VOLUMEN 24. 1971 ABRIL - JUNIO. NUMERO 2

Microbiología Española

Revista
del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y de la Sociedad Española de Microbiología

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirector: Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Vocales: Dr. Antonio Portolés, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó, Prof. Juan Santa María, Dr. Gonzalo Sierra y Prof. Julio R. Villanueva.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Difusión y Publicaciones, del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Calle de Joaquín Costa, 32 MADRID-6 (España)

Suscripción (4 números): España, 240 PTA; extranjero, 340 PTA
Número: España, 70 PTA; extranjero, 100 PTA

RECOMENDACIONES A LOS AUTORES

"Microbiología Española" publicará fundamentalmente trabajos y notas de investigación, dentro del campo de la Microbiología, y también trabajos doctrinales que se estimen de interés especial. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquiera otra revista. Los que aparezcan en "Microbiología Española" podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, deberán estar escritos a máquina, en papel de tamaño holandesa, por una sola cara, a doble espacio y márgenes de 2 cm a cada lado como mínimo. Los dibujos, con tinta china y en papel vegetal; las cifras, letras y leyendas, a lápiz. Para orientación de los autores, las dimensiones de la caja son 18 × 11,5 cm.

En la cabecera de la primera página se harán constar: Centro en que se ha realizado el trabajo, título (conciso), nombre del autor (o inicial) en letras minúsculas y apellido, en mayúsculas. Al pie de la página deberá figurar la dirección postal del autor.

En líneas generales, los trabajos de investigación constarán de: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Resumen en la otra lengua y Bibliografía. Las notas y trabajos doctrinales se redactarán con arreglo a su naturaleza.

Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. Cuando se adopten abreviaturas no corrientes deberán advertirse en el texto. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. Los datos se presentarán en forma de cuadro o de figura; cuadros y figuras, independientemente, estarán numerados y citados en el texto.

El resumen en la otra lengua, de un máximo de doscientas palabras, deberá contener el título del trabajo, un breve esquema del mismo y las conclusiones (abreviadas, en su caso).

La bibliografía se reducirá a la que esté directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabetizadas, se ajustarán al siguiente orden:
Revistas: apellido del autor, inicial del nombre, año, título del trabajo, nombre abreviado de la revista (según Chemical Abstracts), número del tomo o volumen y páginas inicial y final.
Libros: apellido del autor e inicial del nombre [en su caso, del recopilador ("editor")], año, título de la obra, tomo o volumen, capítulo (en su caso), página, editorial y población.

Los autores recibirán pruebas que deberán devolver en el plazo máximo de diez día para los residentes en España, y en el de veinte, para el extranjero. Transcurridos dichos plazos sin devolución de pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha de envío se anulará. Las modificaciones hechas por el autor que excedan del 2 % del texto serán abonadas por él.

Cada autor tendrá derecho a treinta separatas gratuitas; si deseara más, deberá indicarlo por escrito cuando devuelva las pruebas corregidas. Las separatas complementarias serán facturadas a precio de coste.

La responsabilidad de los conceptos escritos corresponde a los autores.

Los trabajos se enviarán al Secretario de "Microbiología Española", Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo Rector de la Revista.

INDICE

Página

Caracteres comparativos entre una raza psicrófila y otra mesófila de *Arthrobacter,* por *I. Bernárdez* y *B. Regueiro* 69

Fosfonomicina (MK-955). Espectro de sensibilidad cuantitativa de diversas cepas hospitalarias a este nuevo antibiótico, por *M. Moreno-López, D. Dámaso, E. J. Perea, A. S. Sousa, M.ª Luisa Martínez* y *M.ª Luisa Marco* 79

Producción y propiedades de mutantes de estafilococos, por *R. Vaamonde, C. Nogueira* y *B. Regueiro* 87

Lisis y estudio de lisados de estafilococos, por *R. Vaamonde, C. Nogueira* y *B. Regueiro* 103

Investigaciones sobre la microflora de la rizosfera. III. Influencia del período de recogida de muestras, por *V. B. Srivastava* y *R. R. Mishra* 115

Acción del L-usnato sódico sobre la actividad ureásica de *Proteus mirabilis,* por *M.ª del Rosario Manso* y *C. Vicente* 123

Los doctores Feduchy y Rubio, en Sudamérica 133

Curso de Cultivo de tejidos 133

Curso de Virología 134

II Simposio sobre aplicaciones de la Espectroscopía molecular en Biología microbiana 134

CONTENTS

Page

Study on psychrophilic and mesophilic strains of *Arthrobacter,* by *I. Bernárdez* and *B. Regueiro* 69

Phosphonomycin (MK-955). Quantitative sensitivity spectra of various hospital strains to this new antibiotic, by *M. Moreno-López, D. Dámaso, E. J. Perea, A. S. Sousa, M.ª Luisa Martínez* and *M.ª Luisa Marco* 79

Study on staphylococci mutants, by *R. Vaamonde, C. Nogueira* and *B. Regueiro* 87

Staphylococci lysis, by *R. Vaamonde, C. Nogueira* and *B. Regueiro* 103

Investigations into rhizosphere microflora. III. Influence of sampling time, by *V. B. Srivastava* and *R. R. Mishra* 115

Action of sodium (L)-usnate on the urease activity of *Proteus mirabilis,* by *M.ª del Rosario Manso* and *C. Vicente* 123

Doctors Feduchy and Rubio, in South America 133

A course on Tissue culture 133

A course on Virology 134

II Symposium on Molecular Spectroscopy applied to Microbial Biology 134

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

CARACTERES COMPARATIVOS ENTRE UNA RAZA PSICROFILA Y OTRA MESOFILA DE *ARTHROBACTER*

por

I. BERNÁRDEZ (*) y B. REGUEIRO

INTRODUCCION

Las actividades y el crecimiento de los microorganismos están muy influidos por las condiciones del ambiente en que viven, siendo una de las más importantes la temperatura. La escala de temperaturas a que pueden vivir los microorganismos es muy amplia, entre — 18 °C y + 70 °C. Los que viven a temperaturas elevadas se denominan *termófilos;* los que viven a temperaturas medias, *mesófilos,* y los que viven a bajas temperaturas se denominan *psicrófilos.*

El interés de estos últimos comenzó a partir de la revisión realizada por Ingraham y Stokes (10), en especial por la importancia económica que adquirió la microbiología de las bajas temperaturas en la conservación de alimentos por refrigeración y congelación. También son importantes estos microorganismos en su contribución a los ciclos de los elementos en las regiones frías, en el suelo y en el agua. Este interés se refleja en las revisiones realizadas desde la fecha anterior (4-7, 9, 11, 13, 15, 17 y 20).

Hoy se admite como microorganismo psicrófilo aquel que crece a 0 °C, en siete días; si la máxima temperatura de crecimiento está por debajo de los 20 °C es "obligado", si está por encima es "facultativo".

(*) Con una beca de Ayuda a la Investigación.

Problema fundamental en relación con estos microorganismos es el de las posibles diferencias fisiológicas y bioquímicas en relación con los mesófilos y que permiten su adaptación a las bajas temperaturas. Por esta razón, una de las maneras de enfocar el problema sería el de comparar las propiedades fisiológicas y bioquímicas de una raza psicrófila y otra mesófila de una misma especie microbiana, con el fin de determinar los componentes, reacciones o estructuras diferentes entre ambas razas y en los que se funda la adaptación a las bajas temperaturas. Esto es lo que se trata de estudiar en el presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Empleamos dos razas de *Arthrobacter,* una, psicrófila, amablemente enviada por el Dr. Druce, de Inglaterra, y otra, mesófila, aislada en nuestro laboratorio. Se cultivan en medio de tripticasa-soja (BBL) y en un medio sintético de Rose (16).

Por técnicas microbiológicas generales (21) se realiza determinación de: fermentación de azúcares; prueba de indol, acetoína, rojo de metilo, citrato; producción de sulfhídrico, caseinasa, ureasa, desaminasa, descarboxilasa y reductasa; tolerancia a cianuro y fermentación de leche tornasolada.

Catalasa, reducción de substratos e hidrólisis de esculina se determinan por las técnicas de Solomon y Sanclemente (18); determinación de fosfatasa, por el método de Barnes y Morris (2); la de la oxidasa, por el de Steel (19); la citocromooxidasa, por el de Gaby y Free (8), y la deshidrogenasa, por el de Ralston y Baer (14).

Se determina el crecimiento por medida de extinción óptica de las muestras, en fotocolorímetro. Se realizan pruebas de sensibilidad a los antibióticos por difusión en placa y por dilución en tubo, según técnicas dadas por Kavanagh (12).

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

Se realiza un estudio de las propiedades que se indican a continuación, sobre las razas psicrófila y mesófila de *Arthrobacter,* comparándose sus resultados.

a) Propiedades morfológicas

Se determinan a las temperaturas de incubación de 2°, 20°, 30° y 37 °C. A todas las temperaturas, ambas razas son bacilos que con la edad adoptan forma cocoide, aerobios, móviles, heterotróficos y gram-positivos, aun cuando la raza mesófila es variable en su respuesta a esta coloración. La raza psicrófila, crecida a 20 °C y especialmenet a 2 °C, presenta una pigmentación amarilla que aumenta con la edad del cultivo.

b) Propiedades fisiológicas

Se realiza una prueba de fermentación con catorce azúcares, con cultivos de las dos razas, incubadas a 2°, 20°, 30° y 37 °C. Los resultados son negativos en todos los casos, a excepción de la raza psicrófila, que fermenta la esculina.

En el *cuadro 1* se expresan los resultados de una serie de reacciones fisiológicas y bioquímicas realizadas con cultivos de las razas psicrófila y mesófila incubadas a diversas temperaturas. Los resultados son paralelos para ambas razas, a excepción de: producción de ureasa por la raza psicrófila y no la mesófila; producción de elastasa y reducción de azul de metileno por la raza mesófila y no por la psicrófila.

Por último, la temperatura de muerte para la raza psicrófila es de 70 °C en diez minutos y para la mesófila es de 80 °C en el mismo tiempo.

c) Pruebas de crecimiento

Se estudia el efecto de las temperaturas de incubación sobre el crecimiento y consumo de azúcar por las razas psicrófila y mesófila de *Arthrobacter,* así como se realiza un estudio de las necesidades en aminoácidos y vitaminas de ambas razas comparativamente.

En relación con el *crecimiento (figuras 1-4),* observamos que la fase logarítmica se acorta al crecer la temperatura de incubación. La raza psicrófila crece más que la mesófila y es óptimo a 30 °C en la primera y 37 °C en la segunda. El consumo de azúcar es similar en todos los casos. Hemos visto también que inóculos crecidos a 37 °C no crecen en el caso de la raza psicrófila, por el contrario, no influye en el caso de la mesófila. En ambas razas, la aireación incrementa el crecimiento.

En relación con las *necesidades en aminoácidos* durante el crecimien-

Cuadro 1

Reacción	Raza psicrófila °C				Raza mesófila °C		
	2	20	30	37	20	30	37
Indol	—	—	—	—	—	—	—
Rojo de metilo	—	—	—	—	—	—	—
Acetoína	—	—	—	—	—	—	—
Citrato	+	+	±	±	+	+	+
Líq. gelatina	—	—	—	—	—	—	—
Producción SH_2	—	—	—	—	—	—	—
Ureasa	+	+	+	+	—	—	—
Red. nitratos	+	+	+	+	+	+	+
Leche tornasol.	—	—	—	—	—	—	—
Red. a-metileno	—	—	—	—	+	+	+
Amoníaco	—	—	—	—	—	—	—
Crec. cianuro	—	±	—	—	—	—	—
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Citocromo-oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Deshidrogenasa	+	+	+	+	+	+	+
Fosfatasa	+	+	+	+	+	+	+
Pirofosfatasa	+	+	+	+	+	+	+
Caseinasa	+	+	+	+	+	+	+
Desaminasa	—	—	—	—	—	—	—
Descarboxilasa	—	—	—	—	—	—	—
Elastasa	—	—	—	—	+	+	+

to, se realiza en un medio sintético (sin aminoácidos) y se añaden éstos en grupos como los siguientes: 1) arginina, cistina, cisteína, metionina; 2) irolencina, lencina, valina; 3) fenilalanina, triptófano, tiroina; 4) aspártico, glutámico, histidina, treonina; 5) alanina, glicina, serina, hidroxiprolina.

El crecimiento se determina en cada caso a temperaturas de incuba-

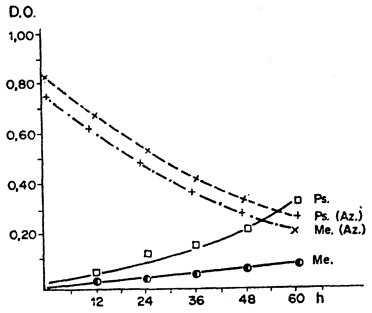

Figura 1. 2 °C

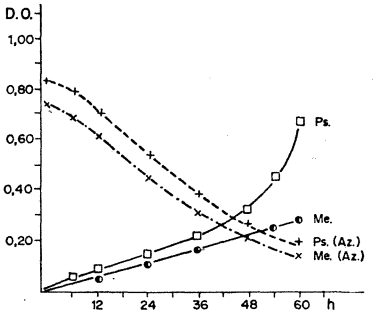

Figura 2. 20 °C

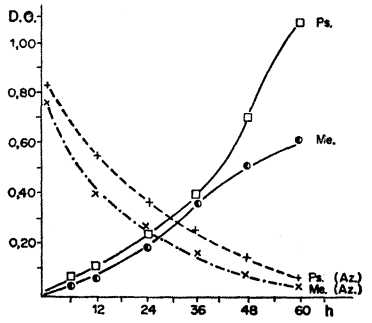

Figura 3. 30 °C

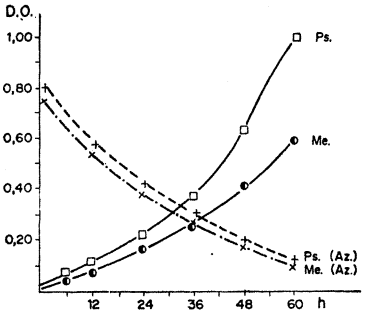

Figura 4. 37 °C

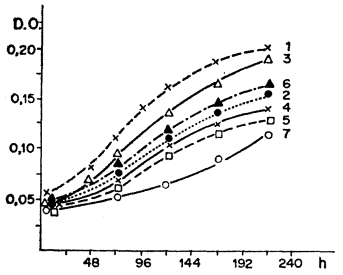

Figura 6. Psicrófilo

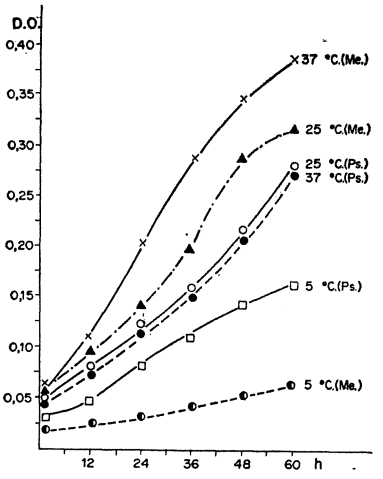

Figura 5. Aminoácidos

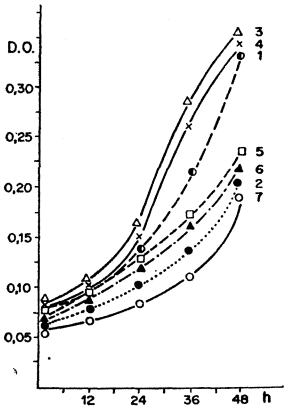

Figura 7. Mesófilo

ción de 5°, 25° y 37 °C. El crecimiento mayor se logra con la adición del grupo 5) de aminoácidos, cuya gráfica *(figura 5)* se acompaña para observar las diferencias por temperaturas.

La raza psicrófila crece menos que la mesófila cuando se adicionan aminoácidos por separado, a excepción de la lencina y triptófano. El mayor crecimiento con mesófilo se logra por la adición de arginina, cistina, metionina y serina. En relación con las *necesidades en vitaminas* durante el crecimiento, se realiza en un medio sintético (sin vitaminas) y se añaden separadamente las siguientes: 1) tiamina, 2) piridoxina, 3) riboflavina, 4) biotina, 5) pantotenato, 6) nicotínico y 7) control sin vitaminas. Los resultados se expresan gráficamente *(figuras 6-7)* y observamos que tiamina y riboflavina son las vitaminas que más incrementan el crecimiento de la raza psicrófila, mientras que estas dos y la biotina lo hacen en la raza mesófila.

d) Pruebas de sensibilidad a los antibióticos

Las pruebas comparativas entre la raza psicrófila y mesófila que se realizan, son las dos siguientes.

1) Prueba de difusión en placa

Se hace por método de discos, con 24 antibióticos, en placas de agar-tripticasa-soja, incubando a las temperaturas que se indican en el cuadro de resultados *(cuadro 2),* en que expresamos los milímetros del halo de inhibición. Observamos que, en general, la raza psicrófila es más sensible que la mesófila. La kanamicina es activa sobre la raza psicrófila a 2 °C y la mesófila a 30 °C, pero no a otras temperaturas de incubación; hay resistencias a determinadas temperaturas, de algunos antibióticos, como se observa en el cuadro.

2) Prueba de dilución en placa

Se realiza con cultivos incubados a las temperaturas que se indican en las gráficas de resultados *(figuras 8-12)* con penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina y novobiocina. Observamos relación entre la sensibilidad a los antibióticos mencionados y la temperatura óptima de crecimiento.

Cuadro 2

Antibióticos	Raza psicrófila °C				Raza mesófila °C		
	4	20	30	37	20	30	37
Tetraciclina	17	21	19	7	11	16	15
Novobiocina	21	11	21	9,5	10	18	15
Kanamicina	11	0	0	0	0	11	13
Vancomicina	14	0	19	7	0	14	10
Gabroral	16	0	18	3,5	0	15 (F.R.)	13
Rifocina	19	15	17	9	13	16	13
Rifampicina	23	19	19	13	9	18	15
Gentamicina	22	13	15	11	9	18	16
Neomicina	11	11	7	9	11	10	14
Oleandomicina	27	27 (F.R.)	20	15	0	12	12
Terramicina	0	11 (F.R.)	22	23	0	12	15
Penicilina	13	17	12	15	8	8	10
Estreptomicina	18	17	7	17	8	11	13
Cloxacilina	0	0	0	0	0	0	0
Cefalotina	18	18	20	13	0	13	17
Cloromicetina	23	0	9	10	0	11	18
Bacitracina	0	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	0	0	11	14	0	8	10
Aureomicina	20	17	28	27	13	17	19
Ac. nalidíxico	0	0	0	0	0	0	0
Lincomicina	0	0	0	0	0	0	0
Nitrofurantoína	13	15	17	17	9	13	21
Eritromicina	25	27 (F.R.)	29	29	0	12	17
Colimicina	0	0	0	0	0	0	0

F. R. = formas de resistencia.

DISCUSION

Señalábamos que una forma de plantear el problema de las bases fisiológicas del crecimiento a bajas temperaturas, es la del estudio comparativo de los caracteres de una raza psicrófila y otra mesófila a diferentes temperaturas de incubación.

Algunos autores habían señalado la influencia de la temperatura de

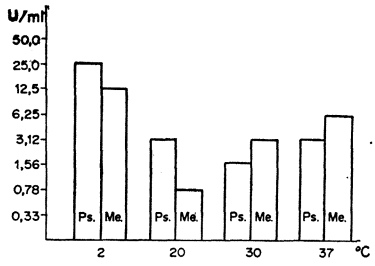

Figura 8. Penicilina

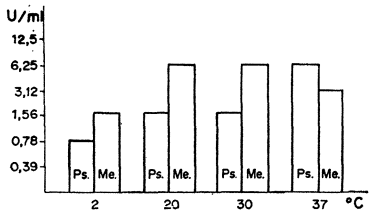

Figura 9. Estreptomicina

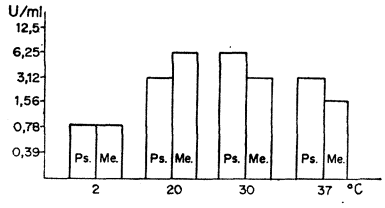

Figura 11. Tetraciclina

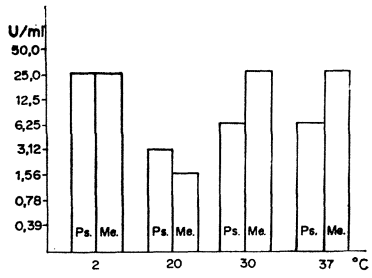

Figura 10. Cloranfenicol

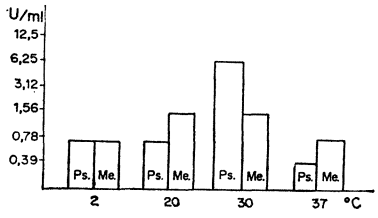

Figura 12. Novobiocina

crecimiento en la morfología celular, pero nosotros no observamos esta influencia, en cambio, sí determinamos la producción de pigmento por la raza psicrófila a bajas temperaturas. Esto se acompaña de un mejor crecimiento de la raza psicrófila, quizá debido a una mejor adaptación a las condiciones de cultivo empleadas. Al contrario que algunos autores (5 y 11) observamos influencia de la temperatura de incubación de los inóculos en la raza psicrófila, pues los crecidos a 37 °C no crecen posteriormente a bajas temperaturas.

Campbell y Williams (3) habían señalado que las exigencias nutritivas aumentan a temperaturas cercanas a la mínima de crecimiento. Nosotros estudiamos las necesidades en aminoácidos y vitaminas comparativamente en la raza psicrófila y mesófila. Así como Adams y Stokes (1) ven que la tiamina, ácido nicotínico y biotina estimulan el crecimiento de *Bacillus* psicrófilo, nosotros observamos que en el *Arthrobacter* psicrófilo lo hacen tiamina y riboflavina, mientras que en el mesófilo lo hacen estas dos vitaminas y la biotina.

En cuanto a la sensibilidad de la raza psicrófila y mesófila a los antibióticos también se observan algunas diferencias que pueden ser debidas a diferencias bioquímicas entre ellas; así, en general, la raza psicrófila es más sensible que la mesófila, y la temperatura de incubación, en casos, influye en la sensibilidad, siendo la óptima en cada caso la más sensible.

RESUMEN

Se comparan las propiedades fisiológicas y bioquímicas de una raza psicrófila y otra mesófila de *Arthrobacter* para determinar el fundamento de la adaptación a las bajas temperaturas de los microorganismos psicrófilos. Se estudian propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, comparativamente, estableciendo algunas diferencias significativas en relación con la pigmentación, crecimiento, exigencias nutritivas y sensibilidad a los antibióticos.

SUMMARY

Study on psychrophilic and mesophilic strains of Arthrobacter

Here we compared the physiological and biochemical properties of the psichrophilic and mesofilic strains of *Arthrobacter* to determine the basis of adaptation of the psichrophilic microorganisms to low temperatures. We studied morfological, physiological, and biochemical properties of each in what regards to pigmentation, growth, nutrition demands, and sensibility to antibiotics.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, J. C., y STOKES, J. L. 1968. J. Bacteriol., 95, 239.
2. BARNES, E. H., y MORRIS, J. F. 1957. J. Bacteriol., 73, 100.
3. CAMPBELL, L. L., y WILLIAMS, D. B. 1963. J. Bacteriol., 65, 141.
4. CHRISTOPHERSEN, J. 1967. Molecular Mechanisms Temperatura Adaptation, 327.
5. DUNCAN, D. W., y NICKERSON, J. T. R. 1961. Proc. Low Temp. Microbiol. Symp., 253.
6. ELLIOT, R. P., y MICHENER, H. D. 1965. U. S. Dep. Agr. Tech. Bull., 1.320.
7. FARREL, J., y ROSE, A. H. 1965. Advan. Appl. Microbiol., 7, 335.
8. GABY, W. L., y FREE, E. J. Bacteriol., 76, 442.
9. IMGRAHAM, J. L. 1965. Recent Progr. Microbiol. Symp. 8th Int. Congr. Microbiol.
10. IMGRAHAM, J. L., y STOKES, J. L. 1959. Bacteriol. Rev., 23, 97.
11. JEZESKI, J. J., y OLSEN, R. H. 1961. Proc. Low Temp. Microbiol. Symp., 199.
12. KAVANAGH, F. 1963. Analytical Microbiology.
13. MICHENER, H. D., y ELLIOT, R. P. 1964. Advan. Food Res., 13, 349.
14. RALSTON, D. J., y BAER, B. S. 1963. J. Bacteriol., 86, 666.
15. ROSE, A. H. 1963. Recent Progr. Microbiol. Symp. VIII Int. Congr. Microbiol.
16. ROSE, A. H., y EVISON, L. M. 1965. J. Gen. Microbiol., 38, 131.
17. SCHOLES, R. B., y SHEWAN, J. M. 1964. Advan. Mar. Biol., 2, 133.
18. SOLOMON, J. J., y SANCLEMENTE, J. J. 1963. Appl. Microbiol., 11, 36.
19. STEEL, K. I. 1962. J. Appl. Bacteriol., 25, 445.
20. STOKES, J. L. 1963. Recent Progr. Microbiol. Symp. 8th Int. Congr. Microbiol.
21. VAAMONDE, R., y REGUEIRO, B. 1964. Manual de Laboratorio de Microbiología.

CLINICA «PUERTA DE HIERRO», DE LA SEGURIDAD SOCIAL. MADRID
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA

PHOSPHONOMYCIN (MK - 955). QUANTITATIVE SENSITIVITY SPECTRA OF VARIOUS HOSPITAL STRAINS TO THIS NEW ANTIBIOTIC (*)

by

M. MORENO - LÓPEZ, D. DÁMASO, E. J. PEREA, A. S. SOUSA
M.ª LUISA MARTÍNEZ and M.ª LUISA MARCO

INTRODUCTION

Phosphonomycin is a new antibiotic produced by several streptomycetes, and discovered by fermentation of a strain of *Streptomyces fradiae,* isolated from a soil sample taken in the Spanish province of Alicante. It was observed later that *S. viridochromogenes* and *S. wedmorensis* also produce phosphonomycin. Discovery, isolation synthesis, pharmacological action, activity spectrum and action mechanism was carried out by the joint work of the Spaniards, J. M. Mata, S. Hernández and S. Mochales of the Research Division of the Compañía Española de Penicilina y Antibióticos, S. A., in Aranjuez, Madrid, and of the Americans D. Hendlin, E. O. Stapley, M. Jackson, H. Wallick, A. K. Miller, L. Chaiet, F. M. Kahan, E. L. Poltz and H. B. Woodruff, of the Research Division of the Merck Institute for Therapeutics, Rahway, N. Y. USA (4 and 6).

The structure of this antibiotic is (—) (1R, 2S)-1, 2- epoxipropilphosphonic acid. M. W. 138, 1. Structure: *figure 1.*

This compound is a bactericidal antibiotic, which acts on the synthesis

(*) Communication presented at the II Congreso Nacional de Microbiología. 1969. Madrid.

of the bacterial cell wall, through competitive and irreversible inhibition of the pyruvate-uridine-diphospho-N-acetilglucosamine transferase, in the first step of the synthesis of the cell wall, preventing the incorporation of phosphoenol-pyruvate to uridin-disphospho-N-acetil-glucosamine (7).

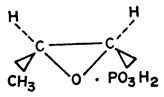

Figure 1

As its calcium salt, the compound is absorbed through the gastro-intestinal tract of the human, effective serum concentrations being obtained over two hours. It may also be administered parenterally as di-sodium salt.

The compound is actively eliminated by the kidneys, and reaches high concentrations in urine. No signs of toxicity were found in the tests conducted both on laboratory animals and on humans.

This communication presents the results obtained in the *in vitro* action of phosphonomycin against a series of bacteria, both Gram-positive and Gram-negative, of hospital origin, as well as against 3 standard strains, which will be indicated later.

This communication is divided into three parts:

1) Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (M.I.C.) of 95 strains against phosphonomycin, which strains were divided as follows:

a) *Staphylococcus,* coagulase-positive, several lysotypes, serotypes and antibiotypes: 24 strains.

b) *Escherichia coli:* 18 strains.

c) *Proteus mirabilis:* 18 strains.

d) *Klebsiella-Aerobacter:* 10 strains.

e) *Pseudomonas aeruginosa,* various pyocine-types: 25 strains.

92 strains were isolated from various pathological products of patients in our Clinic; the other three are the following standard strains:

Staphylococcus aureus, Oxford N. C. T. C. 6,571.

Escherichia coli N. C. T. C. 10,418.

Escherichia coli K-12 E 711 F.

2) Study of the *in vitro* action of the association phosphonomycin plus streptomycin against 19 strains of *Pseudomonas aeruginosa* of diverse pyocinetypes and antibiotypes, all of hospital origin.

3) Study of the *in vitro* action of the association phosphonomycin plus penicillin against 8 hospital strains of coagulase-positive staphylococci of different serotypes, lysotypes and antibiotypes.

MATERIAL AND METHODS

Strains

Those indicated in the preceding paragraph.

Determination of the M. I. C.

This was carried out following the technique described by Chabbert (1-2), using the method of dilution on agar plate, and employing as substrate the Mueller-Hinton medium (Difco). The strains were reactivated in the same liquid medium during 24 hours, and adequately diluted to obtain colonies by means of calibrated wire loops. Readings were taken after 18 hours of incubation at 37 °C except for penicillin and its association with phosphonomycin, where definite readings were taken 48 hours after innoculation.

The following plate series were prepared:

a) Increasing concentration of phosphonomycin, from 0.125 to 128 $\mu g/cm^3$.

b) Penicillin concentrations of 2, 4 and 8 U. O./cm^3.

c) Streptomycin concentration of 10, 20, 40 and 80 $\mu g/cm^3$).

d) Increasing concentrations of phosphonomycin, from 0.125 to 128 $\mu g/cm^3$, with 5 $\mu g/cm^3$ streptomycin in each plate.

e) Increasing concentrations of phosphonomycin from 0.125 to 128 $\mu g/cm^3$, with 2 U. O./cm^3 penicillin in each plate.

RESULTS

1) The distribution of the M. I. C., of the 95 studied strains against phosphonomysin are listed in the *table 1*.

M. I. C. for the Oxford *Staphylococcus* strain is 4 $\mu g/cm^3$.

M. I. C. for *Escherichia coli* 10,418 strain is 32 $\mu g/cm^3$.

M. I. C. for *Escherichia coli* K-12 E 711 F strain is 4 $\mu g/cm^3$.

Table 1. N.º strains inhibited using the following phosphonomycin concentrations, cm³

	N.º of strains	0.125	0.250	0.50	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Staphylococci	24	0	0	0	0	2	6	2	13	0	0	0	1
E. coli	18	0	0	0	0	1	5	3	5	1	2	1	0
Pr. mirabilis	18	0	0	0	0	0	2	2	3	5	0	2	4
Klebsiella-Aerobacter	10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	4	0
Ps. aeruginosa	25	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7	13	3

The *figure 2* shows the M. I. C. distribution for each of the five studied types, in cumulative sensitivity percentages.

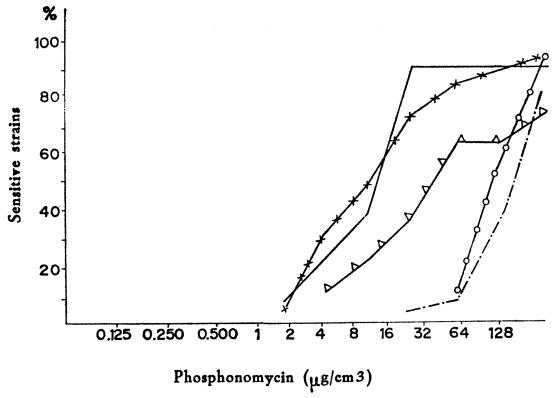

Figure 2. ——— *Staphylococci.* —x—x— E. coli. /\ /\ Pr. mirabilis. o———o Klebsiella-Aerobacter. —.— Ps. aeruginosa

Table 2. Results of the combination of phosphonomycin-penicillin against coagulase-positive staphylococci strains

Group N.°	Antibiotype	Serotype	Lysotipe	M. I. C. U. O./cm³ penicillin	M. I. C. μg/cm³ phosphono-mycin	M. I. C. μg/cm³ phosphono-mycin/peni-cillin	M. I. C. phosphono-mycin reduction
9	P, T, CAF, S	No serot.	No lysot.	8	4	1	4
24	P, T, S, L, E,O	Gr. III	Gr. III	8	4	1	4
12	P, T, CAF, S	Gr. I/II	Gr. I (80-81)	4	16	4	4
10	P, T, S, L	No serot.	Gr. I (80-81)	8	16	2	8
23	P, T, S	Gr. I	Gr. I (80-81)	8	16	0.125	128
19	P, T, S	Gr. 18	Gr. I/III	8	4	4	—
20	P, T, S, E	Gr. 14-18	Gr. III	8	4	4	—
22 P	P, S	Gr. III	Gr. I/III	8	16	16	—

P = penicillin. E = erythromycin. T = tetracyclin. O = oleandomycin. CAF = chloramphenicol. S = streptomycin. L = lincomycin.

2) Study of *in vitro* action of the association phosphonomycin plus streptomycin against 19 strains of *Pseudonomas aeruginosa* of various pyocinetypes and antibiotypes, all of hospital origin:

From the comparison of the M. I. C. for the 19 strains of *Pseudomonas aeruginosa* against phosphonomycin and against the association phosphonomycin plus streptomycin, the absence of synergism or additive effect of the combination was found, all strains studied behaving individually.

This association was chosen because one of the antibiotics (phosphonomycin) acts by inhibiting the synthesis of the bacterial cell wall (4), while the other (streptomycin) inhibits protein synthesis (3), and other antibiotics work by means of similar mechanisms and may exert synergism or additive effect against *Pseudomonas aeruginosa* when used in combinations (5).

3) Study of the *in vitro* action of the association phosphonomycin plus penicillin against 8 hospital strains of coagulase-positive staphylococci of different serotypes, lysotypes and antibiotypes:

The comparison of the M. I. C. of the strains against phosphonomycin with those against the association phosphonomycin-penicillin is shown in *table 2*.

On these 5 strains an obvious synergic or additive effect was noted as the M. I. C.'s were reduced between 4 and 128 fold. From these strains, 3 are lysotypable by phages of Group I (80-81).

The 3 remaining strains were unaffected.

This associatin was chosen because both antibiotics act upon the synthesis of the bacterial cell wall, but steps.

SUMMARY

The Minimun Inhibitory Concentration (M.I.C.) of phosphonomycin was determinated against 3 standard and 92 hospital strains. The *in vitro* action of the association phosphonomycin plus streptomycin against 19 hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa* is reported. The *in vitro* action of the association phosphonomycin plus penicillin against 8 hospital strains of coagulase-positive staphylococci is analyzed.

RESUMEN

Fosfonomicina (MK-955). Espectro de sensibilidad cuantitativa de diversas cepas hospitalarias a este nuevo antibiótico

Se ha determinado la concentración mínima inhibidora de fosfonomicina frente a 92 cepas hospitalarias y 3 cepas estandar internacionales. Se estudia la acción *in vitro* de la asociación fosfonomicina-estreptomicina frente a 19 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario. Se estudia la acción *in vitro* de la asociación fosfonomicina-penicilina frente a 8 cepas hospitalarias de estafilococo coagulasopositivo.

BIBLIOGRAPHY

1. CHABBERT, Y. A. 1963. L'Antibiogramme, 78. Editions de la Tourelle, Paris.
2. CHABBERT, Y. A. 1969. Personal communication.
3. GARROD, L. P., and O'GRADY, F. 1968. Antibiotic and Chemotherapy. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London.
4. HENDLIN, D., et al. 1969. Science, 166, 122-24.
5. MORENO-LÓPEZ, M., and DÁMASO, D. 1969. Notre experience dans le traitement des infections hospitalieres par *Pseudomonas aeruginosa* avec l'antibiotique Gentamicine. Communication presented at the Symposium on Gentamycin, Palma de Mallorca.
6. Preliminary report on the new antibiotic MK-955. 1969. Personal communication, C. E. P. A.
7. STROMINGER, J. L. 1967. Antibiotics, I, 705. D. Gottlieb and P. D. Shaw editors.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

PRODUCCION Y PROPIEDADES DE MUTANTES DE ESTAFILOCOCOS

por

R. VAAMONDE, C. NOGUEIRA y B. REGUEIRO

INTRODUCCION

La adaptación biológica es una propiedad necesaria para la supervivencia de los seres vivos. El estafilococo, según Barber (3), la tiene muy desarrollada y por esto es uno de los microorganismos más variables que existen.

Por la razón anterior podemos afirmar que el medio ambiente en que se encuentra el estafilococo influye en gran manera en sus propiedades y, por lo tanto, en su virulencia. Entonces, el metabolismo de las razas virulentas debe ser diferente del de las no virulentas (15-16). Asimismo, el medio ambiente debe de influir en el cambio de unas razas en otras por procesos de mutaciones, tanto más posible, pensando que el estafilococo presenta "pleiotropía".

El estudio de las anteriores mutaciones espontáneas o inducidas, así como las propiedades de las mismas, es el objeto del presente trabajo.

ANTECEDENTES

Parisi (25) hace algún tiempo que aisló mutantes del *Staphylococcus aureus* con propiedades diferentes de la original. También Boniece (5) aisló mutantes del *S. aureus* crecido en presencia de litio, que son inco-

loros, aun cuando no varían en otras propiedades. Korman (20), en cultivos de *S. aureus,* aisla mutantes que son coagulasonegativos; a partir de éstos puede recuperar espontáneamente razas coagulasopositivas.

Asimismo, pueden inducirse mutaciones como las anteriores por acción de agentes físicos y químicos. Altenbern (1) y Schaefer y Altenbern (28), inducen mutantes no pigmentados de *Staphylococcus aureus* y además coagulasonegativos, por efecto de la nitrosoguanidina. Otros autores (2, 14 y 22) estudian el efecto de la temperatura de incubación, observando la producción de mutantes con algunas diferentes propiedades. Por otro lado, Sonea y colaboradores (29) y Viens y colaboradores (33), estudian el efecto del naranja de acridina, el cual induce mutaciones sobre el *S. aureus.* Firsheim y Zimmerman (10) observaron que digeridos enzimáticos de ADN inducían la producción de mutantes virulentos a partir de cultivos no virulentos de estreptococos. Esto fue estudiado en el caso del estafilococo por McKee y Braun (23), con resultados positivos.

Generalmente, la producción de mutantes se acompaña del cambio en pigmentación y asimismo se relaciona esto con el cambio en patogenicidad (8 y 19); tanto que según Díaz y colaboradores (9) hay un 93 % de concordancia entre la producción de pigmento y la de coagulasa, que se toma siempre como síntoma de patogenicidad. Brown (6) señala que la pérdida de pigmento del *Staphylococcus aureus,* se acompaña de pérdida de otras propiedades. Esto lo estudiamos también en el presente trabajo. Si esto ocurre *in vivo,* quizá pueda relacionarse con el origen y producción de la infección.

Señala Stewart (30) que el estafilococo es el único coco piógeno con actividad lipolítica y esto tiene relación con la utilización de grasas y producción de pigmento. Precisamente las zonas del organismo donde existen grasas es donde más frecuentemente se producen infecciones estafilocócicas. Por otro lado, señalan Hugo y Stretton (13) que cuando aumentan los lípidos celulares se incrementa la resistencia a la penicilina y viceversa.

Dejando aparte la actividad coagulasa, muy estudiada por numerosos autores en relación con la patogenicidad del estafilococo, nos interesa aquí la actividad DN-asa. Ya habíamos señalado la influencia de los digeridos enzimáticos del ADN en la producción de mutaciones; estos digeridos pueden ser originados por la DN-asa exocelular producida por el estafilococo. Nosotros (22) la hemos estudiado con cierta intensidad y la relacionamos con la coagulasa y la patogenicidad.

Asimismo tiene interés la fosfatasa (7), pero también fue muy estudiada por numerosos autores. Nosotros (24) la hemos estudiado en unión de la pirofosfatasa, con la cual mantiene una relación inversa. Esta última actividad no había sido estudiada en el estafilococo, en el que encontramos su presencia en el *Staphylococcus epidermidis* y ausencia en el *S. aureus,* al contrario que la fosfatasa.

Asimismo, en relación con la producción de mutaciones, tiene interés el conocimiento de la adquisición y pérdida de sensibilidad a los antibióticos, problemas que también estudiamos en el presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizan razas de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis (S. albus),* aisladas de muestras patológicas en nuestro laboratorio.

A partir de los anteriores se aislan dos mutantes, uno "blanco", a partir del primero y otro "dorado", a partir del segundo. La técnica general de producción de mutantes se hace siguiendo el esquema que se indica *(figura 1).* Los medios empleados son: caldo común, caldo-agar, infusión

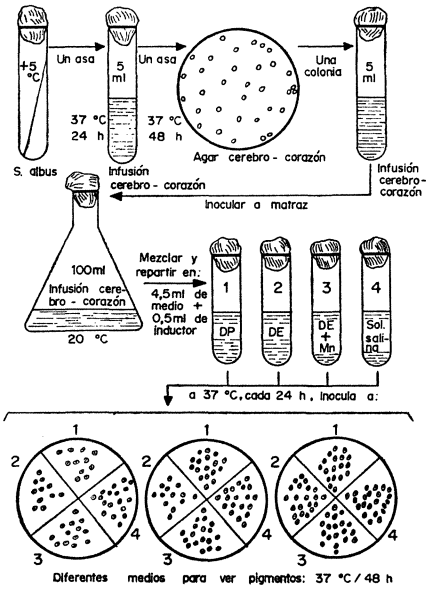

Figura 1. Esquema general de producción de mutaciones

cerebro-corazón y agar cerebro-corazón, de Difco, y caldo tripticasa-soja y agar tripticasa-soja, de BBL.

Para hacer el ADN digerido, preparamos ADN de timo por el método de Kay y colaboradores (18), y se digiere por DN-asa pancreática (Sigma) y DN-asa estafilocócica (exocelular, purificada por nosotros). Se incuba durante dos horas y media la mezcla siguiente: 5,5 ml de tampón de borato (pH = 8,6); 3,5 ml de Cl_2Ca, 0,04M; 7,0 ml de ADN (2 mg/ml) y 2,0 ml de DN-asa, hasta que no precipite con ácido perclórico, y se esteriliza a continuación.

Para las pruebas bioquímicas cualitativas seguimos los métodos generales de Vaamonde y Regueiro (32), así como los de Harrigan y McCance (12). Para las pruebas enzimáticas cuantitativas empleamos los métodos siguientes: para la actividad DN-asa, el de Stone y Burton (31); para la fosfatasa, el de Barnes y Morris (4); para la pirofosfatasa, el de Levinson y colaboradores (21), y para la deshidrogenasa, el de Ralston y Baer (26).

Las pruebas de crecimiento se realizan en matraces de 1.000 ml, con 200 ml de medio e inoculados con 2 ml de un cultivo en caldo común, incubado a 37 °C, por veinticuatro horas. La extinción se determina en muestras en fotocolorímetro (530 mμ).

Las pruebas de sensibilidad se hacen por el método de multidisco (Oxoid), las de difusión, en placas de agar tripticasa-soja y con cultivos de veinticuatro horas. Las placas se incuban a 37 °C, por cuarenta y ocho horas. La prueba de dilución en tubo se hace por el método de Kavanagh (17).

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

A) Producción de mutantes de estafilococos

Se parte de una raza de *Staphylococcus aureus* y otra de *S. epidermidis* que se someten a la acción de varios agentes físicos y químicos, según el esquema dado en la parte de métodos generales. Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

1) Inducción por ADN digerido: únicamente en algún caso de *S. epidermidis* conseguimos mutantes "dorados", que se utilizan en las pruebas posteriores.

2) Inducción por filtrados de cultivos de la raza contraria, filtrados y estériles: únicamente se logró alguna mutación "blanca" a partir de *S. aureus.*

3) Inducción por irradiación ultravioleta: se irradian cultivos por diferentes tiempos, así como placas de cultivo a diferentes distancias, etc.; únicamente en un caso de *S. epidermidis* se consiguió obtener una mutación "dorada".

4) Inducción por variaciones en el medio de cultivo: se emplean una serie de diferentes medios de cultivo, así como caldo común al que se adicionó cloroformo, difenilamina, leche, etc., sin conseguir mutaciones en ninguno de los casos.

5) Inducción por variación en la temperatura de incubación: los cultivos se incuban a temperaturas entre 33° y 42 °C y solamente en algunas experiencias con *S. epidermidis* se consigue obtener mutantes "dorados".

6) Inducción por naranja de acridina: se determina el efecto de este agente en diferentes condiciones y únicamente se observa producción de mutantes "dorados" a partir de *S. epidermidis* en alguna experiencia. Otra observación fue que este agente retarda la producción de coagulasa en las razas pigmentadas.

7) Inducción por novobiocina: en las zonas de inhibición, en las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, se observó que en el caso de la novobiocina sobre el *S. aureus* aparecían mutantes "blancos", que utilizamos en las pruebas posteriores.

En ninguno de los casos hemos conseguido el controlar la producción de mutantes de manera sistemática.

B) Caracteres y crecimiento de las razas de estafilococos

A partir de las anteriores razas originales y mutantes se realiza un estudio sistemático de sus propiedades biológicas y bioquímicas, para tratar de establecer relaciones entre ellos y determinar el grado de mutación.

1) Reacciones cualitativas

Se realizan las reacciones cuyos resultados se expresan en el *cuadro 1* por las técnicas generales indicadas. En relación con la fermentación de azúcares observamos relación entre el *Staphylococcus epidermidis* y el mutante "blanco", pero no entre el *S. aureus* y el mutante "dorado", en el que

Cuadro 1. Caracteres de las razas de estafilococos estudiadas

Caracteres	*S. epidermidis*	"Blanco"	*S. aureus*	"Dorado"
Arabinosa	—	—	+	—
Celobiosa	—	—	+	—
Dextrina	—	—	+	—
Glucosa	+	+	+	+
Inositol	—	—	+	—
Inulina	—	—	+	—
Lactosa	+	+	+	+
Levulosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
Rafinosa	—	—	+	+
Ramnosa	—	—	+	—
Sacarosa	+	+	+	+
Sorbosa	—	—	+	—
Manitol	—	—	+	+
Galactosa	—	—	+	+
Xilosa	—	—	+	+
Indol	—	—	—	—
Rojo de metilo	+	+	+	+
Acetoína	+	+	+	+
Citrato	—	—	—	—
Gelatinasa	—	—	—	—
Producción de SH_2	—	—	—	—
Ureasa	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+
Leche tornasolada	—	—	—	—
Red. de azul de metileno	—	—	+	+
Citocromooxidasa	+	+	+	+
Oxidasa	—	—	—	—
Coagulasa	—	—	+	+
Caseinasa	—	—	+	+
Lecitinasa	—	—	+	+
Deshidrogenasa	+	+	+	+
DN-asa	—	—	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Fosfatasa	—	—	+	+
Pirofosfatasa	+	+	—	—
Telurito-glicina	+	+	++	+++

el primero manifiesta una mayor actividad fermentativa. Se podría sugerir una mayor facilidad de mutación en el sentido de pérdida de propiedades, que de adquisición de las mismas.

En relación con otras propiedades bioquímicas, existe una gran relación entre las razas pigmentadas, por un lado, y las no pigmentadas, por otro. Los caracteres de las primeras se asocian con la patogenicidad (coagulasa, DN-asa, fosfatasa, reducción de azul de metileno, caseinasa, lecitinasa, crecimiento en telurito-glicina). La actividad pirofosfatasa sólo se advierte en las razas no pigmentadas.

2) Reacciones cuantitativas

Nos referimos aquí a la determinación cuantitativa de algunas actividades enzimáticas. Se realiza por los métodos dados anteriormente, en las actividades DN-asa, fosfatasa y pirofosfatasa, cuyos resultados se expresan en el *cuadro 2*. Observamos que la actividad DN-asa es superior en las razas pigmentadas, así como la actividad fosfatasa, en tanto que la

Cuadro 2

Actividad	*S. epidermidis*	"Blanco"	*S. aureus*	"Dorado"
DN-asa	0,355	0,450	0,570	0,750
Fosfatasa	0,056	0,061	0,155	0,301
Pirofosfatasa	0,671	0,550	0,256	0,035

actividad pirofosfatasa es superior en las razas no pigmentadas. Estos resultados son significativos.

Estudiamos con mayor detalle la actividad deshidrogenasa de las razas anteriores, por el método dado anteriormente. Realizamos una prueba cuantitativa empleando una serie de substratos diferentes. Los resultados se expresan en el *cuadro 3*. Observamos que una serie de substratos son utilizados por todas las razas, mientras que otros no. Caso especial es el de la glutamato-deshidrogenasa, que sólo muestra actividad el *Staphylococcus epidermidis*. No sabemos la significación de esto, y el de la asparraguina. De los resultados anteriores se deduce que la actividad deshidrogenasa es mayor en las razas pigmentadas, especialmente en la del *S. aureus*.

Cuadro 3

Substrato	*S. epidermidis*	"Blanco"	*S. aureus*	"Dorado"
Lactato	—	—	—	—
Formiato	—	—	—	—
Malato	—	—	—	—
Aspartato	—	—	—	—
Fumarato	—	—	—	—
Aconitato	—	—	—	—
Cetoglutarato	—	—	—	—
Succinato	—	—	—	—
Serina	—	—	—	—
Glutamato	0,580	—	—	—
Glucosa	2,000	1,100	1,950	1,070
Piruvato	1,450	1,500	2,100	3,200
Acetato	1,680	1,100	1,810	0,430
Etanol	0,090	1,160	0,340	1,090
Glicerol	1,050	1,040	1,200	1,300
Manitol	1,140	1,260	1,880	1,910
Citrato	1,400	0,650	1,580	2,200
Isocitrato	2,800	2,550	1,400	1,970
Glicina	1,550	0,500	0,790	2,150
Alanina	0,900	0,800	1,300	1,450
Asparraguina	0,100	—	1,300	2,000

3) Pruebas de crecimiento

Tratamos de observar las modificaciones que se producen en el mismo por variaciones en su composición. Por adición de ADN o de DN-asa pancreática (10 γ/ml) no observamos variaciones en el crecimiento, aun cuando en el último caso, el *Staphylococcus epidermidis* produce mutantes "dorados". En otras experiencias adicionamos digeridos de ADN (por DN-asa pancreática y estafilocócica). Los resultados son parecidos. Las razas no pigmentadas crecen más lentamente y en general el digerido de ADN parece retardar el mismo, al contrario de los que habían observado algunos autores (23). Los resultados se expresan gráficamente *(figura 2)*. Por otra parte, el manganeso no influye en el crecimiento en presencia de digeridos, como también indicaban otros autores.

Cuadro 4

Variables		Horas			
Actividad	Raza	6	12	24	18
DN-asa	*S. epidermidis*	0,315	0,230	0,230	0,240
	"Blanco"	0,105	0,100	0,110	0,140
	S. aureus	0,170	0,235	0,260	0,270
	"Dorado"	0,190	0,260	0,285	0,410
Fosfatasa	*S. epidermidis*	0,000	0,032	0,036	0,051
	"Blanco"	0,071	0,036	0,036	0,032
	S. aureus	0,022	0,066	0,076	0,097
	"Dorado"	0,046	0,081	0,086	0,097
Pirofosfatasa	*S. epidermidis*	0,022	0,168	0,229	0,310
	"Blanco"	0,022	0,125	0,222	0,337
	S. aureus	0,046	0,071	0,086	0,086
	"Dorado"	0,126	0,076	0,076	0,056

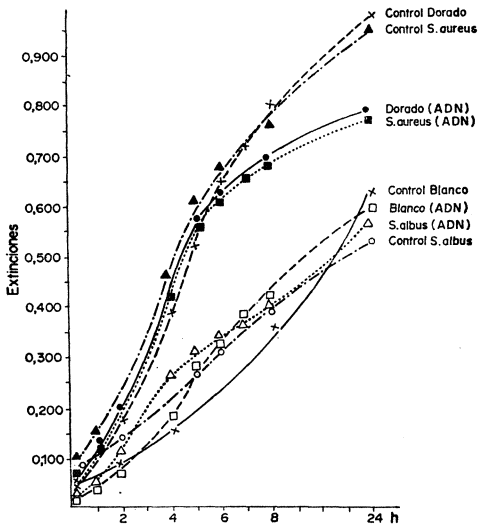

Figura 2. Influencia del digerido de ADN (estafilocócico)

Durante las pruebas anteriores de crecimiento, determinamos algunas actividades enzimáticas relacionadas con la patogenicidad del estafilococo. A intervalos de tiempo se toman muestras y determina la actividad por los métodos dados previamente *(cuadro 4).*

Observamos que la actividad DN-asa se incrementa en las razas pigmentadas, mientras que disminuye o no varía en las no pigmentadas. La actividad fosfatasa aumenta en todos los casos, pero de manera algo más rápida en las razas pigmentadas. En relación con la pirofosfatasa, el nivel es mucho mayor en las razas no pigmentadas incrementando su producción con el tiempo, a excepción del *Staphylococcus aureus,* que disminuye.

En relación con la actividad pirofosfatasa, determinamos el efecto de algunos inhibidores sobre ella y vemos que en todos los casos se produce una cierta inhibición, especialmente con lauril-sulfato, Zn y EDTA. El efecto es mayor en el caso de las razas no pigmentadas, sobre todo en el lauril-sulfato. Esto ya lo habíamos observado en un trabajo anterior (24).

De todo lo anterior se deduce que las razas consideradas virulentas, son pigmentadas y que cuando mutan a no pigmentadas cambian las propiedades que se consideran ligadas a la virulencia. Esto, *in vitro;* debe estudiarse este proceso *in vivo.*

c) Acción de los antibióticos sobre las razas de estafilococos

La acción de los antibióticos a nivel celular o nivel molecular, debe de estar ligada a las propiedades biológicas y bioquímicas de los microorganismos, en el presente caso, de los estafilococos.

1) Se realiza primero una prueba de sensibilidad rutinaria de las razas estudiadas a los principales antibióticos, por el método dado al principio.

Observamos que todas las razas son *resistentes* a polimixina, sulfamidas y a la colimicina, asimismo el *Staphylococcus epidermidis* resiste a novobiocina, el mutante "blanco" a novobiocina y meticilina, el *S. aureus* a meticilina, ampicilina y penicilina, y el mutante "dorado" a ninguno de los indicados. Son *poco sensibles,* a kanamicina, neomicina, cloranfenicol y furazolidona, el *S. aureus;* a kanamicina, neomicina y estreptomicina, el mutante "dorado", y a cloranfenicol y oleandomicina, el mutante "blanco". Son *sensibles* en forma parecida todos los estafilococos, siendo el menos el *S. aureus.*

2) Se realiza ahora una prueba de concentración mínima inhibidora a los principales antibióticos de las razas de estafilococos, por el método indicado previamente.

Los resultados se expresan en el *cuadro 5* y nos indican una mayor resistencia de las razas pigmentadas en general.

Cuadro 5

Antibiótico	C. m. i., γ/ml			
	S. epidermidis	"Blanco"	*S. aureus*	"Dorado"
Penicilina	25,00	12,50	100,00	100,00
Estreptomicina	1,56	1,56	12,50	12,50
Tetraciclina	0,78	0,78	0,78	100,00
Novobiocina	25,00	25,00	0,78	0,39

3) Por último, estudiamos el efecto de la tetraciclina y novobiocina sobre las deshidrogenasas de las diferentes razas de estafilococos. Se hace esto por los métodos dados anteriormente, añadiendo el antibiótico a la suspensión inicial de las células, durante una hora, recogiendo aquéllas por centrifugación y volviendo a determinar la actividad deshidrogenasa. Se realiza con los substratos que previamente se ha visto que tienen actividad en las razas de estafilococos.

Expresamos uno de los resultados en forma gráfica *(figuras 3-6)* como

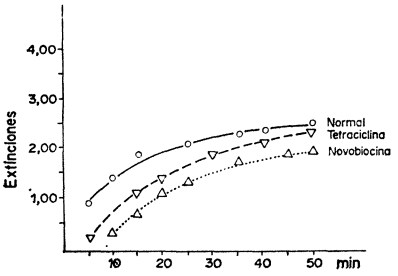

Figura 3. Dorado

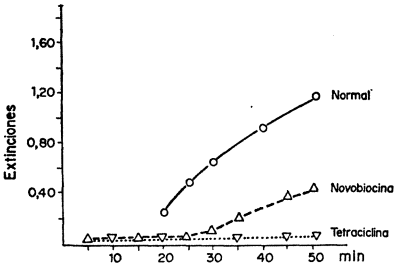

Figura 4. Blanco

ejemplo. En general, observamos que los dos antibióticos mencionados tienen efecto más o menos inhibidor de la actividad deshidrogenasa en todos los casos. Siempre la tetraciclina tiene más acción que la novobiocina. Existe completa inhibición en los casos siguientes: acetato-deshidrogenasa (tetraciclina en *Staphylococcus epidermidis,* "dorado" y "blanco";

novobiocina en "dorado"); etanol-deshidrogenasa (novobiocina y tetraciclina en *S. epidermidis,* "blanco" y *S. aureus*); manitol-deshidrogenasa (novobiocina y tetraciclina en "blanco"); citrato-deshidrogenasa (tetraciclina en *S. epidermidis* y "blanco"); alanina-deshidrogenasa (novobiocina y tetraciclina en *S. epidermidis,* tetraciclina en "blanco"); asparraguina-des-

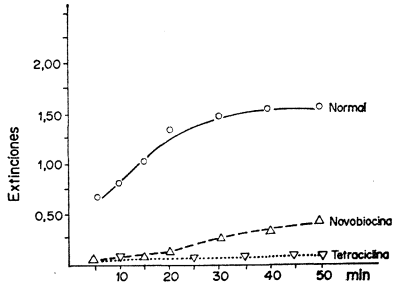

Figura 5. S. albus

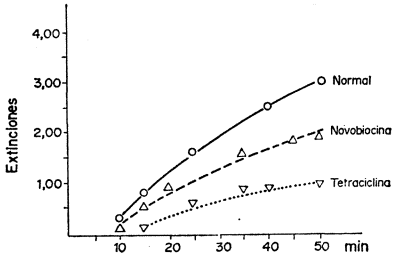

Figura 6. S. aureus

hidrogenasa (novobiocina y tetraciclina en *S. epidermidis* y "blanco"). La glicina-deshidrogenasa incrementa su actividad con novobiocina en el "dorado".

Se conoce que el efecto de la tetraciclina es el de inhibición de la biosíntesis de proteínas (11); quizás esto se relacione con la inhibición de las deshidrogenasas. No tenemos antecedentes del efecto de la novobiocina sobre las deshidrogenasas.

CONCLUSIONES

1.ª A partir de una raza de *Staphylococcus epidermidis* se obtiene un mutante "dorado" por inducción con digerido de ADN. Asimismo, a partir de una raza de *S. aureus* obtenemos un mutante "blanco" por inducción con novobiocina.

2.ª Propiedades comunes a las razas pigmentadas son: pigmento, coagulasa, DN-asa, reducción de azul de metileno, caseinasa, lecitinasa, fosfatasa y crecimiento en agar-telurito-glicina. También estas razas presentan mayor actividaded fermentativa de azúcares. En general, la actividad deshidrogenasa es mayor en las razas pigmentadas cuantitativamente, pues

cualitativamente estas actividades actúan sobre los mismos substratos a excepción de la glutamato-deshidrogenasa, que sólo la posee el *S. epidermidis.*

3.ª El crecimiento en todas las razas no es influido por ADN o por DN-asa; en cambio, los digeridos de ADN inhiben ligeramente a las pigmentadas y estimulan a las no pigmentadas. Durante el crecimiento, la DN-asa exocelular aumenta en las razas pigmentadas y no varía o disminuye en las no pigmentadas; ocurre lo contrario con la actividad pirofosfatasa.

4.ª Las sensibilidades y resistencias a los antibióticos son similares cualitativamente en todas las razas, con ligeras excepciones. Cuantitativamente, la concentración mínima inhibidora de algunos antibióticos, muestra una mayor resistencia de las razas pigmentadas. Se encuentra que la tetraciclina y la novobiocina actúan sobre la actividad deshidrogensa en algunos substratos y de especial manera sobre la de las razas no pigmentadas.

RESUMEN

Estudiamos un mutante "dorado" y otro "blanco" obtenidos, respectivamente, de una raza de *Staphylococcus epidermidis* y otro de *S. aureus* por inducción por digerido de ADN y de novobiocina. Ss estudian las propiedades de las cuatro razas comparativamente, así como la cinética de su crecimiento y de producción de algunas enzimas y por último la sensibilidad de dichas razas a los antibióticos. Se concluye que el mutante "dorado" es similar al *S. aureus* y el "blanco" el *S. epidermidis.*

SUMMARY

Study on staphylococci mutants

We studied a "golden" mutant and a "white" mutant from the strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* respectively by chemical induction. We studied the properties of these four strains as well as the growth kinetics, production of some enzymes, and also the antibiotic

sensitivity of these strains. We can conclude that the "golden" mutant is similar to the *S. aureus* and that the "white" mutant is similar to the *S. epidermidis.*

BIBLIOGRAFIA

1. ALTENBERN, R. A. 1967. Genetics studies of pigmentation of *Staphylococcus aureus.* Can. J. Microbiol., 13, 387.
2. ASHESHOV, E. H. 1966. Low of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* resulting from growth at high temperature. J. Gen. Microbiol., 42, 403.
3. BARBER, M. 1963. Development of drug resistance by staphylococci *in vitro* and *in vivo.* Int. Rev. Cytol., 14, 262.
4. BARNES, E. H., y MORRIS, J. F. 1957. A quatitative study of the phosphatase activity of *Micrococcus pyogenes.* J. Bacteriol., 73, 100.
5. BONIECE, W. S.; WICK, W. E., y HOLMES, D. H. 1957. White variants derived from *Staphylococcus aureus*: comparaison with parent strains. J. Bacteriol., 73, 685.
6. BROWN, A. E. 1965. The production of pigment by *Staphylococcus piogenes.* J. Med. Lab. Technol., 22, 121.
7. CALAFAT, J.; DOMÍNGUEZ, C., y REGUEIRO, B. 1966. Fosfatasa ácida estafilocócica. Rev. Españ. Fisiol., 22, 71.
8. DÍAZ, R.; CHORDI, A.; RODRÍGUEZ-BURGOS, A., y TORMO, J. 1964. Estudio sobre ocho características del *Staphylococcus* relacionadas con la patogenicidad. Microbiol. Españ., 17, 167.
9. DÍAZ, R.; CHORDI, A.; TORMO, A., y RODRÍGUEZ, A. 1964. Producción de pigmento por el estafilococo. Rev. Med. Univ. Navarra, VIII, 172.
10. FIRSEIN, W., y ZIMMERMAN, E. M. 1964. *In vitro* and *in vivo* effects of DNA degradation products on virulent and avirulent group. A streptococci. J. Gen Microbiol., 36, 237.
11. FRANKLYN, T. J. 1966. Mode of action of tetracyclines. XIV Symp. Soc. Gen. Microbiol., 192.
12. HARRIGAN, W. F., y MCCANCE, M. E. 1966 Laboratory Methods in Microbiology.
13. HUGO, W. B., y STRETTON, R. J. 1966. The role of cellular lipids in the resistence of Gram positives bacteria to penicillins. J. Gen. Microbiol., 42, 133.
14. IANDOLO, J. J., y ORDAL, Z. J. 1966. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus.* J. Bacteriol., 91, 134.
15. IVLER, D. 1965. Comparative metabolism of virulent and avirulent staphylococci. Ann. N. Y. Acad. Sci., 128, 62.
16. JACOBS, S. I.; WILLIS, A. T., y GOODBURN, G. M. 1964. Pigment production, enzymatic activity and antibiotic sensitivity of staphylococci: subdivision on the pathogenic group. J. Pathol. Bacteriol., 87, 157.
17. KAVANAGH, F. 1963. Analytical Microbiology.

18. KAY, E. R. M.; SIMMONS, N. S., y DOUNCE, A. L. 1952. An improved preparation of sodium deoxyribonucleate. J. Chem. Soc., 74, 1.724.
19. KEDZIA, W.; MUSIELAK, M.; KEDZIA, B.; KONIAR, H., y PNIEWSKA, E. 1966. Enzymatic activity of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients and healthy carriers. Pathol. Microbiol., 29, 307.
20. KORMAN, R. Z. 1963. Coagulase-negative mutants of *Staphylococcus aureus,* genetic studies. J. Bacteriol., 86, 369.
21. LEVINSON, H. S.; SLOAN, J. D., y HYATT, M. T. 1958. Pyrophosphatase activity of *Bacillus megaterium* spore and vegetative cell extracts. J. Bacteriol., 75, 291.
22. MAY, J. W.; HOUGHTON, R. H., y PERRET, C. P. 1964. The effect or growth at elevated temperatures on some hereditable properties of *Staphylococcus aureus.* J. Gen. Microbiol., 36, 157.
23. MCKEE, J. J., y BRAUN, W. 1962. Effects of enzymatic digest of DNA on staphylococci. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 109, 166.
24. NOGUEIRA, C.; CALAFAT, J.; DOMÍNGUEZ, C., y REGUEIRO, B. 1966. Pirofosfatasa inorgánica de estafilococos. Rev. Med. Univ. Navarra, X, 93.
25. PARISI, J. T. 1966. Significance of chromogenic variants in studies of virulence factors of *Staphylococcus aureus.* J. Bacterial., 92, 589.
26. RALSTON, D. J., y BAER, B. S. 1963. Inhibitory action of phage K on staphylococcal dehydrogenase. J. Bacteriol., 86, 666.
27. REGUEIRO, B., y DOMÍNGUEZ, C. 1965. Producción y actividad de la DN-asa de estafilococos. Resúmenes IV Jor. Bioquím. Latin.
28. SCHAEBER, J. C., y ALTENBERN, R. A. 1966. Pigmentation variants of *Staphylococcus aureus.* Bacteriol. Proc., 37.
29. SONEA, S.; LAWLOR, R., y REPENTIGNE, J. de. 1966. High yields of avirulent *Staphylococcus aureus* mutants obtained with acridine orange. Bacteriol. Proc., 37.
30. STEWART, G. T. 1965. The lipase and pigments of staphylococci. Ann. N. Y. Acad. Sci., 128, 132.
31. STONE, A. B. , y BURTON, K. 1962. Synergistics effect in the activation of a streptococcal DN-ase by bivalent ions. Biochem. J., 83, 492.
32. VAAMONDE, R., y REGUEIRO, B. 1960. Manual de Laboratorio de Microbiología.
33. VIENS, P.; SONEA, S., y REPENTIGNE, J. de. 1965. Inhibition de l'action antibacterienne de la penicilline chez des staphylocoques cultivés en presence d'orange d'acridine. Can. J. Microbiol., 11, 393.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

LISIS Y ESTUDIO DE LISADOS DE ESTAFILOCOCOS

por

R. VAAMONDE, C. NOGUEIRA y B. REGUEIRO

INTRODUCCION

El estafilococo es uno de los microorganismos más difíciles de desintegrar por métodos físicos y esto naturalmente depende de la estructura de su pared celular. Pero el estafilococo se puede romper o lisar y esto ocurre con diferente intensidad en cada raza, lo cual quiere significar diferencias de estructura en las paredes de las mismas. En la línea de nuestro trabajo, esto pudiera utilizarse para diferenciar razas y para relacionar tal propiedad con otras características de los estafilococos.

En el presente trabajo estudiamos la lisis de razas de estafilococos por procesos de autólisis, rotura por ultrasonido y lisis por la lisostafina.

Este último es el método más interesante para nosotros, dado que la rotura es específica de pared celular y no hay alteración del contenido citoplasmático. La lisostafina es una enzima obtenida por Schindler y Schuhardt (9), de un filtrado de *Staphylococcus staphylolyticus*. Schindler (8) dice que lisa al estafilococo *in vivo* y específicamente en el mucopéptido de la pared celular. Se determinó (10) que la velocidad de lisis depende de la concentración de cloruro sódico, temperatura, pH y concentración de lisostafina.

Brower y colaboradores (2) dicen que es una peptidasa que rompe específicamente los enlaces de glicina y alanina en la fracción de mucopéptido de la pared. Zygmunt y colaboradores (15-16 y 18) hacen estudios sobre el efecto de la lisostafina en las infecciones estafilocócicas, así

como Quinn y colaboradores (6), que observan una mayor inhibición en los estafilococos coagulasopositivos que en los negativos. Asimismo, Zygmunt y colaboradores (17) estudian el efecto de la lisostafina sobre razas sensibles y resistentes de *Staphylococcus aureus.*

Tipper (13) estudia los mecanismos de autólisis de paredes celulares aisladas de *Staphylococcus aureus,* así como otros autores, pero no estudiaron las diferencias de autólisis entre razas de estafilococos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizan razas de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* aisladas de muestras patológicas en nuestro laboratorio. A partir de la primera se aisla un mutante "blanco" y del segundo un mutanto "dorado", por los métodos dados por nosotros en otro trabajo (14).

Los cultivos se realizan en: caldo común, caldo tripticasa-soja y agar tripticasa-soja. La lisostafina empleada fue enviada por el Dr. Tavormina de Mead & Johnson Research Lab. (USA). Trabajamos según los métodos dados por dicho autor.

El método de rotura de células por ultrasonido se hace con cultivos en caldo común, crecidos por agitación a 30 °C, por quince horas. Se centrifuga, realizan varios lavados y hace suspensión en agua destilada. Esta se somete al ultrasonido (aparato MSE), centrifuga una vez rotas las células y hace análisis.

La lisis por lisostafina se hace sobre suspensión de las células obtenidas como antes, en tampón de tris-ClNa (pH = 7,5) y en presencia de diversas concentraciones de lisostafina. Se incuba a 37 °C y cada diez minutos se toma una muestra y mide la extinción en un fotocolorímetro de Kipp (filtro, 620 mμ).

Se realizan determinaciones de sustancias con absorción máxima a UV_{260} en espectrofotómetro de Hilger y en los líquidos lisados centrifugados. La proteína se mide por el "biuret", según el método dado por Leggett (4); los grupos reductores, por el método del ácido dinitrosalicílico (13); los aminoazúcares, por los métodos de Reissig y colaboradores (7), y el de Cessi y Piliego (3), expresando los resultados en N-acetilglucosamina; la DN-asa, por el de Stone y Burton (11); la fosfatasa, por el de Barnes y Morris (1), y la pirofosfatasa, por el de Levinson y colaboradores (5).

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

1) Proceso de autólisis

Cultivos de las razas de estafilococos antes mencionadas crecen en caldo tripticasa-soja, en agitación, a 30 °C, por dieciséis horas. Se recogen y lavan las células por centrifugación y ponen en solución salina, abandonando en nevera (+ 4 °C), por treinta días. Se determina la extinción inicial y final de las suspensiones y observa la disminución en la misma. Los resultados se expresan en el *cuadro 1*. Encontramos que las razas pigmentadas se autolizan en mayor intensidad, quizá porque son las únicas que forman enzimas autolíticas o porque sus paredes celulares sean más débiles.

Cuadro 1. Autólisis de estafilococos

Razas	D. o. inicial	D. o. final
S. epidermidis	1,199	1,199
Mutante "blanco"	1,199	1,149
S. aureus	1,199	0,438
Mutante "dorado"	1,199	0,402

2) Rotura por ultrasonidos

Se hace por el método dado previamente. A diferentes períodos de tiempo se toman muestras que se analizan para proteína, nucleótidos, DN-asa, fosfatasa y pirofosfatasa. Damos la gráfica de los resultados sobre una de las razas empleadas, por ser similares los de las otras razas *(figura 1)*.

En general, los nucleótidos son los primeros que difunden en el medio, quizá por su poco peso molecular. La difusión de proteínas va aumentando a medida que se continúa el tratamiento por ultrasonido. La DN-asa difunde en las razas pigmentadas, pero esto ocurre por ser en las que hay producción de la misma, en este caso de tipo endocelular; en las no pigmentadas, como se observa en la gráfica, casi no varía. Algo parecido

ocurre con la actividad fosfatasa. En relación con la pirofosfatasa, ésta aumenta en las razas no pigmentadas, en general, de acuerdo con resultados anteriores.

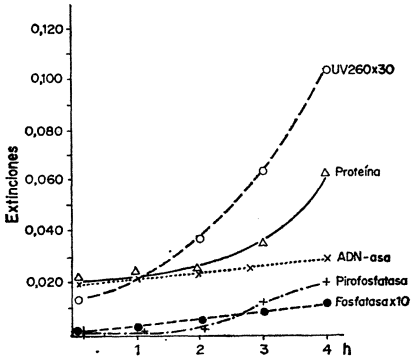

Figura 1. Ultrasonidos

3) Lisis por lisostafina

Esta sustancia, que algunos consideran enzima y otros antibiótico, lisa específicamente la pared celular del estafilococo por efecto de peptidasa.

a) Efecto de la cantidad de lisostafina

Se realiza por el método que hemos dado anteriormente y poniendo concentraciones de lisostafina de 1,0-2,0-3,0 y 4,0 unidades (el producto contiene 250 U/mg), así como un tubo control sin lisostafina. Se incuba y cada diez minutos toma una muestra y determina la extinción que nos da el grado de lisis. Expresamos los resultados gráficamente *(figuras 2-3)* y correspondientes al *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis,* pues los de los mutantes son similares a éstos.

Observamos inmediatamente que todas las concentraciones de lisostafina producen lisis proporcionalmente a su concentración. Otra conclusión que se deduce es que las razas pigmentadas se lisan más fácilmente que las no pigmentadas y un poco más en los mutantes que en las razas originales.

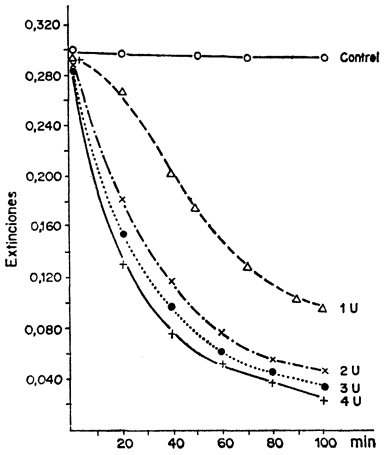

Figura 2. S. aureus

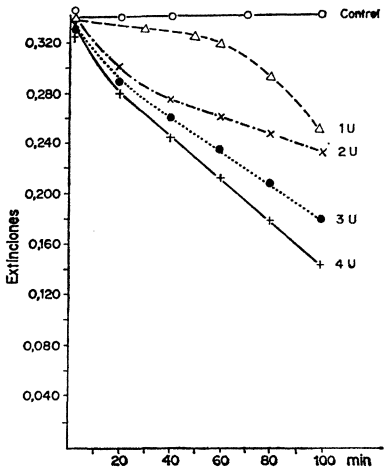

Figura 3. S. albus

b) Análisis de lisados por lisostafina

La experiencia se realiza por los métodos generales antes indicados. La lisis se realiza con dos unidades de lisostafina. Se realizan en los lisados centrifugados los análisis que se indican en el *cuadro 2*.

Cuadro 2. Análisis de lisados por lisostafina

Determinación de	*S. epidermidis*	"Blanco"	*S. aureus*	"Dorado"
Proteína	0,050	0,055	0,055	0,050
Nucleótidos (UV_{260})	0,180	0,180	0,480	0,615
Grupos reductores	0,000	0,000	0,000	0,000
Aminoazúcares	0,290	0,270	0,350	0,320
DN-asa	0,080	0,085	0,060	0,050
Fosfatasa	0,000	0,018	0,061	0,046
Pirofosfatasa	0,029	0,076	0,009	0,012

Observamos que la cantidad de proteínas es similar en todos los casos. Existe mayor cantidad de nucleótidos en las razas pigmentadas que en las no pigmentadas. No se detectan grupos reductores, pero sí aminoazú-

cares, lo cual demuestra el efecto de la lisostafina sobre la estructura de la pared celular; asimismo, el efecto se ve es mayor sobre las razas pigmentadas. Es curioso observar que el contenido en DN-asa endocelular es mayor en las razas no pigmentadas, las cuales casi no la forman exocelularmente. La fosfatasa, en cambio, es mayor en el caso de las razas pigmentadas, al contrario de la pirofosfatasa. La cantidad es baja, pues como se centrifuga se separan estructuras a las cuales se encuentra ligada la actividad pirofosfatasa.

c) Influencia de la edad en la lisis por lisostafina

Se realizan los métodos generales de crecimiento de las diferentes razas de estafilococos, en caldo tripticasa-soja, en agitación y a 30 °C. Cada dos horas se toma una muestra, se centrifuga y las células se lavan y emplean en la lisis por lisostafina, por los métodos generales antes indicados. Los resultados los expresamos gráficamente en el caso del *Staphylococcus aureus (figura 4),* pues los de las otras razas son muy similares.

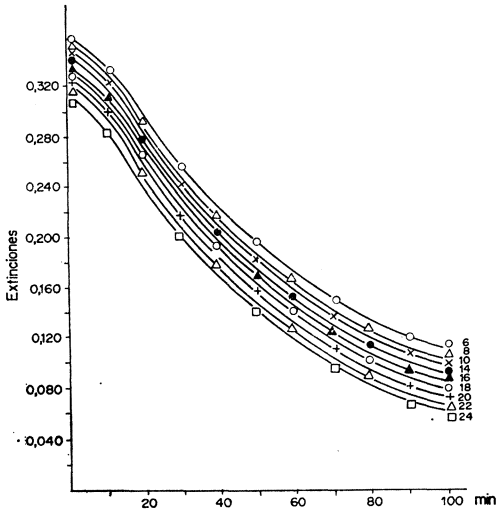

Figura 4. S. aureus

Observamos que la lisis es mayor cuanto más edad tienen las células, aunque dentro de unos límites muy estrechos. Las razas pigmentadas se lisan con más intensidad y más rápidamente.

d) Análisis de los lisados, según tiempos

Se recogen por centrifugación las células de cultivos normales y se someten a la lisis por lisostafina. Las células lisadas en diferentes tiempos se centrifugan y en los líquidos se determinan proteínas, nucleótidos, DN-asa, fosfatasa y pirofosfatasa. Los resultados se expresan gráficamente en los casos de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis (figuras 5-6),* pues las de los mutantes son semejantes.

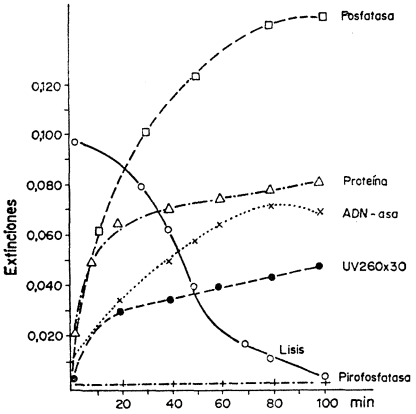

Figura 5. S. aureus

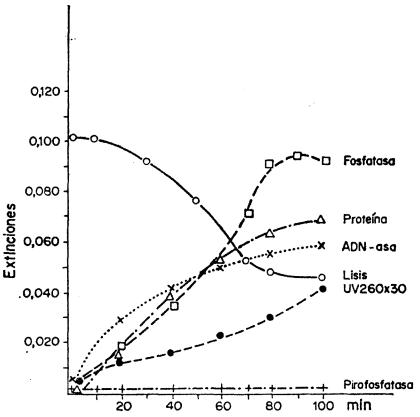

Figura 6. S. albus

Observamos cómo la lisis es mayor en el caso de la raza pigmentada. Aquí no se observa actividad pirofosfatasa en ningún caso. Las otras actividades y componentes celulares aumentan con el tiempo de lisis. Proteína y nucleótidos son semejantes en todas las razas y DN-asa y fosfatasa, lo mismo, pero se producen más rápidamente en las razas pigmentadas.

Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos por rotura con ultrasonido notamos la misma proteína, pero un mayor desprendimiento de nucleótidos en este último caso. La DN-asa es similar, en cambio, es mayor la actividad fosfatasa y pirofosfatasa en los lisados por ultrasonido.

e) Influencia de la isotonía en la lisis

Se había indicado que la velocidad de lisis del estafilococo por lisostafina dependía en parte de la concentración de cloruro sódica del medio.

Hemos realizado alguna experiencia sobre esto aplicando los métodos dados previamente de cultivo y separación de células. La lisis se hace con dos unidades de lisostafina en medio sin ClNa (hipotónico), normal (isotónico) y tres veces concentración normal (hipertónico). Los resultados de la lisis se expresan gráficamente *(figuras 7-9).*

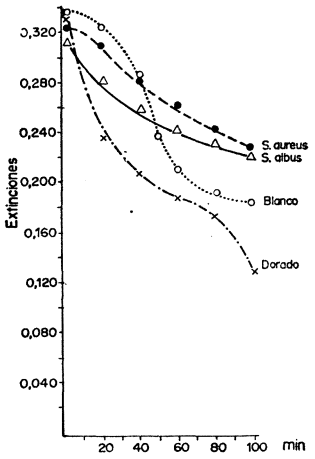

Figura 7. Hipotónico

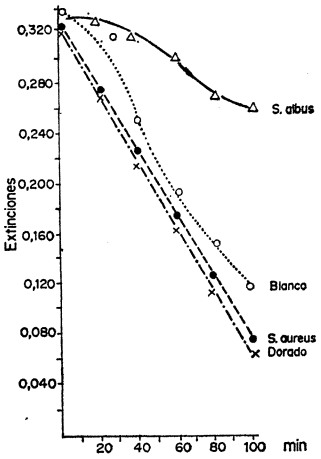

Figura 8. Isotónico

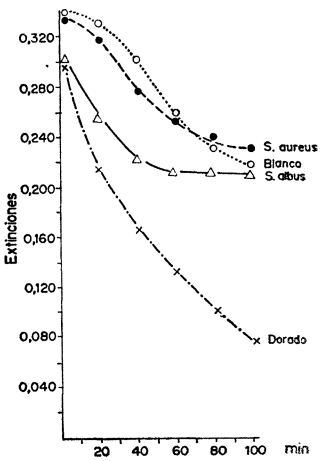

Figura 9. Hipertónico

Observamos que en todos los casos la lisis se desarrolla mejor en medio isotónico, a excepción del caso del *Staphylococcus epidermidis.* Otros autores señalan aumento de lisis con aumento de cloruro sódico.

f) Influencia de antibióticos en la lisis

Pensamos nosotros que quizá la lisostafina pueda actuar de forma diferente sobre células que han sido tratadas por antibióticos, en el sentido de hacerse más sensibles o resistentes a la misma. Se añade a la mezcla de lisis concentraciones sub-bacteriostáticas de novobiocina y tetraciclina y los resultados se expresan gráficamente por la tetraciclina *(figuras 10* y *11),* por ser similar los dos casos. El tratamiento es por una y dos unidades de lisostafina. En esta última, la lisis es más intensa, a excepción del *Staphylococcus aureus,* que quizá esté sensibilizado.

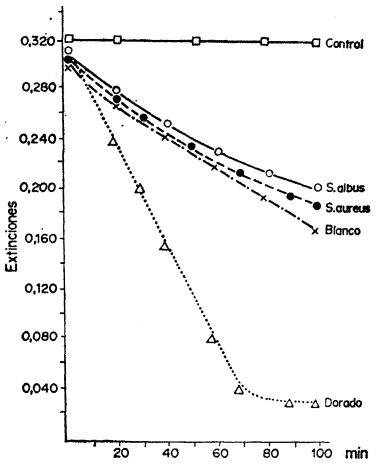

Figura 10. Tetraciclina (1 U)

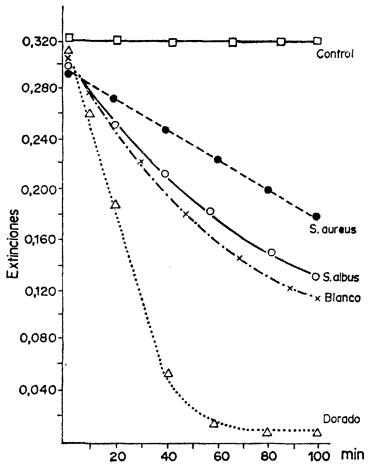

Figura 11. Tetraciclina (2 U)

CONCLUSIONES

1.ª Las razas pigmentadas se autolizan a 4 °C en treinta días, lo que no ocurre a las razas no pigmentadas. Las primeras también son más fáciles de romper por ultrasonido, como se determina por una mayor difusión de proteína, DN-asa y fosfatasa.

2.ª Empleando la lisostafina como agente de lisis, ésta es proporcional a la concentración de aquélla en todas las razas empleadas. La lisis es mayor en las razas pigmentadas que en las no pigmentadas. Las razas mutantes lisan mejor que las originales. La intensidad de la lisis se determina por el grado de difusión de nucleótidos y aminoazúcares.

3.ª La lisis por lisostafina es mayor con la edad de los cultivos de estafilococos y mayor en las razas pigmentadas. También es mayor la lisis cuando se realiza en condiciones isotónicas, a excepción del *Staphylococcus epidermidis,* que es mejor en medio hipertónico.

RESUMEN

Se realizan estudios sobre lisis de razas de *Staphylococcus epidermidis, S. aureus* y mutantes "dorado" y "blanco" obtenidos respectivamente de los anteriores. Las razas pigmentadas autolizan mucho más que las

no pigmentadas, así como son más fáciles de romper por ultrasonido; por otra parte, la lisostafina actúa sobre ellas con mayor intensidad y más con la edad de cultivo. Estas diferencias establecen una separación entre razas de estafilococos.

SUMMARY

Staphylococci lysis

We realized studies on the lysis of the *Staphylococcus epidermidis, S. aureus* and the "golden" and "white" mutants obtained from each respectively. The pigmented strains autolize much more than the non pigmented strains, and are also easier to break-up by ultrasound waves. On the other hand, the lysostaphin lysis acts on these pigmented strains with greater intensity and even more so in relation with the ageing culture. These differences permit to discriminate between *Staphylococcus* strains.

BIBLIOGRAFIA

1. Barnes, E. H., y Morris, J. F. 1957. A quantitative study of the phosphatase activity of *Micrococcus pyogenes*. J. Bacteriol., 73, 100.
2. Broweer, H. P.; Zygmunt, W, A.; Young, J. R., y Tavormina, P. A. 1965. Lysostaphin enzimatic mode of action. Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 383.
3. Cessi, C., y Piliego, F. 1960. The determination of aminoasugars in the presence of aminoacids and glucosa. Biochem. J., 77, 50.
4. Leggett, J. 1962. Techniques in Protein Chemistry.
5. Levinson, H. S.; Sloan, J. D., y Hyatt, M. T.: 1958. Pyrophosphatase activity of *Bacillus megaterium* spore and vegetative cell extracts. J. Bacteriol., 75, 291.
6. Quinn, E. L.; Jones, D. N.; Steinhauer, B. W., y Cox, F. 1966. *In vitro* activity of lysostaphin. Antimicrob. Ag. Chemother., 382.

7. REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L., y LELOIR, L. F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem., 217, 959.
8. SCHINDLER, C. A. 1965. The role of ClNa in the lysis of *Staphylococcus aureus* by lysostaphin. J. Gen. Microbiol., 40, 199.
9. SCHINDLER, C. A., y SCHUHARDT, V. T. 1964. Lysostaphin: a new bacteriolitic agent for *Staphylococcus*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 51, 414.
10. SCHINDLER, C. A., y SCHUHARDT, V. T. 1965. Purification and properties of lysostaphin a lytic agent for *Staphylococcus aureus*. Biochim. Biophys. Acta, 97, 242.
11. STONE, A. B., y BURTON, K. 1962. Synergistics effects in the activation of a streptococcal DN-asa by bivalentions. Biochem. J., 83, 492.
12. SUMMERS, J. B., y SOMMERS, G. F. 1944. Reductors groups determination. Arch. Biochem., 4, 11.
13. TIPPER, D. 1969. Mechanisms of autolysis of isolated cell walls of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 97, 837.
14. VAAMONDE, R.; NOGUEIRA, C., y REGUEIRO, B. 1971. Producción y propiedades de mutantes de estafilococos. Microbiol. Españ., 24, 87.
15. ZYGMUNT, W. A.; BROWDER, H. P., y TAVORMINA, P. A. 1966. Growth inhibition of unusual strains of *Staphylococcus aureus* by lysostaphin and other antistaphylococcal antibiotics. Can. J. Microbiol., 12, 341.
16. ZYGMUNT, W. A.; BROWDER, H. P., y TAVORMINA, P. A. 1966. Influence of blood and serum on the staphylococcal activity of lysostaphin. J. Bacteriol., 91, 725.
17. ZYGMUNT, W. A.; BROWDER, H. P., y TAVORMINA, P. A. 1967. Lytic action of lysostaphin on susceptible and resistat strains of *Staphylococcus aureus*. Can. J. Microbiol., 13, 845.
18. ZYGMUNT, W. A.; HARRISON, E. F., y BROWDER, H. P. 1965. Microbiological activities of lysostaphin and penicillin against bacteriophage 80/81 strains of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., 13, 491.

UNIVERSITY OF GORAKHPUR, U. P. (INDIA)
DEPARTMENT OF BOTANY

INVESTIGATIONS INTO RHIZOSPHERE MICROFLORA

III. Influence of sampling time

by

V. B. SRIVASTAVA and R. R. MISHRA

INTRODUCTION

The investigations regarding the effect of individual factors upon the rhizosphere microflora have recently attracted the attention of various workers. Changes in root exudation and soil composition with varying plant species and age have been widely advocated. The nature of rhizosphere microflora of plants of varying age growing under nearly identical edaphic and environmental conditions when sampled on the same date has inadequately been studied and this forms the theme of the present investigation.

MATERIALS AND METHODS

Seeds of two medicinal plants, viz., *Peristrophe bicalyculata* Nees. and *Andrographis penniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees belonging to same family (Acanthaceae) were sown separately in earthen post containing unsterilized garden soil. Second and third sowings were done 30 and 50 days after the first one. Some pots without plants were kept as control for the assessment of soil microflora. Five replicates containing four plants were kept for each set. Plants were allowed to grow under similar

enviromental conditions and maintained to same moisture level by regular watering.

Sampling was done one month after the third sowing (25th Dec. 1969) when the plants sown in last and first sets were in preflowering (P_I, A_I) and post flowering (P_{III}, A_{III}) stages. The plants sown in between were in flowering (P_{II}, A_{II}) condition. Non-rhizosphere, rhizosphere and rhizoplane microflora was assessed by the method used earlier (3 and 5). Modified Martin's (7) meat extract agar and Czapeck's + yeast extract (pH = 4) media were used for fungi, bacteria and rhizoplane fungi respectively. Frequency of fungi was determined by the method suggested by Saksena (9).

The total free amino acids per gramme of root was determined by the method of Peach and Tracey (8).

RESULTS

Results of the present work are tabulated in *tables 1-4.*

Qualitatively the different sets did not exhibit much variation in rhizosphere mycoflora. Most of the fungal species were of common occurrence in the rhizosphere of the two plants. *Aspergillus niger, A. awamori, Penicillium terrestre* and *Cladosporium herbarum* were dominant in all the cases. A few species were isolated with higher frequency in specific cases only. Only a few rhizospheric fungal species were restricted in their distribution, viz., *Choanephora cucurbitarum* in P_I, *Penicillium funiculosum* in A_{II} and *Stysanus medius* in P_{III}. The fungi specific to control soil were *Chaetomium herbasum, Gelasinospora,* sp., *A. flavipes* and *A. phoenicis.* The variation in the rhizosphere fungal species of different sets was not appreciable while soil fungal flora varied considerably *(table 1).*

In the rhizoplane region only *Cladosporium herbarum* was commonly isolated from all the sets while *Penicillium oxalicum* and *P. terrestre* in P_I, *Aspergillus nidulans* in A_I; *A. awamori* and *P. funiculosum* in A_{II}; *A. sydowi, Curvularia geniculata* and *Alternaria tenuis* in P_{III} and *C. tetramera* in A_{III} were specific. Average colonies per plante were higher during post-flowering stage in both the plants. In this case also, number of fungal species from the different sets showed no remarkable variation *(table 2).*

Table 1. Frequency of fungi in different rhizospheres

Isolates	P_I	A_I	P_{II}	A_{II}	P_{III}	A_{III}	Soil
Gongronella butleri	2	1	1	1			
Rhizopus nigricans	1	1	1	1	1	1	1
Mucor hiemalis		1		1			1
M. racemosus		1	1		1		
Choanephora cucurbitarum	1						
Cunninghamella echinulata	1	1				1	1
Chaetomium herbasum							1
Gelasinospora sp.							1
Neocosmospora vesinfecta	1		1		1		1
Aspergillus nidulans		1					1
A. variecolor		1	1	1			1
Penicillium spiculisporum				1		1	
Trichoderma viride	1		1		1		
A. aculeatus		1		1		1	1
A. awamori	1	2	1	2	1	2	1
A. candidus		1		1			
A. flavipes							1
A. flavus	1	1	1	1	1	1	1
A. niger	2	2	1	2	1	2	2
A. phoenicis							1
A. sydowi			1				1
A. terreus	1	1		1	1		2
A. versicolor	1	1	2	2	1	1	1
P. decumbens			1		1		1
P. digitatum			1	2	1	1	1
P. funiculosum				1			
P. humicola	1				1	1	1
P. notatum		1		1			1
P. oxalicum	1	1				1	
P. terrestre	2	1	2	2	1	2	2
Gliocladium roseum			1			1	
Acremonium vitis			1		1		
Paecilomyces fusisporus	1	1	1	1	1	1	1
Pa. varioti					1		1
Torula herbarum			1			1	
Stachybotrys alternans					1		1
Cladosporium epiphyllum			1	2	1	1	1
C. herbarum	2	3	3	2	3	2	2
Curvularia geniculata	1					1	
Cu. lunata	1	1	1	1	1	1	1
Alternaria tenuis	1		1	1	1	1	1
Stysanus medius					1		
Fusarium avenaceum			1	1	1	1	
F. nivale	1	1	1	2	1	1	1
F. oxysporum			1	1	3		1
Black sterile colonies			1		1	1	
White sterile colonies	3	1	1	1	1	1	1
Number of species	21	22	27	25	27	24	32

Table 2. Percentage frequency of fungi in different rhizoplanes

Isolates	P_I	A_I	P_{II}	A_{II}	P_{III}	A_{III}
Rhizopus nigricans	3	3			1	
Aspergillus nidulans		2				
A. aculeatus		1				2
A. awamori				3		
A. flavus	1		1		2	
A. niger	1	1	2	2	2	
A. sydowi					1	
Penicillium funiculosum			1			
P. oxalicum	2					
P. terrestre	2					
Cladosporium epiphyllum			1	1		
C. herbarum	5	2	3	2	2	4
Curvularia geniculata					2	
Cu. tetramera						1
Alternaria tenuis					1	
Fusarium nivale		1	1	2		1
F. oxysporum				1	1	2
Black sterile colonies			2	1		1
White sterile colonies	2	2	1			
Number of species	7	7	8	7	8	6
Av. Cols./pl.	3	4	4	4	5	4

Quantitatively microflora varied appreciably in different sets, being highest at flowering and lesser either in pre or post-flowering stages. Soil micro-population was least. Generally *Peristrophe bicalyculata* harboured a higher microflora than *Andrographis penniculata (table 3).* Total free amino acid in two plants was higher at flowering and least at post-flowering stage *(table 4).*

Table 3. Microbial popu ation in different rhizospheres and soil

Plant species		Pre-flowering	Flowering	Post-flowering
P. bicalyculata	F	87550	113000	88500
	B	296000	1067000	710000
A. penniculata	F	63000	108500	57200
	B	276000	920000	823500
Soil (control)	F	22800		
	B	102200		

F = fungi. B = bacteria.

Table 4. Total free amino acids in μg/g of root

Plant species	Pre-flowering	Flowering	Post-flowering
P. bicalyculata	1080	1220	960
P. penniculata	1100	1140	1000

DISCUSSION

The quality of the fungi in the rhizosphere of two plants exhibited commonness greatly due to much similarity in edaphic and environmental set up and the same sampling period. During cold months (25th Jan. 1970) Cladosporia and Penicillia recorded abundantly from air, plant parts and soil of this area (3, 5-6 and 10) were dominant and common during different stages. Srivastava (10) observed remarkable succession of rhizosphere mycoflora and reported the dominance of phycomycetes in young stage; ascomycetes and deuteromycetes during flowering, and Fusaria, certain ascomycetes and sterile colonies during senescent stage of certain crops. This pattern, however, was not recorded in the present investigation and the rhizosphere region of the two plants of different ages harboured nearly

the same type of mycoflora. The sampling period for the assesment of the microflora in most of the earlier investigations also differed for the plants of different ages. The variation as observed by the senior author and other workers in the rhizosphere microflora of the plants of different ages may also be due to the difference in sampling period and consequently the environmental and edaphic conditions.

The total free amino acids in root has a direct correlation with the quantity of the root micro-population. During flowering stage of the plants the maximum amino acids directly affected the rhizosphere microflora. Root exudates of plants have been reported to affect the micro-population by breaking down the dormancy of fungal spores (2 and 11) either by overcoming a fungistatic factor (1) or by supplying nutrients to microbes.

SUMMARY

Rhizosphere and rhizoplane microflora of two medicinal plants, viz., *Peristrophe bicalyculata* and *Andropogon penniculata* belonging to same family (Acanthaceae), growing in same soil has been studied. Sampling of pre-flowered, flowered and post-flowered plants and also the control soil was done at the same time to investigate the effect of sampling period. The quality of the rhizosphere mycoflora of the plants of the different ages varied little due to same sampling period. The total free amino acids in root has a direct correlation with the quantity of rhizosphere microflora. *P. bicalyculata* harboured higher microflora than *A. penniculata.*

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to Prof. K. S. Bhargava for research facilities.

RESUMEN

Investigaciones sobre la microflora de la rizosfera. III. Influencia del período de recogida de muestras

Se ha estudiado la microflora de la rizosfera y la rizoplana de dos plantas medicinales, *Peristrophe bicalyculata* y *Andropogon penniculata,* pertenecientes a la misma familia (Acanthaceae) y crecidas en el mismo suelo. Se han recogido muestras de plantas antes, en y después de la

floración, así como también suelo-testigo, al mismo tiempo. Las características de la microflora de la rizosfera de plantas de diferentes edades variaban poco debido a haberse efectuado la recogida de las muestras al mismo tiempo y en la misma época. El total de los aminoácidos libres de la raíz estaba en relación directa con la cantidad de microflora de la rizosfera. *P. bicalyculata* contenía mayor número de microorganismos que *A. penniculata.*

REFERENCES

1. DOBBS, C. G., and HINSON, W. H. 1953. A wide spread fungistasis in soil. Nature, 172, 197.
2. JACKSON, R. M. 1957. Fungistasis as a factor in the rizosphere phenomenon. Nature, 180, 196.
3. MISHRA, R. R., and SRIVASTAVA, V. B. 1969. Rhizosphere fungal flora of certain legumes. Ann. Inst. Pasteur Paris, 117, 717-23.
4. MISHRA, R. R., and SRIVASTAVA, V. B. 1969. Leaf surface microflora *Hordeum vulgare.* Abst. 56th Ann. Sess. Indian Sci. Congr., 308.
5. MISHRA, R. R., and SRIVASTAVA, V. B. 1971. Variation in the rhizosphere microflora of certain crops. Proc. Nat. Acad. Sci. India, in press.
6. MISHRA, R. R., and SRIVASTAVA, V. B. 1971. Aeromycology of Gorakhpur. V. Spore content over wheat and barley fields. Mycopathol. Mycol. Appl., in press.
7. PAPAVIZAS, G. C., and DAVEY, C. B. 1959. Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of soil fungi. Soil. Sci., 88, 112-17.
8. PEACH, K., and TRACEY, M. V. 1955. Modern methods of plant analysis, IV, 14. Springer-Verlag, Berlin.
9. SAKSENA, S. B. 1955. Ecological factors governing the distribution of soil microfungi in some forest soils of Saugar. J. Indian. Bot. Soc., 34, 62.
10. SRIVASTAVA, V. B. 1969. Investigations into rhizosphere microflora of certain crop plants. Doctoral thesis. University of Gorakhpur.
11. STOVER, R. H. 1956. Studies on *Fusarium* wilt of bananas. I. The behaviour of *F. oxysporum* f. *cubense* in different soils. Can. J. Bot., 34, 927.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE MADRID
LABORATORIO DE FISIOLOGIA VEGETAL

ACCION DEL L-USNATO SODICO SOBRE LA ACTIVIDAD UREASICA DE *PROTEUS MIRABILIS*

por

M.ª del Rosario MANSO y C. VICENTE

INTRODUCCION

Varias circunstancias han hecho converger nuestro interés en el sujeto del presente trabajo: el carácter antibiótico de ciertas sustancias liquénicas, el estar en la actualidad experimentando el aprovechamiento por bacterias de fuentes nitrogenadas simples y el hecho de que toda la bibliografía consultada apoyaba la tesis de la ausencia de efecto antibiótico del ácido L-úsnico sobre bacterias gram-negativas (10).

Anteriores estudios sobre la ureasa de *Proteus mirabilis* nos llevaron a postular un fenómeno de inducción de la síntesis de la enzima en presencia de urea (12). Sobre la relación entre antibióticos y ureasa, sólo conocíamos el trabajo de Gale (7), que había realizado estudios sobre la actividad ureásica en relación con la sensibilidad de bacterias frente a ciertos antibióticos. Demostró que seis ácidos hidroxámicos distintos, inhibidores altamente específicos de la ureasa, reducían la sensibilidad de nueve cepas de *Proteus* frente a antibióticos del tipo de la ampicilina.

En nuestro laboratorio se venía trabajando sobre la actividad antibiótica de las sales sódicas del ácido L-úsnico. Bajo este aspecto había sido más ampliamente estudiada la acción de las formas dextro (2-4). Previamente se había demostrado que el L-usnato sódico no presentaba actividad antibiótica frente a *Proteus mirabilis* en concentraciones que iban desde 1,75 a 14 μg/ml. Las mismas concentraciones eran activas frente al gram-positivo *Sarcina lutea.*

En el presente trabajo se da cuenta de los resultados obtenidos en relación con la acción del L-usnato sódico sobre el contenido total de proteínas de *Proteus* en crecimiento y su efecto sobre la actividad ureásica.

MATERIAL Y METODOS

a) Microorganismo y condiciones del cultivo

Proteus mirabilis NCIB 5887; se cultivaba en medio basal líquido recomendado por Magaña-Plaza y Ruiz-Herrera (9), previamente utilizado por uno de nosotros (12), y se mantenía en medio basal sólido de composición también recomendada por los mismos autores. Las medidas de crecimiento se determinaban por turbidometría con un spectronic 20 de Bausch y Lomb. La temperatura de incubación de los cultivos era de 37 °C. Al medio basal líquido se adicionaba urea o antibiótico en las concentraciones que en cada caso se indican.

b) Medida de la actividad enzimática

Las bacterias crecidas en medio líquido durante cuatro horas se centrifugaban a 6.000 g durante veinte minutos en una centrífuga Wifug X-1, se lavaban tres veces con suficiente cantidad de tampón de fosfato 0,075 M de pH 6,9 y se trataban con acetona. Los polvos acetónicos recogidos por centrifugación a 6.000 g durante veinte minutos se secaban a vacío y se eluían en el mismo tampón, de tal manera que la concentración final era de 0,5 mg de peso seco/ml.

Este extracto crudo se utilizaba para la determinación de velocidad de reacción por el método de microdifusión de Conway (5), valorando el amoníaco por colorimetría mediante la reacción de Nessler (11).

Las proteínas se valoraban por el método de Lowry y colaboradores (8), utilizando como patrón seroalbúmina bovina de Armour and Co.

El L-usnato sódico se preparó en nuestro laboratorio a partir de ácido L-úsnico de Läke Oy, Turku (Finlandia). La ureasa cristalizada era de Sigma Chemical Co., de tipo III.

El L-usnato sódico se disolvía con agitación en frío en una disolución de ClNa al 2 %.

RESULTADOS

Efecto del L-usnato sódico sobre el crecimiento de Proteus mirabilis

Como se muestra en la *figura 1,* la adición de L-usnato sódico, a concentración de 14 μg/ml, al medio basal de cultivo incrementa el crecimiento de la población bacteriana.

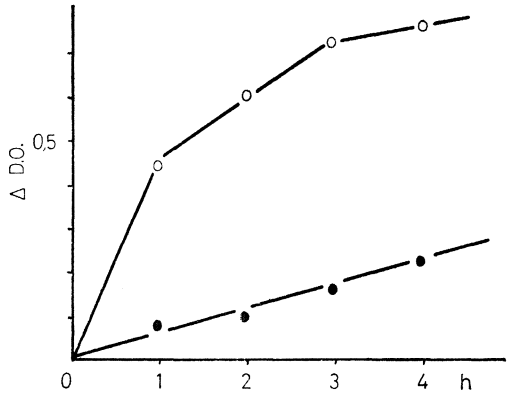

Figura 1. Crecimiento de P. mirabilis *en ausencia de urea.* o——o *con antibiótico;* •——• *sin antibiótico. La densidad óptica se medía a 610 mμ*

La *figura 2* demuestra que el crecimiento de *Proteus mirabilis* se ve incrementado por la presencia de urea en el medio, a concentración de 40 mM. Este efecto es atribuible a la síntesis inducida de enzimas que producen y utilizan amoníaco (13). La presencia del antibiótico en este medio basal suplementado con urea disminuye la velocidad de crecimiento.

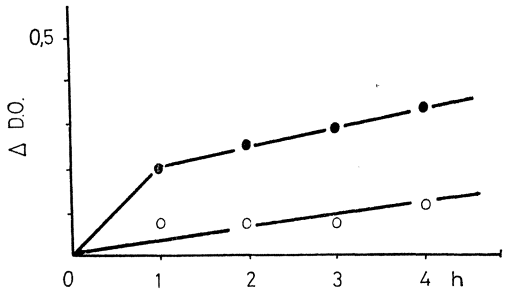

Figura 2. Crecimiento de P. mirabilis *en presencia de urea.* o——o *con antibiótico;* •——• *sin antibiótico*

Efecto del L-usnato sódico sobre la actividad ureásica de Proteus mirabilis

Se utilizaba como inóculo 2 ml de un cultivo mantenido diecisiete horas en medio basal líquido a 37 °C. El inóculo inicial contenía siempre unos 0,5 mg de bacterias. La totalidad de las células, al cabo de cuatro horas de incubación, se cosechaba por centrifugación, se lavaba y se trataba con acetona, tal como se describe en Métodos. Un cultivo paralelo se llevaba a cabo en presencia de antibiótico, a concentración de 14 μg/ml.

Los polvos acetónicos obtenidos se diluían en tampón de fosfato 0,075 M, de pH 6,9, de tal manera que quedara una concentración de 0,5 mg de peso seco/ml. El contenido en proteínas y la actividad ureásica de ambos cultivos vienen expresados en el *cuadro 1*.

Cuadro 1. Efecto del L-usnato sódico sobre actividad ureásica de P. mirabilis *creciendo en ausencia de urea*

Tratamiento	Peso seco mg	Proteína mg	Velocidad de reacción (*)	Actividad específica (**)
Con antibiótico	0,5	0,10	0,023	0,23
Sin antibiótico	0,5	0,16	0,086	0,55

(*) En un volumen final de 3 ml se mezclaban 40 μmol de urea, 0,25 mg de polvos acetónicos y 150 μmol de fosfato, con pH final de 6,9. La velocidad de reacción viene expresada en micromoles de NH_3/minuto.

(**) La actividad específica viene dada en micromoles de NH_3/miligramo de proteína y minuto.

La adición de urea al medio de cultivo modifica en gran manera los resultados. En presencia de antibiótico, la síntesis de proteínas sufre un considerable aumento, mientras que la actividad ureásica se mantiene más baja que en las bacterias no tratadas. Los resultados se dan en el *cuadro 2*.

Cuadro 2. Efecto del L-usnato sódico sobre actividad ureásica de P. mirabilis *en presencia de urea*

Tratamiento	Peso seco mg	Proteína mg	Velocidad de reacción	Actividad específica
Con antibiótico	0,5	0,28	0,086	0,31
Sin antibiótico	0,5	0,18	0,160	0,85

Las condiciones de medición son las expresadas en el *cuadro 1.*

Efecto del L-usnato sódico sobre la actividad ureásica in vitro

Antes de interpretar los resultados obtenidos sobre células vivas, se llevaron a cabo experiencias que tendían a esclarecer si el L-usnato sódico tenía algún efecto sobre la actividad ureásica *in vitro.*

Manteniendo un volumen final de 3 ml se hicieron tres determinaciones de velocidad de reacción en las siguientes condiciones:

a) Se preincubaban a 37 °C durante cinco minutos, 40 μmol de urea, al cabo de los cuales se añadían 5 μg de ureasa cristalina;

b) se preincubaban a 37 °C durante cinco minutos, 40 μmol de urea y 14 μg de L-usnato sódico, al cabo de los cuales se añadían 5 μg de enzima.

c) se preincubaban 5 μg de enzima y 14 μg de L-usnato sóduco durante cinco minutos, al cabo de los cuales se añadían 40 μmol de urea.

Los resultados se expresan en la *figura 3.* Al aumentar el tiempo de incubación de enzima y antibiótico juntos, la velocidad de reacción disminuía. Mientras que la preincupación de la enzima y antibiótico provoca un 86 % de inhibición, el antibiótico sin incubación previa con la enzima, sólo produce una inhibición del 32 %. El L-usnato sódico parecía actuar como inhibidor de ureasa *in vitro.*

La concentración de L-usnato sódico, que, en condiciones de preincubación, produce un 50 % de inhibición, se determinó haciendo actuar sobre la enzima concentraciones de antibiótico de 14, 10, 7 y 3 μg/ml. Enfrentando velocidades de reacción a logaritmos de concentraciones de inhibidor, la concentración de antibiótico que daba un 50 % de inhibición era de 4,68 μg/ml *(figura 4).*

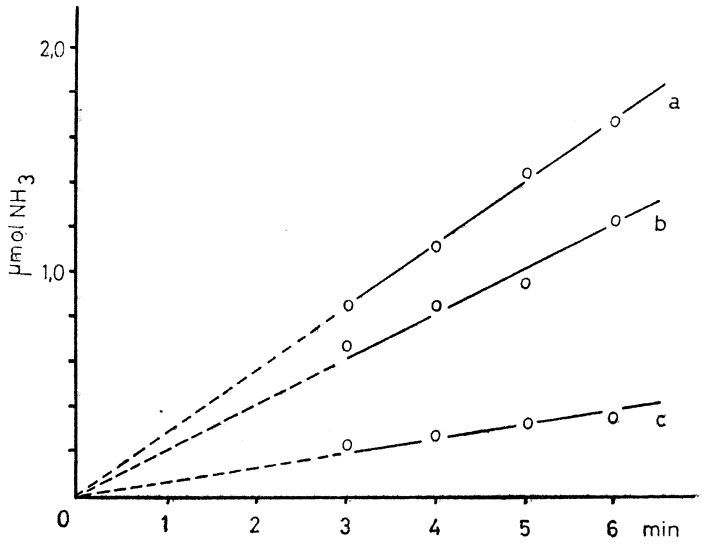

Figura 3. Inhibición de ureasa por L-usnato sódico. En un volumen final de 3 ml se mezclaban 40 μmol de urea, 5 μg de ureasa y 150 μmol de fosfato con pH de 6,9 en a. En b y c se añadían, además, 14 μg de antibiótico. Las condiciones experimentales se especifican en el texto

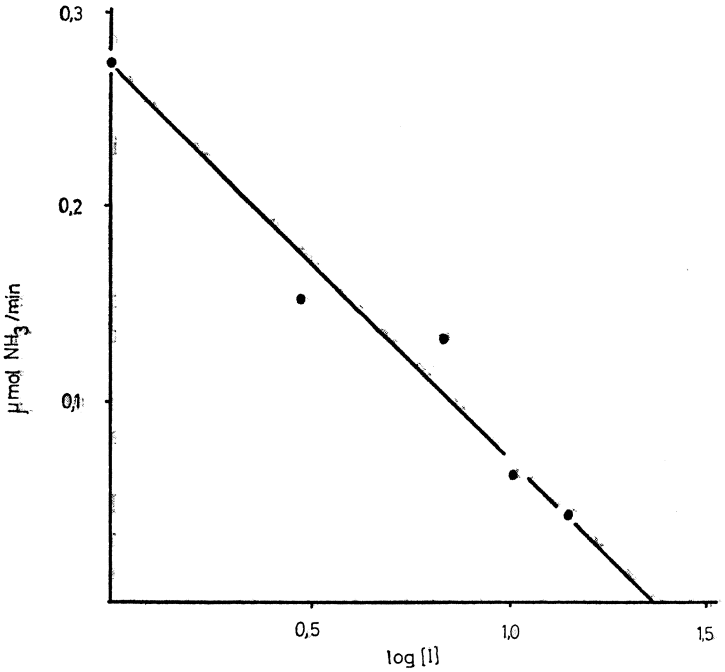

Figura 4. Inhibición de ureasa por L-usnato sódico. Enzima e inhibidor se preincubaban a 37 °C antes de la adición de substrato

Una vez determinada esta concentración de antibiótico, se variaron las concentraciones de substrato en presencia y ausencia de la concentración fijada de inhibidor. Las rectas recíprocas que se dan en la *figura 5* demuestran que la inhibición de ureasa por L-usnato sódico es de tipo competitivo.

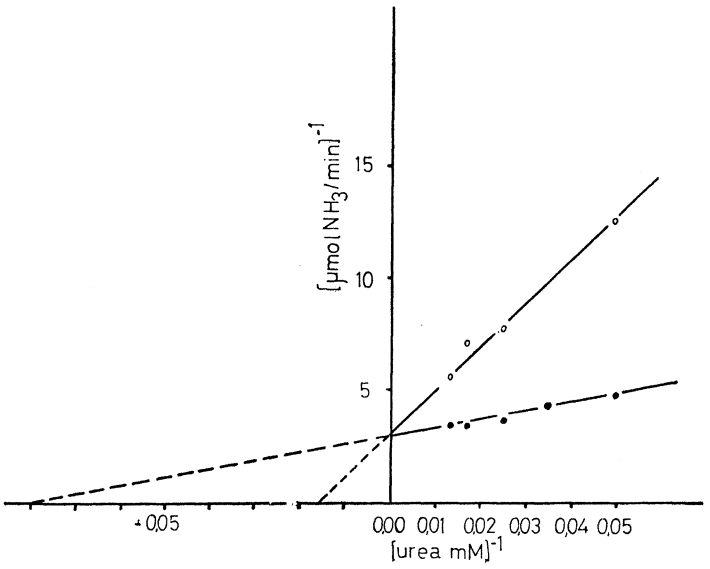

Figura 5. Rectas recíprocas de concentración de substrato frente a velocidades de reacción. o——o con inhibidor; •——• sin inhibidor. Las condiciones experimentales vienen dadas en el texto

En el *cuadro 3* se dan los resultados obtenidos al tratar de demostrar si la inhibición era reversible o irreversible. La concentración de la enzima se aumentó a 100 μg/ml, ya que la pérdida de actividad por diálisis era considerable. Los resultados demuestran que la actividad no se restaura por diálisis. En este caso, la inhibición de ureasa por L-usnato sódico era competitiva e irreversible.

Cuadro 3. Irreversibilidad de la inhibición

Tratamiento	Velocidad de reacción	Inhibición %
Enzima sin dializar	5,04	
Enzima + inhibidor sin dializar	1,50	70
Enzima dializada	4,40	
Enzima + inhibidor dializados	0,09	98

Se incuban durante treinta minutos 1 mg de enzima junto con 46,8 μg de antibiótico en un volumen final de 10 ml. La diálisis se lleva a cabo durante veinte horas a 4 °C, según indicación de Gale (6), frente a tampón de fosfato 0,075 M, de pH 6,9, con agitación constante. El baño de diálisis se cambiaba tres veces. La velocidad de reacción se hallaba mezclando en un volumen final de 3 ml, 1 ml de dializado, o del sistema no dializado, 40 μmol de urea y 150 μmol de fosfato, a pH 6,9.

DISCUSION

Sobre la actividad antibiótica del ácido L-úsnico conocemos los trabajos de Virtanen y colaboradores (14-15), en los que se ensayan algunos derivados de este ácido liquénico. Bernal y colaboradores (1) demostraron que el ácido L-úsnico no tenía influencia sobre la actividad hexocinásica de levadura en concentraciones que iban de 0 a 32 $\times$ 10^{-6} M.

Los resultados obtenidos por nosotros en experiencias realizadas *in vivo* son aparentemente contradictorios. El efecto de disminución de la actividad ureásica de los cultivos es claramente atribuible al efecto inhibidor *in vitro* demostrado para el antibiótico. No podemos descartar que el L-usnato sódico afecte también a la síntesis de ureasa, ya que la cantidad total de proteínas por unidad de peso seco es modificada por este tratamiento (véanse *cuadros 1-2).* El hecho de que exista mayor crecimiento en bacterias tratadas *(figura 1)* podría ser debido a un hipotético reblandecimiento de las paredes celulares, lo que redundaría en un mejor y más rápido aprovechamiento de nutrientes. Esto no está en desacuerdo con los resultados obtenidos cuando existe urea en el medio de cultivo. La mayor síntesis de proteínas en bacterias tratadas estaría en relación con la mayor permeabilidad del inductor. No solamente la síntesis de

ureasa es desencadenada por urea, sino también la de algunas enzimas asociadas a la utilización de amoníaco (13).

El hecho de que la actividad ureásica de bacterias tratadas con antibiótico permanezca baja después de repetidos lavados de las células con tampón estaría de acuerdo con la naturaleza irreversible de la inhibición.

RESUMEN

Utilizando *Proteus mirabilis* como fuente de ureasa, se demuestra que el L-usnato sódico disminuye en todas las circunstancias la actividad enzimática de los cultivos. Esta pérdida de actividad parece ser debida a una inhibición de tipo competitivo e irreversible de la enzima por el antibiótico.

El efecto observado sobre el contenido total de proteínas parece estar relacionado con la disponibilidad de nutrientes e inductores presentes en el medio de cultivo. Parece ser que es en relación con esta disponibilidad donde el antibiótico ejerce su acción.

SUMMARY

Action of sodium (L)-usnate on the urease activity of Proteus mirabilis

Using *Proteus mirabilis* as a cource of urease, we demonstrate that the sodium usnate diminishes in all circumstances the enzymic activity of the cultures. This decrease of activity is apparently due to an inhibition of the competitive and irreversible type produced by the antibiotic on the enzyme.

The results observed on the total contents of proteine seems to be in relation with the availability of the nutrient substances and of the inductors which are in the culture medium.

It seems to be that the antibiotis exerts its activity in connexion with said availability.

BIBLIOGRAFIA

1. Bernald, R.; Feldott, G., y Lardy, H. A. 1950. The mode of action of the antibiotic, usnic acid. Arch. Biochem., 28, 317.
2. Bustinza, F. 1951. Substancias antibióticas procedentes de líquenes. Endeavour, 10, 95.

3. BUSTINZA, F. 1951. Usnimicina y usnidihidromicina. Farm. Nueva, 16, 213.
4. BUSTINZA, F., y CABALLERO, A. 1948. Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes. An Jardín Bot. Madrid, 7, 511.
5. CONWAY, E. J. 1957. Microdifussion Analysis and Volumetric Error. Crosby Lock Wood, Londres.
6. GALE, G. R. 1965. Inhibition of urease by hydroxyurea. Biochem. Pharmacol., 14, 693.
7. GALE, G. R. 1966. Urease activity and antibiotic sensivity of bacteria. J. Bacteriol., 91, 499.
8. LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.
9. MAGAÑA-PLAZA, I., y RUIZ-HERRERA, J. 1967. Mechanisms of regulation of urease byosynthesis in *Proteus rettgeri*. J. Bacteriol., 93, 1.294.
10. MARSHAK, A.; BARRY, G. T., y CRAIG, L. C. 1947. Antibiotic compound isolated from the lichen *Ramalia reticulata*. Science, 106, 394.
11. Standard Methods. 1955. American Public Health Association Inc., Nueva York.
12. VICENTE, C. 1969. Inducción de biosíntesis de ureasa en *Proteus mirabilis*. Rev. Real Acad. Cienc. Exactas, Fís. Natur., Madrid, 63, 565.
13. VICENTE, C.; CARRASCO, L.; CARREIRA, J., y MARTÍN, A. 1970. Represión por aminoácidos de biosíntesis de ureasa en *Proteus mirabilis*. Resúmenes X Reunión Soc. Españ. Bioquím. Madrid, 34.
14. VIRTANEN, O. E. 1954. The antibiotic activity of some amino compound derivates of L-usnic acid. II. Suom. Kemistilehti, 27, 67.
15. VIRTANEN, O. E.; VIRTANEN, H., y KORTEKANGAS, H. E. 1954. The antibiotic activity of some compound derivates of L-usnic acid. I. Suom. Kemistilehti, 27, 18.

LOS DOCTORES FEDUCHY Y RUBIO, EN SUDAMERICA

Durante el pasado mes de marzo, el Vicedirector del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, Dr. Enrique Feduchy, asistió, como Delegado español, al XIII Congreso Internacional de la Viña y del Vino, celebrado en Mendoza (Argentina), y posteriormente, en Santiago de Chile, a la LI Asamblea general de la Oficina Internacional de la Viña y del Vino y a la III Conferencia Internacional sobre la Mecanización de la Viticultura y de la Enología. En el citado Congreso, corrió a su cargo el informe nacional, con el tema Naturaleza, caracterización y valoración de las antocianas.

Invitado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas, de Argentina, el doctor Miguel Rubio, Jefe del Departamento de Virología del Instituto "Jaime Ferrán", dictó un curso para Ingenieros Agrónomos, en la nación hermana, sobre Microscopía normal y electrónica aplicada al estudio de los virus, del 3 de marzo al 3 de abril últimos, curso desarrollado en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (Mendoza), excepto la fase final, que tuvo lugar en el Instituto de Estudios Agronómicos (Córdoba).

CURSO DE CULTIVO DE TEJIDOS

Del 19 de abril al 31 de mayo ha tenido lugar en el Instituto "Jaime Ferrán" un curso sobre Cultivo *in vitro* de tejidos y órganos vegetales, a cargo del Prof. Ricardo Tizio, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (Argentina). Como Secretario ha actuado la Dra. Genoveva Tejerina, miembro del Instituto.

LOS DOCTORES FEDUCHY Y RUBIO, EN SUDAMERICA

Durante el pasado mes de marzo, el Vicedirector del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, Dr. Enrique Feduchy, asistió, como Delegado español, al XIII Congreso Internacional de la Viña y del Vino, celebrado en Mendoza (Argentina), y posteriormente, en Santiago de Chile, a la LI Asamblea general de la Oficina Internacional de la Viña y del Vino y a la III Conferencia Internacional sobre la Mecanización de la Viticultura y de la Enología. En el citado Congreso, corrió a su cargo el informe nacional, con el tema Naturaleza, caracterización y valoración de las antocianas.

Invitado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas, de Argentina, el doctor Miguel Rubio, Jefe del Departamento de Virología del Instituto "Jaime Ferrán", dictó un curso para Ingenieros Agrónomos, en la nación hermana, sobre Microscopía normal y electrónica aplicada al estudio de los virus, del 3 de marzo al 3 de abril últimos, curso desarrollado en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (Mendoza), excepto la fase final, que tuvo lugar en el Instituto de Estudios Agronómicos (Córdoba).

CURSO DE CULTIVO DE TEJIDOS

Del 19 de abril al 31 de mayo ha tenido lugar en el Instituto "Jaime Ferrán" un curso sobre Cultivo *in vitro* de tejidos y órganos vegetales, a cargo del Prof. Ricardo Tizio, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (Argentina). Como Secretario ha actuado la Dra. Genoveva Tejerina, miembro del Instituto.

CURSO DE VIROLOGIA

Organizado por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense y el Instituto "Jaime Ferrán", (Catedrático-Director: Prof. Lorenzo Vilas), se ha celebrado en los laboratorios de la Cátedra, del 19 de abril al 13 de mayo, un curso práctico de Técnicas fundamentales en Virología. Los profesores, todos pertenecientes al Instituto, han sido los Dres. Angel García Gancedo (Director técnico), M.ª Luisa Alonso, Carmen Gil, Emilio Ronda, Pilar Vilas, y Concepción Ronda, y los Licdos. Sacramento Rico y Carmen Otegui.

II SIMPOSIO SOBRE APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA MOLECULAR EN BIOLOGIA MICROBIANA

En Granada, del 10 al 12 de mayo, se ha celebrado este Simposio, organizado por la Universidad de dicha capital y patrocinado por la Sociedad Española de Microbiología y la Sociedad Española de Optica. Las comunicaciones presentadas por miembros del Instituto "Jaime Ferrán" y de la Sociedad de Microbiología fueron las siguientes:

Espinosa, M.; López, R., y *Corripio, R.:* Control de la síntesis de fenoxazonas por espectroscopía infrarroja.

López, R.; López-Martínez, M., y *Espinosa, M.:* Variaciones moleculares de la síntesis microbiana de fenazinas.

Portolés, A.; Pérez-Ureña, M. T., y *Ramos, F.:* Aplicación de las espectroscopías infrarroja y de resonancia magnética nuclear al estudio de antígenos penicilínicos.

Ramos, R.; Rubio, N., y Tapia, A.: Espectros moleculares de antígenos de *Pseudomonas.*

Sierra, G.: Identificación de polímeros microbianos de reserva por espectroscopía molecular.

CURSO DE VIROLOGIA

Organizado por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense y el Instituto "Jaime Ferrán", (Catedrático-Director: Prof. Lorenzo Vilas), se ha celebrado en los laboratorios de la Cátedra, del 19 de abril al 13 de mayo, un curso práctico de Técnicas fundamentales en Virología. Los profesores, todos pertenecientes al Instituto, han sido los Dres. Angel García Gancedo (Director técnico), M.ª Luisa Alonso, Carmen Gil, Emilio Ronda, Pilar Vilas, y Concepción Ronda, y los Licdos. Sacramento Rico y Carmen Otegui.

II SIMPOSIO SOBRE APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA MOLECULAR EN BIOLOGIA MICROBIANA

En Granada, del 10 al 12 de mayo, se ha celebrado este Simposio, organizado por la Universidad de dicha capital y patrocinado por la Sociedad Española de Microbiología y la Sociedad Española de Optica. Las comunicaciones presentadas por miembros del Instituto "Jaime Ferrán" y de la Sociedad de Microbiología fueron las siguientes:

Espinosa, M.; López, R., y *Corripio, R.:* Control de la síntesis de fenoxazonas por espectroscopía infrarroja.

López, R.; López-Martínez, M., y *Espinosa, M.:* Variaciones moleculares de la síntesis microbiana de fenazinas.

Portolés, A.; Pérez-Ureña, M. T., y *Ramos, F.:* Aplicación de las espectroscopías infrarroja y de resonancia magnética nuclear al estudio de antígenos penicilínicos.

Ramos, R.; Rubio, N., y Tapia, A.: Espectros moleculares de antígenos de *Pseudomonas.*

Sierra, G.: Identificación de polímeros microbianos de reserva por espectroscopía molecular.

Depósito legal: M. 702 - 1968

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid