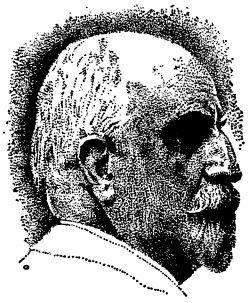
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Editada por el Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán" y la Sociedad Española de Microbiología



VOLUMEN 36
NUMEROS 3-4
JULIO-DICIEMBRE, 1983

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director

Dr. Gonzalo Sierra, Director del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Vicedirector

Dr. César Nombela, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Consejo de Redacción

Dra. Ramona Beltrá, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Gobernado, Servicio de Microbiología, Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social «La Fe», Valencia.

Dr. Carlos Hardisson, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Dr. Juan Francisco Martín, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de León.

Dra. Fuensanta Reyes, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Rubio, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez.

Redacción

«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
Madrid-6 (España)

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
Madrid-6 (España)

NORMAS PARA LOS AUTORES

«Microbiología Española» publicará trabajos y notas de investigación originales dentro del campo de la Microbiología y ocasionalmente artículos de revisión. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquier otra revista. Los artículos publicados en «Microbiología Española» podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, estarán escritos a máquina, a doble espacio, en hojas UNE A-4 por una sola cara, numeradas correlativamente y con márgenes de 2,5 cm como mínimo; no deberán exceder de doce páginas en total, *incluyendo* el espacio necesario para figuras y tablas.

Las fotografías deberán limitarse a las estrictamente necesarias para la comprensión del trabajo, y serán de calidad suficiente para asegurar una buena reproducción. Deberán estar numeradas al dorso, indicando el apellido del primer autor, a lápiz. Los textos de las mismas irán mecanografiados a doble espacio y en hoja aparte.

Los dibujos y gráficas, con tinta china negra y en papel vegetal, o bien fotografías de los mismos. Para su presentación se seguirán las normas dadas para las fotografías. Fotografías, dibujos y gráficas irán numerados de forma conjunta y correlativamente.

Las tablas se presentarán en hoja aparte, numeradas independientemente de las figuras, con números romanos y el correspondiente título explicativo.

En la cabecera de la primera página se indicará, por este orden: título del trabajo, nombre y apellidos del autor o autores, centro en que se ha realizado el trabajo y dirección completa del mismo.

Los trabajos constarán de: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Resumen, Agradecimientos (en su caso) y Bibliografía.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización, para los textos en español. Los resúmenes en español e inglés, de un máximo de doscientas palabras cada uno, deberán contener un esquema del trabajo y las conclusiones abreviadas, y serán redactados para que sea posible su comprensión sin necesidad de leer total o parcialmente el trabajo. No deberán incluir material o datos no citados en el texto.

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 página 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.

Las notas, que no deberán exceder de cuatro páginas, tienen por objeto la presentación de observaciones experimentales, descripción de técnicas o modificaciones metodológicas de interés. Su redacción se efectuará ateniéndose a las normas previamente descritas para los trabajos, pero suprimiendo las divisiones con encabezamiento, y con resúmenes no superiores a cincuenta palabras. Las ilustraciones y tablas se reducirán a las mínimas indispensables.

Los artículos de revisión versarán sobre temas de Microbiología de amplio interés, y su redacción se solicitará a especialistas. Incluirán, en lugar de resumen, un índice del contenido.

Los autores recibirán en un plazo no superior a tres meses desde la recepción del manuscrito, notificación del Consejo de Redacción sobre la aceptación, rechazo o necesidad de modificación del mismo. En este último caso, el manuscrito modificado deberá devolverse al Consejo de Redacción en un plazo no superior a un mes.

Los autores recibirán pruebas (galeradas) de los trabajos aceptados, que deberán devolver en plazo no superior a una semana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha del envío, se anulará. Las correcciones se limitarán a errores tipográficos, gramaticales o de datos incorrectos. Modificaciones más importantes, que impliquen recomposición del texto, deberán ser abonadas por el autor.

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

Los trabajos se enviarán a «Microbiología Española», Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo de Redacción de la Revista.

INDICE

Página

Producción por hongos de enzimas proteolíticas con especial referencia a las fibrinolíticas, *A. F. Abdel-Fattah* y *A. S. Ismail* (**) 59

El lipopolisacárido del *Pseudomonas savastanoi*, *M. Santaolalla* y *L. Cañas* (*) 65

Estudio de distintas actividades enzimáticas durante el ciclo de desarrollo de dos cepas de *Myxococcus xantus*, *C. Ruiz*, *J. J. Sánchez*, *C. Rodríguez* y *A. Ramos-Cormenzana* (*) 75

Actividad del ciliado *Onychodromus acuminatus* sobre el virus de la vacuna incorporado al medio del protozoo, *S. Pérez-Prieto*, *M. A. Jareño* y *A. García-Gancedo* (*). 83

Estudios sobre la ultraestructura de hongos microscópicos del suelo. I. Los ascocarpos de *Corynascella inaequalis*, *J. Guarro* y *M. J. Figueras* (*) 93

Estudio comparativo de tres estirpes de *Naegleria*, *Elena Zubiaur* y *Pilar Alonso* (*). 103

Caracterización de estirpes de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a penicilina y productoras de β-lactamasa, aisladas en España (1978-81), *R. Rotger* y *C. Nombela* (**) 115

Aztreonama: actividad *in vitro*, *M. Gobernado*, *E. Cantón* y *M Santos* (**) 123

(*) En español. (**) En inglés.

INDEX

Page

Production of proteolytic with special reference to fibrinolytic enzymes by fungi, *A. F. Abdel-Fattah* and *A. S. Ismail* (**) 59

The LPS of *Pseudomonas savastanoi*, *M. Santaolalla* and *L. Cañas* (*) 65

Studies on different enzymatic activities during morphogenesis of two strains of *Myxococcus xanthus*, *C. Ruiz*, *J. J. Sánchez*, *C. Rodríguez* and *A. Ramos-Cormenzana* (*) 75

Activity of the ciliate protozoa *Onychodromus acuminatus* on the vaccinia virus in protozoa culture medium, *S. Pérez-Prieto*, *M. A. Jareño* and *A. García-Gancedo* (*). 83

Studies on the ultrastructure of microscopic fungi soil. I. Ascocarps of *Corynascella inaequalis*, *J. Guarro* and *M. J. Figueras* (*) 93

Comparative study of three *Naegleria* strains, *Elena Zubiaur* and *Pilar Alonso* (*). 103

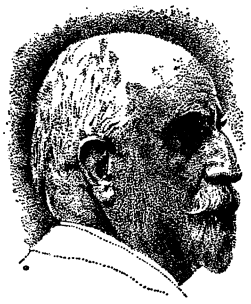
Characterization of penicillin-resistant β-lactamase producing-strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Spain (1978-81), *R. Rotger* and *C. Nombela* (**) 115

Azthreonam: *in vitro* activity, *M. Gobernado*, *E. Cantón* and *M. Santos* (**) 123

(*) In Spanish. (**) In English.

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Editada por el Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán" y la Sociedad Española de Microbiología



VOLUMEN 36. 1983

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director

Dr. Gonzalo Sierra, Director del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Vicedirector

Dr. César Nombela, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Consejo de Redacción

Dra. Ramona Beltrá, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Gobernado, Servicio de Microbiología y Bacteriología Experimental, Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social «La Fe», Valencia.

Dr. Carlos Hardisson, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Dr. Juan Francisco Martín, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de León.

Dra. Fuensanta Reyes, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Rubio, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez.

Redacción

«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
Madrid-6 (España)

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
Madrid-6 (España)

INDICE

Página

Abdel-Fattah, A. F., e *Ismail, A. S.*: Producción por hongos de enzimas proteolíticas con especial referencia a las fibrinolíticas (**) ... 59

Alonso, Pilar: véase *Zubiaur, Elena* ... 103

Cantón, E.: véase *Gobernado, M.* ... 123

Cañas, L.: véase *Santaolalla, M.* ... 65

Casadesús, J.: véase *Contreras, A.* ... 23

Casal, M.; *Gutiérrez-Aroca, J.*, y *Clemente, J.*: Actividad *in vitro* de quimioterápicos, sulfamidas y antifúngicos frente a *Prototheca stagnora* (*) ... 9

Clemente, J.: véase *Casal, M.* ... 9

Contreras, A., y *Casadesús, J.*: Transposición de Tn10 a la región xyl-mtl (minuto 78) del cromosoma de *Salmonella typhimurium* (*) ... 23

Chatterjee, Manika: véase *Sen, S. K.* ... 15

Chatterjee, S. P.: véase *Sen, S. K.* ... 15

Figueras, M. J.: véase *Guarro, J.* ... 93

Francisco-Polledo, J. J.; *Gutiérrez, L. M.*; *García, M. L.*, y *Moreno, B.*: Estudios epidemiológicos en estafilococos coagulasa-positivos aislados de manipuladores de alimentos (*) ... 35

García, E.: véase *López*, R. ... 45

García, M. L.: véase *Francisco-Polledo, J. J.* ... 35

García, P.: véase *López, R.* ... 45

García-Gancedo, A.: véase *Pérez-Prieto, S.* ... 83

Gobernado, M.; *Cantón, E.*, y *Santos, M.*: Aztreonama: actividad *in vitro* (**) ... 123

Guarro, J., y *Figueras, M. J.*: Estudios sobre la ultraestructura de hongos microscópicos del suelo. I. Los ascocarpos de *Corynascella inaequalis* (*) ... 93

Gutiérrez, L. M.: véase *Francisco-Polledo, J. J.* ... 35

Gutiérrez-Aroca, J.: véase *Casal, M.* ... 9

Ismail, A. S.: véase *Abdel-Fattah, A. F.* ... 59

Jareño, M. A.: véase *Pérez-Prieto, S.* ... 83

Joshi, I. J.: Estudios sobre la micoflora de la rizosfera y rizoplano del *Cajanus cajan* (L.) Millsp. en períodos anteriores y posteriores a la cosecha (**) ... 1

López, R.; *García, P.*, y *García, E.*: Autolisinas bacterianas (*) ... 45

Moreno, B.: véase *Francisco-Polledo, J. J.* ... 35

Nombela, C.: véase *Rotger, R.* ... 115

Pérez-Prieto, S.; *Jareño, M. A.*, y *García-Goncedo, A.*: Actividad del ciliado *Onychodromus acuminatus* sobre el virus de la vacuna incorporado al medio del protozoo (*) ... 83

Página

Ramos-Cormenzana, A.: véase *Ruiz, C.* 75
Rodríguez, C.: véase *Ruiz, C.* 75
Rotger, R., y *Nombela, C.*: Caracterización de estirpes de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a penicilina y productoras de β-lactamasa, aisladas en España (1978-81) (**) 115
Ruiz, C.; *Sánchez, J. J.*; *Rodríguez, C.*, y *Ramos-Cormenzana, A.*: Estudio de distintas actividades enzimáticas durante el ciclo de desarrollo de dos cepas de *Myxococcus xanthus* (*) 75
Sánchez, J. J.: véase *Ruiz, C.* 75
Santaolalla, M., y *Cañas, L.*: El lipopolisacárido del *Pseudomonas savastanoi* (*) ... 65
Santos, M.: véase *Gobernado, M.* 123
Sen, S. K.; *Chatterjee, Manika*, y *Chatterjee, S. P.*: Acumulación de lisina a partir de hidrocarburos por el *Micrococcus varians* 2 FA bajo diferentes condiciones de cultivo (**) 15
Zubiaur, Elena, y *Alonso, Pilar*: Estudio comparativo de tres estirpes de *Naegleria* (*) 103

(*) En español. (**) En inglés.

INDEX

Page

Abdel-Fattah, A. F., and *Ismail, A. S.*: Production of proteolytic with special reference to fibrinolytic enzymes by fungi (**) ... 59
Alonso, Pilar: see *Zubiaur, Elena* ... 103
Cantón, E.: see *Gobernado, M.* ... 123
Cañas, L.: see *Santaolalla, M.* ... 65
Casadesús, J.: see *Contreras, J.* ... 23
Casal, M.; *Gutiérrez-Aroca, J.*, and *Clemente, J.*: *In vitro* activity of antimicrobial agents, sulphonamides and antifungal agents against *Prototheca stagnora* (*) ... 9
Clemente, J.: see *Casal, M.* ... 9
Contreras, A., and *Casadesús, J.*: Tn10 transposition to xyl-mtl region (78 minute) of *Salmonella typhimurium* chromosome (*) ... 23
Chatterjee, Manika: see *Sen, S. K.* ... 15
Chatterjee, S. P.: see *Sen, S. K.* ... 15
Figueras, M. J.: see *Guarro, J.* ... 93
Francisco-Polledo, J. J.; *Gutiérrez, L. M.*; *García, M. L.*, and *Moreno, B.*: Epidemiological studies of coagulase positive staphylococci isolated from the noses of food handlers (*) ... 35
Garcia, E.: see *López, R.* ... 45
Garcia, M. L.: see *Francisco-Polledo, J. J.* ... 35
Garcia, P.: see *López, R.* ... 45
Garcia-Gancedo, A.: see *Pérez-Prieto, S.* ... 83
Gobernado, M.; *Cantón, E.*, and *Santos, M.*: Azthreonam: *in vitro* activity (**) ... 123
Guarro, J., and *Figueras, M. J.*: Studies on the ultrastructure of microscopic fungi soil. I. Ascocarps of *Corynascella inaequalis* (*) ... 93
Gutiérrez, L. M.: see *Francisco-Polledo, J. J.* ... 35
Gutiérrez-Aroca, J.: see *Casal, M.* ... 9
Ismail, A. S.: see *Abdel-Fattah, A. F.* ... 59
Jareño, M. A.: see *Pérez-Prieto, S.* ... 83
Joshi, I. J.: Studies on rhizosphere and rhizoplane mycoflora of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. during pre-harvest and post-harvest periods (**) ... 1
López, R.; *García, P.*, and *García, E.*: Bacterial autolysines (*) ... 45
Moreno, B.: see *Francisco-Polledo, J. J.* ... 35
Nombela, C.: see *Rotger, R.* ... 115
Pérez-Prieto, S.; *Jareño, M. A.*, and *García-Gancedo, A.*: Activity of the ciliate protozoa *Onychodromus acuminatus* on the vaccinia virus in protozoa culture medium (*) ... 83

Page

Ramos-Cormenzana, A.: see *Ruiz, C.* 75
Rodríguez, C.: see *Ruiz, C.* 75
Rotger, R., and *Nombela, C.*: Characterization of penicillin-resistant β-lactamase producing-strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Spain (1978-81) (**) 115
Ruiz, C.; *Sánchez, J. J.*; *Rodríguez, C.*, and *Ramos-Cormenzana, A.*: Studies on different enzymatic activities during morphogenesis of two strains of *Myxococcus xanthus* (*) 75
Sánchez, J. J.: see *Ruiz, C.* 75
Santaolalla, M., and *Cañas, L.*: The LPS of *Pseudomonas savastanoi* (*) 65
Santos, M.: see *Gobernado, M.* 123
Sen, S. K.; *Chatterjee, Manika*, and *Chatterjee, S. P.*: Lysine accumulation from hydrocarbon by *Micrococcus varians* 2 FA, under different cultural conditions (**). 15
Zubiaur, Elena, and *Alonso, Pilar*: Comparative study of three *Naegleria* strains (*). 103

(*) In Spanish. (**) In English.

PRODUCTION OF PROTEOLYTIC WITH SPECIAL REFERENCE TO FIBRINOLYTIC ENZYMES BY FUNGI

A. F. ABDEL-FATTAH and A. S. ISMAIL

Laboratory of Microbial Chemistry, National Research Centre, Dokki, Cairo (Egypt)

Summary

In the present work the production of fibrinolytic, gelatinase, caseinase and milk-clotting enzymes from various fungi under different cultural conditions has been studied. *Cochliobolus lunatus* was the most potent producer of active fibrinolytic enzymes in surface culture at 6 days incubation. Production of the fungal fibrinolytic enzyme was considerably affected by initial pH values of the culture medium. Cultivation at pH 7.0 was the most favourable for stimulation of fibrinolytic enzyme, reaching its highest activity (97.6 μg tyrosine/ml reaction mixture).

Resumen

En el presente trabajo se ha estudiado la producción de enzimas proteolíticas que degradan la gelatina, caseína y fibrina a partir de varios hongos cultivados en diferentes medios. Se encontró que *Cochliobolus lunatus* era el más potente productor de enzimas fibrinolíticas, observándose que la actividad máxima era considerablemente afectada por el valor inicial del pH del medio de cultivo. La inoculación a pH 7,0 resultó ser la más favorable para estimular la actividad fibrinolítica, obteniéndose una actividad máxima de 97,6 μg tirosina/ml.

Introduction

Search for new microbial sources of fibrinolytic enzymes has become a common goal for many workers due to the apparent significance of these enzymes in thrombosis therapy in man. Tillet and Garner (12) discovered a bacterial enzyme capable of thrombus dissolution. Bergkvist (2) reported on

the production of three different proteases by *Aspergillus oryzae* by submerged cultivation on a protein and carbohydrate rich medium. Ivis and Tosoni (8) obtained fibrinolytic enzyme from *Aspergillus oryzae* (B-1273) which showed an ideal thrombolytic activity. The present work deals with the production of fibrinolytic, gelatinase, caseinase and milk-clotting enzymes from various fungi under different cultural conditions. Emphasis was therefore focused on the fermentative production of fibrinolytic enzymes by *Cochliobolus lunatus*. As far as we are aware nothing has yet been reported on the fibrinolytic enzymes of the latter organism.

Material and methods

Microorganisms

The fungal strains used in the present work were obtained from the Fungal Collection of the National Research Centre, Cairo, Egypt and from the United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois 61604, U.S.A. (NRRL).

Cultivation

Transfers were made from the subcultures to Dox's agar plates, which were then incubated at 30 °C for 7 d. Liquid cultures were grown in 250 ml flatbottomed flasks, each containing 50 ml sterile medium. Two discs, each of 1 cm diameter were cut from 7-days-old culture plates and used for inoculating each flask. The culture flasks were incubated at 30 °C using the surface and shaken culture techniques.

Culture media

The following culture media were used (g/l): Medium: peptone, 10; bacta yeast extract, 2.0; $MnSO_4H_2O$, 0.003; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.0044; $FeSO_4.7H_2O$, 0.00723 and few drops of 4N H_2SO_4. This medium and the following media were prepared in tap water and adjusted to pH 6.98 with 1 N HCl acid before autoclaving. Media 2, 3, 4, 5 and 6: had the same composition as medium 1 but peptone and yeast extract were substituted by the following nitrogen sources, respectively: bovine fibrin blood, 17.9883; soybean, 23.303; casein (Difco), 10.7327; corn steep powder, 29.0189; sodium nitrate, 9.3382. Medium 7: had the same composition as medium 1 but glucose monohydrate, 11.0002; was added as carbon source. Media 8, 9, 10 and 11: had the same composition as medium 7 but glucose was substituted by the following carbon sources, respectively: sucrose, 5.0; lactose, 5.2632; ribose, 12; soluble starch, 10. Medium 12: had the same composition as medium 7 but peptone and yeast extract were substituted by casein, 10.7327. Media 13, 14, 15 and 16: had the same composition as medium 12 but glucose was substituted by the following carbon sources, respectively: sucrose, 5.0; lactose, 5.2632; ribose, 12; soluble starch, 10.

Determination of protein content

This was done by the method of Lowry *et al.* (10).

Examination of fibrinolytic activity

This was done using the phenol color method as described by Greenberg (7).

Examination of caseinase activity

This was done according to the method of Bergkvist (1).

Examination of milk-clotting activity

This was achieved using the method of Berridge (3).

Examination of gelatinase activity

This was done according to the method of Bergkvist (1) for proteases of *Aspergillus oryzae* by estimating the decrease in the relative viscosity of 5 % gelatin solution containing the buffered enzyme solution (phosphate buffer, pH 6.98).

RESULTS AND DISCUSSION

The culture filtrates obtained after cultivation of the investigated fungal isolates in medium 1 were used for assaying the proteolytic activities. Almost all the fungal cultures investigated produced or no milk-clotting and caseinase activities. On the other hand, the culture filtrates of *Cochliobolus lunatus* and *Drechslera hawaïensis*, in surface culture, and *Aspergillus terreus*, in shaken culture, showed the highest gelatinase activities *(table 1)*.

Table 1. The gelatinase activity of the culture filtrates of fungal cultures

Micro-organisms / Period of incubation (days)	Gelatinase acttvity (% reduction in viscosity after 15 min)					
	Surface culture			Shaken culture		
	6	9	12	3	5	9
Aspergillus flavus 90	6.41	13.98	32.16	46.78	15.43	3.66
A. niger NRRL 609	13.29	9.00	8.30	7.70	17.52	0.00
A. niger NRRL 372	0.45	15.13	4.22	10.24	6.34	0.00
A. niger NRRL 321	22.49	16.66	16.60	2.14	3.51	0.38
A. ochraceus	25.12	38.91	31.57	13.14	10.56	10.25
A. terreus	0.93	1.00	21.18	50.03	53.49	48.60
Cochliobolus lunatus	53.30	54.95	51.05	22.55	24.92	16.94
Drechslera hawaïensis	51.60	53.35	55.10	40.67	37.61	4.08
Epicoccum nigrum	5.00	18.33	18.87	24.03	34.11	40.05
Fusarium solani	1.45	4.37	3.2	3.34	37.33	5.11
Macrosporium cladosporioides	35.51	24.36	24.50	21.62	27.06	13.98
Penicillium chrysogenum	43.27	28.52	28.14	48.76	27.46	16.13
P. citrinum	0.65	11.21	23.77	0.00	0.00	11.23
Trichoderma lignorum	0.00	1.28	21.98	15.75	3.05	0.00
Trichothecium roseum	12.05	18.06	1.28	0.00	31.14	0.49

Of the 15 fungal isolates investi-

gated, *Cochliobolus lunatus* was the most potent and produced active fibrinolytic enzymes in surface culture at 6 days incubation (*table 2*). Production of similar proteolytic enzymes by other fungal cultures has been reported by many authors (1, 5-6).

Substitution of peptone + yeast extract by casein (medium 4) did not affect the mycelial growth but resulted in significant increase in fibrinolytic activity. On the other hand, sodium nitrate was unsuitable nitrogen source for the production of fibrinoly-

Table 2. The fibrinolytic activity of the culture filtrates of fungal cultures

Micro-oorganisms / Period of incubation (days)	Fibrinolytic activity (ug tyrosine released per 1 ml of reaction mixture)					
	Surface culture			Shaken culture		
	6	9	12	3	5	9
Aspergillus flavus 90	41.27	37.8	37.8	72.00	62.21	46.23
A. niger NRRL 609	9.00	9.29	19.95	7.07	10.65	4.95
A. niger NRRL 372	6.45	6.00	24.29	10.65	13.5	13.64
A. niger NRRL 321	14.24	18.59	6.45	4.2	16.35	12.89
A. ochraceus	17.85	19.83	9.29	39.9	18.59	33.59
A. terreus	37.03	29.25	24.9	62.21	58.13	29.98
Cochliobolus lunatus	72.57	56.75	53.28	39.16	39.83	37.05
Drechslera hawaiïensis	34.94	32.72	31.47	46.23	47.72	24.9
Epicoccum nigrum	23.55	19.83	19.83	72.00	46.4	41.84
Fusarium solani	37.79	32.09	30.74	42.00	40.66	34.95
Macrosporium cladosporioides	17.22	14.87	10.04	70.64	55.40	35.69
Penicillium chrysogenum	39.16	24.29	18.59	71.09	69.69	66.83
P. citrinum	29.25	23.54	26.39	71.13	65.67	55.40
Trichoderma lignorum	32.22	42.00	25.64	16.49	11.4	13.64
Trichothecium roseum	32.87	32.49	27.68	23.34	22.02	20.03

Suitability of different media for the production of fungal fibrinolytic enzymes was investigated using *Cochliobolus lunatus* in surface culture. Substitution of yeast extract and peptone (medium 1) by soybean (medium 3) or corn-steep (medium 5) led to decrease in fibrinolytic activity. On using bovine fibrin as nitrogen source a good mycelial growth was only obtained.

tic enzymes. In all cases, the pH values of the culture filtrates lied in the alkaline range and were almost identical (*table 3*). These results are in agreement with those reported for the production of extracellular fibrinolytic enzymes by *Aspergillus terricola* (9) and *Trichothecium roseum* (11).

In the presence of peptone + yeast extract as the nitrogen source (*ta-*

ble 4), addition of glucose (medium 7), sucrose (medium 8), lactose (medium 9) or soluble starch (medium 11) led to decrease in the fibrinolytic activity. On the other hand, ribose had a stimulating effect whereby the culture filtrate possessed the highest fibrinolytic activity (medium 10). In presence of casein as nitrogen source, addition of either glucose (medium 12), sucrose (medium 13), lactose (medium 14), ribose (medium 15) or soluble starch (medium 16) favoured mycelial growth but lowered fibrinolytic activity.

Table 3. Effect of nitrogen source on the production of fibrinolytic enzyme by Cochliobolus lanatus

Medium number	Nitrogen source	Dry weight of mycelium (mg/ 50 ml culture medium)	pH of culture filtrate	Protein content of culture fltrate (mg/ml)	Fibrinolytic activity (ug tyrosine released/ ml of reaction mixture)
1	Peptone + yeast extract	140.0	8.1	3.72	49.87
2	Bovine fibrin	616.5	8.0	3.60	51.25
3	Soybean	599.2	8.2	2.70	24.90
4	Casein	139.6	8.3	5.10	61.17
5	Corn steep	540.0	8.0	2.43	25.64
6	Sodium nitrate	23.4	8.2	0.08	10.03

Table 4. Effect of carbon source, in presence of peptone + yeast extract as nitrogen source, on the production of fibrinolytic enzyme by Cochliobolus lunatus

Medium number	Carbon source	Dry weight of mycelium (mg/ 50 ml culture medium)	pH of culture filtrate	Protein content of culture filtrate (mg/ml)	Fibrinolytic activity (ug tyrosine released/ ml of reaction mixture)
7	Glucose	314.5	7.7	2.59	34.20
8	Sucrose	247.4	7.9	2.70	37.66
9	Lactose	300.0	7.8	3.14	42.64
10	Ribose	310.0	7.4	4.78	60.40
11	Soluble starch	366.5	7.8	2.74	32.69

The effect of phosphate level in the culture medium 4 using different concentrations of K_2HPO_4 and KH_2PO_4 was also investigated. In either case,

productivity of fibrinolytic enzyme varied within a limited range. These results are in contrast with those reported by Fayek *et al.* (6) for the production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium semitectum*. The latter authors found that the highest enzyme activity was detected within a concentration range of phosphate from 0.05-0.1 M while no activity was detected at 0.25 M.

Production of the fungal fibrinolytic enzyme was considerably affected by initial pH value of the culture medium. Cultivation at pH 7.0 was the most favourable, whereby production of fibrinolytic enzyme was stimulated and reached its highest activity (97.6 μg tyrosine/ml reaction mixture).

From the above, it is obvious that composition of the culture medium had a considerable effect on the elaboration of the fibrinolytic enzyme by the selected fungal isolate. Furthermore, the suitability of medium composition on elaboration of the enzyme varied with the fungal isolate. These conclusions are in accord with those reported by Egorov *et al.* (4) on the biosynthesis of proteinases with thrombolytic activity by mold fungi.

References

1. Bergkvist, R. 1963. The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. I. Methods for the estimation and isolation of the proteolytic enzymes. Acta Chem. Scand., 17, 1521-40.
2. Bergkvist, R. 1963. The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. II. Properties of the proteolytic enzymes. Acta Chem. Scand., 17, 1541-51.
3. Berridge, N. J. 1952. Some observations on the determination of the activity of rennet. Analyst (London), 77, 57-62.
4. Egorov, N. S.; Al-Nuri, M. A.; Landau, N. S., and Buyak, L. I. 1978. Biosynthesis of proteinases with thrombolytic activity in mixed cultures of mold fungi. Mikol. Fitopatol., 12, 13-19.
5. Egorov, N. S.; Golant, M. B.; Landau, N. S.; Okhokhonina, G. M.; Sycheva, N. A., and Bryukhova, A. K. 1977. Effect of electromagnetic waves on the production of proteinases with fibrinolytic activity by *Aspergillus oryzae*. Mikol. Fitopatol., 11, 303-7.
6. Fayek, K. I.; Foda, M. S., and Elnaggar, M. R. 1976. Production physiology and properties of a novel fungal fibrinolytic enzyme. Z. Allg. Mikrobiol., 16, 417-23.
7. Greenberg, D. M. 1957. Methods Enzymol., 2, 54-64.
8. Ives, D. A. J., and Tosoni, A. L. 1967. Purification of CA-7, a thrombolytic fungal protease. Can. J. Biochem., 45, 1055-65.
9. Korshunov, V. V., and Brotskaya, S. Z. 1972. Relation of synthesis of proteinases with fibrinolytic properties by *Aspergillus terricola* 3-374 to the composition and concentration of components of the medium. Akad. Nauk SSSR, Otd. Biokhim. Biofiz. Akt. Soedin, 2, 149-54.
10. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-75.
11. Maksimova, R. A.; Pokh, L. I., and Silaev, A. B. 1973. Fibrinolytic and antibiotic activity of *Trichothecium roseum* during submerged cultivation. Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 9, 891-94.
12. Tillet, W. S., and Garner, R. L. 1933. Fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. J. Exp. Med., 58, 485-502.

EL LIPOPOLISACARIDO DEL *PSEUDOMONAS SAVASTANOI*

M. SANTAOLALLA y L. CAÑAS

Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC, Madrid

RESUMEN

El LPS del *Pseudomonas savastanoi* observado al microscopio electrónico, tanto en tinciones positivas o negativas, es morfológicamente igual a otros LPS procedentes de bacterias gran-negativas y patógenas de animales. Químicamente, en su polisacárido, la suma de ramnosa y glucosa supera el 70 % del total; éste está desprovisto de heptosas.

El resultado del fraccionamiento con sephadex G 50 indica ser un LPS de una cepa semirrugosa.

El lípido A de este LPS es específico por su composición, tanto cualitativa como cuantitativa, como nos lo indica la presencia conjunta de los ácidos palmítico y palmitoleico, aunque básicamente está compuesto por ácidos grasos superiores comunes a otros lípidos A de LPS de bacterias patógenas de animales.

SUMMARY

The LPS of *Pseudomonas savastanoi* is morphologically similar at the electron microscope (negative and positive staining) to others LPS from Gram-negative animal pathogens bacteria. Cremically, in the polysaccharide, the percentage of ramnose plus glucose was more than 70 % of the total and it did not contain heptoses.

The results of Sephadex G 50 fractionation indicates a LPS of a SR strain.

The lipid A from *Pseudomonas savastanoi* LPS is especific by its quantitative and qualitative composition, viz. The presence of palmitic and palmitoleic acids together, but basically is composed by long-chain fatty acids conmun to other lipids A in bacterial pathogens.

Introducción

El lipopolisacárido (LPS) es el componente más importante de la endotoxina de los microorganismos gram-negativos y se localiza en la membrana externa de la pared celular.

La macromolécula del LPS está constituida por tres regiones bien diferenciadas: 1ª) las cadenas laterales específicas O portadoras de la especificidad inmunológica, constituidas por monosacáridos; 2ª) el denominado corazón, de composición similar en la mayoría de los LPS, también formado por monosacáridos, aunque lleve algunos específicos: las heptosas y el 3-desoxi-octulosónico (KDO), que sirve de unión entre el polisacárido antigénico; y 3ª), el lípido A.

Hasta ahora se han estudiado extensamente los LPS de bacterias patógenas para el hombre y los animales, y sólo algunos de bacterias fitopatógenas (5, 17-18).

En el presente trabajo estudiamos el LPS del *Pseudomonas savastanoi*, microorganismo gram-negativo y patógeno de plantas, causante de la tuberculosis del olivo, enfermedad muy difundida en los olivares españoles, donde también se conoce con los nombres de «verrugas», «roña», etc.

A continuación, hacemos un estudio submicroscópico y químico del LPS con objeto de comparar nuestros resultados con aquellos otros obtenidos por diversos investigadores en bacterias patógenas para el hombre y los animales.

Materiales y métodos

Empleamos el *Pseudomonas savastanoi* aislado de tumores de ramas jóvenes de olivos situados en El Molar (Madrid), y cultivado en caldo común, en matraces Erlenmeyer de 6 l de capacidad, con agitación en un incubador Shaker, a 250 rpm, a la temperatura de 28 °C, durante 24 h. Separamos por centrifugación los microorganismos y los lavamos tres veces consecutivas con agua destilada estéril; caracterizamos el *P. savastanoi* por los métodos taxonómicos habituales.

Técnicas de microscopia electrónica

Observamos el LPS y lo fotografiamos empleando las tinciones negativa y positiva de la misma forma indicada en trabajos anteriores (16-17).

Métodos empleados para la extracción del LPS

1. Método del fenol-agua de Westphal y Jann (21), purificación por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa (16-17).
2. Extracción previa de la endotoxina y a partir de ésta el LPS, siguiendo el método de Konno (9).
3. Para comprobar la posible existencia del LPS en la fase fenólica del método fenol-agua, empleamos el método señalado por Hurvell (6).

Análisis químico

Para identificar lipopolisacáridos empleamos el reactivo de Schwimmer y Bevenue (19); la identificación se comprobó por los patrones tipo, correspondientes.

La determinación cuantitativa de los monosacáridos, por cromatografía en fase gaseosa: utilizamos el método de Laine y cols. (10) para formar los correspondientes alditoles, que a conti-

nuación acetilamos con piridina y anhídrido acético. Empleamos un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer, mod. Sigma 3, con integrador/programador Sigma 10, columna 3 % SP-2340 en 100/120 Supelcoport, de 2 m × 2 mm (vidrio), temperatura inicial 200 °C, final 230 °C, flujo 30 ml/min de nitrógeno. Detector de ionización de llama, sensibilidad 10^{-10}; para la correcta identificación de los monosacáridos empleamos patrones de Applied Science Laboratories y comparamos los tiempos de retención.

Fraccionamos el polisacárido en Sephadex G 50 siguiendo el método indicado por Jann y cols. (7), y como eluyente empleamos una solución de piridina : ácido acético : agua, 10 : 4 : 486 (v/v), pH 5,2, y una columna de 57 cm × 2 cm. Controlamos las fracciones mediante el método de la antrona y las estudiamos por cromatografía de gases.

La electroforesis del LPS en geles de poliacrilamida se realizó utilizando el método de Jann y cols. (7).

Análisis del lípido A

Empleamos los mismos métodos que en trabajos anteriores (17-18).

Investigamos la posible existencia de distintos lípidos A por cromatografía en capa fina, usando cromatofolios de aluminio silicagel $60F_{254}$; como solventes utilizamos los siguientes: a) cloroformo-metanol-agua: 65 : 22,5 : 3,5 (v/v); b) 2-butanol : n-propanol : agua, 2 : 10 : 5 (v/v); como reveladores empleamos la ninhidrina en acetona al 2 % y el reactivo de Dittmer y Lester (3).

El análisis cuantitativo de los ácidos grasos, previamente metilados por el método de Metcalfe y Schmitz (13), se realizó en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer, mod. Sigma 3, con integrador/programador Sigma 10, columna 3 % SP-2100 DOH Supelcoport 2 m × 2 mm (vidrio), temperatura inicial 120 °C, final 220 °C, flujo 30 ml/min de nitrógeno; detector de ionización de llama, sensibilidad 10^{-10}; volumen de la muestra 3 µl. Como patrones para la comparación de los tiempos de retención, se empleó una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos de bacterias Supelco, NC. 4-5436, disueltos en metilcoproato (25 mg/ml), y también los derivados metílicos de cada uno de los ácidos identificados.

Resultados

La estructura submicroscópica del LPS total es semejante a la observada en otros lipopolisacáridos estudiados por nosotros (16-18).

Análisis químico de los polisacáridos

El LPS purificado y liofilizado, sometido a hidrólisis para separar el lípido A del polisacárido, dio los porcentajes expresados en la *tabla 1* según el tipo de hidrólisis empleado.

Tabla 1

Hidrólisis	Lípido A %	Polisacárido-proteína, %
Acido acético, 1 %	19,60	61,50
Acido clorhídrico 0.1 N	22,80	62,30

Los porcentajes de N y P que correspondieron a este lipopolisacárido fueron respectivamente de 4,01 y 3,6.

La media de los porcentajes de endotoxina y lipopolisacárido bruto y purificado, según el método de extracción empleado, la expresamos en la *tabla 2*.

Tabla 2

Método de extracción	Endotoxina	SPS	
		Bruto	Puro
Según Westphal y Jann		11,90	2,20
Según Konno	3,90		1,90

Los resultados se refieren a porcentajes referidos a peso seco del microorganismo.

También se realizó una prueba para tratar de encontrar otro LPS en las fases fenólicas que se obtienen empleando el método de Hurvell (6), obteniendo resultados negativos, ya que no se pudo identificar ningún lipopolisacárido hidrófobo en las fases fenólicas.

La homogeneidad dle lipopolisacárido se comprobó sometiendo una muestra del LPS al análisis cromatográfico en capa fina. El resultado fue la aparición de una sola mancha en las pla-

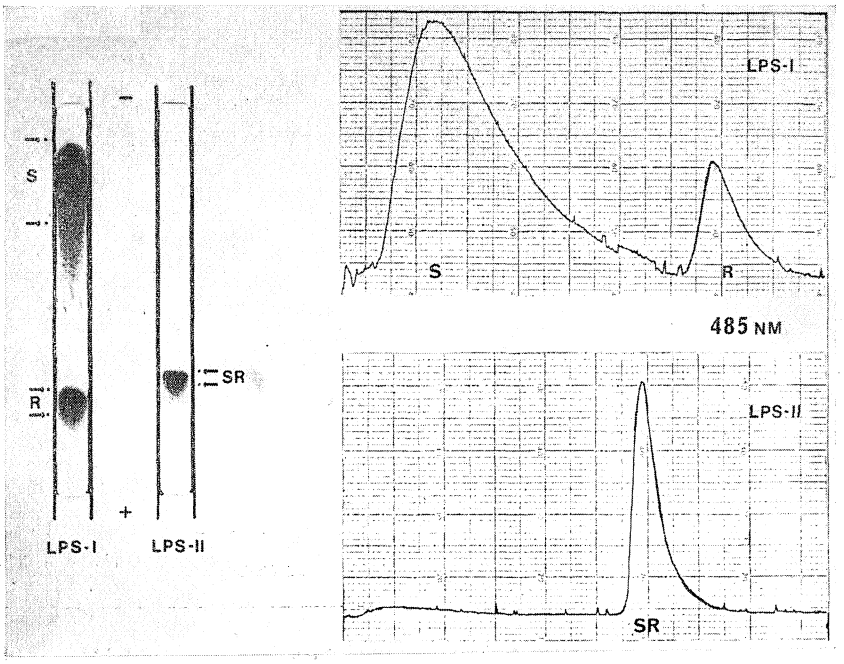


Figura 1. Resultados comparativos de la electroforesis en geles de poliacrilamida. En LPS I se aprecian 2 bandas, una R y otra S, correspondientes al LPS de P. viridiflava. *En LPS se ve una sola banda que corresponde al LPS de* P. savastanoi. *Las gráficas representan las mediciones de las bandas de los geles realizadas en el espectrofotómetro Gilford a 485 nm*

cas con un Rf de 0,47, lo que nos induce a pensar que sólo existe un LPS.

Los resultados de la electroforesis en geles de poliacrilamida del LPS, quedan reflejados en la *figura 1*. En ella aparece el LPS correspondiente

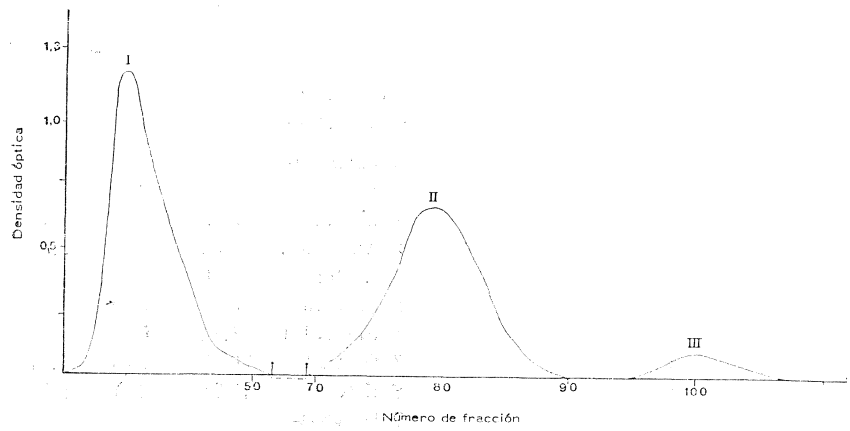


Figura 2. Fraccionamiento cromatográfico del polisacárido en sephadex G 50 utilizando como eluyente acetato de piridina

al *Psedoumonas savastanoi* (LPS II) y otro LPS extraído por uno de nosotros (18) de una estirpe salvaje (2012) de *P. viridiflava*. Como podemos observar en la figura de los geles empleados en el proceso de electroforesis de cada LPS, mientras que el gel del LPS perteneciente al *P. viridiflava* (LPS I) muestra dos bandas con distinta movilidad (banda S y banda R), el correspondiente al *P. savastanoi* presenta una sola banda en la parte inferior del gel, ligeramente superior a la banda R del LPS-I. Este tipo de banda la denominan Jann y cols. (7) banda SR y señalan que son típicas de LPS pertenecientes a estirpes semirrugosas (SR). Las gráficas de la figura representan las mediciones de las bandas realizadas en un espectrofotómetro Gilford, a 485 nm. La gráfica de la *figura 2* representa el fraccionamiento en sephadex G 50 del polisacárido degradado, y en ella se aprecian tres picos: el I que corresponde a las cadenas laterales (antígeno O), el II al corazón y el III al KDO. El análisis, mediante la cromatografía de gases, de las fracciones de estos tres picos, indica que la fracción I estaba constituida por un 87,6 % de ramnosa, un 5,20 % de glucosa y un 3,30 % de ribosa; los demás monosacáridos se encontraron en cantidades no significativas. La fracción II está compuesta fundamentalmente de glucosa 68,70 %; le sigue la ramnosa 28,10 % y otros monosacáridos a nivel de trazas, tales como xilosa, glucosamina, etc. La fracción III se compone exclusivamente de KDO, apareciendo sólo otros monosacáridos en forma de indicios.

Los monosacáridos totales correspondientes al polisacárido se identificaron previamente por cromatografía en capa fina como glucosa, ramnosa, xilosa, fucosa y aminoazúcares; los resultados cuantificados por cromatografía de gases en forma de acetil-alditoles, se exponen en la *figura 3* y

tabla 3. La mayor proporción, una relación molar del 38 %, correspondió a la ramnosa, seguido por 32 % de glucosa. Como azúcares típicos del lipopolisacárido identificamos KDO por cromatografía en capa fina, con un

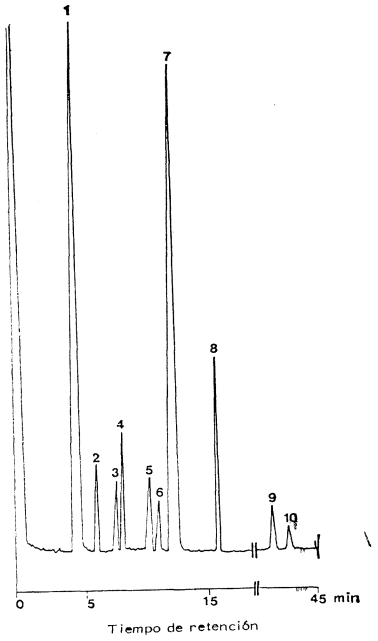


Figura 3. Cromatograma obtenido por cromatografía de gases de los acetatos alditoles del polisacárido del LPS

Rfg de 0,89 similar al del patrón empleado. Sin embargo, no se encontraron heptosas.

Tabla 3. Muestra los tiempos de retención, áreas de los picos, concentraciones y relaciones molares de los acetatos alditoles del polisacárido del LPS

Acetatos alditoles	T. de retención min	Area X FR	Concentración	Relac. molar
Cloroformo (solvente)	0,35	544,77	85,11	
1 Ramnositol	4,13	18,28	2,86	38
2 Ribitol	5,40	0,96	0,15	2
3 Arabinitol	6,66	0,56	0,09	1
4 Xilitol	7,06	2,16	0,37	5
5 Fucositol	8,71	0,95	0,18	2
6 Galactitol	9,32	0,45	0,08	1
7 Glucitol	10,21	15,87	2,47	33
8 KDO	17,25	4,19	0,66	9
9 Glucosaminitol	38,24	2,17	0,37	5
10 Galactosaminitol	44,33	1,89	0,32	4

Análisis del lípido A

Hidrolizando el LPS con ácido acético al 1 %, siguiendo el método indicado anteriormente, obtenemos un rendimiento del 19,60 % referido a peso seco, que corresponde al lípido A. Su aspecto es céreo, blanquecino, insoluble en agua y soluble en cloroformo.

Comprobamos la homogeneidad del lípido A por cromatografía en capa fina apareciendo una sola mancha con un Rf de 0,88 ó 0,73, según el solvente empleado.

Empleando la cromatografía en papel y placa fina, identificamos el aminoazúcar basal (matriz del lípido A), que resultó ser la glucosamina; también identificamos la presencia de etanolamina y de grupos fosfato con el reactivo de Dittmer y Lester (3).

Con los ácidos grasos separados, posteriormente metilados y disueltos en metil-caproato (hexanoato), hicimos una cromatografía en fase gaseosa, encontrando los metil-ésteres de los

siguientes ácidos: 2-OH-decanoico, decanoico, 2-OH-dodecanoico, 3-OH-dodecanoico, tetradecanoico, 3-OH-tetradecanoico, hexadecanoico, 14-hexadecanoico, octadecanoico y 1-octadecanoico. La *figura 4* y *tabla 4* nos indican los tiempos de retención, áreas y relaciones molares de estos ácidos. La mayor proporción de ellos corresponde al dodecanoico (láurico) y sus derivados hidroxilados.

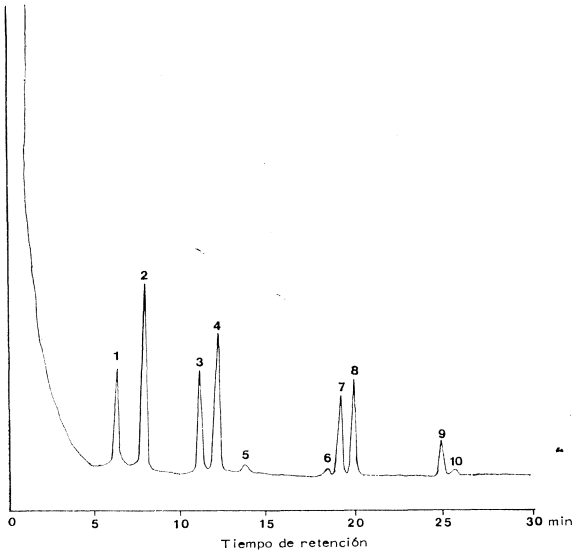


Figura 4. Cromatograma obtenido por cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del lípido del LPS

Discusión

El LPS extraído del *Pseudomonas savastanoi* muestra en tinción positiva una estructura en forma de cintas trilaminares, como la descrita por Lopes e Innis (11) para el LPS de *Escherichia coli*, o la mencionada por Shands y cols. (20) para el LPS de *Salmonella typhimurium*, que también encuentra Santaolalla (17) en los LPS de microorganismos gram-negativos y patógenos de plantas tales como de *Agrobacterium tumefaciens* (formas normal y L), *Erwinia carotovora* y *P. viridiflava*. Su estructura está formada por dos capas externas más densas al paso de los electrones, con un espesor comprendido entre 7,5-10 nm, separadas por una intermedia menos densa, de 4,5 nm, por lo que no existen diferencias estructurales apreciables entre estos LPS.

Los porcentajes de N, P y lípido A encontrados en el LPS están perfectamente encuadrados entre los señalados por otros investigadores para distintos LPS.

El fraccionamiento en columna de la parte polisacárida del LPS proporciona unos resultados muy similares a

los descritos por Jann y cols. (7) y Wilkinson y Galbraith (22) para otros lipopolisacáridos de diversas estirpes de *Pseudomonas*: así, los primeros ponen de manifiesto que en los LPS de estirpes lisas (S) siempre encuentran

lamida con SDS al 1 % (*figura 1*). Los monosacáridos predominantes son ramnosa y glucosa, que juntos superan el 70 % del total (*figura 2*).

El porcentaje de lípido A separado por hidrólisis ácida del LPS, es de

Tabla 4. Muestra los tiempos de retención, áreas de los picos, concentraciones y relaciones molares de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del lípido A del LPS

	Esteres metílicos	Tiempo de retención min	Area X FR	Concentración	Relación molar
	Hexanoato (solvente)	0,74	320,97	92,87	
1	2-OH-decanoato (2-OH 10:0)	5,57	1,97	0,57	13
2	Laurato (12:0)	7,38	3,67	1,07	24
3	2-OH-dodecanoato (2-OH 12:0)	10,78	1,96	0,57	13
4	3-OG-dodecanoato (3-OH 12:0)	11,49	3,22	0,94	21
5	Miristato (14:0)	13,07	0,20	0,06	1
6	3-OH-tetradecanoato (3-OH 14:0)	17,72	0,19	0,06	1
7	Pamitoleato (16:1)	18,41	1,57	0,46	10
8	Palmitato (16:0)	19,26	1,85	0,55	12
9	Oleato (18:1)	24,37	0,59	0,18	4
10	Estearato (18:0)	25,28	0,20	0,06	1

las tres fracciones F_I (cadenas laterales), F_{II} (corazón) y F_{III} (KDO), mientras que en los pertenecientes a estirpes rugosas (R), que no poseen cadenas laterales, sólo obtienen las fracciones F_{II} y F_{III}, por lo que consideran este método adecuado para caracterizar estirpes mutantes de tipo R (*figura 1*).

La composición de las fracciones estudiadas por nosotros y la ausencia de heptosas nos sugiere la inclusión de este LPS atípico dentro del tipo de semirrugosos (SR), caracterizados por poseer defectos en la organización de su polisacárido. Esta afirmación viene también avalada por su comportamiento electroforético en geles de poliacri-

19,60 %, cantidad comprendida entre las citadas por Wilkinson y cols. (23) para el *Pseudomonas stutzeri* y *P. syncyanea*, que tienen, respectivamente, un 23,6 % y un 18,2 % de lípido A. El primero de ellos puede resultar patógeno para el hombre y animales superiores.

Nosotros, en el lípido A del *Pseudomonas savastanoi* hemos identificado exclusivamente glucosamina como componente monosacárido. Matrices constituidas por glucosamina han sido detectadas en otras especies de *Pseudomonas* por Dewry y cols. (4), y entre ellas en el *P. aeruginosa*, patógena para el hombre y animales superiores. La etanolamina y grupos fosfato en-

contrados en dicho lípido A por nosotros, se encuentran en algunos lípidos A pertenecientes a varias especies de *Salmonella* y *Pseudomonas*.

Respecto a los ácidos grasos cuantificados por nosotros como componentes estructurales del lípido A del *Pseudomonas savastanoi*, vemos que son componentes comunes del lípido A de otros microorganismos. Así, tenemos que el ácido 2-OH-decanoico, que nosotros encontramos en una relación molar de 13, se encuentra también según Wilkinson y Galbraith (22) unido a la glucosamina en el lípido A del *P. aeruginosa*, patógeno del hombre, y también en el lípido A de *P. stutzeri* y *P. syncyanea*, patógenos de plantas. Key y cols. (8) lo identifican en el *P. alcaligenes*. *Meadow* (12) y Moss y cols. (14) lo citan como componente del lípido A de *P. putida*, *P. acidovorans* y *P. testosteroni*, todos ellos patógenos de plantas. Estos ácidos grasos hidroxilados van unidos a los aminoazúcares de la matriz por un enlace amídico y se unen, a su vez, por su grupo hidroxilo a un ácido graso no saturado.

El ácido láurico (12:0) que nosotros encontramos en mayor proporción, un 24 % en relación molar, ha sido encontrado en *Pseudomonas stutzeri* y *P. syncyanea* por Wilkinson y cols. (22) y también por Adams y cols. (1) en *P. calcoaceticus*.

El 2-OH-dodecanoato y 3-OH-dodecanoato, hallados por nosotros en las relaciones molares de 13 y 21, respectivamente, son descritos por Meadow (12) y Moss y cols. (14) en *Pseudomonas putida* y *P. aminovorans*. En cuanto a los ácidos palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1), que nosotros encontramos en las relaciones molares de 12 y 10, queremos indicar que, así como el primero es frecuente en muchos lípidos A de microorganismos como *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *F. mortiferum*, *Bordetella* sp. y algunos más, no conocemos ningún trabajo que señale estos dos ácidos juntos en el lípido A. Por último, mencionaremos que el ácido oleico identificado y cuantificado por nosotros en el lípido A estudiado, también se encuentra en otros lípidos A de microorganismos, como por ejemplo en el *Rhizobium trifolii*, identificado por Russa y Lorkiewicz en 1974 (15). Adams y cols. (2) también lo mencionan como presente en la estructura química del lípido A de *Neisseria catarrhalis*.

Con esto queremos indicar que el lípido A del *Pseudomonas savastanoi*, específico en cuanto a su composición cuantitativa y también cualitativa con respecto a los ácidos grasos de otros lípidos A de microorganismos patógenos de animales y de plantas, está compuesto por ácidos grasos superiores frecuentes en la estructura de otros lípidos A.

Bibliografía

1. Adams, G. A.; Quadling, C.; Yaguchi, M., and Tornabene, T. G. 1970. The chemical composition on cell wall lipopolysaccharides from *Moraxella duplex* and *Micrococcus calco-aceticus*. Can. J. Microbiol., 16, 1-8.
2. Adams, G. A.; Tornabene, T. G., and Yaguchi, M. 1969. Cell-wall lipopolysaccharides from *Neisseria catarrhalis*. Can. J. Microbiol., 15, 365-74.
3. Dittmer, J. C., and Lester, R. L. 1964. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. J. Lipid. Res., 5, 126-7.
4. Drewry, D. T.; Lomax, J. A.; Gray, G. W., and Wilkinson, S. G. 1973. Studies of lipid A fractions from the

lipopolysaccharides of *Pseudomonas alcaligenes*. Biochem. J., 133, 563-72.

5. Graham, P. H., and O'Brien, M. A. 1968. Composition from lypopolysaccharides from *Rhizobium* and *Agrobacterium*. Antonie van Leeuwenhoek, 34, 326-30.

6. Hurvell. 1973. Serological cross-reactions between different *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B, 81, 105-12.

7. Jann, B.; Reske, K., and Jann, K. 1975. Heterogeneity of lipopolysaccharide analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate polyacrylamide electrophoresis. Eur. J. Biochem., 60, 239-46.

8. Key, B. A.; Gray, G. W., and Wilkinson, S. G. 1970. The purification and chemical composition of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas alcaligenes*. Biochem. J., 120, 559-66.

9. Konno, S. 1974. Studies on the lipid components in endotoxin. Kitasato Archiv. Exp. Med., 47, 115-27.

10. Laine, R. A.; Esselman, W. J., and Sweeley, C. C. 1972. Gas-liquid chromatography of carbohydrates. Methods Enzymol., 28, 159-67.

11. Lopes, J., and Inniss, W. E. 1970. Electron mycroscopic study of lipopolisaccharides from an avian strain of *Escherichia coli* 018. J. Bacteriol., 103, 238-43.

12. Meadow, P. M. 1975. Genetic and Bio chemistry of *Pseudomonas*, 67-98. Clarck P. H. and Richmods M. H., London.

13. Metcalfe, L. D., and Schmitz, A. A. 1961. Rapid preparation of fatty acid ester for gas chromatography analys's. Anal. Chem., 33, 363-64.

14. Moss, C. W.; Samuel, S. B., and Weaver, R. E. 1972. Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species. Appl. Microbiol., 24, 596-98.

15. Russa, R., and Lorkiewiez, Z. 1974. Fatty acids present in the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii*. J. Bacteriol., 119, 771-75.

16. Santaolalla, M. 1971. Estructura y composición química del lipopolisacárido de la forma L fija del *Agrobacterium tumefaciens*. Microbiol. Españ., 25, 179-94.

17. Santaolalla, M. 1974. El lipopolisacárido de los microorganismos gram-negativos y patógenos de plantas. Rev. Real Acad. Cienc. Exactas, Fís. Natur. Madrid, 78, 357-94.

18. Santaolalla, M. 1979-80. El lipopolisacárido y la endotoxina del *Pseudomonas viridiflava*. Microbiol. Españ., 32-33, 27-42.

19. Schwimmer, S., and Bevenue, A. 1956. Reagent for differentiation of 1,4 — and 1,6 — linked glucosaccharides. Science, 123, 543-44.

20. Shands, Jr., J. W.; Graham, J. A., and Nath, R. 1967. The morphologic structure of isolated lipopolysaccharide. J. Mol. Biol., 25, 15-21.

21. Westphal, O., and Jann, K. 1965. Bacte terial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further aplications of the procedure. Methods Carbohyd. Chem., 5, 83-91.

22. Wilkinson, S. G., and Galbraith, L. 1975. Studies of lipopolysaccharides from *P. aeruginosa*. Eur. J. Biochem., 52, 331-43.

23. Wilkinson, S. G.; Galbraith, L., and Lightfoot. 1973. Cell walls, lipids, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas* species. Eur. J. Biochem., 33, 158-74.

ESTUDIO DE DISTINTAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DURANTE EL CICLO DE DESARROLLO DE DOS CEPAS DE *MYXOCOCCUS XANTHUS*

C. RUIZ, J. J. SANCHEZ, C. RODRIGUEZ y A. RAMOS-CORMENZANA
Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

Resumen

Se ha determinado el número de células y la producción de enzimas con actividad esterásica, proteolítica y bacteriolítica, en dos cepas de *Myxococcus xanthus*, a lo largo del ciclo de desarrollo. La evolución del número de células muestra que ambas cepas sufren en dicho ciclo una masiva muerte celular, siendo mayor y más rápida en *Myxococcus xanthus* MD4 que en *M. xanthus* MD2.

Determinaciones enzimáticas se realizaron utilizando como substratos, tween 20, caseína, y células tratadas en autoclave de *Myxococcus xanthus* MD4 y *Micrococcus lysodeikticus* desecado a la acetona.

Se demuestra la existencia de enzimas con actividad esterásica, proteolítica y bacteriolítica a lo largo del ciclo de desarrollo en *Myxococcus xanthus* MD2 y *M. xanthus* MD4. Las actividades esterásicas y proteolíticas se detectan, tanto en las suspensiones celulares, como en los sobrenadantes de cultivo. En *M. xanthus* MD4, las actividades enzimáticas extracelulares estudiadas aumentan a lo largo del proceso de desarrollo. Por el contrario, en *M. xanthus* MD2 estas actividades enzimáticas disminuyen.

Existe una selección de las enzimas extracelulares con actividad bacteriolítica sobre células tratadas en autoclave de *Myxococcus xanthus* MD4, en relación con los activos sobre células de *Micrococcus lysodeikticus* desecadas.

Summary

The number of cells and the production of enzymes with esterase, proteolytic and bacteriolytic activity have been determined during morphogenesis in two strain of *Myxococcus xanthus*.

Development of the number of cells, showed that both strains of *Myxococcus xanthus* MD4 than in *M. xanthus* MD2.

Enzymathical determinations were carried out using the following substrates: tween 20, casein and autoclaved cells of *Myxococcus xanthus* MD4 and *Micrococcus lysodeikticus* dried with acetone.

We have prooved the existence of enzymes with esterase, proteolytic and bacteriolytic activities during morphogenesis in *Myxococcus xanthus* MD2 and *M. xanthus* MD4. Esterase and proteolytic activities were detected in cells suspension as well as in supernatans. Respect to *M. xanthus* MD4 studied extracellular enzymic activities decreased in *M. xanthus* MD2.

There is an selection of extracellular enzymes with higher bacteriolytic activities over autoclaved cells of *Myxococcus xanthus* MD4 relating to active enzymes over dried cells of *Micrococcus lysodeikticus*.

Introducción

Mixococcus xanthus puede entrar opcionalmente en dos ciclos interconectados, uno de crecimiento vegetativo, y el otro de desarrollo. En el primero, las células crecen vegetativamente dividiéndose por fisión binaria transversal. En condiciones adecuadas, como lo es la carencia de nutrientes específicos, el contacto con una superficie sólida y una densidad celular apropiada, se forman los llamados cuerpos fructificantes, dentro de los cuales, las células vegetativas se han transformado en mixosporas. En este último proceso, denominado ciclo de desarrollo, Wireman y Dworkin (11) demostraron la existencia de una masiva muerte celular.

Desde hace bastante tiempo, se sabe que las mixobacterias pueden crecer rápidamente sobre bacterias, hongos filamentosos, algas verde azuladas, así como degradar macromoléculas insolubles, merced a la liberación de una gran variedad de enzimas.

La producción de enzimas en el ciclo de crecimiento vegetativo ha sido ampliamente estudiada por muchos investigadores. Así, se han demostrado en dicho ciclo enzimas lipolíticas (4, 9-10), proteolíticas (3), bacteriolíticas (5), etc. Sin embargo, estas enzimas no han sido estudiadas, hasta el momento, durante el ciclo de desarrollo. En este trabajo se demuestra la presencia de estas enzimas, las cuales podrían estar relacionadas con la lisis celular que se observa durante el ciclo de desarrollo, y además, diferencias entre una y otra raza en cuanto a estas actividades enzimáticas, podrían justificar el hecho de que *Myxococcus xanthus* MD2 fructifique y *M. xanthus* MD4, no.

Material y métodos

Cepas

Las cepas objeto de nuestro estudio fueron *Myxococcus xanthus* MD2 y *M. xanthus* MD4, que fueron suministradas por el Dr. Martín Dworkin, de la Universidad de Minnesota. Ambas cepas presentan crecimiento disperso en medio líquido. *M. xanthus* MD2 tiene

capacidad para formar cuerpos fructificantes y *M. xanthus* MD4, no.

Técnicas de cultivo

La conservación de las cepas se realizó por siembras periódicas cada 3 ó 4 días en tubos de agar casitone inclinados, incubados a 28 °C. Para conseguir el crecimiento disperso en medio líquido, se inocularon matraces Erlenmeyer de 500 ml, que contenían 80 ml de medio CT (2), con 0,5 ml de una suspensión que contenía del orden de 10^8 células/ml de *Myxococcus xanthus*. A continuación, estos cultivos se mantuvieron en agitación a 28 °C, y cuando se encontraban en fase logarítmica de crecimiento, se inocularon nuevos matraces Erlenmeyer.

Técnicas para el desarrollo en placas Petri

Se partió de un cultivo de *Myxococcus xanthus* en medio CT, a una y cuando se encontraban en fase loconcentración celular de 4×10^8 a 6×10^8 células/ml. Se procedió a su centrifugación y posterior lavado con medio CT estéril y frío. Las células obtenidas se resuspendieron en el volumen necesario de medio CT para conseguir una concentración de 5×10^9 células/ml.

Un volumen determinado (0,2 ml/placa) de esta suspensión se repartió en placas Petri de 8,5 cm de diámetro que contenían agar-agar, y se extendió uniformemente sobre cada placa de agar con una espátula de Driglasky. Posteriormente, se llevaron a incubar a 32 °C. Las placas de agar han de estar recientemente preparadas y la suspensión se debe extender sin romper la superficie del agar.

Lisis en líquido

A las 24 h de iniciarse el proceso de desarrollo, se raspó la superficie del agar con una cuchilla de afeitar, y posteriormente se recogieron las células mediante tres lavados sucesivos con tampón fosfato - magnésico (sulfato magnésico 8 mM y fosfato potásico 10 mM, pH 7,6). Se recogieron en lotes de 4 placas y por cada lote se emplearon 10 ml del citado tampón. En todas las experiencias realizadas se utilizaron 8 lotes, lo que representa un volumen total de 80 ml.

Una vez recogidas las células en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se colocaron en un agitador a 32 °C. Periódicamente se fueron realizando tomas de muestra, que se emplearon en los estudios posteriores.

Recuento del número total de células

Se efectuó un recuento directo del número total de células, empleando una cámara de Petroff-Hauser y siguiendo el método descrito por Wireman y Dworkin (11).

Preparación de las muestras

A partir de 10 ml de la muestra anterior, se procedió a su centrifugación a 1.500 × g durante 15 min, obteniéndose un sobrenadante y un sedimento. El sedimento se suspendió en 5 ml de tampón fosfato-magnésico. Ambas fracciones se valoraron inmediatamente después.

Determinación cuantitativa de la actividad esterásica

La actividad esterásica se determinó utilizando como substrato tween 20 y

siguiendo el método de Gomory y Archibald (1). La actividad se expresó en todos los casos como U/ml min. Una unidad equivale a 0,01 ml de NaOH 0,02 N consumidos en la reacción.

Determinación cuantitativa de la actividad proteolítica

Se procedió en todos los casos por el método de Häska y Noren (6), que utiliza como substrato caseína. La actividad se expresó en U/ml. Una unidad de actividad proteolítica se designó como la cantidad de enzima que libera × mol (181 µ mol × g) de tirosina/min, utilizando caseína como substrato.

Determinación cuantitativa de la actividad bacteriolítica

Se llevó a cabo empleando como susbtrato células de *Myxococcus xanthus* MD4 tratadas en autoclave y *Micrococcus lysodeikticus* desecado a la acetona. En el primer caso se siguió el método de Häska y Noren (6), mientras que frente a *M. lysodeikticus* se siguió el método de Hutterman (7). Los resultados obtenidos se han expresado en porcentajes de células no lisadas con respecto al número inicial.

Resultados

Lisis en el proceso de desarrollo

Los resultados obtenidos se exponen en la *figura 1*. Ambas cepas de *Mixococcus xanthus* sufren en el proceso de desarrollo una masiva muerte celular, aunque ésta difiere para una y otra cepa, de forma que en *M. xanthus* MD4 el proceso de lisis es mayor y más rápido; de cada 100 células (número máximo alcanzado a las 24 h en ambas cepas) a las 72 h del proceso de desarrollo, sólo sobreviven como células vegetativas un 10,65 %, mientras que en *M. xanthus* MD2 sobreviven un 38,76 %. Como podemos observar en esta misma figura, al iniciarse el proceso de desarrollo hay un aumento del número de células, hasta alcanzar un valor máximo a las 24 h de iniciado el proceso, igual para las dos cepas.

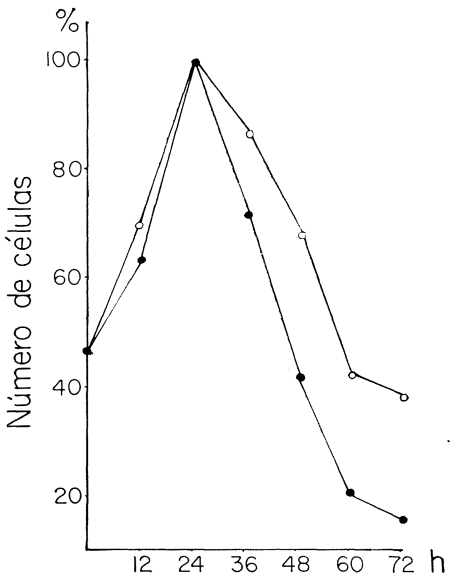


Figura 1. Número de células vegetativas (tanto por ciento máximo) en función del tiempo, en el proceso de desarrollo. ○——○ M. xanthus *MD2* y ●——● M. xanthus *MD4*

Actividad esterásica

Los resultados obtenidos para ambas cepas se exponen en la *figura 2*. Para *Myxococcus xanthus* MD2 muestran que, tanto las células como los sobrenadantes, presentan un máximo de ac-

tividad a las 36 h con un valor de 28,66 y 25,66 U respectivamente, pero al disminuir a medida que transcurre el tiempo, los sobrenadantes mantienen valores más elevados que las células.

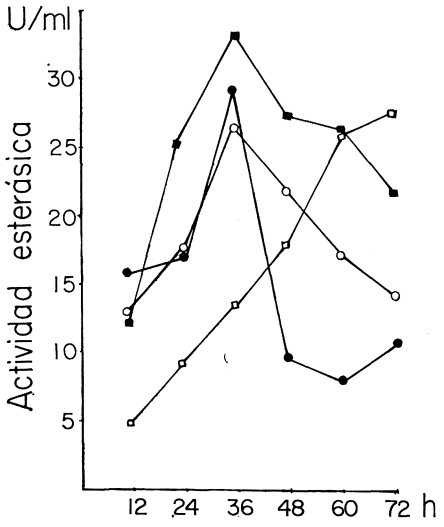


Figura 2. Actividad esterásica frente al tween 20 en el proceso de desarrollo de M. xanthus *MD2 y* M. xanthus *MD4.* ●——● *suspensiones celulares y* ○——○ *sobrenadantes de* M. xanthus *MD2.* ■ —— ■ *suspensiones celulares y* □——□ *sobrenadantes de* M. xanthus *MD4*

Para *Myxococcus xanthus* MD4 la actividad esterásica de las células alcanza también un máximo a las 36 h con 33 U/ml, pero a diferencia con la cepa anterior, la actividad para los sobrenadantes aumenta a lo largo de todo el proceso, presentando a las 72 h un valor de 27 U/ml.

Actividad proteolítica

En *Myxococcus xanthus* MD2 (*figura 3*) los sobrenadantes presentan un máximo de actividad proteolítica a las 24 h, con un valor de 18,39 mU/ml × 10, mientras que en las células la actividad sigue una curva de pendiente negativa, detectándose el valor máximo al comienzo del ciclo de desarrollo con 27,79 mU/ml × 10. En *M. xanthus* MD4 (*figura 3*) se alcanza un máximo de actividad tanto en las células como en los sobrenadantes, presentándose en aquéllas a las 24 h con 11,96 mU/ml × 10 y en los sobrenadantes a las 60 h con 18,40 mU/ml × 10.

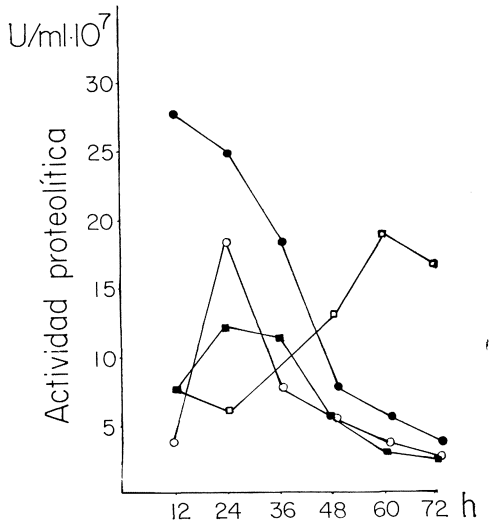


Figura 3. Actividad proteolítica frente a la caseína en el proceso de desarrollo de M. xanthus *MD2 y* M. xanthus *MD4.* ●——● *suspensiones celulares y* ○——○ *sobrenadantes de* M. xanthus *MD2.* ■ —— ■ *suspensiones celulares y* □——□ *sobrenadnates de* M. xanthus *MD4*

Actividad bacteriolítica

Los resultados se exponen en la *figura 4* y muestran que en las dos cepas estudiadas, la máxima actividad se de-

tecta a las 24 h del proceso de desarrollo, siendo en ambos casos mucho mayor frente a las células tratadas en la autoclave de *Myxococcus xanthus* MD4 que frente a *Micrococcus lysodeikticus* desecado a la acetona. Asímismo, hay que reseñar la brusca disminución de esta actividad bacteriolítica en *M. xanthus* MD2 a partir de las 24 h de iniciado el proceso de desarrollo. Por el contrario, en *M. xanthus* MD4 esta actividad mantiene valores más elevados a lo largo de todo el proceso.

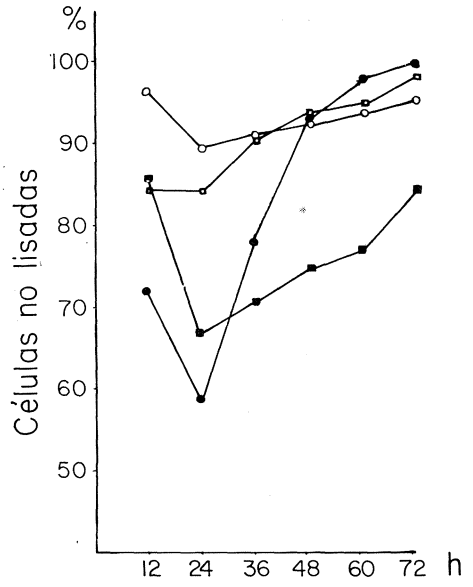


Figura 4. Actividad bacteriolítica de los sobrenadantes de M. xanthus *MD2 y* M. xanthus *MD4, en el proceso de desarrollo.* M. xanthus *MD2 sobre* ●—● M. xanthus *y* ○—○ *sobre* Mi. lysodeikticus. M. xanthus *MD4 sobre* ■ —— ■ M. xanthus *y* □—□ *sobre* Mi. lysodeikticus

Discusión

En este trabajo se ha abordado el estudio de algunas actividades enzimáticas durante el proceso de desarrollo en *Myxococcus xanthus* MD2 y *M. xanthus* MD4. En *M. xanthus* MD4, la muerte celular a lo largo del ciclo de desarrollo es mayor y más rápida que en *M. xanthus* MD2. Si se tiene en cuenta que el ciclo de desarrollo se lleva a cabo de una forma secuencial y totalmente ordenada (11), esta rápida muerte celular podría impedir alguno de los pasos esenciales para el proceso (agregación o fructificación), ya que esta cepa es incapaz de formar cuerpos fructificantes.

La actividad esterásica determinada en las suspensiones celulares fue mayor a lo largo de todo el proceso de desarrollo para *Myxococcus xanthus* MD4 que para *M. xanthus* MD2, hecho que fue también observado durante el ciclo de crecimiento vegetativo en experiencias preliminares en nuestro laboratorio.

En la actividad proteolítica de las células en suspensión no existen diferencias considerables en las dos cepas estudiadas.

Según nuestro trabajo, podemos afirmar que en *Myxococcus xanthus* MD4 las actividades proteolíticas y esterásicas extracelulares aumentan a lo largo del proceso de desarrollo, y por el contrario, en *M. xanthus* MD2, disminuyen. Este aumento en ambas actividades enzimáticas, podría explicar el hecho de que en *M. xanthus* MD4 la muerte celular sea mayor que en *M. xanthus* MD2, y que como consecuencia de ello, *M. xanthus* MD4 ha perdido la capacidad de formar cuerpos fructificantes. Por otro lado, podría pensarse que este aumento en ambas actividades se debiera a una liberación de enzimas intracelulares; si éste fuese el motivo, dicho aumento debería producirse en las dos cepas pero en *M. xanthus* MD2 la actividad

disminuye, aún cuando la lisis continúa.

Las actividades bacteriolíticas ayudan a esclarecer el mecanismo de la lisis celular, en el sentido de que se producirían enzimas que actuarían de forma más selectiva sobre capa de mureína, propia de las mixobacterias. En *Myxococcus xanthus* MD4 la actividad bacteriolítica extracelular, como ocurre con las actividades esterásica y proteolítica, mantiene niveles elevados durante todo el ciclo.

De acuerdo con al hipótesis propuesta por Oetker (8), que hace referencia a la necesidad de un contacto físico entre las células para que se inicie la lisis celular, podríamos sugerir que las enzimas unidas a estructuras celulares iniciasen el proceso de lisis que ocurre durante el ciclo de desarrollo, y que los extracelulares lo culminasen. Debido a la mayor muerte celular, que podría ser la causa de la incapacidad para fructificar que esta cepa manifiesta.

Bibliografía

1. Bier, M. 1955. Lipase. Methods Enzimol., 1, 627-41.
2. Dworkin, M. 1962. Nutritional require ments for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 84, 250-57.
3. Gnosspelius, G. 1978. Purification and properties of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*. J. Bacteriol., 133, 17-25.
4. Harcke, E.; Huttermann, A., and Kuhlwein, H. 1971. Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacteriales). I. Purification and some properties of the bacteriolytic and proteolytic activity. Arch. Mikrobiol., 77, 86-95.
5. Hart, B. A., and Zahler, S. A. 1966. Lytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 92, 1632-37.
6. Häska, G., and Noren, B. 1967. Growth and enzymes activity of *Myxococcus virescens* in liquid medium. Physiol. Plant., 20, 851-61.
7. Huttermann, A. 1969. Studies on a bacteriolytic enzymes of *Archangium violaceum* (Myxobacteriales). I. Partiel purification and properties of the enzyme. Arch. Mikrobiol., 67, 306-17.
8. Oetker, B. 1953. Nutritional requirements of Myxobacteria. Arch. Mikrobiol., 19, 206-46.
9. Rodríguez, C.; Arias, J. M.; and Montoya, E. 1979. Demonstration of cell surface enzymes with esterase activity in *Myxococcus xanthus*. Microbios Lett., 8, 129-32.
10. Sørhaug, T. 1974. Glycerol ester-hidrolase, lipase of *Myxococcus xanthus* FB2. Can J. Microbiol., 20, 611-15.
11. Wireman, J. W., and Dworkin, M. 1977. Developmental induced autolysis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. J Bacteriol., 129, 769-802.

ACTIVIDAD DEL CILIADO *ONYCHODROMUS ACUMINATUS* SORRE EL VIRUS DE LA VACUNA INCORPORADO AL MEDIO DEL PROTOZOO

S. PEREZ-PRIETO, M. A. JAREÑO y A. GARCIA-GANCEDO

Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC, Madrid

Resumen

El protozoo ciliado *Onychodromus acuminatus* es capaz de capturar el virus de la vacuna añadido al medio de cultivo del protozoo, haciéndolo desaparecer de dicho medio, dirigiéndolo y perdiendo el virus su capacidad infectiva.

Ello sugiere que este ciliado podría ejercer una acción descontaminante en las aguas donde tiene su hábitat.

Summary

The vaccinia virus is captured by the ciliate *Onychodromus acuminatus* when the virus is added to the protozoa culture medium. This culture medium is completely decontaminated and the virus inactivated in the protozoa.

This result suggest that the ciliate may be active in water decontamination.

Introducción

Continuando experimentos realizazados por nosotros (6, 9) encaminados a estudiar las posibles interacciones entre protozoos ciliados y virus que infectan a mamíferos, se presentan en este trabajo los resultados obtenidos al poner en contacto virus de la vacuna en suspensión, con cultivos de *Onychodromus acuminatus*. Con ello pretendemos determinar inicialmente el comportamiento de dicha especie de ciliado en relación con la presencia del virus vacunal, e inferir las posibles consecuencias de la coexistencia en aguas contaminadas de virus de mamíferos y protozoos ciliados, análogos al que es objeto de este estudio. El motivo de haber seleccionado el virus

de la vacuna para la realización del presente trabajo, se debe a que su estructura específica e inconfundible facilita su identificación durante las observaciones mediante microscopia electrónica.

La bibliografía sobre el tema de la interacción entre virus de mamíferos con protozoos es escasa (1, 3-4, 6, 9), y prácticamente no existen observaciones al microscopio electrónico que muestren virus de mamíferos en el interior de protozoos, lo cual confiere cierta relevancia a los resultados que se presentan en este trabajo.

Recientemente, en el 6.º Congreso Internacional de Protozoología, diversas comunicaciones presentaron datos interesantes sobre interacciones entre virus y protozoos (2, 7, 10, 12), lo que indica el interés que comienza a despertar este tipo de trabajos, que puede dar como resultado datos de interés ecológico y sanitario.

Material y métodos

Protozoo y virus

Para los experimentos realizados, hemos partido de un depósito de virus cuyo título es de $1{,}4 \times 10^6$ PFU (plaque forming units)/ml, conservado a — 70 °C.

La especie de protozoos ciliados utilizada (*Onychodromus acuminatus*) y sus características de cultivo en el laboratorio, han sido descritas previamente (5), utilizándose en este caso, como alimento adicional, cultivos axénicos de *Clorogonium*. Los cultivos de *O. acuminatus* empleados en los experimentos, se mantuvieron varias horas sin adición de *Clorogonium*, con objeto, tanto de facilitar la ingestión de los viriones, como de no introducir otro microorganismo en el experimento.

Preparación de la mezcla del virus y del protozoo

A partir de 14 ml de la suspensión de virus «stock» en medio de cultivo, sedimentamos los viriones mediante centrifugación durante 60 min a 80.000 g, en centrífuga Spinco, mod. L, resuspendiendo dicho sedimento en 5 ml de medio de cultivo de protozoos, con el fin de concentrar el virus y separar su medio de cultivo, el cual interfiere en la multiplicación de los protozoos. Un volumen de 3 ml de esta suspensión de virus se añade a un volumen de 27 ml del cultivo de protozoos que contiene 100 células/ml (recogidas bajo lupa binocular y con micropipeta). Dicha mezcla se mantiene en cápsulas de 80 mm Ø cubiertas con vidrios de reloj y a la temperatura de laboratorio. Posteriormente, se realizan tomas de muestras para su observación mediante microscopia electrónica y para la titulación del virus intracelular y extracelular. Esta titulación se realizó en membrana corioalantoidea (MCA), por el método de Nadaje y cols. (8), o en cultivos de células de embrión de pollo, en placas Petri, por el método de Dulbecco, modificado por Ronda y cols. (11), con el fin de seleccionar el procedimiento más adecuado a las condiciones de experimentación. Comprobada la idoneidad de ambas técnicas, optamos por la de Dulbecco modificada, por ser más exacta.

Paralelamente y con objeto de asegurarnos de que la interacción virus-protozoos se debía a la acción directa de *Onychodromus acuminatus*, preparamos una mezcla de protozoos lisa-

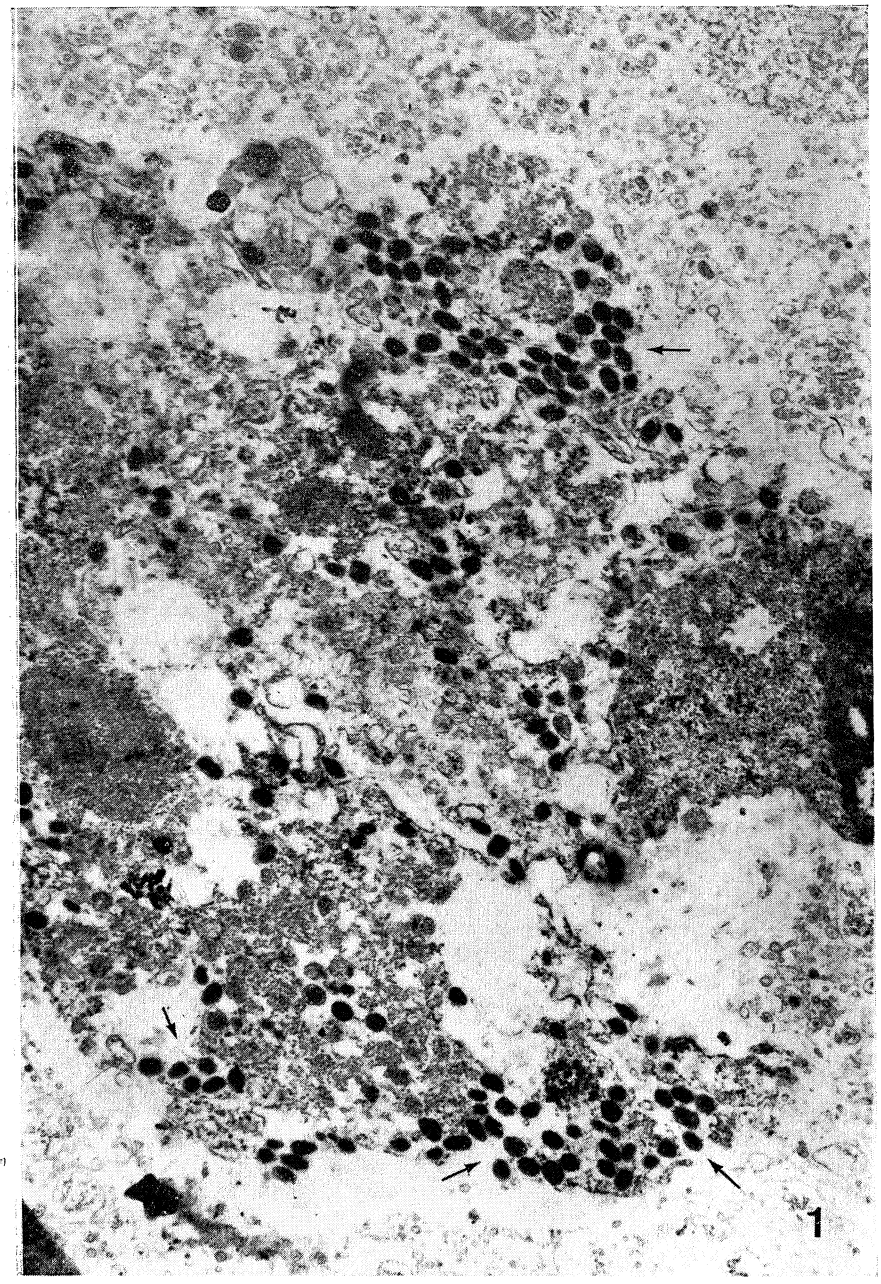


Figura 1. O. acuminatus *en contacto con el virus de la vacuna durante 30 min. Vacuola digestiva conteniendo virus. Las flechas indican virus.* × *16.000*

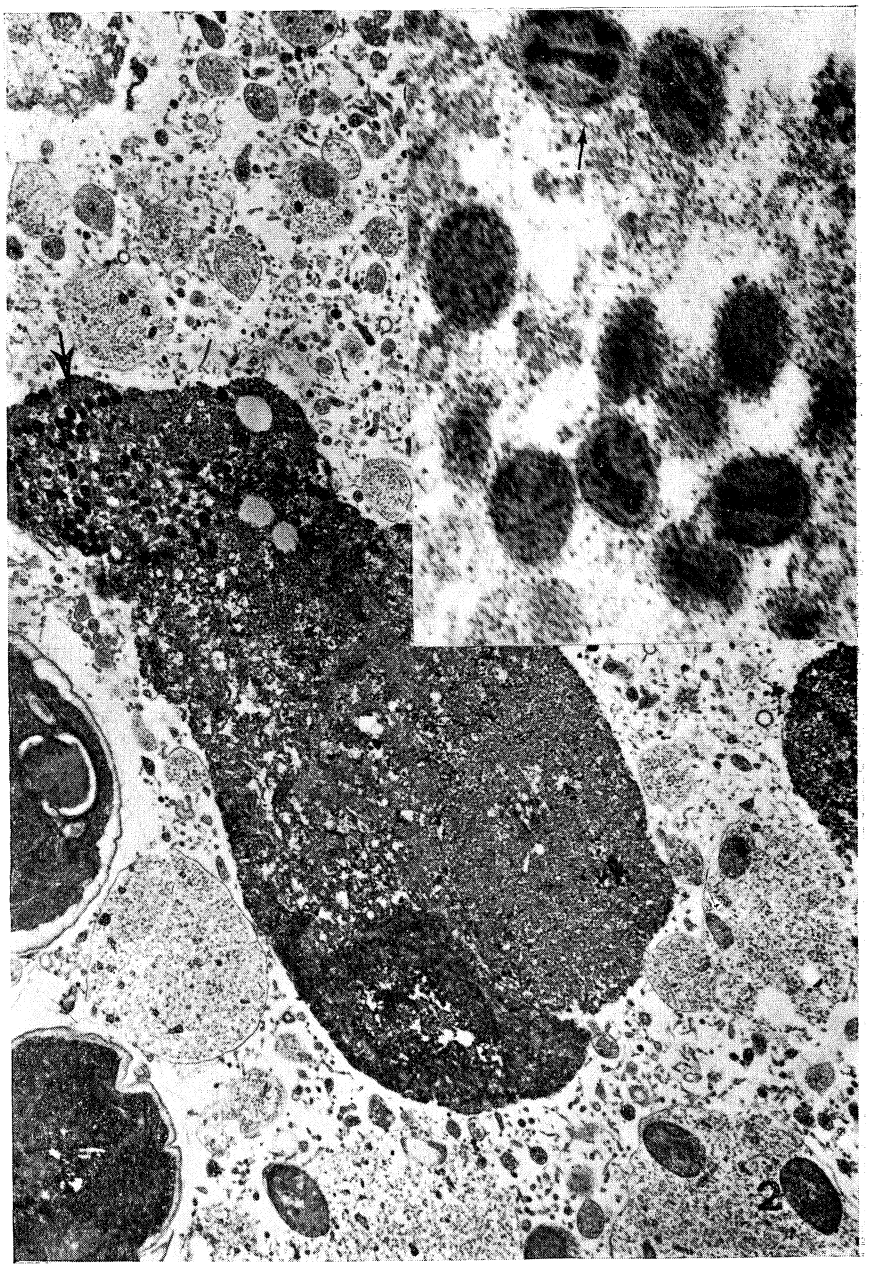


Figura 2. O. acuminatus *en contacto con el virus de la vacuna durante 2 h. Diversas vacuolas digestivas conteniendo virus. × 11.000. En el recuadro superior mayor aumento de una vacuola donde se observan viriones con su estructura bien definida. × 72.000. Las flechas indican virus*

dos resuspendidos en su medio metabolizado, con virus vacunal, y otra muestra con virus vacunal como control, en suspensión, a la misma proporción, en medio de tierra. Mantenidas ambas suspensiones a temperatura ambiente y recogidas muestras a las 3 h y 24 h, comprobamos, mediante titulación en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo, que no existían diferencias significativas del título infectivo del virus entre ambas mezclas.

Microscopia electrónica

Partiendo de muestras obtenidas de la mezcla de virus y protozoos, se recogen (bajo lupa binocular y con micropipetas) protozoos que se lavan varias veces con medio de cultivo de protozoos, y se fijan en una mezcla (v/v) de glutaraldehido al 2 %, en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4, y de osmio (OsO_4) al 2 %, en agua destilada, durante 30 min. Tras un posterior lavado con tampón fosfato, se deshidrata mediante una serie de diluciones de acetona, incluyéndose finalmente en araldita. Se obtienen cortes ultrafinos entre 400-600 Å de espesor, con un ultramicrotomo LKB, mod. B, tratándose aquéllos posteriormente y durante 15 min con acetato de uranilo alcohólico saturado, y después con citrato de plomo durante 15 min. Las preparaciones se observan en un microscopio Siemens, mod. Elmiscop.

Resultados

Protozoos y virus en contacto continuo

Mediante microscopia electrónica, se observa que a los 30 min de contacto entre virus y protozoos, aparecen gran cantidad de viriones en vacuolas digestivas (*figura 1*). Después de 120 min de contacto, también se observa el mismo fenómeno (*figura 2*).

Por otra parte, y con el fin de determinar la evolución del número de viriones, tanto en el exterior de los protozoos y en suspensión en su medio de cultivo (virus extracelular), como en el interior de los protozoos (virus intracelular), se han tomado muestras de la mezcla virus y protozoos a sucesivos períodos de tiempo, titulándose en células de embrión de pollo mediante el método de Dulbecco modificado. Dichas muestras consisten en alícuotas del medio de cultivo de los protozoos, por una parte, y por otra parte, 200 protozoos/muestra, lavados varias veces con medio de cultivo de los protozoos y suspendidos en 2 ml de medio de protozoos. Estos protozoos se rompen mediante sonicación durante 15 min, a una temperatura de 4 °C. Simultáneamente, se ha preparado como control una mezcla de virus con medio de protozoos en ausencia de éstos, pero en las mismas condiciones de volumen y temperatura, con el fin de controlar la posible pérdida de título del virus de una forma inespecífica, no debida a la acción de los protozoos.

Los resultados obtenidos se presentan en el *cuadro 1*, observándose que el virus en la mezcla control sin protozoos mantiene su capacidad infectiva durante la duración del experimento, aunque con gradual pérdida de título, probablemente por su sensibilidad a la temperatura de cultivo. En la mezcla de virus y protozoos, el número de viriones extracelulares presente en el medio de cultivo experimenta una disminución progresiva más rápida, desapareciendo a las 120 h de contacto, lo cual indica que los viriones son capturados por los protozoos presentes en el medio de cultivo; y por otra parte,

la cantidad de virus infectivo intracelular presente en el interior de los protozoos, que alcanzan un título de 6-7 × 10^2 PFU/ml entre 75 min y 3 h, decrece a un título de 2,9 × 10^2 PFU/ml a las 24 h, desapareciendo el virus a las 48 h.

Cuadro 1. Presencia de virus vacunal extracelular e intracelular en cultivo de O. acuminatus *durante 120 h de cultivo (PFU/ml). 200 protozoos/muestra*

Tiempo de contacto	Medio sin protozoos	Virus + protozoos	
		Virus extracelular	Virus intracelular
75 min	9,5 × 10^5	9,0 × 10^4	6,0 × 10^2
3 h	1,2 × 10^5	6,5 × 10^4	7,0 × 10^2
24 h	8,3 × 10^4	1,7 × 10^4	2,9 × 10^2
48 h	2,8 × 10^4	3,0 × 10^3	0
120 h	7,5 × 10^2	0	0

Protozoos y virus en contacto durante 2 h y cultivo posterior de los protozoos en medio de cultivo libre de virus

Los protozoos se mantienen en contacto con el virus durante 2 h, y después se recogen, bajo lupa y con micropipeta, muestras de 200 protozoos, lavando varias veces con medio de cultivo de los protozoos, y resuspendiéndoles en medio de cultivo nuevo sin virus. Tras 4 h de cultivo, se toman muestras de protozoos y se procesan para microscopia electrónica. Todo ello con el fin de evitar la posible captura continuada de viriones durante todo el período de cultivo y así poder controlar la evolución de los viriones tras un período de captura limitado a 2 h.

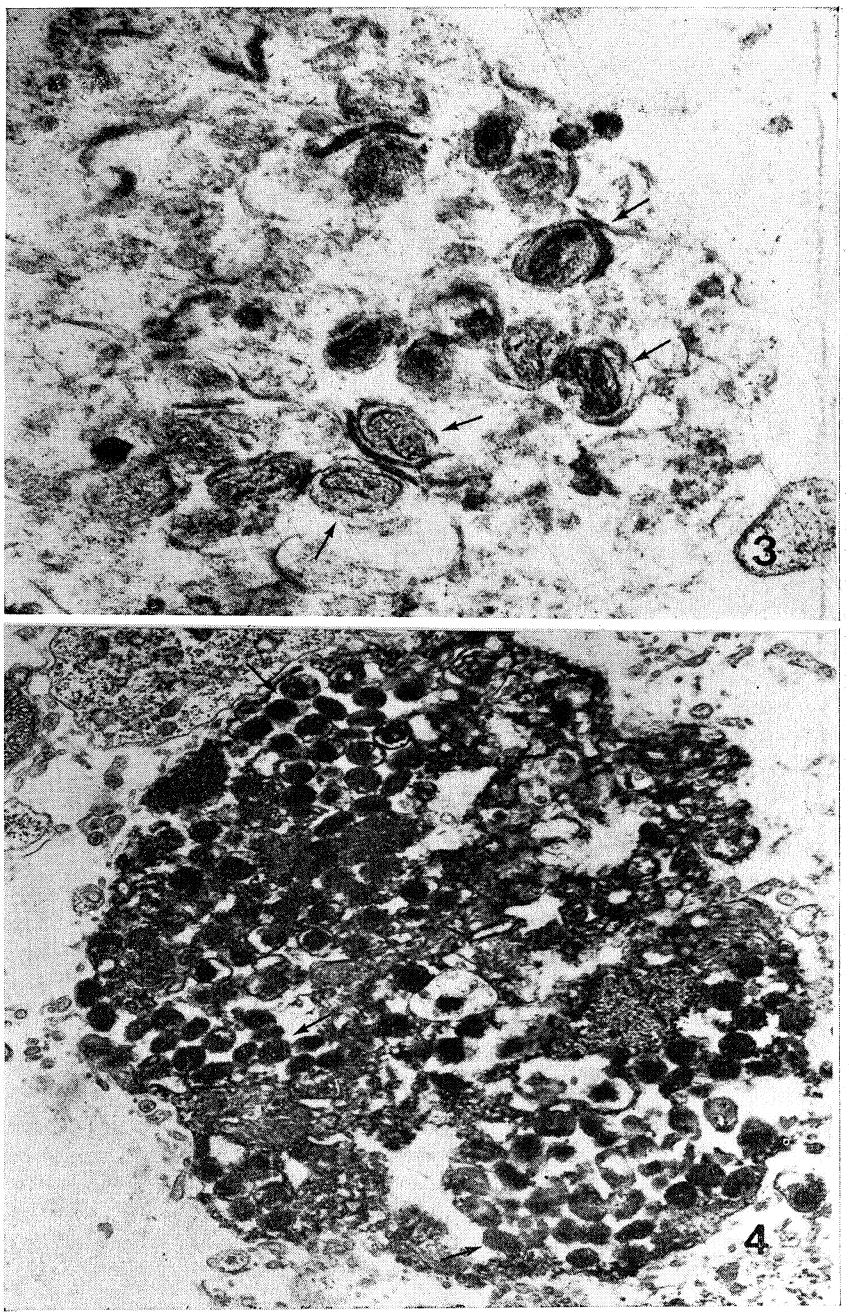
La observación mediante microscopia electrónica (*figura 3*) nos muestra que los protozoos sometidos a estas condiciones experimentales, contienen viriones en el interior de vacuolas digestivas, pero no todos mantienen su estructura totalmente íntegra, observándose incluso estructuras membranosas que podrían ser restos de la envoltura de viriones.

Protozoos en cultivo con virus incorporado periódicamente cada 7 d y 5 veces sucesivas

Con el fin de observar los posibles efectos de sucesivas reinfecciones de los protozoos con el virus vacunal, sometemos un cultivo de protozoos a la adición de virus nuevamente cada 7 d de cultivo, durante 5 veces consecutivas. Tras la última adición de virus y a los 30 min, tomamos muestras de protozoos, y asimismo 30 min antes de dicha adición de virus. Procesadas las muestras y observadas las preparaciones obtenidas mediante microsocpia electrónica, encontramos que los protozoos 30 min antes de añadir virus por 5.ª vez no contienen viriones, mientras que los protozoos 30 min después de la adición de virus presentan acúmulos de viriones en algunas vacuolas digestivas (*figura 4*) con menos frecuencia que en los experimentos anteriores, observándose una más rápida alteración de las estructuras de los viriones con respecto a los experimentos anteriores.

Discusión

Con referencia a las posibles interacciones entre virus de mamíferos y protozoos se conocen pocos datos. No



Figuras 3-4. O. acuminatus. *3) En contacto con el virus de la vacuna durante 2 h, lavado y mantenido posteriormente durante 4 h en medio libre de virus. Las flechas indican virus.* × *69.000. 4) En contacto con el virus de la vacuna una vez cada 7 d durante 35 d sucesivos y fijado 30 min después del último contacto. Vacuola digestiva conteniendo viriones. Las flechas indican virus.* × *23.000*

obstante, diversos autores han encontrado diferentes formas de interacción, tales como que el ciliado *Tetrahymena pyriformis* incorpora e inactiva el virus de la gripe, como asimismo la hemaglutinina vírica (3-4); que tras un corto período de contacto de picornavirus con *T. pyriformis*, los ciliados vivos y sus lisados producen efectos patológicos en animales de experimentación, manteniéndose dicha capacidad patogénica durante algunos años en los protozoos cultivados en medio libre de virus, induciéndose, además, variaciones antigénicas en dichos protozoos infectados con el virus (7); que *T. pyriformis* es capaz de inactivar mixovirus, y que la infección previa con picornavirus no afecta a la capacidad del protozoo para inactivar mixovirus (10); que la infección previa de *T. pyriformis* con mixovirus bloquea una segunda infección con picornavirus, estableciéndose un fenómeno de interferencia vírica (10); que el protozoo *Giardia duodenalis* resulta infectado por picornavirus, el cual persiste en los protozoos, y aún se multiplica (2); que el protozoo *Acanthamoeba castellani*, que no posee aparato oral como los anteriormente citados, es capaz de absorber en su membrana poliovirus y ecovirus, induciendo un mayor período de supervivencia de este último virus en el medio ambiente del protozoo (1).

Por nuestra parte, en un trabajo anterior (8), indicamos que el ciliado *Tetrahymena pyriformis* captura el virus de la vacuna, el cual persiste infectivo durante cierto tiempo en el interior del protozoo, lo que difiere de los resultados obtenidos en este trabajo con *Onychodromus acuminatus*, que muestran que este protozoo captura el virus presente en el medio de cultivo y lo digiere, inactivando su capacidad infectiva en un período corto de tiempo. No existen hasta ahora datos suficientes que expliquen este diferente comportamiento entre las dos especies de ciliados frente a un mismo virus, pero puede pensarse en cierta especificidad de acción propia de cada una de las especies de ciliados. En el caso de *O. acuminatus* se sugiere que puede ejercer una actividad descontaminante en aguas contaminadas.

A la vista de los resultados obtenidos hasta ahora por los diversos autores citados y por nosotros, es indudable que los protozoos son capaces de interaccionar de diversas formas con virus de mamíferos que puedan ponerse en contacto con aquéllos, tales como inactivación del virus, mantenimiento de la infectividad del virus durante períodos de tiempo más o menos largos, inducción de fenómenos de interferencia vírica y, posiblemente, incluso soportar la multiplicación del virus.

Bibliografía

1. Danes, L., and Cerva, L. 1981. Survival of polioviruses and echoviruses in *Acanthamoeba castellani* cultivated *in vitro*. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 25, 169-74.
2. Galina, L.; Teras, J., and Kesa, L. 1981. On the interaction of *Giardia duodenalis* and picornaviruses *in vitro*. Abst VI Int. Congr. Protozool. Pol., 210.
3. Groupé, V.; Herrmann (jr.), E. C., and Rauscher, F. J. 1955. Ingestion and destruction of influenza virus by free living ciliate *Tetrahymena pyriformis*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 88, 479-82.
4. Groupé, V., and Pugh, L. H. 1952. Inactivation of influenza virus and of viral hemagglutinin by the ciliate *Tetrahymena geleii*. Science, 115, 307-8.
5. Jareño, M. A. 1977. Enkystement conjoint chez un cilié hypotriche. Protistologica XIII, 187-94.

6. JAREÑO, M. A.; PÉREZ-PRIETO, S., et GARCÍA-GANCEDO, A. 1980. Étude ultrastructurale préliminaire de quelques ciliés inoculés avec le virus de la vaccine. J. Protozool., 27, 83A.
7. KESA, L., and TERAS, J. 1981. On the pathogenicity and antigenic properties of *Tetrahymena pyriformis* induced with picornaviruses. Abst. VI Int. Congr Protozool. Pol., 181.
8. NADAJE, T.; TAMM, I., and OVERMAN, J. R. 1955. A new technique for dropping the chorioallantoic membrane in embrionated chicken eggs. J. Lab. Clin. Med., 46, 648.
9. PÉREZ-PRIETO, S., and GARCÍA-GANCEDO, A. 1981. Uptake of vaccinia virus by *Tetrahymena pyriformis*. Microbiol. Españ., 34, 29-44.
10. PÉREZ-PRIETO, S.; JAREÑO, M. A., and GARCÍA-GANCEDO, A. 1981. On the possible role of certain ciliates in the uptake of the vaccinia virus: Its pathogenical or depurative potential. Abst. VI Int. Congr. Protozool. Pol., 290.
11. RONDA-LAÍN, C., and GIL-FERNÁNDEZ, C. 1970. Plaque assay in petri dishes in the absence of CO_2 atmosphere. Microbiol. Españ., 23, 61-67.
12. TERAS, J., and KESA, L. 1981. On the blocade of invasion of picornaviruses to *Tetrahymena pyriformis* due to the previous contact with myxoviruses. Abst. VI Int. Congr. Protozool. Pol., 364.

ESTUDIOS SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA DE HONGOS MICROSCOPICOS DEL SUELO. I. LOS ASCOCARPOS DE *CORYNASCELLA INAEQUALIS*

J. GUARRO

Departamento de Biología y Microbiología. Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona Reus (Tarragona)

M. J. FIGUERAS

Centrum voor Medische Elektronenmicroscopie, Rijksuniversiteit, Groningen (Holanda)

RESUMEN

Se describe la ultraestructura y desarrollo de los ascocarpos de *Corynascella inaequalis* en base a su observación mediante microscopia electrónica de transmisión y de barrido. Los ascocarpos son esféricos, superficiales y se hallan rodeados uniformemente por apéndices piliformes. Están delimitados por un peridio simple formado por varias capas de células aplanadas con los orgánulos citoplasmáticos típicos de estos hongos, destacando la presencia de vesículas y gotitas con material lipídico, plasmalemosomas asociados a los septos y cuerpos densos a los electrones. El peridio rodea una zona central, en la cual se desarrolla la ascoporogénesis, que se inicia tras la autólisis de las células parenquimatosas centrales. Las células más externas del peridio se hallan fuertemente melanizadas. Las excrecencias de los apéndices piliformes se hallan constituidas por deformaciones hacia el exterior de la totalidad de la capa externa de la pared celular de los mismos.

SUMMARY

Ascocarp ultrastructure and development in *Corynascella inaequalis* is described on the basis of observations by transmision- and scanning electron microscopy. The ascocarps are spherical, superficial and homogeneously surrounded by perithecial hairs. They are delimitated by a single peridium of several layers of flattened cells. The presence of vesicles and

droplets with lipidic material, plasmalemmasomes and dense bodies is emphasized. The peridium surrounds an ascosporogenous central cavity formed by the lysis and resorption of parenchymatous centrum cells. The outer layer of the peridium is highly melanized. The hair excrecences are produced by outward deformations of the whole outer layer of the cell wall.

Introducción

El género *Corynascella*, basado en la especie tipo *Corynascella humicola* v. Arx & Hodges, fue establecido por v. Arx (1) para agrupar aquellas especies de *Thielavia* Zopf con dos poros germinativos, situados en los extremos, y con engrosamiento de la pared celular, característico, alrededor de los mismos. Dicho género reúne las características generales de los Sphaeriales y en el mismo se incluyen además de la especie ya citada, *C. inaequalis* (Pidoplichko et al.) v. Arx (2) y *C. inquinata* Udagawa & Ueda (20), las dos primeras aisladas originalmente del suelo.

En los estudios que estamos realizando sobre hongos microscópicos del suelo, hemos encontrado recientemente una cepa que, en base a sus características morfológicas, identificamos como *Corynascella inaequalis* (14). En el presente trabajo intentamos describir algunos de los aspectos ultraestructurales más representativos de la citada cepa, con la finalidad de conseguir una mejor caracterización de la estructura y desarrollo en este grupo de hongos.

Materiales y métodos

La cepa de *Corynascella inaequalis* utilizada en este trabajo, conservada en nuestra colección (FFBA 141), fue aislada del suelo y se cultivó durante 15 d en agar extracto de malta al 2 % a 25 °C y en la oscuridad. Pequeños fragmentos del cultivo fueron fijados por inmersión en glutaraldehído, al 2 %, tamponado con cacodilato sódico 0,1 M, a pH 7,38 y a 4 °C, durante un período de 24 h, fijándose luego con tetróxido de osmio al 1 %, con el mismo tampón, durante un período de 12-14 h a la misma temperatura. Tras un lavado con agua se procedió a una deshidratación en alcoholes, desde el 30 % al absoluto.

Las muestras destinadas para su observación al microscopio elctrónico de transmisión, fueron incluidas en Epon tras los habituales pasos por alcohol absoluto y óxido de propileno. Cortes semifinos de 1 µ de grosor, obtenidos mediante un microtomo LKB, fueron teñidos con azul de toluidina al 1 %. Los cortes ultrafinos conseguidos con cuchilla de diamante fueron contrastados con solución acuosa de acetato de uranilo al 2 %, y, a continuación, tratados con citrato de plomo, según la técnica de Reynolds (18). La observación se realizó mediante un microscopio Philips 201.

Para la observación al microscopio de barrido, las muestras se sometieron a la técnica del punto crítico, previo paso por acetato de amilo, efectuándose la metalización mediante la técnica de «sputtering» (5), consistente en el metalizado de las muestras con oro y argón, alcanzándose una capa de

100-200 Å de grosor. La observación se realizó mediante un microscopio de barrido JEOL U35.

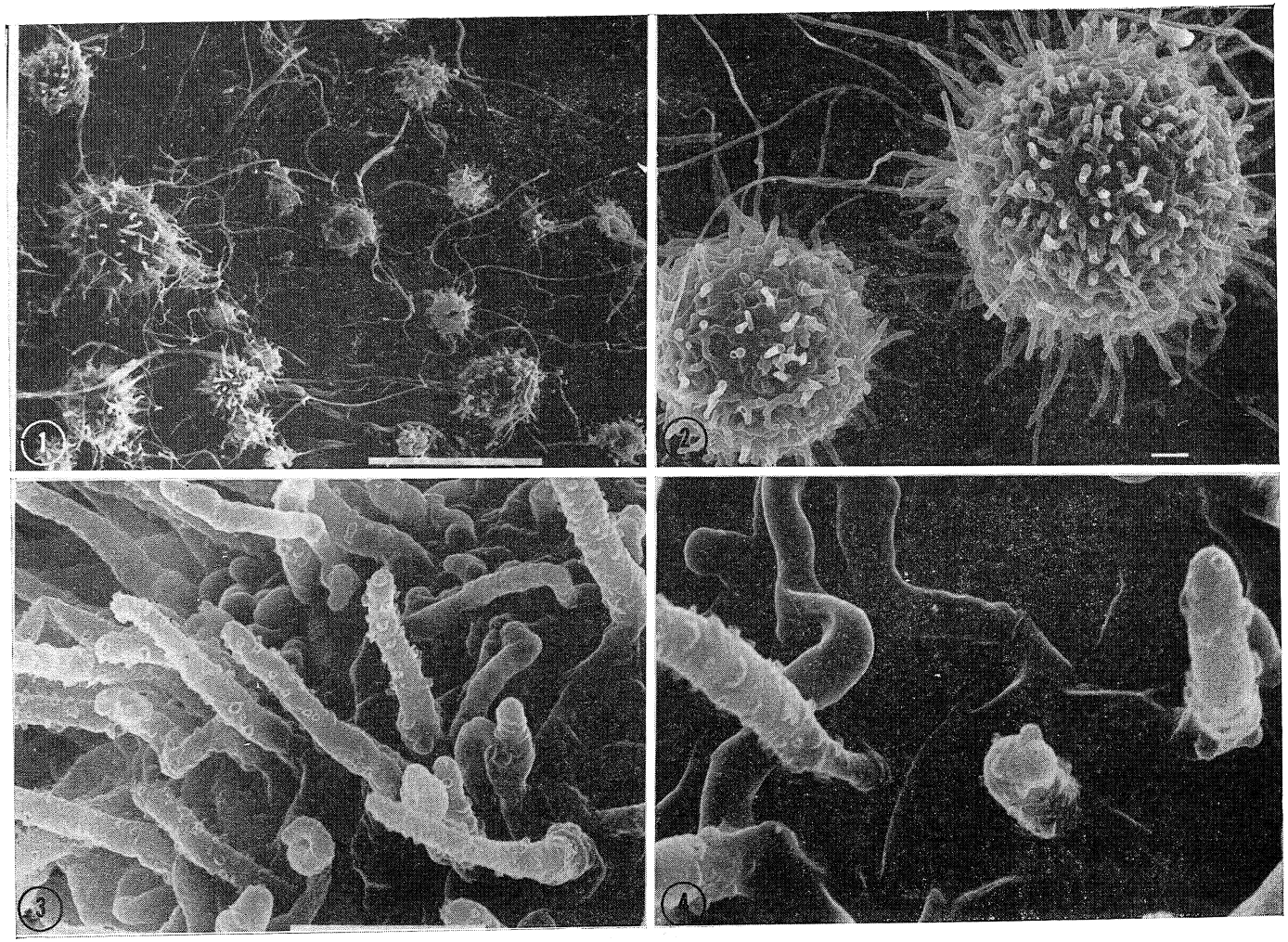
Resultados

Los ascocarpos se desarrollan en gran número sobre la superficie del medio de cultivo (*figura 1*), siendo de coloración oscura y esféricos (*figura 2*). Su tamaño suele estar comprendido entre 80 y 90 µm de diámetro. La superficie externa de los mismos está constituida por un entramado de células parenquimáticas irregulares, de 6-14 × 3-8 µm, adquiriendo una textura «epidermoidea» típica de algunos hongos de la familia Chaetomiaceae. Se hallan rodeados uniformemente en toda su superficie por apéndices piliformes (*figura 3*) de 1,5-2 µm de grosor, los cuales poseen una coloración marronácea, siendo rectos o ligeramente sinuosos y con los ápices romos (*figuras 4-5*), algunas veces presentando ramificaciones características. En un trabajo anterior (13), al ser observados estos apéndices al microscopio óptico, señalábamos la existencia de paredes rugosas; sin embargo, mediante microscopía electrónica de barrido, estas rugosidades se identifican como excrecencias de la pared celular, de diferentes tamaños, con la superficie externa irregular, desgarrada en algunos casos y otras veces incurvada o plegada hacia el interior de la luz. Las ascosporas (*figura 6*) son elípticas, con los extremos redondeados, midiendo 13-16 × 6-7 × 7-9 µm, y con un poro germinativo en cada extremo.

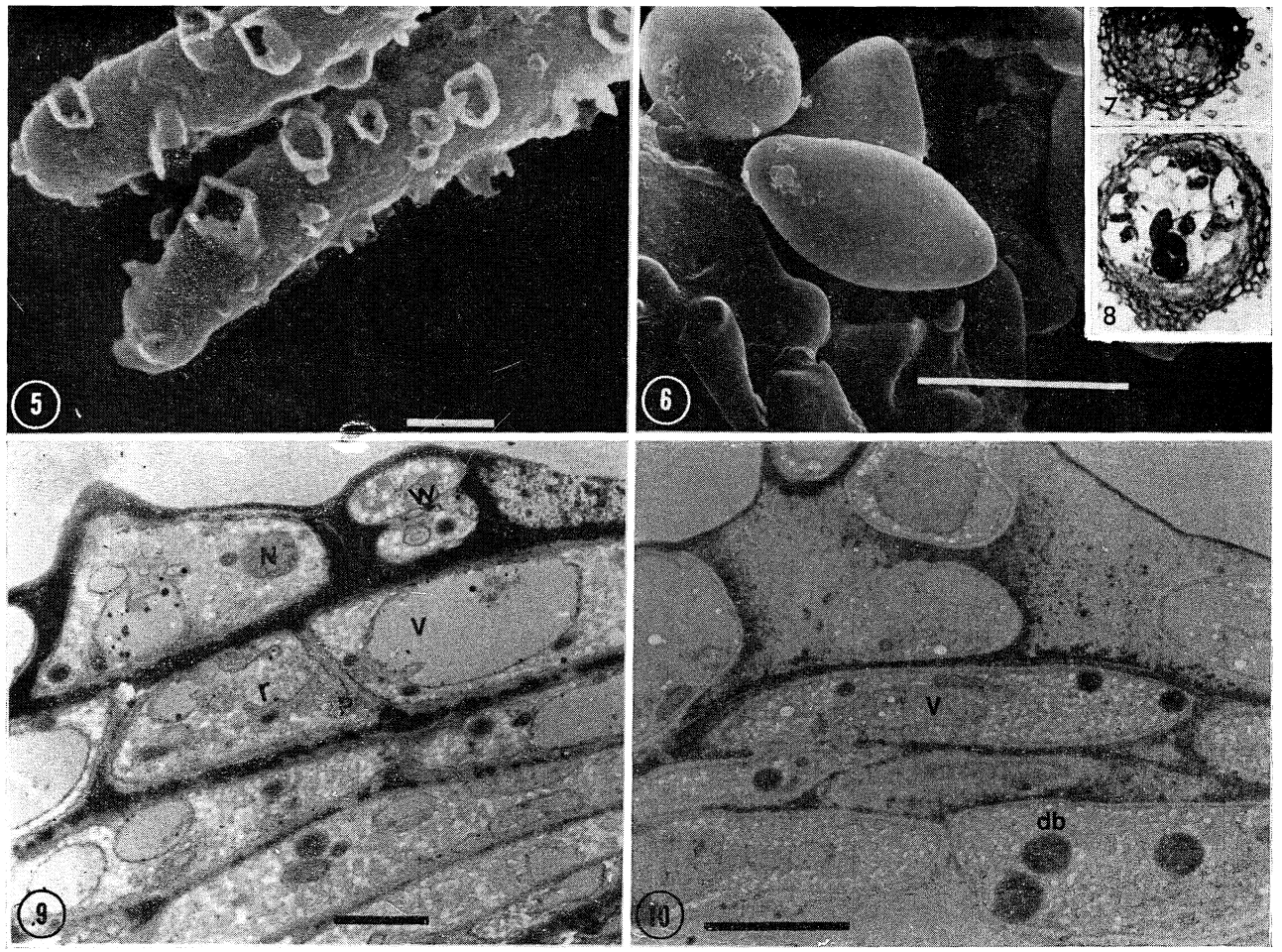
Al ser observados estos ascocarpos en sección, se aprecian dos zonas netamente diferenciadas: el peridio, o cubierta externa de protección, y el *centrum* (8), o zona donde se lleva a cabo la ascosporogénesis. En la *figura 7* puede observarse una sección de estas estructuras aún jóvenes, al microscopio óptico, apareciendo como esferas macizas, constituidas por un peridio de células aplanadas, escamosas y densamente empaquetadas, delimitando una zona central constituida por células de mayor tamaño y de tipo parenquimático. En la *figura 8* se ve un ascocarpo, ya maduro, en el que las células del *centrum* han sufrido un proceso de autólisis, quedando vacías de orgánulos, fusionándose unas con otras y dando lugar a los ascos, en cuyo seno se forman las ascosporas en número de 8.

Mediante la ayuda de la mocroscopia electrónica de transmisión, se aprecia el peridio, constituido por 2-3 capas de células aplanadas (*figuras 9-10*) de naturaleza epitelial, y con una serie de orgánulos citoplasmáticos parecidos a los que se presentan en hongos relacionados (3-4, 8). Es de destacar la existencia de grandes vacuolas con pequeños depósitos de material denso a los electrones, que en algunos casos llegan a ocupar casi todo es espacio intracelular, pequeñas gotitas constituidas probablemente por lípidos neutros (*figuras 9-10*) y cuerpos esféricos de material denso a los electrones de tamaños variables (*figura 10*), que no aparecen en los trabajos mencionados. Aparecen también plasmalemosomas asociados a los septos y al plasmalema (*figura 9*). En las células más externas se destaca una fuerte melanización de sus paredes celulares, que se extiende también hacia los espacios intercelulares.

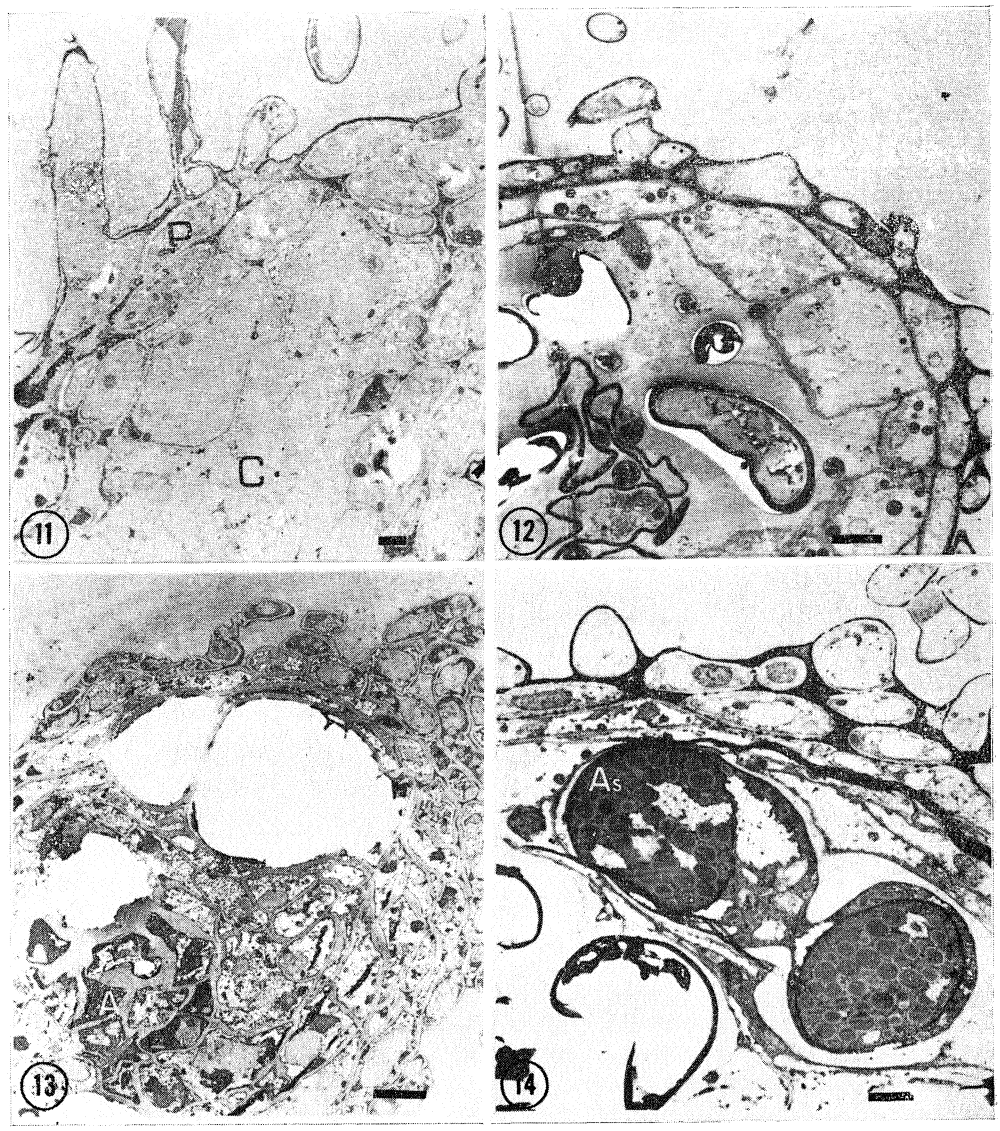
Las células del *centrum* (*figura 11*) se distinguen fácilmente de las peridiales por su coloración más clara y por sus paredes más delgadas y transparentes a los electrones. Las paredes de las células adyacentes se van fusionando a medida que van desapareciendo



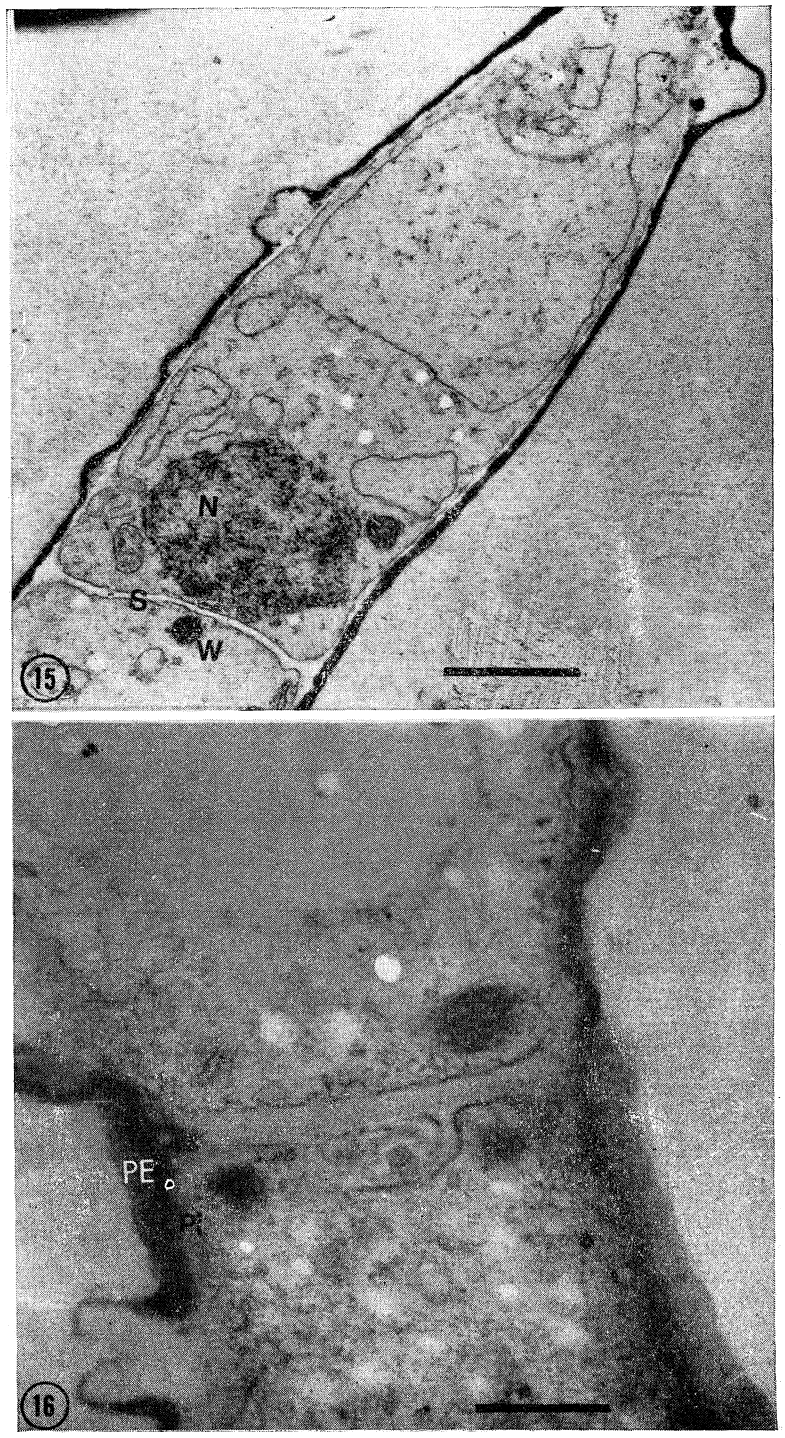
Figuras 1-4. C. inaequalis. *1) Ascocarpos en estado joven desarrollándose sobre la superficie del medio de cultivo. Escala: 100 µm.*



Figuras 5-10. C. inaequalis. *5) Detalle de los apéndices piliformes con excrecencias manifiestas. Escala: 1 µm. 6) Ascosporas maduras. Escala: 10 µm. 7) Sección de un ascocarpo en estado joven; nótense las células parenquimáticas de la zona central. 8) Sección de un ascocarpo maduro con un estado de esporogénesis avanzado. 9) Células peridiales del ascocarpo, algunas de ellas septadas y otras con doble núcleo. Escala: 1 µm. N, núcleo; V, vacuola; p, plasmalemosoma; W, cuerpo de Woronin; r, retículo endoplasmático. 10) Células peridiales con numerosos cuerpos densos a los electrones. Escala: 1 µm. db, cuerpos densos*



Figuras 11-14. C. inaequalis. *11) Zona central del peridio en la que se observa la fusión entre las paredes de sus células, como asimismo la desaparición de sus orgánulos citoplasmáticos. Escala: 1 µm. P, peridio; C, zona central. 12) Estadio más avanzado de la ascosporogénesis. Escala: 1 µm. 13) Formación de los ascos en la zona central del ascocarpo. Escala: 1 µm. A, ascos. 14) Formación de ascosporas en el interior de los ascos. Escala. 1 µm. As, ascosporas*



Figuras 15-16. C. inaequalis. *15) Sección de un apéndice piliforme en la que se observa la formación de excrecencias. Escala: 1 µm. N, núcleo; S, septo; W, cuerpo de Woronin. 16) Sección de un pelo peridial en la que se observa la ultraestructura de la pared celular. Escala: 0,5 µm. PE, zona externa de la pared; PI, zona interna*

los orgánulos intracelulares. Según Ellis (7), la diferenciación de los ascos y la lisis de las células centrales parece que ocurren simultáneamente (*figura 12*), siendo absorbido el protoplasma celular por aquéllos al desarrollarse, hasta que llegan a ocupar la mayor porción del *centrum* (*figura 13*). A continuación se constituirán las ascosporas en el seno de los ascos (*figura 14*).

Los pelos peridiales que rodean al ascocarpo están compuestos, estructuralmente, por una pared constituida por una capa interna transparente a los electrones y otra externa, fuertemente melanizada, densa a los electrones (*figura 15*). Observada con mayor detalle esta capa externa se ve que está constituida, a su vez, por dos zonas con diferente grado de melanización (*figura 16*). El citoplasma contiene los orgánulos típicos del resto de las células, y cerca del septo aparecen los cuerpos de Woronin. Se observan las excrecencias, constituidas por deformaciones, hacia el exterior de la capa externa de la pared celular, que van hinchándose y constituyendo estructuras semiesféricas y rompiéndose por el ápice al madurar.

Discusión

En *Corynascella inequalis* se observa un peridio más o menos uniforme, en toda la superficie del ascocarpo, constituido por células planas, escamosas y densamente empaquetadas, que difiere de la estructura presentada por otros grupos de hongos estrechamente relacionados. En *Chaetomium termophile* el peridio está formado por dos capas de células, la externa con célas pseudoparenquimatosas, y la interna con células aplanadas parecidas a las de nuestro espécimen; y en *C. gracile* la pared del ascocarpo está delimitada por una sola capa de 4-5 hileras de células de grosor y de tipo pseudoparenquimático (8). Ellis (8) indica que la existencia de una doble pared podría ser característica de las especies con ascos cilíndricos, mientras que las paredes simples lo podrían ser de las especies con ascos mazudos. Nuestro espécimen sería un típico ejemplo de este segundo caso, pero estamos de acuerdo con dicho autor en que deberían ser examinadas un mayor número de especies para dar validez a tal conclusión. La doble pared podría ser una adaptación de los hongos al termofilismo, quedando protegidos, de esta forma, frente a la desecación (8).

Las vacuolas con material denso a los electrones, que aparecen en el citoplasma de las células de *Corynascella inequalis*, según Ellis (9) también podrían ser consideradas orgánulos típicos de hongos termófilos. A temperaturas elevadas el material denso de naturaleza fosfolipídica estaría protegido por una membrana limitante; por otra parte, al desarrollarse los hongos a temperaturas más bajas, almacenarían gotitas de lípidos neutros desprovistas de membrana. En nuestro caso, ha sido cultivado el hongo a 25 °C, observándose una preponderancia de gotitas lipídicas en el citoplasma celular, lo que corrobora en parte el plantemiento de Ellis (9).

Referente a las excrecencias que aparecen en los pelos peridiales, Hawksworth y Wells (15) reconocieron 10 tipos de las mismas en las especies del género *Chaetomium* estudiadas, poniendo de manifiesto la verdadera naturaleza de las mismas en contra de lo expuesto por Skolko y Groves (19), quienes habían indicado que dichas

estructuras estaban constituidas por depósitos cristalinos. Estructuras parecidas han sido observadas en conidios (10-12, 17) y apéndices setiformes (16) de algunos hongos imperfectos. En un anterior trabajo (13) pusimos de manifiesto la existencia de estas estructuras externas en dos especies del género *Chaetomium*, e indicábamos que probablemente podría tratarse de un solo tipo de excrecencias con varios estadios madurativos, en vez de los 10 tipos propuestos por Hawksworth y Wells (15). Ellis (6) había señalado, en este mismo sentido, que la morfología de las excrecencias dependía del estado del citoplasma de las células adyacentes. Según dicho autor, estas excrecencias estarían formadas por un hinchamiento hacia el exterior de una cutícula superficial presente en la pared celular y quedarían separadas del pelo por la gruesa capa melanizada de la pared. En *Corynascella inequalis*, por el contrario, se observa claramente (*figuras 15-16*) que es la totalidad de la capa externa de la pared la que se deforma hacia el exterior, quedando la luz de la excrecencia en íntimo contacto con la capa interna, más clara, de la pared. Ellis (6) supone que dichas estructuras podrían funcionar como sacos llenos de mucílago capaces de poder absorber agua de las células vecinas con gran rapidez, aunque se duda de si dichas cavidades están vacías u ocupadas por material fibrilar de naturaleza desconocida.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Prof. I. Molenaar, director del Centro de Microscopia Electrónica, de la Facultad de Medicina de Groningen, y a W. Jongebloed y P. Havinga por su constante apoyo y ayuda. También queremos agradecer la ayuda a la investigación recibida por parte de la CIRIT de la Generalitat de Catalunya.

Bibliografía

1. Arx, J. A. von. 1975. On *Thielavia* and some similar genera of Ascomycetes. Stud. Mycol., 8, 1-29.
2. Arx, J. A. von. 1975. On *Thielavia angulata* and some recently described *Thielavia* species. Kavaka, 3, 33-6.
3. Beckett, A.; Heath, I. B., and McLaughlin, D. J. 1974. An Atlas of Fungal Ultrastructure. Longman, London.
4. Bracker, C. E. 1967. Ultrastructure of fungi. Annu. Rev. Phytopathol., 5, 343-74.
5. Echlin, P. 1975. Sputter coating techniques for SEM. Proc. 8th Ann. SEM Symp. IITR Chicago, 217-24.
6. Ellis, D. H. 1981. Ascocarp morphology and terminal hair ornamentation in thermophilic *Chaetomium* species. Mycologia, 73, 755-73.
7. Ellis, D. H. 1981. Ultrastructure of thermophilic fungi. II. Ascus and ascospore development of *Thermoascus aurantiacus*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 76, 467-78.
8. Ellis, D. H. 1981. Ultrastructure of thermophilic fungi. III. Ascocarp morphology of *Chaetomium thermophile* and *C. gracile*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 77, 165-77.
9. Ellis, D. H. 1982. Ultrastructure of thermophilic fungi. VI. General discussion. Trans. Brit. Mycol. Soc., 78, 305-13.
10. Ellis, D. H., and Griffiths, D. A. 1975. The fine structure of conidial development in the genus *Torula*. I. *T. herbarum* (Pers.) Link ex Gray and *T. herbarum* f. *quaternella* Sacc. Can. J. Microbiol., 21, 1661-75.
11. Ellis, D. H., and Griffiths, D. A. 1975. The fine structure of conidial development in the genus *Torula*. II. *T. cali-*

gans (Batista & Upadhay) M. B. Ellis and *T. terrestris* Misra. Can. J. Microbiol., 21, 1921-29.

12. Ellis, D. H., and Griffiths, D. A. 1976. The fine structure of conidial development in the genus *Torula*. III. *T. graminis* Desm. Can. J. Microbiol., 22, 858-66.
13. Guarro, J., y Calvo, M. A. 1982. Ornamentación de los pelos terminales de *Chaetomium montblancense* Guarro, Calvo et Ramírez y *C. teratoideum* Ames var. *minor* Guarro, Calvo et Ramírez. Bol. Soc. Micol. Cast., 7, 41-48.
14. Guarro, J., and Calvo, M. A. 1983. Soil Ascomycetes from Catalunya (Spain). VI. Nova Hedwigia, en prensa.
15. Hawksworth, D. L., and Wells, H. 1973. Ornamentation on the terminal hairs in *Chaetomium* Kunze ex Fr. and some allied genera. Mycol. Pap., 134, 1-24.
16. Jones, D. 1980. Scanning electron microscopy of cryofixed sporodochia of *Volutella ciliata*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 75, 311-13.
17. Reisinger, O., and Kiffer, E. 1974. Contribution to the fungal microflora of the Congo. IV. *Polyschema congolensis* sp. nov. Taxonomy and ultrastructure. Trans. Brit. Mycol. Soc., 62, 289-94.
18. Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, 208-12.
19. Skolko, A. J., and Groves, J. W. 1948. Notes on seed-borne fungi. V. *Chaetomium* species with dichotomously branched hairs. Can. J. Res. Sect. C, 26, 269-80.
20. Udagawa, S., and Ueda, S. 1979. *Corynascella inquinata*, a new cleistothecial Ascomycete from sewage sludge. Mycotaxon, 8, 292-96.

ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES ESTIRPES DE *NAEGLERIA*

ELENA ZUBIAUR y PILAR ALONSO
Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, CSIC, Madrid

RESUMEN

En este estudio se han utilizado dos estirpes de *Naegleria gruberi* (1518/1f y 1518/1e) y *N. lovaniensis*. Puesto que las estirpes patógenas de *Naegleria* son termófilas, la temperatura normal de cultivo de nuestras estirpes (30 °C) se aumentó a 34 °C y 37 °C, consiguiéndose una adaptación temporal a dichas temperaturas. Las dos estirpes de *N. gruberi* sólo soportaron varios pases, y *N. lovaniensis* se mantuvo indefinidamente a temperaturas elevadas, por lo que se inoculó a embriones de pollo, no provocando lesiones, pero pudiendo aislarse nuevamente de algunos de sus órganos.

Dado que las estirpes patógenas de *Naegleria* tienen gran avidez por el tejido cerebral, se complementó el medio de cultivo bien con una suspensión de cerebro de ratón o con el fosfolípido l-α-cefalina (dipalmitoil). Se obtuvo una estimulación del crecimiento en ambos casos, aunque fue disminuyendo en pases sucesivos. Al inocular las amebas crecidas en medio con cefalina a ratones, no se apreció ninguna virulencia, ni aún con *N. lovaniensis*, especie conocida como citopática.

SUMMARY

In the present study two strains of *Naegleria gruberi* (1518/1f and 1518/1e) and *N. lovaniensis* have been used. Since the pathogenic strains of *Naegleria* are thermophilic, the normal culture temperature of our strains (30 °C) was raised to 34 °C and 37 °C, and a transient adaptation to such temperatures was obtained.

Both *Naegleria gruberi* strains tolerate only a few passages, but *N. lovaniensis* could be maintained longer at high temperatures. The latter was inoculated to chick embryos provoking no lesions, but it could be again isolated from some of their organs.

Due to the high avidity of *Naegleria* pathogenic strains for cerebral tisue, the normal culture medium was supplemented well with a mouse brain suspensión or with the phospholipid l-α-cephaline (dipalmytoil). In both cases a growth stimulation was obtained, although it was decreasing with successive transfers.

When amoebae grown in culture medium supplemented with cephaline were inoculated to mice no virulence was appreciated, even in the case of *Naegleria lovaniensis*, strain well known as cytopathogenic.

Introducción

Hace relativamente pocos años se identificaron algunas amebas de vida libre como causantes de la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), enfermedad fatal para el hombre.

Uno de los principales agentes causantes de la MEAP es *Naegleria fowleri* (1); en cambio, otras meningoencefalitis pueden deberse a especies de *Acanthamoeba*. Esta enfermedad y sus agentes causantes han despertado la atención de numerosos investigadores y dado lugar a bastantes publicaciones y revisiones (3, 7, 9, 13), algunas de ellas muy recientes (4, 12).

La mayor parte de los casos descritos de esta enfermedad eran de jóvenes que habían frecuentado piscinas climatizadas, ríos con aportes de aguas calientes de origen industrial, lagos termales, etc. La vía de entrada de las amebas era la cavidad nasofaríngea con rápida invasión cerebral.

La capacidad de este tipo de amebas de crecer a temperaturas elevadas, parece que está directamente relacionada con su virulencia. Sin embargo, hay estirpes no patógenas capaces de desarrollarse a estas mismas temperaturas (6, 14). Asimismo, se ha comprobado que estirpes patógenas pierden su carácter virulento en condiciones prolongadas de cultivo axénico, el cual puede recuperarse por pases seriados en animales de experimentación. Realmente no se tiene una idea clara sobre la barrera que separa las estirpes patógenas de las no patógenas de *Naegleria*; incluso en un trabajo reciente (14) se ha descrito una nueva especie termófila, *N. lovaniensis*, emparentada estrechamente con la patógena *N. fowleri* y que, sin ser virulenta para animales, produce efecto citopático en cultivos celulares.

Algunos autores han descrito medios de cultivo que permiten la selección de estirpes patógenas de *Naegleria* de las no patógenas, en base a las diferencias nutricionales de estas amebas, puesto que las no patógenas son más exigentes.

En este trabajo hemos utilizado *Naegleria lovaniensis* y dos estirpes de *N. gruberi* que sin ser patógenas crecen en un medio descrito para cultivar estirpes patógenas. Los datos indicados nos han inducido a intentar provocar el carácter patógeno potencial de estas tres estirpes.

Material y métodos

Microorganismos

Se han utilizado dos estirpes de *Naegleria gruberi* (1518/1f y 1518/1e) y *N. lovaniensis*, amablemente suminis-

tradas por el Dr. De Jonckheere, del Instituto de Higiene y Epidemiología de Bruselas.

Medios de cultivo

Las tres estirpes de amebas se han mantenido en medio axénico SCGYEM, compuesto por suero fetal de ternera, caseína isoeléctrica, glucosa, extracto de levadura y sales (5). Las amebas se incubaron a 30 °C en un volumen de 5 ml en tubos Pirex de 16 × 160 mm con un 5 % de inclinación, y los pases a nuevo medio se llevaron a cabo en un período entre 5 d y 15 d.

Se han realizado algunos ensayos introduciendo variaciones en el medio normal de cultivo: sustitución total de la fracción serosa del medio SCGYEM, por un 10 %, 5 % y 1 % de cerebro triturado en 4 ml de solución salina, obtenido estérilmente de ratones Balb/c; sustitución parcial del suero (5 % suero + 1 % cerebro), y adición, por último, de 0,5 % de cerebro al medio completo.

Otra variación ha consistido en complementar el medio de cultivo conteniendo un 5 % de suero fetal de ternera, con el lípido cerebral l-α-cefalina (dipalmitoil). Usando técnicas asépticas, el fosfolípido se disolvió en una mezcla de cloroformo y metanol (en proporción 2:1) y se añadió al medio a una concentración de 50 µg/ml. Todos los cultivos contenían, además, penicilina y estreptomicina a una concentración final de 200 U/ml y a 200 µr/ml, respectivamente.

Determinación de la densidad de población

La densidad de población se determinó mediante dos métodos: por recuento directo del número de células en un hemocitómetro (Neubauer de Leitz), o por lecturas de absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 70 de Bausch & Lomb). Las medidas en ambos métodos se realizaron a intervalos de 24 h en cultivos previamente agitados, y siempre por duplicado.

Obtención de extractos celulares

Las tres estirpes de *Naegleria* se cultivaron durante 96 h a 30 °C, en volúmenes de 50 ml de medio en frascos Roux de plástico de 75 cm² de superficie, con tapón de rosca. Para la obtención de los extractos celulares, se ha seguido el método de Visvesvara y Healy (15), aunque la ruptura de las amebas se ha realizado por congelaciones y descongelaciones repetidas.

La determinación de proteínas se realizó según el método de Lowry y cols. (11).

Las electroforesis se realizaron siguiendo el método de Weber y Osborn (16) en geles de poliacrilamida al 5-10 %, empleándose una corriente constante de 3 mA/gel durante 2 h.

Una vez realizada la electroforesis, los geles eran introducidos en un densitómetro y trazados sus perfiles correspondientes.

Pruebas de patogenicidad en animales

Para las pruebas de patogenicidad de las tres estirpes de *Naegelia* (*N. lovaniensis*, *N. gruberi* 1518/1f y *N. gruberi* 1518/1e), se utilizaron 20 ratones hembras Balb/c de 3-4 semanas, que fueron inoculados intranasalmente con amebas crecidas en el medio normal de cultivo, en un volumen de 50 µl. Las dosis/ratón fueron

de 2×10^3 amebas de cada una de las tres estirpes; *N. lovaniensis* se inoculó, además, a las concentraciones de 5×10^3 y 1×10^4 amebas/ratón. Los ratones testigo se inocularon con el mismo volumen de medio estéril.

Posteriormente y con el mismo objeto, se utilizaron 40 ratones hembras Balb/c de la misma edad, que fueron inoculados en la cavidad retroorbital con amebas crecidas en medio SCGYEM o en medio complementado con l-α-cefalina (después de 4 pases en este último). Los ratones fueron previamente anestesiados con éter. Se realizaron dos inoculaciones separadas por un período de 15 d. En la primera, grupos de 5 ratones fueron inoculados con 4×10^4 amebas de cada una de las tres estirpes en 0,1 ml de medio normal de cultivo, y otros grupos fueron inoculados con 2×10^4 amebas crecidas en medio complementado con l-α-cefalina. Como testigos se utilizaron 2 lotes de 5 ratones, uno de los cuales permaneció sin tratar y el otro se inoculó con 0,1 ml de medio estéril.

A los 15 d, se les suministró una segunda dosis, más concentrada, de amebas por la misma vía retroorbital (1×10^5 trofozoitos/ratón).

Asimismo, para las pruebas de patogenicidad de *Naegleria lovaniensis* se utilizaron 30 embriones de pollo de 11 d, variando tanto el inóculo (cultivos crecidos a 30 °C y 37 °C), como la vía de inoculación (cámara alantoidea, saco vitelino o saco alantoideo). El inóculo/embrión consistió en 0,2 ml de medio SCGYEM que contenía 4,8 $\times 10^4$ trofozoitos cultivados a 30 °C, ó $3,2 \times 10^3$ trofozoitos cultivados a 37 °C. Un grupo testigo se inoculó por las mismas vías con 0,2 ml de medio de cultivo estéril y otros permanecieron sin ningún tratamiento, realizándose cada ensayo por triplicado.

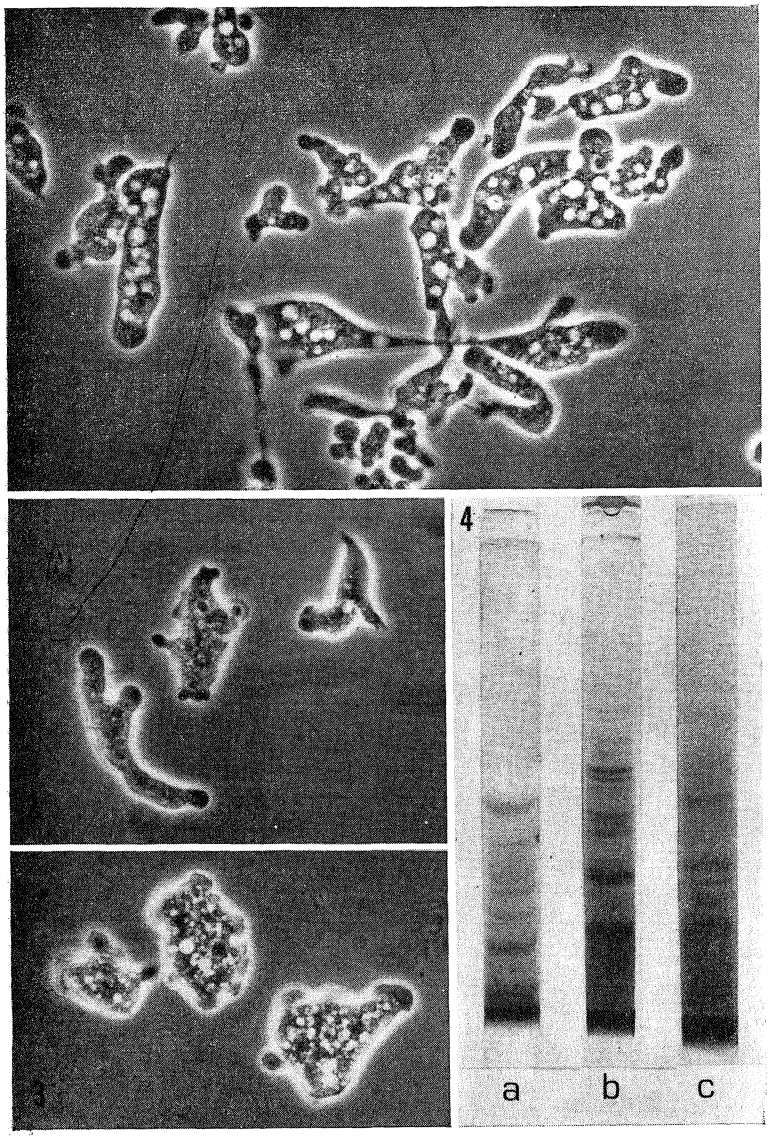
Resultados

Las tres estirpes de *Naegleria* se han examinado al microscopio óptico, observándose el gran parecido morfológico que existe entre ellas, aunque presentan ligeras diferencias según puede apreciarse en las *figuras 1-3*, correspondientes a cultivos de 96 h. Los trofozoitos de *N. lovaniensis* presentan un citoplasma muy vacuolizado; son muy pleomórficos y su tamaño oscila entre 20-50 µm de largo × 12-20 µm de ancho. En cambio, en las dos estirpes de *N. gruberi*, el citoplasma presenta vacuolas mucho menores, sobre todo en *N. gruberi* 1518/1f. Ambas estirpes poseen con frecuencia formas vegetativas polipodiales, y sus dimensiones varían de 35-45 µm de largo × 8-20 µm de ancho en *N. gruberi* 1518/1f y de 25-50 µm de largo × 20-30 µm de ancho en *N. gruberi* 1518/1e.

Sin embargo, debido a su pleomorfismo, dichas estirpes de *Naegleria* resultan con frecuencia difíciles de diferenciar, por lo cual se procedió al análisis de sus proteínas totales mediante electroforesis, con el fin de facilitar su identificación. Al comparar los proteinogramas se aprecia que cada estirpe presenta su propia distribución de bandas (*figura 4*).

En la *figura 5* se muestran los resultados obtenidos de las electroforesis utilizando muestras hervidas de *Naegleria lovaniensis* crecida tanto a 30 °C (a), como a 37 °C (b). Al comparar ambos perfiles puede comprobarse que una de las bandas centrales (marcada con una flecha) no se aprecia en el correspondiente a 37 °C.

Se han determinado las curvas de crecimiento en condiciones normales de cultivo, mediante recuentos celulares diarios hasta las 96 h de cultivo,



Figuras 1-4. 1-3) Trofozoitos de cada una de las tres estirpes de Naegeria, *procedentes de cultivos de 96 h en medio SCGYEM. Preparaciones en fresco, contraste de fases. 1)* N. lovaniensis. *Obsérvese el citoplasma muy vacuolizado. 2) Trofozoitos de* N. gruberi *1518/1f con citoplasma poco vacuolizado. 3)* N. gruberi *1518/1e. Predominio de trofozoitos ensanchados con lobopodis cortos. 4) Proteinogramas de las tres estirpes de* Naegleria *crecidas en medio SCGYEM a 30 °C. Muestras hervidas. a:* N. lovaniensis; *b:* N. gruberi *1518/1f; c:* N. gruberi *1518/1e*

momento en el cual se alcanza la máxima densidad de población. Cada estirpe de *Naegleria* presenta una curva de crecimiento diferente (*figura 6*), siendo *N. lovaniensis* la que tiene la tasa de crecimiento más elevada, con una máxima densidad de población (MDP) de 6 × 10^5 células/ml a las 96 h; la sigue *N. gruberi* 1518/1f con una MDP de 4 × 10^5 células/ml, y finalmente *N. gruberi* 1518/1e, con la menor tasa de crecimiento y una MDP de 1,5 × 10^5 células/ml.

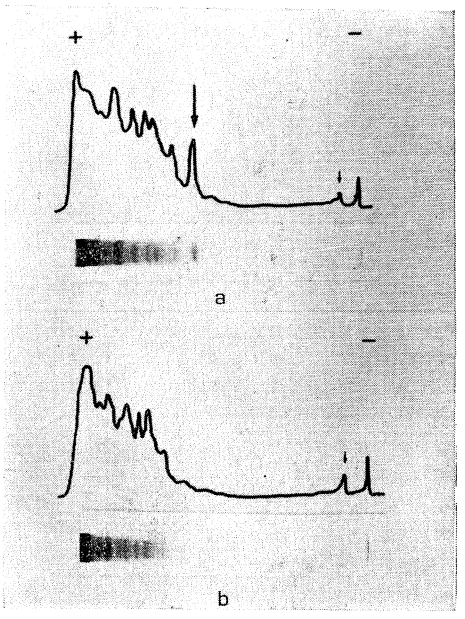


Figura 5. Proteinogramas y perfiles densitométricos de N. lovaniensis. *Muestras hervidas: a) procedentes de cultivos a 30 °C, b) procedentes de cultivos a 37 °C. La flecha indica el comienzo del gel de poliacrilamida al 10 %. La flecha grande indica la banda no detectable a 37 °C*

Con el fin de evitar el recuento manual de células en el hemocitómetro, se intentó determinar la densidad de población por medio de los valores de la absorbancia registrada en un espectrofotómetro. Se realizaron varios experimentos con cada una de las tres estirpes de *Naegleria*, determinando simultáneamente en cada cultivo el número de células y la densidad óptica correspondiente, según se muestra en la *tabla 1*. Con el fin de comprobar la correlación entre los valores obtenidos del número de células y de la densidad óptica correspondiente, se calcularon las líneas de regresión, observando que los datos experimentales se ajustaban estrechamente a los calculados, obteniéndose coeficientes de correlación

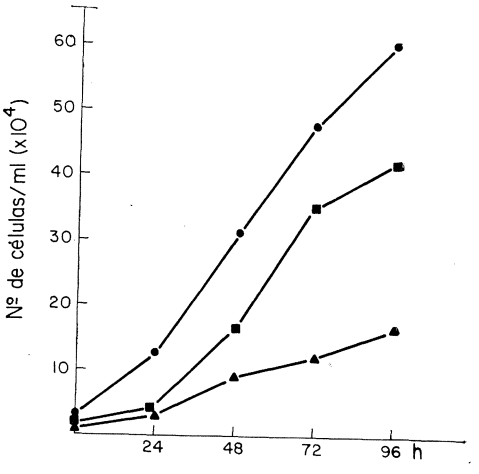


Figura 6. Crecimiento de las tres estirpes de Naegleria *en medio SCGYEM a 30 °C.* N. lovaniensis, ●; N. gruberi *1518/1f*, ■; N. gruberi *1518/1e*, ▲

de $r \geqslant 0{,}98$. Con la ayuda de estas gráficas puede determinarse el número de células correspondiente a una determinada densidad óptica hasta un máximo de 96 h de cultivo.

Tabla 1. Valores de número de células y densidad óptica en las tres estirpes de Naegleria

Estirpe	Edad del cultivo h	Densidad óptica	Número de células $\times 10^4$
N. lovaniensis	0	0,019	3,21
	24	0,057	12,60
	48	0,148	31,38
	72	0,216	47,49
	96	0,282	59,88
N. *gruberi* 1518/1f	0	0,020	1,72
	24	0,043	4,10
	48	0,091	16,44
	72	0,174	34,88
	96	0,226	41,00
N. gruberi 1518/1e	0	0,012	1,00
	24	0,032	3,11
	48	0,068	9,13
	72	0,118	12,00
	96	0,160	16,55

Variaciones de las condiciones de cultivo

Variaciones de temperatura. Una vez establecidas las curvas de crecimiento de cada estirpe en las condiciones normales de cultivo (30 °C), se han determinado, además, las correspondientes de *Naegleria lovaniensis* y *N. gruberi* 1518/1f, a 34 °C y 37 °C, después de un pase previo de aclimatación a dichas temperaturas. En *N. lovaniensis* la tasa de crecimiento a las tres temperaturas ensayadas se mantuvo aproximadamente igual hasta las 72 h de cultivo, momento a partir del cual la densidad de población disminuía a medida que aumentaba la temperatura.

En *Naegleria gruberi* 1518/1f la densidad de población disminuía a medida que la temperatura era más elevada, empezando a destacarse estas diferencias a partir de las 24 h de cultivo, y siendo muy marcadas a las 96 h de incubación.

En subcultivos sucesivos a 34 °C y 37 °C, se pudo comprobar que en las dos estirpes de *Naegleria gruberi* la tasa de crecimiento disminuía gradualmente hasta desaparecer al cuarto o quinto pase semanal. En cambio, en *N. lovaniensis* se mantenían los cultivos después de numerosos pases sucesivos, aunque la tasa de crecimiento iba disminuyendo paulatinamente.

Variaciones en la composición del medio de cultivo. Se ha sustituido total o parcialmente la fracción serosa del medio normal de cultivo por una suspensión de cerebro de ratón en solución salina, o bien se ha complementado con dicha suspensión. Dado que el cerebro triturado enturbia el medio de cultivo, las densidades de población se estimaron por recuento del número de células y no por densidad óptica.

Como puede observarse en las diferentes curvas de crecimiento de *Naegleria lovaniensis* (*figura 7*), a las 24 h de cultivo ya hay una estimulación del crecimiento en todos los tubos tratados con cerebro, respecto al testigo. Esta estimulación va haciéndose más marcada a lo largo del tiempo, obteniéndose a las 96 h de cultivo en el medio con un 5 % de suero + 1 % de cerebro, la mayor densidad de población ($7,6 \times 10^5$ células/ml frente a 5×10^5 células/ml de los tubos testigo). En los medios sin suero y con un 5 % y 10 % de cerebro, se obtuvo la máxima densidad de población a las 168 h de cultivo.

En otros experimentos realizados en estas mismas condiciones, los resulta-

dos obtenidos no fueron todo lo homogéneos que cabría esperar, dada la complejidad del material utilizado. Por ello, nos vimos obligados a seleccionar un compuesto fácilmente cuantificable que estuviera presente en el cerebro.

En *Naegleria lovaniensis* y *N. gruberi* 1518/1e esta estimulación se observa desde las primeras horas de cultivo, alcanzando a las 96 h unas densidades de población de 9,3 × 10^5 células/ml y 2,9 × 10^5 células/ml, respectivamente, frente a sus correspon-

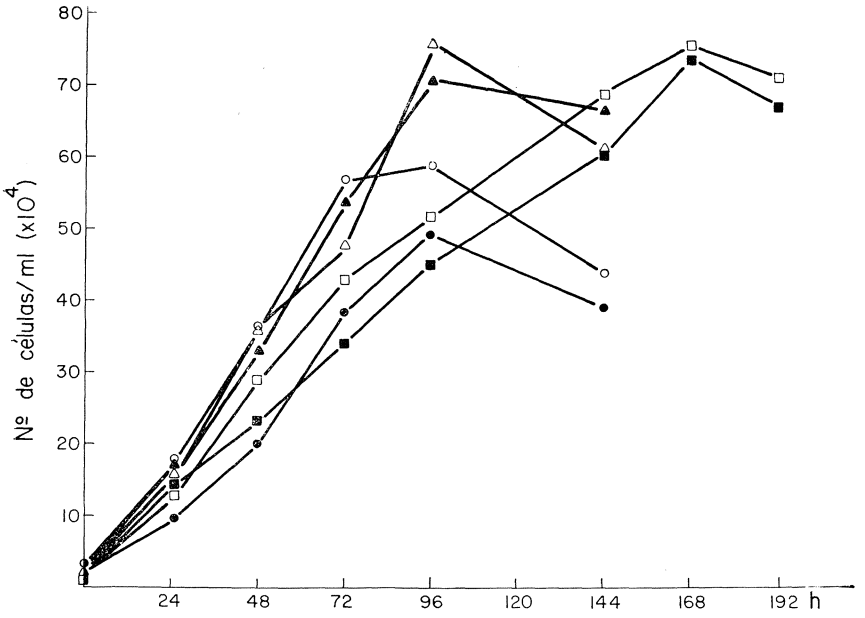


Figura 7. Crecimiento de N. lovaniensis *en medio SCGYEM sustituyendo o complementando la fracción sérica con una suspensión de cerebro de ratón. SCGYEM,* ●; *SCGYEM + 0,5 % cerebro,* ▲; *SCGYEM sin suero + 10 % cerebro,* ■; *SCGYEM sin suero + 5 % cerebro,* □; *SCGYEM sin suero + 1 % cerebro,* ○; *SCGYEM con 5 % de suero + 1 % cerebro,* △

De este modo, se realizaron una serie de experimentos con el lípido cerebral l-α-cefalina (dipalmitoil), como complemento al medio, con un 5 % de suero. La adición de dicho fosfolípido provocó la estimulación de la tasa de crecimiento en las tres estirpes de *Naegleria* (*figura 8*), análogamente a los resultados obtenidos con cerebro de ratón.

dientes testigos (5,9 × 10^5 células/ml y 1,9 × 10^5 células/ml).

En *Naegleria gruberi* 1518/1f no se observa un aumento claro de la densidad de población hasta las 96 h de cultivo con 6,5 × 10^5 células/ml, frente a 3,8 × 10^5 células/ml en el testigo.

En pases sucesivos en dicho medio con l-α-cefalina se comprobó que di-

cha estimulación del crecimiento se perdía en las tres estirpes de *Naegleria*, obteniéndose densidades de población inferiores a las de los testigos.

Pruebas de patogenicidad en animales

En las primeras pruebas de patogenicidad en ratones, inoculados por vía intranasal con cada una de las tres estirpes de *Naegleria* en SCGYEM, no se observó ningún efecto patógeno.

En pruebas posteriores, los ratones inoculados por vía retroorbital con trofozoitos crecidos, tanto en SCGYEM como en medio complementado con l-α-cefalina, tampoco presentaron ningún síntoma anormal, incluso después de la administración de la segunda dosis más concentrada de amebas.

En las pruebas de patogenicidad de *Naegleria lovaniensis* con embriones de pollo, tampoco se obtuvieron resultados positivos. Los embriones siguieron su desarrollo normal hasta el momento de su disección, a los 4 d de la inoculación.

Como resultado de las observaciones minuciosas realizadas en los diferentes órganos y tejidos de dichos embriones, solamente se pudieron apreciar amebas, en un número muy reducido, en el líquido alantoideo de los embriones inoculados en el saco alantoideo. Un volumen pequeño de dicho líquido se añadió a medio SCGYEM obteniéndose cultivos abundantes de *Naegleria lovaniensis*, que se mantuvieron perfectamente viables incluso a los 15 d de cultivo.

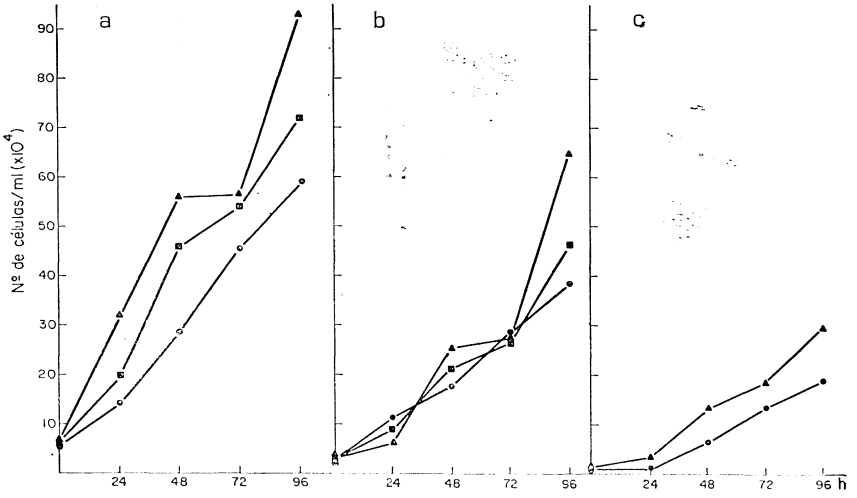


Figura 8. Crecimiento de cada una de las tres estirpes de Naegleria *en medio SCGYEM con 5 % de suero complementado con l-α-cefalina: a)* N. lovaniensis, *b)* N. gruberi *1518/1f, c)* N. gruberi *1518/1e. SCGYEM,* ●*; SCGYEM con 5 % de suero + cloroformo: metanol (2:1),* ■*; SCGYEM con 5 % de suero + l-α-cefalina,* ▲

Discusión

Aunque generalmente no se han apreciado diferencias morfológicas aparentes entre los trofozoitos de diferentes especies de *Naegleria* (13, 15), en este trabajo hemos podido comprobar que sí existen diferencias cuando se observan cultivos abundantes de cada una de las tres estirpes aquí estudiadas. Sin embargo, cuando se han examinado amebas aisladas, las diferencias entre ellas no son tan apreciables.

Como resultado de los electroforetogramas obtenidos, también hemos encontrado diferencias marcadas entre las tres estirpes estudiadas.

Generalmente, en publicaciones sobre amebas, la densidad de población viene determinada mediante recuentos en contador Counter o en hemocitómetro; incluso se ha llegado a preferir este último método (2). Hemos comprobado que utilizando valores de absorbancia, se obtenían resultados satisfactorios para determinar la densidad de población, ya que, mediante recuentos paralelos en hemocitómetro, se pudo constatar la estrecha relación existente entre estos dos tipos de determinación hasta las 96 h de cultivo, según se demuestra por las líneas de regresión obtenidas para cada una de las tres estirpes. En los cultivos más viejos se pierde esta correlación, puesto que hay un aumento de la densidad óptica no atribuible al aumento del número de células, sino a productos resultantes de la lisis celular.

Puesto que las estirpes patógenas de *Naegleria* se mantienen a temperaturas elevadas (2, 8), tratamos de adaptar las estirpes objeto de nuestro estudio a dichas temperaturas, con el fin de intentar comprobar si esta adaptación térmica iba ligada a la patogenicidad.

En el caso de las dos estirpes de *Naegleria gruberi*, sólo se consiguió mantener los cultivos a 37 °C hasta el 4.° ó 5.° pase; en cambio, los de *N. lovaniensis* pudieron mantenerse durante períodos de tiempo mucho más largos, aunque con densidades de población bastante menores que los testigos a 30 °C. Resulta interesante destacar la diferencia entre los proteinogramas obtenidos de *N. lovaniensis* cultivada a 30 °C y 37 °C, ya que a 37 °C no se detecta una de las bandas centrales.

Las pruebas de patogenicidad en embriones de pollo con *Naegleria lovaniensis* mantenidas a 30 °C y 37 °C, no dieron resultados positivos, aunque las amebas permanecieron viables en algunos de ellos, puesto que al resembrar su líquido alantoideo en medio propio de estas amebas se obtuvieron cultivos amebianos puros, con gran vitalidad incluso a los 15 d de la resiembra. Conviene mencionar que en las condiciones normales de cultivo, la densidad de población amebiana empieza a disminuir a los 8 d, y es prácticamente nula a los 15 d.

Puesto que la vía de entrada de las amebas patógenas de vida libre es la mucosa naso-faríngea con rápida invasión cerebral, parece indicar que dichos organismos tienen gran apetencia por el sistema nervioso (13).

En este trabajo se intentó estimular el crecimiento en las tres estirpes de *Naegleria*, así como provocar su posible carácter virulento, añadiendo o complementando el medio de cultivo con cerebro o l-α-cefalina. Aunque se consiguió estimular notablemente la tasa de crecimiento, esta estimulación se fue perdiendo en pases sucesivos. Haight y John (10) estudian la estimulación de *N. fowleri* al añadir al medio de cultivo diferentes lípidos cerebrales,

pero no indican si los resultados corresponden al primer pase o a datos obtenidos después de varios pases.

Los intentos de provocar el carácter patógeno de las estirpes aquí estudiadas, variando las condiciones de cultivo (temperatura y composición del medio) no han dado resultados positivos por el momento como se desprende de los ensayos realizados con ratones.

Nuestro propósito es proseguir en esta línea de investigación, uno de cuyos objetivos inmediatos es la realización de ensayos de citopatogenicidad en cultivos celulares.

Agradecimientos

Las autoras agradecen la ayuda prestada por los Dres. A. Portolés, E. Ronda y M. L. Alonso, y por las Srtas. Lda. M.ª del Mar Melgar, M.ª del Carmen Granados y M.ª Jesús Sánchez.

Este trabajo ha sido subvencionado, en parte, por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, y por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad.

Bibliografía

1. Carter, R. F. 1970. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and the experimental pathological changes induced by it. J. Pathol., 100, 217-44.
2. Červa, L. 1977. The influence of temperature on the growth of *Naegleria fowleri* and *N. gruberi* in axenic culture. Folia Parasitol., 24, 221-28.
3. Culbertson, C. G. 1971. The pathogenicity of soil amebas. Annu. Rev. Microbiol., 25, 231-54.
4. Culbertson, C. G. 1981. Amebic meningoencephalitis. Antibiot. Chemother., 30, 28-53.
5. De Jonckheere, J. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates. Appl. Environ. Microbiol., 33, 751-57.
6. De Jonckheere, J., and Van de Voorde, H. 1977. Comparative study of six strains of *Naegleria* with special reference to nonpathogenic variants of *Naegleria fowleri*. J. Protozool., 24, 304-9.
7. Fulton, C. 1970. Amebo-flagellates as research partners. The laboratory biology of *Naegleria* and *Tetramitus*. En: D. Prescott (ed.). Methods in Cell Physiology, 4, 341-476. Academic Press Inc., New York.
8. Griffin, J. L. 1972. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. Science, 178, 869-70.
9. Griffin, J. L. 1978. Pathogenic free-living amoebae. En: J. P. Kreier (ed.). Parasitic Protozoa, II, 507-47. Academic Press Inc., New York.
10. Haight, J. B., and John, D. T. 1982. Varying the serum component in axenic cultures of *Naegleria fowleri*. Proc. Helminthol. Soc. Wash., 49, 127-34.
11. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-75.
12. Pernin, P.; Cuilleret, C., et Liou, C. 1981. Les amibes libres pathogènes pour l'homme. Lyon Méd., 245, 105-10.
13. Schuster, F. L. 1979. Small amebas and ameboflagellates. En: M. Levandowsky and S. H. Hutner (ed.). Biochemistry and Physiology of Protozoa, 1, 216-85. Academic Press Inc., New York.
14. Stevens, A. R.; De Jonckheere, J., and Willaert, E. 1980. *Naegleria lovaniensis* new species: isolation and identifi-

cation of six thermophilic strains of a new species found in association with *Negleria fowleri*. Int. J. Parasitol., **10**, 51-64.

15. VISVESVARA, G. S., and HEALY, G. R. 1980. Disc electrophoretic patterns of esterase isoenzymes of *Naegleria fowleri* and *N. gruberi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **74**, 411-12.

16. WEBER, K., and OSBORN, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., **244**, 4406-12.

CHARACTERIZATION OF PENICILLIN-RESISTANT β-LACTAMASE PRODUCING-STRAINS OF *NEISSERIA GONORRHOEAE* ISOLATED IN SPAIN (1978-81)

R. ROTGER and C. NOMBELA

Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense-Madrid

SUMMARY

The characterization of three β-lactamase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae*, isolated in Spain (1978-81) has been carried out. Two of them carried a 4.7 Mdalton plasmid and the third a 3.4 Mdalton plasmid, together with two other extrachromosomal elements of about 2.6 and 25 Mdalton. Mating experiments showed that the three strains were capable of transferring either the 4.5 Mdalton or the 3.4 Mdalton plasmids to *Escherichia coli*, together with the penicillin resistance and the capacity to produce β-lactamase. We conclude that the three strains carry an R plasmid (of either 4.7 or 3.4 Mdalton) which can be mobilized by the sex factor activity of the bigger plasmid, of about 25 Mdalton. These results show that gonococci, which carry R factors, similar to those isolated in South East Asia, Holland and Canada, have been introduced in Spain.

RESUMEN

Se ha llevado a cabo la caracterización de tres estirpes, aisladas en España (1978-81), de *Neisseria gonorrhoeae*, productoras de β-lactamasas. Dos de ellas eran portadoras de un plásmido de 4,7 Mdaltons, y la tercera de uno de 3,4 Mdaltons, junto con otros dos plásmidos de 2,6 y 25 Mdaltons, respectivamente. En experimentos de conjugación se pudo poner de manifiesto que las tres estirpes eran capaces de transferir, bien el plásmido de 4,7 Mdaltons o el de 3,4 Mdaltons, a *Escherichia coli* junto con la resistencia a penicilina y la capacidad de producir β-lactamasa. Se concluye que las tres estirpes son portadoras de un plás-

mido de resistencia (de 4,7 ó 3,4 Mdaltons) que puede movilizarse por la capacidad conjugativa de otro de masa molecular próxima a 25 Mdaltons. Estos resultados ponen de manifiesto la presencia en España de estirpes de gonococos resistentes a penicilina, de características similares a las aisladas en Sureste de Asia, Holanda y Canadá.

Introduction

Since 1976, when they appeared, the isolation β-lactamase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* has become common in many countries (6, 14). On the basis of epidemiological data, initially, it was possible to trace origin of β-lactamase-producing gonococci either to South East Asia or to South Africa. The former strains were characterized by carrying a 4.7 Mdalton R plasmid, responsible for the β-lactamase production and a 24.5 Mdalton plasmid, previously described as an indigenous gonococcal extrachromosomal element, which was capable of the conjugal mobilization of the R plasmid. In contrast, the South African strains lacked the conjugative element and carried an R plasmid of 3.4 Mdalton, very much related to and possibly derived from the 4.7 Mdalton plasmid by deletion (15). Another 2.6 Mdalton cryptic plasmid was normally present in both types of strains.

The spreading of the 3.4 Mdalton R plasmid has been limited by the lack of conjugative capacity of the corresponding strains. However, since 1981 strains carrying this plasmid together with the conjugative element of 24.5 Mdalton have started to be isolated in Holland (1, 16) and in Canada (4).

We have analyzed the plasmid complement and the genetic properties of β-lactamase-producing gonococci isolated in Spain. In this paper we describe some of the characteristics of the first three strains isolated in this country, during the period 1978-81.

Materials and methods

Bacterial strains and culture media

Neisseria gonorrhoeae GC12, GC18 and GC20 were three strains of β-lactamase producing gonococci isolated in Spain. Their origins and some other characteristics are listed in *table 1*. *N. subflava* 080 belongs to our strain collection; *Escherichia coli* K12 185 (Nal^r) and *E. coli* V517, which carries a set of plasmids used as standards for molecular weight determinations (7), were from by J. M. Ortiz. *E. coli* HB101 [F^-, *HsdS20* (r^-_B, r^-_B), *recA13*, *ara14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20* (Sm^r), *xyl-5*, *mtl-1*, *supE44*] was a gift of V. Rubio and *E. coli* B NCIB9484, a wild type strain, was obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT).

Agar GC (BBL) enriched with B suplement (Difco) was used to grow *Neisseria gonorrhoeae*. For isolation and initial subcultures this medium was supplement with 5 % heated blood («chocolate»). The plates were incubated at 36 °C under a CO_2 enriched atmosphere (using a candle jar). *N. subflava* was grown in tripticase soy agar (TSA, Difco) and *Escherichia coli* in LB medium (3) either solid or

liquid. Antibiotic susceptibility testing was carried out by the disc difusion method (2) in Mueller Hinton agar (BBL), and the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the dilution technique using the same medium and an inoculum which led to isolated colonies.

graphed with a Kodak tri-X film and a Kenko R-1 filter.

Transmission of antibiotic resistances

Mating experiments were caried out by preparing suspensions of donor and recipient cells in saline (to an optical

Table 1. β-lactamase producing strains of N. gonorrhoeae *isolated in Spain (1978-81)*

Strain	Source	Clinical data of the case
N. gonorrhoeae GC12	Dr. P. Alomar. Residencia Sanitaria «Virgen de Lluch«, Palma de Mallorca.	Male. Acute urethritis; possibly acquired in Thailand. 1978.
N. gonorrhoeae GC18	Dr. J. R. Domínguez. Hospital. Central de la Cruz Roja, Madrid.	Male. Acute urethritis; possibly acquired in Holland. 1981.
N. gonorrhoeae GC20	Dr. E. Pérez Trallero. Residencia Sanitaria «Nuestra Señora de Aranzazu», de la Seguridad Social, San Sebastián.	Female. Acute bllateral salpingitis. Acquired in Madrid. 1981 (10).

Analysis of plasmid DNA

The presence of plasmids in the bacterial strains was tested by agarose gel electrophoresis. The method described by Grisnted *et al.* (5) was used for the preparation of clear lysates which were electrophoresed either directly or after DNA purification (8). Agarose gel electrophoresis was carried out in a vertical slab (10 × 13 × 0.4 cm) or in a horizontal one (11.5 × 13 × 0.6 cm) as described by Meyers *et al.* (8). The gels were stained with ethidium bromide, viewed under a short-wave UV ligth transilluminator (Ultraviolet Products Co., Mod. C-61) and photo-

density at 600 nm of 0.2) and mixing the two suspensions in the proportions indicated below. The mixture was filtered through a Millipore (0.45 μm) filter and the filter placed on a plate of GCB agar. The mating was allowed by incubating the plate at 36 °C in a CO_2-enriched atmosphere for the periods of time indicated in the Results. The cells were finally harvested by washing the filter with 1 ml of saline and plated in the appropriate selective medium supplemented with antibiotic. When *Eschedichia coli* was the recipient, McConkey agar containing carbenicillin (500 μg/ml) was used whereas *Neisseria subflava* was selected by plating in TSA containing

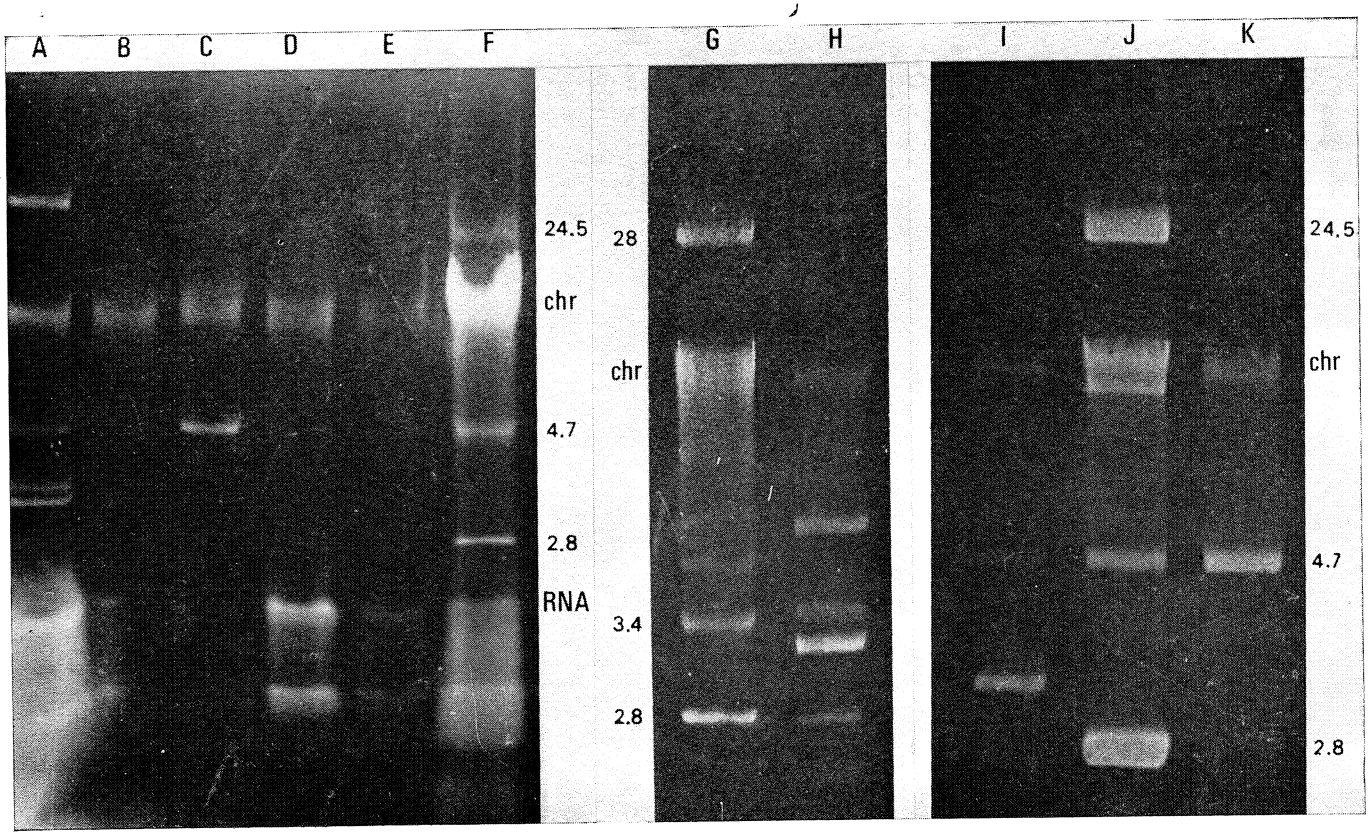


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of DNA from different bacterial strains. A, H, and I) E. coli *V517 (plasmids used as standards for molecular weight determination). B)* E. coli *K12 185. C)* E. coli *K12 185 (4.7 Mdalton plasmid), transcipient of a mating with* N. gonorrhoeae *GC12. D and E)* N. subflava *080 (4.7 Mdalton plasmid), transcipient of a mating with* N. gonorrhoeae *GC12. F)* N. gonorrhoeae *GC12. G)* N. gonorrhoeae *GC18. J)* N. gonorrhoeae *GC20. K)* E. coli *HB101 (4.7 Mdalton plasmid), transcipient of a mating with* N. gonorrhoeae *GC20*

penicillin (20 μg/ml). In some of the matings the filter was loaded with a 1 mg/ml solution of pancreatic DNAase I (Sigma Chemical Co.) in 0.25 M $MgSO_4$, in order to test the effetc of this enzyme on the transfer of the resistance.

The *Neisseria gonorrhoeae* plasmids were also introduced in *Escherichia coli* by transformation. In these cases, plasmid DNA was purified by phenol extraction and ethanol precipitation (8), and transformed into *E. coli* HB101 as described by Cohen *et al.* (3). Transformed cells were also selected in LB agar containing carbenicillin (500 μg/ml).

Assay of β-lactamase

Colonies of β-lactamase-producing *Neisseria* sp. and *Escherichia coli* were detected with a chromogenic cephalosporin (9). The quantitative determination of β-lactamase in extracts obtained by sonication of cell suspensions of *N. gonorrhoeae* GC12 was carried out by the iodine technique (11). The cells were suspended in 25 mM phosphate buffer pH 7.4, and the cell debris eliminated, after the ultrasonic treatment, by centrifugation at 50.000 × g for 30 min in a Beckman J2-21 centrifuge with the JA-21 rotor.

Antibiotics

Penicillin G was purchased from Sigma Chemical Co.; ampicillin and carbenicillin were kindly supplied by Compañía Española de Penicilina y Antibióticos (CEPA); cloxacillin and cephalosporin by Normon S. A. (Madrid) and chromogenic cephalosporin 87/312 (Nitrocefin) by Glaxo.

Results

The plasmid complement of *Neisseria gonorrhoeae* GC12, GC18 and GC20 was analyzed by agarose gel electrophoresis of clear lysates and it is shown in *figure 1*. The estimated molecular weights of the plasmids from *N. gonorrhoeae* GC12 and GC20 were 24.5 × 10^6; 4.7 × 10^6 and 2.8 × 10^6 whereas *N. gonorrhoeae* GC18 carried plasmids of 28 × 10^6; 3.4 × 10^6 and 2.8 × 10^6. Mating of these three strains with *Escherichia coli* resulted in the transmission of the penicillin resistance and of the capacity to produce β-lactamase (data shown in *table 2* and described below). As it is also shown in *figure 1 E. coli* transcipients had acquired the intermediate size plasmid, namely the 4.7 Mdalton plasmid from *N. gonorrhoeae* GC12 and GC20. The 3.4 Mdalton plasmid was also present in *E. coli* transcipients after mating with *N. gonorrhoeae* GC18 (not shown).

Table 2 gathers the data obtained in several mating experiments. *Neisseria gonorrhoeae* GC12 could transfer the penicillin resistance to *Escherichia* coli and to N. *subflava*, in this case with significantly higher frequency, in what can be considered a conjugal process since it was DNAase resistant. *N. gonorrhoeae* GC18 and GC20 behaved similarly. *E. coli* transcipients were not able to transfer the penicillin resistance as it could be expected from the small size of the acquired plasmids. Total plasmid DNA, extracted from the three gonococcal strains as indicated in Methods, was used to transform *E. coli* HB101, followed by selection of penicillin-resistant clones. In all cases transformant clones, carrying either the 3.4 or the 4.7 Mdal-

ton plasmid, could be selected (not shown).

A preliminary characterization of the β-lactamase from *Neisseria gonorrhoeae* GC12 was carried out by determining its substrate profile. Assigning a value of 100 % to its activity against benzylpenicillin, the activity against other β -lactam antibiotics was as follows: ampicillin, 101 %; cloxacillin, 0 %; carbeninicillin, 26 %; cephaloridin, 93 % and cephalothin, 19 %. This substrate profile corresponds to that of the TEM type β-lactamases.

of the genus, namely *Neisseria menigitidis*. We are currently interested in the problem of R plasmid maintenance in *Neisseria* (13), and have asked clinical laboratories in Spain to send to us their gonococcal isolates in order to screen for antibiotic resistance and R plasmids. The three β-lactamase-producing *N. gonorrhoeae* strains described in this paper are possibly the only ones isolated in Spain during the period 1978-81.

Our results indicate that *Neisseria gonorrhoeae* GC12 and GC20, corres-

Table 2. Transfer of penicillin resistance from N. gonorrhoeae *to* E. coli *and* N. subflava

Experiment number	Donor strain	Recipient strain	Length ef incubatien h	Trnnsfer frequency(*)
1	*N. gonorrhoeae* GC12	*E. coli* K12 185	6	10^{-6}
	N. gonorrhoeae GC12	*E. coli* K12 185	6	10^{-6} (**)
	N. gonorrhoeae GC12	*E. coli* B NCIB9484	18	10^{-7}
	N. gonorrhoeae GC12	*N. subflava* 080	6	10^{-4}
2	*N. gonorrhoeae* GC12	*E. coli* HB101	3	3×10^{-7}
	N. gonorrhoeae GC18	*E. coli* HB101	3	3×10^{-7}
3	*N. gonorrhoeae* GC18	*E. coli* HB101	6	2×10^{-6}
	N. gonorrhoeae GC20	*E. coli* HB101	6	3×10^{-6}

(*) The frequencies were calculated by dividing the number of transcipients by the total number of recipients at the end of the incubation. (**) Mating carried out in the presence of DNAase.

Discussion

The emergence of β-lactamase-producing gonococci, in certain localized areas, raised much concern, not only in itself but from the point of view of the possible spreading of R plasmids to the other pathogenic member

pond to the type of strains originally isolated in Asia. Their plasmid complement consists of three elements: a 4.7 Mdalton plasmid, which is the responsible for the penicillin-resistance as suggested by the finding that it appears in penicillin-resistant *Escherichia coli*; a 24.5 Mdalton plasmid which must encode sex factor activity

and a 2.8 Mdalton cryptic plasmid. On the other hand, *N. gonorrhoeae* GC18 carries an R plasmid of 3.4 Mdalton which can be transferred to *E. coli* through the agency of a bigger element of 28 Mdalton. This pattern corresponds to that of the strains of more recent appearance in Holland (1, 16) and in Canada (4).

From these data we can conclude that penicillin-resistant β-lactamase-producing gonococci have been introduced in Spain. In fact, at the present time, they seem to be much more common thant they were a few years ago (A. Alberte, personnal communication). The capacity of *Neisseria gonorrhoeae* to maintain resistance and other plasmids could lead to the isolation of strain with new combination of plasmids which can influence the antbiotic sensitivity and the pathogenic capacities of this bacterial species.

References

1. Anon, J. 1981. Surveillance of β-lactamase-producing PNG *Neisseria gonorrhoeae*: Emergence of strains with a new plasmid combination. Wkly. Epidemiol. Re., 28, 221.
2. Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherry, J. C., and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Pathol., 45, 486-93.
3. Cohen, S. N.; Chang, A. C. Y., and Hsu, L. 1972. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 69, 2110-14.
4. Dillon, J. R., and Pauzé, M. 1981. Appearance in Canada of *Neisseria gonorrhoeae* strains with a 3.2 Megadalton penicillinase-producing plasmid and a 24.5 Megadalton transfer plasmid. Lancet, 2, 700.
5. Grinsted, J.; Bennett, P. M.; Higginson, S., and Richmond, M. H. 1978. Regional preference of insertion of Tn 501 and Tn 502 into RP1 and its derivatives. Mol. Gen. Genet., 166, 313-20.
6. Lefèvre, J. C.; Prère, M. F., et Bouvier, F. 1981. Isolement et caracterization d'un plasmide de résistance a la pénicilline, dans une souche de *Neisseria gonorrhoeae*. Ann. Microbiol. Paris, 132 A, 283-92.
7. Macrina, F. L.; Kopecho, D. J.; Jones, K. R.; Ayers, D. J., and Mc. Cowen, J. M. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. Plasmid, 1, 417-20.
8. Meyers, J. A.; Sánchez, D.; Elwell, L., and Falkow, S. 1976. Simple agarosa gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., 127, 1529-37.
9. O'Callagham, C. H.; Morris, A.; Kirby, S. V., and Shingler, A. H. 1972. Novel method for detection of β-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob. Ag. Chemother., 12, 283-88.
10. Pérez, E.; García-Arenzana, J. M.; Rotger, R.; Pintado, C., y Ayllon, R. 1982. Anexitis por gonococo productor de penicilinasa. Un caso de infección autóctona. Acta Obstet. Ginecol. Hisp.-Lus., 30, 371-78.
11. Perret, C. J. 1954. Iodometric assay of penicillinase. Nature London, 174, 1012-13.
12. Roberts, M.; Elwell, L. P., and Falkow, S. 1978. Introduction to the mechanisms of genetic exchange in the gonococcus: Plasmids and conjugation in *Neisseria gonorrhoeae*. In G. I. Brooks, E. C. Gotschlich, K. K.

HOLMES, W. D. SAWYER and F. E. YOUNG (eds.). Immunobiology of *Neisseria gonorrhoeae*, 39-43. American Society for Microbiology, Washington.

13. ROTGER, R.; PINTADO, C., and NOMBELA, C. 1981. Multiple transmissible antibiotic resistance in commensal *Neisseria*. FEMS Microbiol. Lett., **10**, 161-64.
14. SIEGEL, M. S.; PERINE, P. L.; WESTBROOK, W. G., and DE JESÚS, I. 1978. Epidemiology of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. In G. I. BROOKS, E. C. GOTSCHLICH, K. K. HOLMES, W. D. SAWYER and F. E. YOUNG (eds.). Immunobiology of *Neisseria gonorrhoeae*, 75-79. American Society for Microbiology, Washington.
15. SPARLING, P. F.; SOX, T. E.; MOHAMMED, W., and GUYMOON, L. F. 1978. Antibiotic resistance in the gonococcus: Diverse mechanisms of coping with a hostil environment. In G. I. BROOKS, E. C. GOTSCHLICH, K. K. HOLMES, W. D. SAWYER and F. E. YOUNG (eds.). Immunobiology of *Neisseria gonorrhoeae*, 44-51. American Society for Microbiology, Washington.
16. VAN EMBDEN, J. D. A.; VAN KLINGEREN, B.; DESSENS-KROON, M., and VAN WIJNGAARDEN, L. J. 1981. Emergence in the Nederlands of penicillinase-producing gonococci carrying «African» plasmid in combination with transfer plasmid. Lancet, **1**, 938.

AZTHREONAM: *IN VITRO* ACTIVITY

M. GOBERNADO, E. CANTON and M. SANTOS

Servicio de Microbiología y Bacteriología Experimental de la Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social «La Fe», Valencia

SUMMARY

A new monocyclic beta-lactam antibiotic, azthreonam (SQ 26,776), was evaluated *in vitro* against clinical isolates, and its activity was compared with cefotaxime, cefoperazone, moxalactam, ceftazidime and N-f thienamycin. Azthreonam was the most active antibiotic against 80 % of all tested strains, inhibiting the bacteria at 2 µg/ml, followed by cefotaxime, moxalactam ceftazidime and N-f thienamycin. Azthreonam was bactericidal, producing cellular elongation on *Pseudomonas aeruginosa* and elongation and spheroplast formations on *Escherichia coli*. The *in vitro* activity suggests that azthreonam should prove useful in settings in which the most likely pathology is gram-negative infection.

RESUMEN

Se ha probado la actividad *in vitro* de un nuevo antibiótico betalactámico, aztreonama, comparado con cefotaxima, cefoperazona, moxalactama, ceftazidima y NF-tienamicina, sobre 546 bacterias gram-negativas. Aztreonama fue el antibiótico más activo sobre el 80 % de las bacterias ensayadas, con MCIs iguales o inferiores a 2 µg/ml. Le siguieron en actividad cefotaxima, moxalactama, ceftazidima y NF-tienamicina. La acción de aztreonama fue bactericida, produciendo un alargamiento en *Pseudomonas aeruginosa* y alargamiento y esferoplastos en *Escherichia coli*. Por su actividad *in vitro*, aztreonama puede ser muy útil en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias gram-negativas.

Introduction

Azthreonam (SQ 26,776) is a synthetic monobactam, specifically active against gram-negative aerobic bacteria and stable against most beta-lactamases (1, 4, 5, 7, 8).

Azthreonam was tested to determine its *in vitro* efficacy against recent clinical isolates obtained from hospitalized patients. The *in vitro* activity of other new drugs, like ceftazidime, N-f thienamycin, moxalactam, cefoperazone and cefotaxime was also compared with that of azthreonam.

Material and methods

Bacterial strains

The gram-negative bacilli tested were: 71 *Escherichia coli*, 50 *Salmonella spp.*, 33 *Citrobacter freundii*, 41 *Enterobacter spp.*, 58 *Klebsiella spp.*, 53 *Serratia marcescens*, 63 *Proteus mirabilis*, 18 *P. vulgaris*, 31 *Morganella morganii*, 25 *Providencia*, 71 *Pseudomonas aeruginosa*, 32 *Acinetobacter calcoaceticus*, and 5 *Bacteroides spp.* and gram-positive cocci: 25 *Staphylococcus aureus*, 25 *Streptococcus faecalis*.

Antibiotics

Azthreonam was supplied by The Squibb Institute for Medical Research, ceftazidime by Glaxo Group Research Ltd., N-f thienamycin by Merck, Sharp and Dohme Research Laboratory, moxalactam by Lilly and Co., cefoperazone by Pfizer Inc., and cefotaxime by Hoechst-Roussel.

Susceptibility testing

Antibiotic solutions were prepared fresh daily in sterile distilled water. Antibacterial activity was determined by the agar-dilution method, using the Mueller-Hinton medium. An inoculum of 10^6 colony-forming units/ml, prepared in a Ringer 1/4 (Oxoid) from a fresh overnight culture was used. The inoculum was applied as a spot with a Steer replicator (6). The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was the lowest concentration that inhibited visible growth of organisms in agar after 18 h at 35 °C.

Growth curves

The growth curves for *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Serratia* with azthreonam were carried out in a MS-2 research system, using the Abbot MS-2 medium in biphasic cartridges. The predetermined concentrations of microorganisms for transferring from upper-growth chamber (UGC) to the lower-growth chamber (LGC) was delta OD 0.004, equivalent to 10^4 cfu/ml, with an incubation period of 8 h.

Morphology studies

Different samples of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* were taken from the LGC and observed under the light microscope at different times and different antibiotic concentrations. Bacteria were stained with diluted fuchsin.

Results

The results of the *in vitro* activity of azthreonam against gram-negative bacilli are summarized in *table 1*. Az-

threonam was very active against all of the aerobic gram-negative bacilli. At a concentration of 0.5 µg/ml it inhibited 98 % of the isolates of *Escherichia coli*, 90 % of the isolates of *Klebsiella*, 100 % of the isolates of *Proteus mirabilis* and indol-positive *Proteus*, 96 % of the isolates of *Providencia*, and 100 % of the isolates of *Salmonella*. At the same concentration as above, it also inhibited 87 % of the isolates of *Citrobacter*. At a concentration of 4 µg/ml it inhibited 88 % of the isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, 85 % of the isolates of *Enterobacter* and 90 % of the isolates of *Serratia*. *Bacteroides* and *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis* were not susceptible to azthreonam.

The comparative activity of azthreonam with that of ceftazidime, N-f thienamycin, moxalactam, cefoperazone and cefotaxime can be observed in *table 2*. The most active drug against *Escherichia coli* was azthreonam, followed by cefotaxime, N-f thienamycin and moxalactam. Azthreonam and cefotaxime were the two most active drugs against *Klebsiella*. They inhibited 90 % of the isolates at concentrations of 0.25 µg/ml and 0.12 µg/ml. With the exception of cefoperazone, all of the other compounds showed excellent activity against this organism.

Azthreonam showed limited activity against some strains of *Enterobacter spp.*, it inhibited 85 % of the isolates at 4 µg/ml. The most active drug was cefotaxime, followed by N-f thienamycin, azthreonam, moxalactam, ceftazidime, and cefoperazone, in this order.

Azthreonam, ceftazidime and N-f

Table 1. In vitro *activity of azthreonam*

Organism	N.° testcd	Range	Concentration required to inhibit the followig percentages of isolates µg / ml		
			50	70	90
Escherichia coli	71	0.01-64	0.06	0.12	0.12
Salmonella spp.	50	0.01-.5	0.06	0.12	0.25
Citrobacter freundii	33	0.06-32	0.12	0.25	1
Enterobacter spp.	41	0.01-64	0.12	2	16
Klebsiella spp.	56	0.03-32	0.09	0.12	0.25
Serratia marcescens	53	0.06-32	0.25	0.5	4
Proteus mirabilis	63	0.001-.01	0.001	0.03	0.007
P. vulgaris	18	0.001-.06	0.005	0.007	0.03
Morganella morganii	31	0.001-.5	0.005	0.01	0.12
Providencia	25	0.01-2	0.03	0.06	0.25
Pseudomonas aeruginosa	71	1-16	3.12	4	4
Acinetobacter calcoaceticus	32	16-256	32	32	64
Total	546		0.06	0.5	4

Table 2. Antibacterial activity of azthreonam and other antibiotics

Organism	N.° strains tested	Compound	MIC range µg/ml	Activity, µg/ml	
				MIC 50	MIC 90
Escherichia coli	71	CTX	0.007-32	0.09	0.25
		MXT	0.01-64	0.12	16
		CFP	0.03-256	2	256
		THM	0.09-1.56	0.19	0.39
		AZT	0.01-64	0.06	0.12
		CAZ	0.25-128	0.5	2
Salmonella spp.	50	CTX	0.03-2	0.12	0.25
		MXT	0.06-32	0.19	0.5
		CFP	0.25-256	0.39	1
		THM	0.02-3.12	0.39	0.78
		AZT	0.01-0.5	0.06	0.25
		CAZ	0.12-4	0.5	1
Citrobacter spp.	33	CTX	0.12	0.12	0.12
		MXT	0.06-32	0.19	0.5
		CFP	0.25-256	0.39	1
		THM	0.02-3.12	0.39	0.78
		AZT	0.06-32	0.12	1
		CAZ	0.12-64	1	25
Enterobacter spp.	41	CTX	0.03-8	0.12	1
		MXT	0.12-128	0.25	16
		CFP	0.12-256	0.5	64
		THM	0.78-3.12	0.5	2
		AZT	0.01-64	0.12	16
		CAZ	0.06-256	1	128
Klebsiella spp.	58	CTX	0.03-8	0.06	0.12
		MXT	0.01-64	0.12	1
		CFP	0.03-256	1	256
		THM	0.04-1.56	0.39	1
		AZT	0.03-32	0.09	0.25
		CAZ	0.06-4	0.19	1
Serratia marcescens	53	CTX	0.03-16	0.25	8
		MXT	0.06-32	0.25	16
		CFP	0.25-256	8	256
		THM	0.19-6.25	1	3.12
		AZT	0.06-32	0.25	4
		CAZ	0.06-8	0.12	1

Table 2 (continuation)

Proteus mirabilis	63	CTX	0.07-.03	0.01	0.01
		MXT	0.12-2	0.78	2
		CFP	0.5-2	1	2
		THM	1.56-12.5	2	3
		AZT	0.001-.01	0.001	0.007
		CAZ	0.01-4	0.12	0.5
P. vulgaris	18	CTX	0.01-.06	0.03	0.06
		MXT	0.06-.12	0.12	0.12
		CFP	1-2	1	2
		THM	0.78-1.56	1	1.56
		AZT	0.001-.06	0.005	0.03
		CAZ	0.05-2	0.78	1.56
Morganella morganii	31	CTX	0.03-.5	0.06	0.25
		MXT	0.06-1	0.06	0.5
		CFP	0.25-8	1	4
		THM	3.12-6.25	3	6.25
		AZT	0.001-.5	0.005	0.12
		CAZ	4-8	8	8
Providencia	25	CTX	0.07-2	0.03	0.5
		MXT	0.06-4	0.12	1
		CFP	1-128	2	64
		THM	1.56-6.25	1.56	3.12
		AZT	0.01-2	0.03	0.15
		CAZ	0.06-32	0.25	4
Pseudomonas aeruginosa	71	CTX	4-128	16	64
		MXT	8-256	16	64
		CFP	2-256	4	128
		THM	0.12-12.5	1.56	3.12
		AZT	1-16	3.12	4
		CAZ	0.5-8	1	3.12
Acinetobacter	32	CTX	0.03-128	8	64
		MXT	0.06-256	32	64
		CFP	0.12-256	256	256
		THM	0.09-.78	0.39	0.78
		AZT	16-256	32	64
		CAZ	1-256	64	128

CTX, cefotaxime. MXT, moxalactam. CFP, cefoperazone. THM, thienamycin. AZT, azthreonam. CAZ, ceftazidime.

thienamycin show a remarkable activity against *Serratia marcescens*, inhibiting more than 80 % at concentrations of 4 μg/ml. Azthreonam was the most active compound against *Proteus mirabilis*, *Proteus* indol positive, and *Providencia*. 100 % of the isolates were inhibited at 0.03 μg/ml, although all of the antibiotics tested were very active.

at concentrations of 8 μg/ml, but ceftazidime and N-f thienamycin were more active, inhibiting 100 % and 98 % of the isolates, respectively, at 8 μg/ml. N-f thienamycin was the most active drug against *Acinetobacter calcoaceticus* inhibiting 100 % of the isolates at a concentration of 0.78 μg/ml. The rest of the cephalosporins showed only marginal activity.

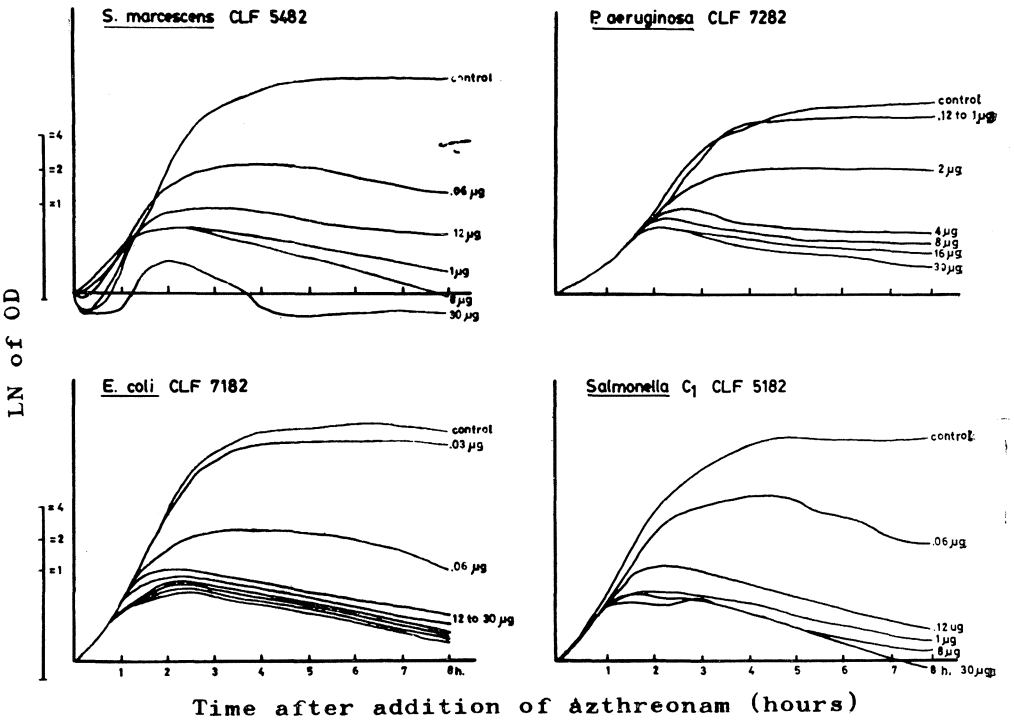


Figure 1. Growth curves of S. marcescens, Ps. aeruginosa, E. coli *and* Salmonella *group C1 under different azthreonam concentrations*

Azthreonam, showed excellent activity against *Citrobacter freundii* and *Salmonella*, inhibiting 94 % of the isolates at 1 μg/ml. These antibiotics were also tested for their *in vitro* activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Azthreonam inhibited 94 % of isolates An azthreonam concentration of 32 μg/ml was required to inhibit 69 % of the isolates.

In *figure 1* the pattern of growth of the *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Serratia* and *Pseudomonas aeruginosa* with azthreonam can be observed.

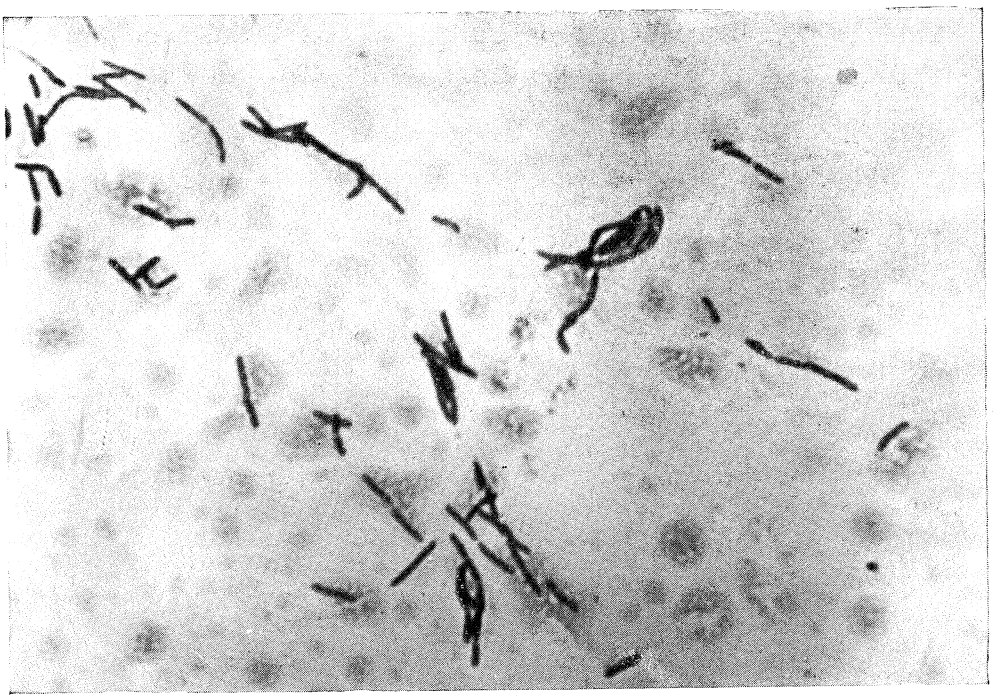


Figure 2

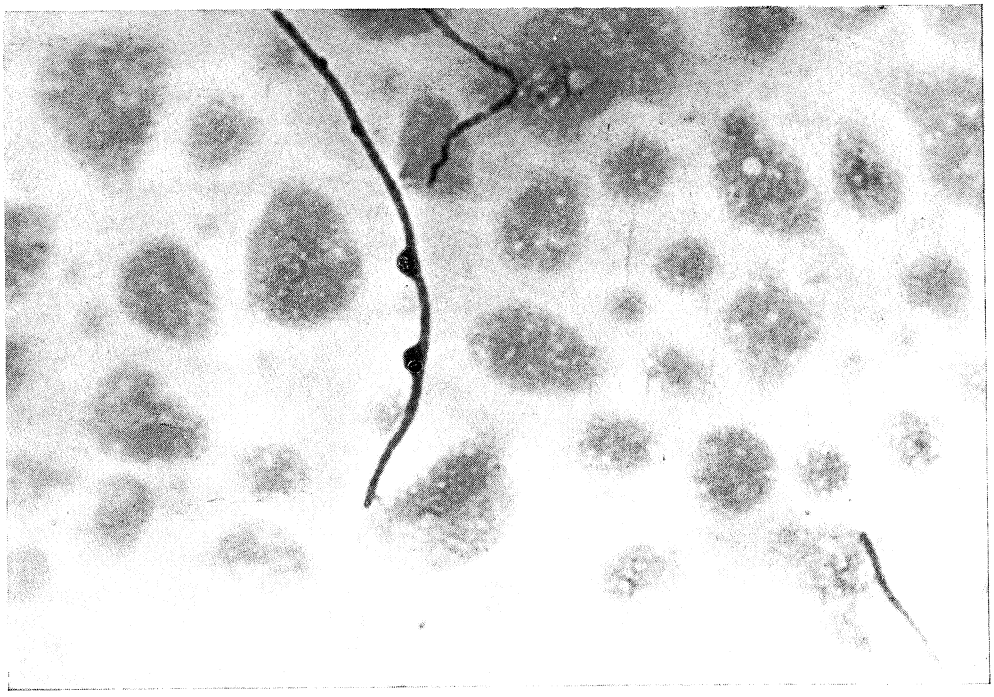


Figure 3

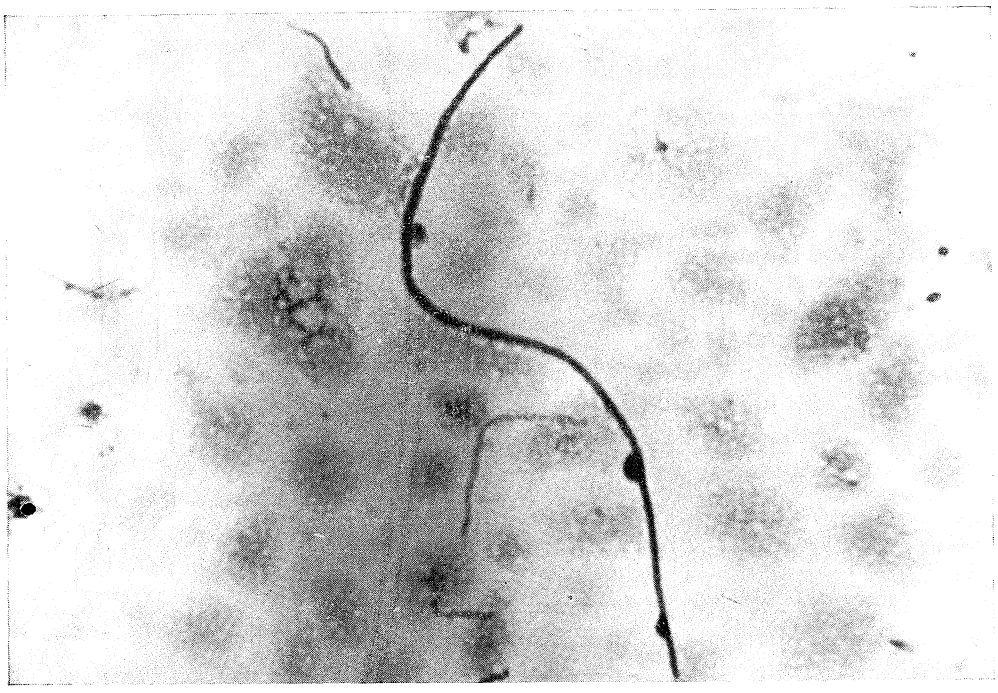


Figure 4

Figures 2-4. Morphological changes of E. coli *after 7 h of exposure to the action of azthreonam. 2) 0.03 μg. 3) 0.06 μg. 4) 0.12 μg*

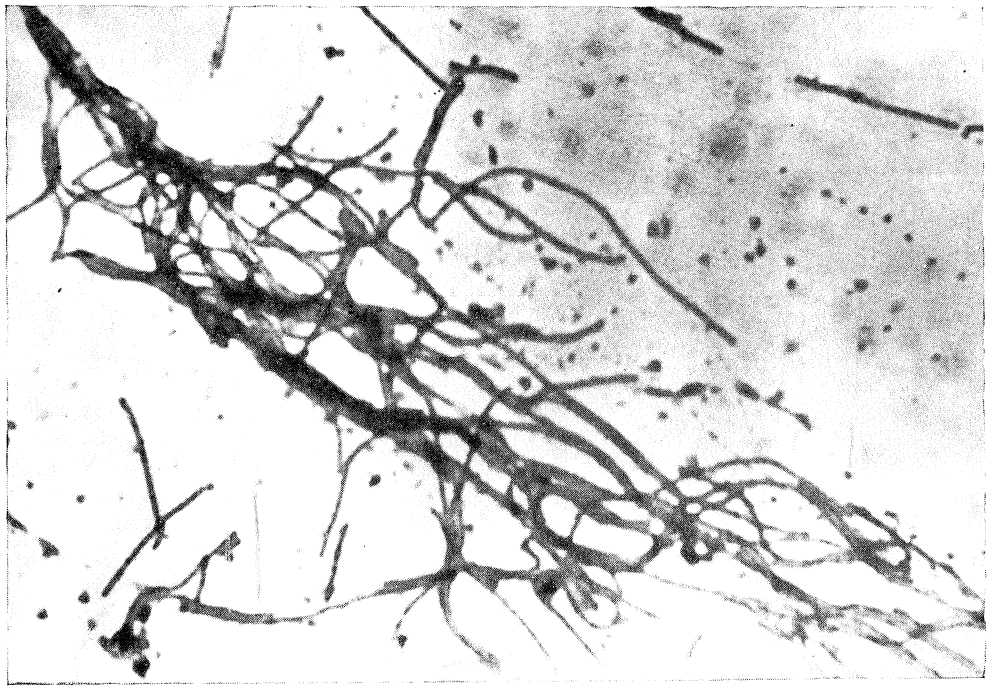


Figure 5. Morphological changes observed in Ps. aeruginosa *after 7 h of exposure to azthreonam (1/4 MCI)*

The MIC's of the microorganisms were 0.12 μg/ml for *Serratia*, *Salmonella* and *E. coli* and 4 μg/ml for *Ps. aeruginosa*. In all cases, the number of living bacterial cells was less than 10^2 cfu/ml when the microorganisms were growing with the antbiotic at concentrations equal to or less than their MIC's. The morphological effects of azthreonam with *E. coli* are shown in *figures 2-4* at 0.03 μg/ml, at this concentration, there are normal bacterial cells and elongated bacterial cells. At 0.06 μg/ml there are elongated cells, some of them with spheroplasts. At 0,12 μg/ml (MIC concentration) the elongated cell, spheroplasts and destroyed bacteria are observed. At the next upper concentrations, the same effect is observed. *Figure 5* shows the effect of azthreonam in *Ps. aeruginosa*, where there is elongation and filamented bacterial cells from 1 μg/ml of the antibiotic, and the destruction of cells with 16 μg/ml.

Discussion

Azthreonam is a novel monocyclic beta-lactam antibiotic which is very active against aerobic gram-negative bacilli, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia*. Azthreonam is comparable to the «Third Generation» cephalosporins in its *in vitro* activity (1, 3-5, 7).

It inhibits 89 % of the *Pseudomonas aeruginosa* isolates at a concentration of 4 μg/ml, making it one of the most active beta-lactams against these microorganisms.

Azthreonam was only minimally effective against *Acinetobacter calcoaceticus*. Because of its mechanism of action, inhibiting the PBP3, azthreonam affects the cell wall septation, producing filamentous bacteria (2-3, 7). Therefore, it is said to have a bactericidal effect, but in the case of *Escherichia coli*, the formation of spheroplasts (PBP1a) (3, 7, 9) has also been observed.

The lack of activity against *Bacteroides* and other anaerobic microorganisms could be an important point to consider since it could avoid ecological changes in the intestinal flora when used for the treatment of gram-negative infections.

References

1. Fainstein, V.; Weaver, S., and Bodey, G. P. 1982. Comparative *in vitro* study of SQ 26,776. Antimicrob. Ag. Chemother., 21, 294-98.
2. Georgopapadakou, N. H.; Smith, S. A.; Cimarusti, C. M., and Sykes, R. B. 1982. Binding of monobactam to penicillin binding proteins of *E. coli* and *S. aureus*. EMBO Workshop on Beta-Lactam Antibiotics, Abstracts. El Escorial, Spain.
3. Georgopapadakou, N. H.; Smith, S. A., and Sykes, R. B. 1982. Mode of action of azthreonam. Antimicrob. Ag. Chemother., 21, 950-56.
4. Neu, H. C., and Labthavikul, P. 1981. Antimicrobial activity of a monocyclic beta-lactam SQ 26,776. J. Antimicrob. Chemother., Suppl. E, 8, 111-22.
5. Norrby, R.; Friberg, K., and Holm, S. E. 1981. *In vitro* antibacterial activity of SQ 26,776. J. Antimicrob. Chemother., Suppl. E, 8, 69-76.
6. Steers, E.; Foltz, E. L., and Graves, G. 1959. An inocula-replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. Chemother. Basel, 9, 307.

7. SYKES, R. B.; BONNER, D. P.; BUSH, K., and GEORGOPAPADAKOU, N. H. 1982. Aztreonam specifically active against aerobic Gram negative bacteria. Antimicrob. Ag. Chemother., 1, 85-92.
8. SYKES, R. B.; CIMARUSTI, C. M.; BONNER, D. P.; BUSH, K.; FLOYD, D. M.; GEORGOPAPADAKOU, N. H.; KOSTER, W. H.; LIU, W. C.; PARKER, W. L.; PRINCIPE, P. A.; RATHNUM, M. L.; SLUSARARCHYK, W. A.; TREJO, W. H., and WELLS, J. S. 1981. Monocyclic beta-lactam antibiotics produced by bacteria. Nature London, 291, 489-91.
9. YOURASSOWSKY, E.; VAN DER LINDEN, M. P.; LISTMONT, M. J., and CROKAERT, F. 1981. Growth curves patterns of *E. coli* and *P. aeruginosa* submitted to different SQ 26,776 concentrations. J. Antimicrob. Chemother., Suppl. E, 8, 89-96.