trataron primero con la preparación enzimática II (enzimas epiteliales) en las condiciones indicadas, centrifugadas e incubadas a continuación durante igual período de tiempo con la preparación enzimática I (enzimas extracelulares).

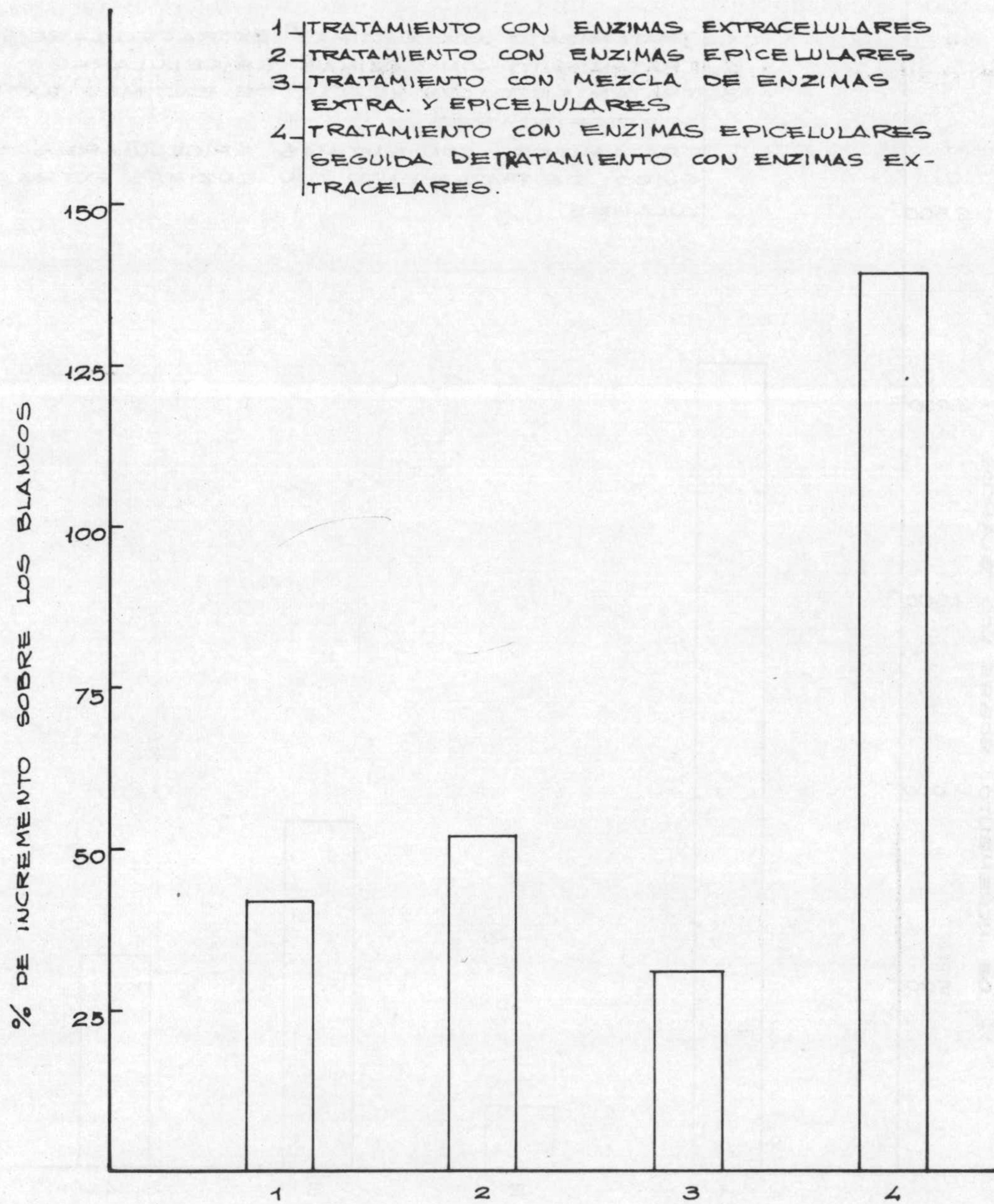
Los resultados obtenidos se obtuvieron como cuentas/minuto/ml. de suspensión bacteriana, pero dado que los valores obtenidos en cada una de las distintas experiencias realizadas no pueden ser comparados, ya que la concentración de las suspensiones celulares empleadas no fué uniforme, se han expresado como por ciento de incremento sobre los blancos, de la radioactividad medida, calculado según la siguiente fórmula:

$$\frac{(c/m/ml \text{ problema}) - (c/m/ml \text{ blanco})}{c/m/ml \text{ blanco}} \times 100$$

Los resultados expresados en esta forma, correspondientes a M. lysodeikticus y P. mirabilis, se exponen, respectivamente, en las Gráficas 9 y 10.



GRAFICA Nº 9. RADIATIVIDAD LIBERADA POR CELULAS DE M. lysodeikticus MARCADAS CON P³² POR TRATAMIENTOS CON ENZIMAS PRODUCIDOS POR M. xanthus



GRAFICA Nº 10 RADIOACTIVIDAD LIBERADA POR CELULAS DE P. mirabilis MARCADAS CON P³² POR TRATAMIENTOS CON ENZIMAS PRODUCIDOS POR EL M. xanthus.

5. PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS POR EL M. XANTHUS .

Como ya se ha indicado, una hipótesis mantenida por algunos autores (Margalith, 1962; Norén, 1953b) supone, que para que se lleve a cabo la lisis de eubacterias vivas, éstas han de ser previamente muertas por sustancias antibióticas producidas por las mismas mixobacterias que las atacan.

Con tal motivo se realizaron una serie de experiencias encaminadas a poner de manifiesto si el M. xanthus producía algún tipo de antibiótico, cuya acción precediera a la lisis de las bacterias.

Las técnicas empleadas en estas determinaciones están descritas en los apartados 6.1, 6.2 y 6.3 del Capítulo anterior. Los microorganismos de prueba fueron los siguientes: E. coli, S. aureus, B. subtilis, y Pseudomonas sp.

Los resultados obtenidos fueron en todos los casos negativos por lo que la hipótesis antes citada ha de ser descartada, al menos para la raza de M. xanthus empleada en este trabajo.

DISCUSSION

Tal como se expresó en la Introducción, el objeto del presente trabajo consistía en el estudio de los distintos enzimas producidos por el M. xanthus que capacitan a este microorganismo no sólo para aprovechar ciertos tipos de macromoléculas y bacterias muertas y más o menos profundamente alteradas, sino también para lisar diversos tipos de eubacterias vivas y crecer exclusivamente a expensas de los productos liberados en dicha lisis.

Los resultados expuestos en el Capítulo anterior han confirmado el hecho, sobradamente demostrado por diferentes autores, de que la mixobacteria ensayada en este trabajo produce una serie de enzimas extracelulares capaces de degradar macromoléculas y de originar la lisis de eubacterias muertas por el calor o desecadas con acetona.

Aún cuando más adelante se discutirá el significado y la interpretación dada a los resultados obtenidos en relación con los citados enzimas extracelulares, la principal aportación de este trabajo consiste en la demostración, extracción y purificación parcial de enzimas con actividad lipásica presentes en las células de M. xanthus y que, hasta el momento, no habían podido ser demostrados en los cultivos de este microorganismo. Es por ello que comenzamos este Capítulo refiriéndonos a dichos enzimas.

ENZIMAS EPICELULARES

Como ya ha quedado citado, la producción de lipasas por mixobacterias ha sido sospechada por varios autores (Dworkin, 1966; Harcke et al, 1971) basándose en una serie de pruebas indirectas, consistentes fundamentalmente en que los enzimas extracelulares son incapaces de originar la lisis de bacterias Gram negativas, en la matriz de cuya pared celular abundan los componentes lipídicos, mientras que sí son activos frente a las mismas bacterias tratadas con disolventes que extraen los citados componentes lipídicos (Bender, 1962).

No obstante, no había sido posible poner de manifiesto los citados enzimas lipásicos en cultivos de mixobacterias debido a la insistencia de todos los autores que han trabajado sobre el tema en buscarlos en sobrenadantes exentos de células.

Por el contrario, en este trabajo fué sorprendentemente fácil demostrar la existencia de enzimas dotados de actividad lipásica: bastó con aplicar al M. xanthus una técnica de rutina empleada en bacteriología para la determinación de la actividad lipásica de bacterias. Mediante ella se pudo demostrar que el M. xanthus era capaz de esterificar la trioleína añadida al medio, con la consiguiente liberación de ácidos grasos; la misma experiencia puso de manifiesto que dicha liberación no excedía jamás los límites de la colonia, lo que hacía sospechar que los enzimas con actividad lipásica no difundían al medio sino que probablemente estaban localizados en las estructuras superficiales de las mixobacterias.

Estos resultados fueron confirmados en experiencias en las que suspensiones lavadas de células de M. xanthus mostraron una fuerte actividad esterásica frente a soluciones de Tween 20, en tanto que los sobrenadantes exentos de células demostraron carecer de dicha acción.

Así pues, ya en las experiencias preliminares quedó establecida la existencia de enzimas con actividad lipásica que no se liberan al medio sino que se encuentran unidos a estructuras celulares: enzimas lipásicos epicelulares.

Las experiencias resumidas en la Tabla 18 mostraron que la actividad lipásica de las células de M. xanthus no se afecta sustancialmente cuando se hace crecer esta bacteria en medios de muy diversa composición por lo que, al contrario de lo que ocurre con los enzimas extracelulares, deben ser considerados como enzimas constitutivos; cosa que era lógico esperar si los citados enzimas forman parte de estructuras celulares siempre presentes en las células de M. xanthus.

El hecho de que el tiempo de cultivo sí influya en cambio sobre la actividad lipásica de las células ensayadas, aboga, en nuestra opinión, en favor de que los enzimas lipásicos sean componentes nor

males de la pared celular de las células vegetativas del M. xanthus. Efectivamente (Tabla 17), conforme aumenta la masa celular aumenta la actividad lipásica total del cultivo, hasta alcanzar un máximo a las 120 horas de incubación, momento a partir del cual la actividad disminuye de manera continua hasta el final de la experiencia. Esta disminución no puede atribuirse a fenómenos de autólisis, puesto que no existe liberación simultánea de actividad lipásica al medio, sino que hay que relacionarla con el proceso de fructificación de la mixobacteria, en el transcurso de la cual las células vegetativas pasan a un estado de reposo que desemboca en la formación de microquistes; proceso que lleva consigo una serie de cambios en la composición química de la pared celular (Adye y Powelson, 1961) que son los responsables probablemente de la desaparición progresiva de los enzimas lipásicos epicelulares a medida que avanza el proceso de fructificación.

Teniendo en cuenta, de otra parte, que de acuerdo con los resultados obtenidos, la actividad lipásica de las células puede ser extraída con detergentes y que las preparaciones así obtenidas pueden disociarse por tratamientos con n-butanol en un componente lipídico y otro proteínico activo, se llega a la conclusión de que los enzimas epicelulares estudiados se encuentran en estado nativo bajo forma de lipoproteínas.

Dado que la estructura de la pared celular del M. xanthus no difiere de la de las bacterias Gram negativas típicas (Mason y Powelson, 1958), es de suponer que estas lipoproteínas con actividad enzimática constituyen las estructuras más externas de la mixobacteria estudiada.

Esto por lo que respecta a la existencia, naturaleza y probable localización de los enzimas epicelulares demostrados. En lo tocante a la extracción y purificación de los mismos, en el Capítulo anterior han sido expuestos y comentados los métodos empleados para tal fin, por lo que no es necesario insistir sobre lo allí expuesto. Baste señalar que mediante la extracción con Tween 20 o n-butanol y la precipitación fraccionada con acetona, se han llegado a obtener preparaciones con actividad específica de 116,5 unidades por mg de proteína, cuando fueron valoradas por la técnica de Gomori (1945).

En cuanto a la diversidad de los enzimas epicelulares, la fil-

tración por Sephadex G-100, permite separar tres fracciones proteínicas dotadas de actividad lipásica en las condiciones en que se efectúa el ensayo (pH 6,5), lo que coincide con los resultados obtenidos en los fraccionamientos por electroforesis en geles de poliacrilamida. De acuerdo con estas últimas experiencias, una de las citadas proteínas es inactiva a pH 8.

Como habrá podido observarse se califican con el nombre de "lipasas" las proteínas demostradas capaces de hidrolizar los ésteres del ácido láurico del Tween 20. No obstante dado que en 1965 - la Comisión de Enzimas recomendó que fueran respetadas las decisiones tomadas en 1961 por la Unión Internacional de Bioquímica, en el sentido de que el término "lipasa" fuese reservado para aquellos enzimas capaces de esterificar triglicéridos en emulsión, se deja constancia de que se emplea el citado término con cierta reserva, ya que si bien se ha comprobado que los extractos de células son igualmente activos frente a trioleína que frente a Tween 20, no se ha comprobado lo mismo con las distintas fracciones activas separadas por filtración en Sephadex G-100.

Otro aspecto importante que hay que destacar en relación con los enzimas epicelulares demostrados en M. xanthus es que son igualmente capaces de degradar lípidos complejos extraídos de bacterias Gram negativas.

También, y desde un punto de vista cualitativo, se ha estudiado mediante separación por electroforesis en geles de poliacrilamida y revelado con α -naftilacetato, las proteínas epicelulares extraídas dotadas de actividad esterásica. Se han encontrado a pH 6,5 dos proteínas dotadas de la citada actividad que coinciden con las lipasas demostradas con Tween 20 y cuatro a pH 8, dos de las cuales no aparecen en el revelado con Tween 20. Por esta razón, se llega a la conclusión que a más de las tres lipasas capaces de esterificar ésteres de ácidos grasos de cadena larga, existen entre los enzimas epicelulares un mínimo de dos proteínas más dotadas de actividad exclusivamente esterásica.

Finalmente, mediante la misma técnica de electroforesis y revelado con caseína, se ha llegado a la conclusión de que entre los enzimas epicelulares no existen proteínas con actividad proteolítica.

ENZIMAS EXTRACELULARES

Al contrario de lo que sucede con los enzimas epicelulares, cuya existencia en mixobacterias era totalmente desconocida, los enzimas extracelulares producidos por el M. xanthus, o la especie próxima M. virescens, han sido estudiados, si bien el número de autores que se han interesado por el tema, tal como se expuso en la Introducción, ha sido muy escaso.

De acuerdo con la bibliografía allí expuesta se han demostrado en los sobrenadantes de las mixobacterias estudiadas un sistema lítico formado por un enzima o enzimas, con un tipo de acción muy parecido al de la lisozima, un sistema proteolítico al parecer complejo, que sería el responsable de la desintegración del citoplasma en células cuya pared celular estuviera previamente alterada por el sistema lítico anterior y, finalmente, un dudoso sistema o enzima lítico de acción distinta al de la lisozima.

En el transcurso de este trabajo, se ha confirmado en principio, la existencia en los sobrenadantes de cultivos de M. xanthus de un sistema enzimático dotado de una fuerte actividad proteolítica y de otro sistema lítico capaz de lisar eubacterias muertas por el calor y en casos muy particulares M. lysodeikticus bacterias vivas. Tal como ha sido expuesto y comentado en el Capítulo anterior estas actividades enzimáticas extracelulares fueron puestas de manifiesto primeramente por experiencias llevadas a cabo en medios sólidos y posteriormente en sobrenadantes exentos de células.

Los factores culturales que afectan a la producción de los enzimas extracelulares proteolíticos y líticos citados, se han estudiado tomando únicamente como punto de referencia la actividad de los sobrenadantes frente a la caseína y células autoclavadas de P. mirabilis, respectivamente. Los resultados obtenidos a este respecto muestran, como ya ha sido comentado, que ambos sistemas enzimáticos no son constitutivos, sino que su aparición en el medio en cantidades significativas viene condicionada por la presencia en el mismo de proteínas -caseína- y en menor grado por la de eubacterias autoclavadas. Dado que los ensayos de actividad lítica frente a células de M. lysodeikticus desecadas a la acetona, no se introdujeron sino con posterioridad a los ensayos de que se está hablando, no ha

sido posible incluir entre los resultados datos referentes a los sustratos presentes en el medio sobre la acción lítica de los sobrenadantes sobre la citada bacteria. Sin embargo, experiencias realizadas con posterioridad a la terminación de este trabajo demuestran que la actividad lítica frente a M. lysodeikticus desecado a la acetona, se incrementa notablemente cuando se incorporan al medio bacterias autoclavadas, especialmente si son Gram positivas.

Por lo que respecta a la adición al medio de fuentes de carbono fácilmente utilizables -glucosa- ya se ha expuesto que no afectan notablemente -induciendo o reprimiendo- el nivel de los dos sistemas enzimáticos ensayados, si bien retrasa notablemente la fase de declive de ambos sistemas. Esto cabe atribuirlo al alargamiento de la fase de crecimiento vegetativo de la mixobacteria, con el consiguiente retraso en el paso a la fase de reposo que lleva a la formación de microquistes fisiológicamente inactivos.

La modalidad de cultivo y el tiempo de incubación que favorecen una máxima producción de los sistemas enzimáticos ensayados han quedado igualmente reseñados. El cultivo estático en frascos de Roux ha demostrado ser el más conveniente, cosa que, como se dijo oportunamente, no es de extrañar si se tiene en cuenta que la raza de M. xanthus empleada es incapaz de crecer en forma dispersa. Los tiempos de cultivo óptimos en estas condiciones y con los medios empleados fueron, respectivamente, de 144 horas para los enzimas con actividad proteolítica y de 168 horas para aquellos con actividad lítica.

Finalmente, conviene resaltar que en las condiciones indicadas los niveles obtenidos en este trabajo para ambos tipos de actividades, fueron bastante superiores a los obtenidos por otros autores (Haská y Norén, 1967): dos veces mayor en el caso del sistema proteolítico y del orden de trece veces mayor en el caso del sistema lítico.

En relación con la separación de los dos tipos de actividades, los resultados expuestos en las Tablas 10, 11, 12 y 13, demuestran que ni la precipitación fraccionada con sulfato amónico ni con acetona es útil para este fin, si bien pueden lograrse mediante estos procedimientos preparaciones cuya actividad específica para ambos ti-

pos de actividades enzimáticas se encuentra bastante aumentada en relación con los sobrenadantes de partida. En el caso de precipitación con sulfato amónico al 80 % de saturación el aumento en las actividades proteolítica y lítica específicas fué, respectiva y aproximadamente, de 10 y 15 veces, si bien se perdió en ambos casos las $3/4$ partes aproximadamente de la actividad total. En el caso de precipitación con acetona al 66,6 % (v/v) el aumento de la actividad específica fué en ambos casos de 10 veces, pero sólo se perdió, aproximadamente, la mitad de la actividad total; por esta razón, las preparaciones obtenidas por este último procedimiento fueron las utilizadas para ulteriores fraccionamientos y purificaciones.

Estos se llevaron a cabo en columnas de DEAE-celulosa y de Sephadex G-200. Con respecto al primer método los resultados expuestos en las Tablas 14 y 15 y Gráficas 4 y 5, demuestran ya - aunque no pudiera lograrse una separación neta - que la actividad lítica frente a P. mirabilis autoclavado no coincide, al menos totalmente, con la actividad proteolítica de las preparaciones y con la introducción de los ensayos de actividad lítica frente a M. lysodeikticus - que la actividad lítica se debe también a dos enzimas o sistemas de enzimas distintos.

Las experiencias de fraccionamiento por filtración por Sephadex G-200, confirmaron y ampliaron estos resultados. De acuerdo con los resultados obtenidos en estas experiencias -Tabla 16 y Gráfica 6- puede afirmarse que en las preparaciones ensayadas existe un mínimo de tres enzimas o sistemas enzimáticos dotados de actividad proteolítica y/o lítica.

En relación con los dotados de actividad proteolítica se demuestran dos tipos: uno de ellos dotado exclusivamente de actividad proteolítica y otro, netamente separado del primero, que al lado de la citada actividad es el responsable de la lisis de bacterias Gram negativas autoclavadas, así como también muestra cierta actividad frente a células de M. lysodeikticus.

Se considera que el primer enzima o sistema enzimático corresponde al descrito por Haská (1971) y que su única misión es la degradación de las proteínas presentes en el medio, con independencia de que éstas provengan de la lisis de bacterias o no.

En cuanto al segundo sistema, es evidente que intervienen de manera directa en la lisis de bacterias previamente alteradas, fundamentalmente en el caso de las Gram negativas. Con los datos obtenidos en este trabajo no puede formularse el posible mecanismo por el que llevan a cabo su acción lítica, sino simplemente sugerir que posiblemente se traten de endopeptidasas capaces de destruir no sólo las proteínas que forman parte de la pared celular de este tipo de bacterias, bajo la forma de lipoproteínas y proteínas globulares, sino también de actuar sobre las cadenas peptídicas que mantienen unidas las cadenas polisacáridicas que forman el esqueleto del mucopéptido. Es evidente que el sistema lítico - proteolítico de que se está hablando debe ser complejo (Sudo y Dworkin, 1972), aún cuando en este trabajo no ha sido posible individualizar los enzimas que componen el mismo.

Finalmente, cabe distinguir un segundo sistema lítico carente de toda actividad proteolítica. Dado el sustrato utilizado para ponerlo de manifiesto - células de M. lysodeikticus, cuya pared celular está compuesta casi exclusivamente de mucopéptido - y la carencia ya citada de actividad proteolítica, se deduce que se trata de un sistema compuesto por uno o varios enzimas de tipo muramidásico, con un mecanismo de acción muy parecido al de la lisozima y que ejercerían en sobrenadantes de M. xanthus el mismo papel que los enzimas bacteriolíticos I y II demostrados por Haskā (1971, 1972a y b) en sobrenadantes de M. virescens.

Resumiendo y de acuerdo con los ensayos efectuados, se han puesto de manifiesto y purificado dos enzimas, o más probablemente dos sistemas enzimáticos independientes, dotados de actividad proteolítica, uno de los cuales muestra simultáneamente una intensa acción lítica sobre bacterias Gram negativas muertas por el calor y en menor grado sobre Gram positivas (M. lysodeikticus). Independientemente de los anteriores se ha puesto de manifiesto un segundo sistema lítico que actúa exclusivamente a nivel del mucopéptido de la pared bacteriana y que carece de toda acción proteolítica.

Las experiencias de fraccionamiento realizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida indican que, al menos en el caso de los sistemas proteolíticos, se está lejos de haber conseguido separar los distintos enzimas que lo componen mediante los métodos emplea-

dos. No obstante, se han conseguido obtener preparaciones enzimáticas con un alto grado de actividad específica para los distintos tipos de actividades ensayadas: 870×10^6 u/mg de proteína para el sistema enzimático con actividad exclusivamente proteolítica; 889×10^6 u/mg de proteína de actividad proteolítica y 2.669×10^3 u/mg de proteína de actividad lítica para el segundo de los sistemas proteolítico y, 1.071×10^3 u/mg de proteína para el sistema enzimático dotado de actividad del tipo de la lisozima. Estos logros, facilitarán indudablemente trabajos posteriores, actualmente en curso en nuestro laboratorio, sobre la separación y aislamiento de los distintos enzimas que entran a formar parte de los sistemas cuya actividad se ha ensayado.

Esto naturalmente por lo que respecta a enzimas extracelulares que están más o menos relacionados con la lisis de eubacterias vivas o muertas. Es indudable que el número de enzimas extracelulares producidos por el M. xanthus debe ser mucho mayor que los descritos y capaces de hidrolizar un número muy variado de sustratos. En este mismo trabajo se ha puesto de manifiesto una fuerte actividad amilolítica y el hecho de que la bacteria ensayada pueda crecer perfectamente, como se ha comprobado, en medios compuestos exclusivamente de suspensiones de levaduras en una solución salina, hace suponer que sea capaz de producir enzimas capaces de atacar los diversos polisacáridos que componen las paredes de estos hongos. Es evidente, por tanto, que con los estudios realizados en este Tesis y los efectuados por otros autores, apenas si se ha comenzado a abordar el complejo mundo de los enzimas extracelulares producidos por el M. xanthus y que serán necesarios todavía una serie de extensos y detallados estudios si se quiere esclarecer esta importante cuestión.

PAPEL DE LOS ENZIMAS EXTRA Y EPICELULARES EN LA LISIS DE EUBACTERIAS.

En el apartado anterior de esta Discusión se ha mostrado cómo los enzimas extracelulares producidos por el M. xanthus son capaces de lisar los diversos tipos de eubacterias ensayadas, a condición de que éstas estén muertas mediante la acción de agentes físicos o químicos que simultáneamente originan una desorganización de la pared celular.

El panorama, sin embargo, es totalmente distinto cuando se trata de lograr la lisis "in vitro" de bacterias intactas.

Los ensayos realizados por el procedimiento clásico, basado en observación de la disminución de la D.O. de las distintas suspensiones bacterianas, fracasaron totalmente, con excepción del caso del M. lysodeikticus, tanto cuando se utilizaron enzimas extra o epicelulares aislados como en mezcla.

No obstante, la previa demostración de los enzimas epicelulares con acción lipásica y/o esterásica a cuya ausencia se venía -- atribuyendo la no consecución de lisis de bacterias vivas, sobre todo en el caso de las Gram negativas, motivó que se insistiera sobre el tema mediante el empleo de un método más sensible para detectar la lisis bacteriana.

El método empleado, basado en la liberación de P^{32} , a partir de bacterias previamente marcadas, ha sido descrito en el Capítulo correspondiente. Resulta, desde luego un método engorroso de realizar por la enorme cantidad de material que se contamina con radioactividad en cada experiencia y por la exactitud con que hay que reproducir en cada caso las condiciones experimentales, pero decididamente ha mostrado ser muy sensible y, aún cuando el número de experiencias realizadas no ha permitido efectuar un análisis estadístico, los resultados de las mismas coinciden substancialmente.

Mediante la aplicación de este método se ha podido confirmar totalmente que la lisis de bacterias Gram positivas, cuya pared celular presenta un alto contenido en mucopéptido se lleva a cabo exclusiva o casi exclusivamente por los enzimas extracelulares, cosa que no es de extrañar ya que en estos casos, tanto los enlaces glucosídicos entre el ácido N - acetilmurámico y la N-acetilglucosamina que componen las cadenas polisacarídicas del mucopéptido, como los enlaces peptídicos de las cadenas que enlazan las anteriores son fácilmente asequibles, respectivamente, a la acción hidrolítica del sistema enzimático con actividad del tipo de la lisozima y al sistema de enzimas proteolíticos.

En el caso de otras bacterias Gram positivas con una matriz más compleja parece probable que se requiera la acción de los enzi

mas epicelulares. Se expresa esta opinión porque de una experiencia parcial realizada dentro de este trabajo con S. aureus y de otras que se llevan a cabo en la actualidad, empleando esta misma bacteria, parece deducirse que se produce lisis cuando, al igual que ocurre con el P. mirabilis, el tratamiento con enzimas extracelulares viene precedido de otro con enzimas epicelulares.

Por lo que respecta a bacterias Gram negativas, los ensayos de lisis realizados con una representante típica de las mismas -P. mirabilis- indican que tanto los enzimas extracelulares como los epicelulares aplicados independientemente, originan un aumento muy pobre en la radioactividad liberada, aumento que incluso puede atribuirse perfectamente a la acción de los respectivos sistemas enzimáticos sobre el escaso porcentaje de células muertas que existen inevitablemente en toda suspensión de bacterias en reposo, aún cuando provengan de cultivos en fase logarítmica de crecimiento. Por el contrario, cuando las células se someten primero a un tratamiento con enzimas epicelulares y a continuación a otro con enzimas extracelulares, el incremento en el porcentaje de radioactividad liberada es substancial, del orden de tres veces mayor que en los casos anteriores.

A pesar de lo peligroso que resulta generalizar basándose en los resultados obtenidos con una sola bacteria, los datos reseñados llevan a postular que en el caso de bacterias Gram negativas, la lisis de las mismas viene condicionada por un primer ataque de los componentes lipídicos de su pared celular -lipoproteínas y lipopolisacáridos- a cargo de los enzimas epicelulares presentes bajo la forma de lipoproteínas en la pared celular del M. xanthus. Una vez llevado a cabo este primer ataque, para cuya realización es necesario el contacto físico entre el M. xanthus y la bacteria atacada, los restantes componentes de la pared celular serían ya asequibles al ataque de los enzimas extracelulares que rematarían el proceso de lisis.

Es interesante señalar que la mezcla de enzimas extra y epicelulares da resultados, en el caso del Proteus, inferiores incluso a los obtenidos cuando se emplean separadamente. La explicación más probable de este hecho quizá radique en que los enzimas epicelulares empleados no se encuentran en su estado nativo de lipoproteínas, sino como simples proteínas sensibles al ataque de los sis-

temas proteolíticos extracelulares que al mismo tiempo que los degradan anulando su acción, sufren también una disminución en su actividad lítica al tener que actuar sobre un substrato adicional, o bien porque la acción esterásica de los enzimas epicelulares inhiba en cierto modo su actividad.

En el caso del M. lysodeikticus ocurre un fenómeno parecido, pero además aparece un dato ilógico, ya que aún cuando los enzimas epicelulares no tuviesen intervención alguna en su lisis, las experiencias en las que se emplean tratamientos sucesivos deberían dar resultados similares a los obtenidos con los enzimas extracelulares aislados, cosa que no sucede ya que se obtienen resultados aproximadamente cuatro veces menores. No parece existir explicación lógica de este hecho, a menos que se admita que los enzimas epicelulares quedan absorbidos sobre las células de M. lysodeikticus y continúen así interfiriendo la acción de los enzimas extracelulares.

PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS Y LISIS.

Los resultados obtenidos sobre la producción de antibióticos por el M. xanthus apenas si merecen comentario. En la raza empleada no se ha detectado la producción de ningún tipo de antibiótico activo frente a bacterias Gram positivas o negativas, por lo que hay que descartar la hipótesis, al menos en este caso, de que para que se produzca la lisis de bacterias éstas deben ser previamente muertas por sustancias producidas por el M. xanthus.

CONCLUSIONES

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
540 EAST 57TH STREET, CHICAGO, ILL. 60637

ACQUISITIONS DEPARTMENT

100 EAST 57TH STREET, CHICAGO, ILL. 60637

TEL: 773-936-3300 FAX: 773-936-3301

WWW.CHICAGO.LIBRARY.EDU

LIBRARY SERVICES

100 EAST 57TH STREET, CHICAGO, ILL. 60637

TEL: 773-936-3300 FAX: 773-936-3301

WWW.CHICAGO.LIBRARY.EDU

LIBRARY SERVICES

100 EAST 57TH STREET, CHICAGO, ILL. 60637

TEL: 773-936-3300 FAX: 773-936-3301

WWW.CHICAGO.LIBRARY.EDU

LIBRARY SERVICES

100 EAST 57TH STREET, CHICAGO, ILL. 60637

TEL: 773-936-3300 FAX: 773-936-3301

WWW.CHICAGO.LIBRARY.EDU

LIBRARY SERVICES

100 EAST 57TH STREET, CHICAGO, ILL. 60637

TEL: 773-936-3300 FAX: 773-936-3301

WWW.CHICAGO.LIBRARY.EDU

LIBRARY SERVICES

- 1a. - El M. xanthus no sólo produce un sistema de enzimas extracelulares sino también una serie de enzimas epicelulares -- que no se liberan al medio.
- 2a. - Los enzimas epicelulares demostrados tienen exclusivamente una acción lipásica y/o esterásica.
- 3a. - La composición del medio de cultivo no afecta los niveles de enzimas epicelulares presentes en el M. xanthus, por lo que deben ser considerados como constitutivos.
- 4a. - En estado nativo, los enzimas epicelulares se encuentran como lipoproteínas, formando parte probablemente de las capas más externas de la pared celular de la bacteria estudiada.
- 5a. - El sistema de enzimas extracelulares es extraordinariamente complejo e interviene no sólo en la degradación de una variedad de macromoléculas, sino también en la lisis de eubacterias.
- 6a. - Independientemente de una actividad amilolítica extracelular, demostrada sólo cualitativamente, el M. xanthus produce como mínimo, los sistemas enzimáticos extracelulares siguientes:
- a) Enzimas dotados exclusivamente de actividad proteolítica.
 - b) Enzimas con acción proteolítica que intervienen en la lisis de eubacterias.
 - c) Enzimas que intervienen en la lisis de eubacterias merced a su actividad exclusivamente muramidásica.
- 7a. - A diferencia de los enzimas epicelulares, los enzimas extracelulares estudiados no son constitutivos, sino que su producción

es inducida o reprimida de acuerdo con la composición del medio de cultivo en que crece el M. xanthus.

8a. - La lisis y utilización de eubacterias vivas es el resultado de la acción conjunta de los enzimas epicelulares y extracelulares, aún cuando la importancia del efecto de unos y otros varía grandemente según los distintos tipos de eubacterias.

9a. - En el caso de bacterias Gram positivas en cuya pared celular predomina el mucopéptido -M. lysodeikticus- la lisis de células vivas parece correr a cargo casi exclusivamente del sistema enzimático extracelular de tipo muramidásico, complementado por el sistema proteolítico con acción lítica.

10a. - En el caso de bacterias Gram negativas -P. mirabilis- la lisis de células vivas viene condicionada por un primer ataque de las lipoproteínas y lipopolisacáridos de la pared celular a cargo de los enzimas epicelulares, ataque que permite la acción ulterior de los enzimas líticos extracelulares antes citados.

11a. - La lisis de eubacterias no está condicionada a la muerte previa de las mismas por antibióticos producidos por el M. xanthus, al menos en el caso de la raza estudiada.

Mediante la aplicación de este método se ha podido confirmar totalmente que la lisis de bacterias Gram positivas, cuya pared celular presenta un alto contenido en mucopéptido se lleva a cabo exclusivamente o casi exclusivamente por los enzimas extracelulares, cosa que no es de extrañar ya que en estos casos, tanto los enlaces glucosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina que componen las cadenas polisacarídicas del mucopéptido, como los enlaces peptídicos de las cadenas que enlazan las anteriores son fácilmente asequibles, respectivamente, a la acción hidrolítica del sistema enzimático con actividad del tipo de la lisozima y al sistema de enzimas proteolíticos.

En el caso de otras bacterias Gram positivas con una matriz más compleja parece probable que se requiera la acción de los enzi

BIBLIOGRAFIA

- ADYE, J. C. and POWELSON, D. M. 1961. "Microcyst of Myxococcus xanthus. Chemical composition of the wall". J. Bacteriol. 81, 780-785.
- BEEBE, J. M. 1943. "Studies on the mixobacteria. 3. The utilization of carbohydrates". Iowa St. Coll. Journ. Sci. 17, 227-240.
- BENDER, H. 1962. "Untersuchungen über Myxococcus xanthus. I. Bildungsbedingungen, Isolierung und Eigenschaften eines bakteriolytischen Enzymsystems". Arch. Mikrobiol. 43, 262-279.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 7ª edición. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1967.
- CALLAO, V., ALVARADO, R., SEDANO, A., OLIVARES, J. y MONTOYA, E. 1966. "Efecto antagónico del Myxococcus xanthus sobre los Azotobacter". Microbiol. Españ. - 19, 45.
- CLARK, W. A. 1954. "Effect of carbohydrates on some myxobacteria". J. Bacteriol. 67, 589-592.
- CLERMONT-BEAUGIRAUD, S.; CHARPENTIER, M. and PERCHESSON, F. 1970. "Polysacharidasas from Sporocytophaga myxococcoides: β -mannanose, cellulase and xylanase". Bull. Soc. Chim. Biol. 52(12), 1481-1495.
- DAWSON, R. M. C., ELLIOTT, D. C., ELLIOT, W. H. and JONES, K. M. "Data for Biochemical Research". 2ª edición -- (Oxford University Press, London, 1969) pág. 484.
- DWORKIN, M. 1962. "Nutritional requeriments for vegetative growth of Myxococcus xanthus". J. Barteriol. 84, 250-257

- DWORKIN, M. 1966. "Biology of the myxobacteria". *Ann. Rev. Microbiol.* 20, 75-106.
- ENSIGN, J. C. and WOLFE, R. S. 1965. "Lysis of bacterial cell walls by an enzyme isolated from a myxobacter". *J. Bacteriol.* 90, 395-402.
- ENSIGN, J. C. and WOLFE, R. S. 1966. "Characterization of a small proteolytic enzyme which lyses bacterial cell walls". *J. Bacteriol.* 91, 524-534.
- GILLESPIE, D. C. and COOK, F. D. 1965. "Extracellular enzymes from strains of *Sorangium*". *Can. J. Microbiol.* 11, 109-118.
- GOMORI, G. 1945. En "Methods in Enzimology". S. P. Colowich and N. O. Kaplan Eds. (Academic Press, New York, 1955), vol. 1, 630-631.
- 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.
- HART, B. and ZAHLER, S. A. 1966. "Lytic enzyme produced by *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 92, 1632-1637.
- HARRIGAN, W. F. and McCANCE, M. E. "Métodos de laboratorio en Microbiología" (Editorial Academia, León, 1968).
- HASKÁ, G. 1971. "Extracellular lytic enzymes of *Myxococcus virescens*. I. Separation of the bacteriolytic enzyme from the bulk of the proteinases". *Physiol. Plant.* 25, 85-89.
- HASKÁ, G. 1972a. "Extracellular lytic of *Myxococcus virescens*. II. Purification of three bacteriolytic enzymes and determination of their molecular weights and isoelectric points". *Physiol. Plant.* 26, 221-229.

- HASKÅ, G. 1972b. "Extracellular lytic enzymes of *Myxococcus virescens*. III. Characterization of two endo- β -N-acetylglucosaminidases". *Physiol. Plant.* 27, 139-142.
- HASKÅ, G. and NORÉN, B. 1967. "Growth and enzyme activity of *Myxococcus virescens* in liquid medium". *Physiol. Plant.* 20, 851-861.
- HASKÅ, G. and STÅHL, S. 1971. "Variants of *Myxococcus virescens* exhibiting dispersed growth. Growth and production of extracellular enzymes and slime". *Physiol. Plant.* 24, 136-142.
- HUGGINS, C. and LAPIDES, J. 1955. En "Methods in Enzymology". S. P. Colowick and N. O. Kaplan Eds. (Academic Press, New York, 1955). Vol. 1, 631-634.
- HÜTTERMANN, A. and KÜHLWEIN, H. 1969. "Über ein bakteriolytisches enzym von *Archangium violaceum* (Myxobacteriales). II. Messungen in vivo". *Arch. Mikrobiol.* 65, 105-114.
- HÜTTERMANN, A. 1969. "Studies on a bacteriolytic enzyme of *Archangium violaceum* (Myxobacteriales). I. Partial purification and properties of the enzyme". *Arch. Mikrobiol.* 67, 306, 317.
- IMSENECKI, A. and SOLNTZEVA, L. 1937. "On cellulose-decomposing myxobacteria". *Mikrobiologica, Moscow*, 6, 3.
- JAHN, E. 1915. "Kryptogamenflora der Mark Brandenburg". V Heft 1, 187.
- JAHN, E. 1924. "Beiträge zur botanischen protistologie. I. Die Polyangiden". Leipzig. Gebr. Borntraeger.
- JAHN, E. 1939. "Kulturmethoden und Stoffwechseluntersuchungen bei Myxobakterien". In *Abderhalden: Handbuch d. biol. Arbeitsmeth.*, Abt. XII, 2, 1, 921-925.

- KATZNELSON, H., GILLESPIE, D. C. and COOK, F. D. 1964. "Relation between Nematodes and other soil microorganism. III. Lytic action of soil Myxobacters on certain sp. Nematodes". *Can. J. Microbiol.* 10, 699-709.
- KRZEMILNICKI, H. und SIVERYN. 1937. "Über die Zersetzung der Zellulose durch Myxobakterium". *Bull. Int. Acad. Cracovie, B. Sci. Nat.* 1, 33.
- KÜHLWEIN, H. 1950. "The biology and the history of the development of myxobacteria". *Arch. Mikrobiol.* 14, 678-704.
- LOPEZ GORGE, J. y MONTEOLIVA, M. 1966. "Algunas aportaciones al fraccionado proteico del suero sobre DEAE-celulosa". *Rev. Esp. Fisiol.* 22, 127-134.
- LOWRY, H. D., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. S. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- LLOYD, G. I., MORRIS, E. D. and SMITH, J. E. 1971. "A study of the esterases and their function in *Candida lipolytica*, *Aspergillus niger* and yeast-like fungus". *J. Gen. Microbiol.* 63, 141-150.
- MARGALITH, P. 1962. "Bacteriolytic principles of *Myxococcus fulvus*". *Nature*, 196, 1335-1336.
- MASON, D. J. and POWELSON, D. 1958. "The cell wall of *Myxococcus xanthus*". *Biochim. Biophys. Acta*, 29, 1-7.
- MILLNER, S. N. and MASSIE, B. 1969. "Detection of proteolytic enzymes after cellulose acetate electrophoresis". *Anal. Biochem.* 32, 154-157.
- MISHUSTIN, E. N. 1938. "Cellulose decomposing myxobacteria". *Microbiologica, Moscow*, 7, 427.
- MORTON, R. K. 1955. En "Methods in Enzymology". S. P. Colowich and N. O. Kaplan Eds. (Academic Press, New York. 1955) Vol. 1, 40-50.

- MORRIS, M. S. 1969. "Solubilization of autoclaved feathers and wool by myxobacteria". *Can. J. Microbiol.* 15, 1393-1397.
- NORÉN, B. 1953 a. "Studies on myxobacteria. II. Bacteriolytic activity". *Svensk. Bot. Tidskr.* 47, 309-332.
- NORÉN, B. 1953b. "The production of antibiotics by myxobacteria". *Botan. Tidskr.* 47, 402-410.
- NORÉN, B. 1955a. "Studies on myxobacteria. IV. Lytic activity on different eubacteria". *Svensk. Botan. Tidskr.* 49, 282-294.
- NORÉN, B. 1955b. "Studies on myxobacteria. III. Organic factors in nutrition". *Botan. Not.* 108, 81-134.
- NORÉN, B. 1960a. "Notes on the bacteriolytic activity of *Myxococcus virescens*". *Botan. Tidskr.* 54, 550-560.
- NORÉN, B. 1960b. "Lytic activity on autoclaved and on intact eubacterial cells by a preparation U2D, obtained from a metabolic solution of *Myxococcus virescens*". *Botan. Not.* 113, 320-336.
- NORÉN, B. 1964. "Effect of metabolic products of eubacteria on the bacteriolytic activity of *Myxococcus xanthus*". *Physiol. Plant.* 17, 262-268.
- NORÉN, B. and RAPER, K. B. 1962. "Antibiotic activity of myxobacteria in relation to their bacteriolytic capacity". *J. Bacteriol.* 84, 157-162.
- OETKER, H. 1953. "Nutritional requirements of Myxobacteria". *Arch. Mikrobiol.* 19, 206-246.
- OKAFOR, 1967. En "Progress in soil biology" (Graff, Statchell, ed.) Vieweg, Braunschweig, 440-454, pág. 770.
- ORNSTEIN, L. and DAVIS, B. J. 1964. "Disc electrophoresis. I. Background and theory". *Annales New York. Academic Science*, 121, 321-402.

- 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.
- PINOY, M. E. 1913. "Sur la nécessité d'une association bacterienne pour le développement d'une myxobactérie, *Chondromyces crocatus*". C. R. Acad. Sci., Paris 157, 77-78.
- SHILO, M. 1970. "Lysis of blue-green algae by a Myxobacter". J. Bacteriol. 104, 453.
- SINGH, B. N. 1947. "Myxobacteria in soils and composts, their distribution, number and lytic action on bacteria". J. Gen. Microbiol. 1, 1-10.
- SOLNTZEVA, L. I. 1940. "Biology of myxobacteria. I. Myxococcus". Microbiology, 9, 217-232.
- SOUCEK, A., MICHALEC, C. and SONCKOVÁ, A. 1971. "Identification and characterization of a new enzyme of the group "Phospholipase D", isolated from *Corynebacterium ovis*". Biochim. Biophys. Acta 227, 116-128.
- STANIER, R. Y. 1942. "The Cytophaga group: a contribution to the biology of myxobacteria". Bact. Rev. 6, 143.
- STANIER, R. Y. 1943. Myxobacteriales, en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7^a edición. pág. 854. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 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 walls of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or specific peptidases)". Science, 156, 213-221.
- SUDO, S. Z. and DWORKIN, M. 1968. "Extracellular cell wall-lytic enzyme system of *Myxococcus xanthus*". Bact. Proc. 68, 48.

- SUDO, S. Z. and DWORKIN, M. 1970. "Separation of extracellular bacteriolytic enzymes of *Myxococcus xanthus*". Bact. Proc. 70, 17.
- SUDO, S. and DWORKIN, M. 1972. "Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 110(1), 236-245.
- THAXTER, R. 1892. "On the myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes". Bot. Gaz. 17, 389.
- WHITAKER, D. R., ROY, C., TSAI, C. S. and JURÁSEK, L. 1965. "Lytic enzymes of *Sorangium* sp. A comparison of the proteolytic properties α - and β -lytic proteases". Can. J. Biochem. 43, 1961-71.
- WILLSTÄTTER, E., WALOSCHMIDTLEITZ, E. and NAMMEN, F. 1923. In "Methods in Enzymology". S. P. Colowick and N. O. Kaplan Eds. (Academic Press. New York. 1955), Vol. 1, 628-630.

---o0o---

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de
la fecha, constituido por:

- D. Juan Recalde Martínez: Presidente
D. Diego Freva Pozo
D. Enrique Montoya Gomez } Vocales
D. Gonzalo Piedrola Anzules
D. Aurelio Murillo Tarrillo: Secretario

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Doña
Concepción Rodríguez Franco

se acordó por UNANIMIDAD otorgar la califica-
ción de Sobresaliente cum laude

y para que conste, se extiende firmada por los
componentes del Tribunal, la presente diligen-
cia.

Granada, a 24 de Septiembre de 1973

El Secretario,

Murillo

El Presidente,

J. Recalde

El Vocal,

Diego Freva

El Vocal,

Enrique Montoya

El Vocal,

Gonzalo Piedrola



Biblioteca Universitaria de Granada



01052136