

Departamento de Microbiología
Universidad de Navarra
Pamplona (España)

Diferenciación de penicilinasas en *Bacillus cereus* *

por
J. M. Arcos

(Recibido para publicar el 23 de marzo de 1968)

El *Bacillus cereus* es sin duda uno de los microorganismos que producen más altos niveles de Beta-lactamasas y entre sus cepas existen dos muy próximas genéticamente, que difieren entre sí fundamentalmente en lo que respecta a la producción de esta enzima. Mientras una (NRRL 569) resulta ser inducible, la otra (NRRL 569/H) es constitutiva (12) si bien las diferencias entre sus respectivas enzimas purificadas se consideran insignificantes (15).

En los cultivos normales de una y otra siempre aparece actividad enzimática contra la penicilina tanto en el medio exterior como acompañando a las células. Esta localización diferente, lleva consigo, al parecer, un distinto estado inmunológico que, junto con otras propiedades físico-químicas, caracterizan a cada fracción (4).

Sin embargo, en la literatura se observa fácilmente que los autores han trabajado, bien sobre penicilinasas más o menos purificadas tras sufrir siempre pérdida de material activo, o bien sobre preparaciones crudas consideradas «a priori» homogéneas en la calidad de su penicilinasas.

Nuestro objeto en el presente trabajo es demostrar la heterogeneidad existente en las penicilinasas de los preparados crudos

precisamente en aquellas propiedades que luego caracterizan a la enzima purificada. Esta complejidad haría posible la pérdida selectiva y no simplemente cuantitativa de ciertos tipos de penicilinasas durante los procesos de aislamiento y purificación.

Material y métodos

ORIGEN Y OBTENCIÓN DE PREPARADOS CRUDOS CON ACTIVIDAD DE BETA-LACTAM-HIDROLASAS. La cepa constitutiva *Bacillus cereus* NRRL 569/H fue cultivada en medios de hidrolizado de caseína, citrato

* Resumen del trabajo presentado para obtener el grado de Doctor, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, abril de 1967. El director técnico fue el Dr. A. Chordí. El Tribunal estuvo presidido por el Prof. E. Zapatero (Facultad de Medicina de Valladolid), actuando como vocales el Prof. B. Regueiro (Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela), el Prof. R. Gallego (Facultad de Ciencias de Valladolid), el Prof. J. López Aparicio (Facultad de Ciencias de Valladolid), que actuó como ponente, y el Prof. J. Planas (Facultad de Ciencias de Barcelona), director de la tesis. La calificación obtenida fue de Sobresaliente «cum laude».

y sales a 36° C según técnica descrita por POLLOCK (18). Este cultivo fue denominado constitutivo normal (H). Para la inducción de la cepa inducible *Bacillus cereus* NRRL 569 se añadió al medio, después de 6 horas de incubación, bencilpenicilina sódica, en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 10 u/ml. Después se proseguía la incubación como en el caso anterior durante 16-18 horas. El resultado final se denominó cultivo inducido (I). De igual manera se adicionó penicilina sobre otros cultivos de la cepa constitutiva NRRL 569/H, que en este caso fueron denominados constitutivos forzados (F). Finalmente, aquellos otros cultivos inoculados con la cepa inducible NRRL 569 a los que no se indujo con bencilpenicilina sódica, fueron denominados cultivos basales (B).

Para su estudio cada uno de estos cuatro cultivos fue fraccionado en parte soluble o sobrenadante (S/-) y extracto acuoso de células (C/-), sin posteriores procesos de purificación. El sobrenadante en cada caso se obtuvo por centrifugación repetida tres veces a 4° C y 6.000 rpm durante 15 minutos. La observación microscópica demostraba la inexistencia de células en número significativo.

Los extractos celulares se consiguieron a partir de las células obtenidas en la primera centrifugación, después de lavadas dos veces en suero fisiológico estéril. Al sedimento final se añadía como mínimo tres volúmenes de acetona a -20° C y se mantenía en congelador a esta temperatura durante 36 horas, al término de las cuales una nueva centrifugación proporcionaba un sedimento que se desecaba y liofilizaba. En estas condiciones pasaba a formar parte del material inyectado a conejos. Cuando se deseaba un extracto acuoso de este residuo, se resuspendía en agua estéril hasta 60 mg de peso seco por mililitro y se sometía a la acción de un fino molino desintegrador, con las debidas precauciones para evitar el calentamiento excesivo.

En total se han estudiado, por tanto, ocho preparados enzimáticos crudos: sobrenadante constitutivo (S/H), sobrenadante inducido (S/I), sobrenadante constitutivo forzado (S/F) y sobrenadante basal (S/B); extracto de células constitutivas normales (C/H), extracto de células inducidas (C/I), extracto de células constitutivas forzadas (C/F) y extracto de células basales (C/B) (tabla I).

Las valoraciones químicas (14) y microbiológicas (3) de penicilinas se hicieron siempre sobre bencilpenicilina sódica.

Las unidades (uP) fueron las descritas por POLLOCK y TORRIANI (19).

MICROELECTROFORESIS EN AGAR. Sus constantes fueron: campo eléctrico 6 voltios/cm; intensidad por portaobjetos de microscopio 6 mA; tampón veronal de pH 8,6 y fuerza iónica 0,035; duración media aproximada 70-80 minutos.

El agar Noble Difco se empleó al 2 % en tampón veronal de pH 8,6 y fuerza iónica 0,0175. Una cantidad de 3 ml se vertió sobre cada portaobjetos con lo que se obtuvo una capa de 1,5 mm de espesor.

Las movilidades electroforéticas relativas se calcularon con respecto a la albúmina humana normal. Este valor expresado en tanto por ciento sirvió para identificar y nombrar cada zona o banda detectada.

Su comprobación se realizaba mediante la toma de pequeños cilindros de agar en los puntos elegidos, que se sometían a una electroforesis, idéntica en todo a la primera, con posterior revelado microbiológico, químico o inmunológico.

REVELADO MICROBIOLÓGICO DEL ELECTROFEROGRAMA. Cada portaobjetos, una vez terminada la electroforesis, fue recubierto estérilmente con medio nutritivo de agar al cual se había añadido momentos antes bencilpenicilina sódica a concentración final de 12,5 uI/ml y a continuación se procedió a sembrar sobre su superficie suspensiones estandarizadas (25 % de transmisión a 550 milimicras) de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P en suero fisiológico. Después de una incubación de

18 horas a 36° C aparecían perfectamente señaladas las regiones donde la existencia de beta-lactamasas y, por tanto, la ausencia de bencilpenicilina, había hecho posible el normal desarrollo del microorganismo revelador.

Sustituyendo a la bencilpenicilina sódica se emplearon igualmente otros antibióticos beta-lactámicos: Penicilina V, Meticilina, Oxacilina, Cloxacilina, Feneticilina y Ampicilina.

REVELADO QUÍMICO DEL ELECTROFEROGRAMA. Cada portaobjetos, al término de la electroforesis fue recubierto cuidadosamente con 2 ml de un medio revelador semisólido de la siguiente composición: 0,5 ml de agua destilada; 0,2 ml de púrpura de bromocresol; 0,8 ml de Agar Noble Dico al 2 %, en tampón veronal de pH 8,6; 0,5 ml de bencilpenicilina sódica a 200.000 uI/ml.

La localización de las beta-lactamasas fue señalada por la aparición de zonas ácidas de color amarillo, en los puntos en que hubo formación de ácido peniciloico.

INMUNOELECTROFORESIS. La técnica empleada fue la microinmunoelectroforesis según SCHEIDEGGER (23), ligeramente modificada (8). Los inmunosueros fueron obtenidos de conejos machos de unos 3 kg de peso, previa inoculación subcutánea de los preparados antigénicos mezclados a partes iguales con coadyuvante incompleto de Freund, en dos series de cuatro semanas separadas por dos de descanso. Las cantidades inoculadas fueron dobladas (120 mg/inyección) en la segunda serie, siempre en días alternos. Según criterios de inmunodifusión, fueron elegidos para estudio intensivo los inmunosueros siguientes: I-141, anti-sobrenadante constitutivo normal; I-144, anti-cultivo constitutivo completo, y I-146, anti-cultivo inducido completo. La absorción de anticuerpos se llevó a cabo mezclando en proporción 2:1 el inmunosuero elegido con los antígenos heterólogos. La mezcla, después de agitada, se mantuvo a 37° C durante dos horas y a 4° C toda la noche. Al día

siguiente se eliminaba por centrifugación el precipitado correspondiente a los complejos insolubles antígeno-anticuerpo y se repetía nuevamente la absorción. No fue considerado ningún suero como absorbido sin la previa comprobación por la técnica de inmunodifusión simple en gel de agar.

Para la identificación entre zona penicilinasas-positiva y su correspondiente banda de inmunoprecipitación fue utilizada la superposición del revelado químico sobre el inmunoelectroferograma (2).

PRUEBA DE INACTIVACIÓN DE LAS PENICILINASAS POR ACCIÓN DEL YODO. La inhibición de la actividad enzimática fue determinada sumergiendo en baño de yodo 0,0038 M y yoduro potásico 0,02 M, la placa de agar inmediatamente después de sometida a electroforesis. Luego de este baño, cuya duración era variable, se sometieron al revelado químico. Las zonas que mantenían su actividad enzimática se consideraron como no sensibles al yodo en las condiciones de la experiencia (4).

ULTRACENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL. Los distintos preparados enzimáticos fueron sometidos a 100.000 g durante 18 horas a 4° C, en aparato Martin Christ modelo M y gradiente continuo de sacarosa. Finalmente, se tomaron 10 capas líquidas de 1 ml mediante pipeta capilar a presión y se determinó en cada una la concentración de sacarosa, así como el contenido en proteínas totales por el método de Biuret.

Previo diálisis contra agua destilada a 4° C, se verificó la liofilización de las distintas capas y su posterior resuspensión en la cantidad adecuada de agua destilada hasta conseguir la concentración proteica deseada para las pruebas enzimáticas e inmunológicas posteriores.

SENSIBILIDAD AL CALOR. Medio mililitro de los preparados enzimáticos a concentraciones de 10.000 uP/ml fueron introducidos durante intervalos variables de tiempo en baño maría a diferentes temperaturas.

Durante todo el proceso, los tubos fue-

ron mantenidos herméticamente cerrados para evitar las pérdidas por evaporación. Finalmente, las muestras eran sometidas a electroforesis y revelados microbiológico, químico e inmunológico.

Resultados

PENICILINASAS PRESENTES EN EL SOBRENADANTE DEL CULTIVO CONSTITUTIVO NORMAL, S/H. Según anteriores experiencias (1, 2), el sobrenadante constitutivo normal, S/H, demostró ser el preparado con mayor proporción de penicilinasas en relación con su complejidad antigénica. A esto se unía su mayor actividad absoluta (6.600 uP/ml) y la espontaneidad y sencillez de obtención. Por estos motivos se tomó como objeto principal de estudio en relación al cual fueron estudiados los otros siete preparados.

Mediante bioautografía inversa y revelado químico fue posible constatar la presencia en S/H (tabla II) de cinco áreas electroforéticas penicilinasas-positivas denominadas P-38, P-52, P-67, P-196 y P-143 (1).

P-96 aparecía claramente a los 5-10 mi-

nutos de recubierta la placa con el medio revelador semisólido. Entre los 10-15 minutos se destacaba claramente P-67 y 5 minutos más tarde empezaba a iniciarse P-52. P-153 y P-38 necesitaban algunas horas para revelarse y completar la imagen total de las penicilinasas activas.

La inmunolectroforesis de S/H frente a su inmunosuero homólogo de elección I-141 (2), proporcionó diez bandas de precipitación cuyas movilidades electroforéticas fueron: 0 (2 bandas), 23, 38, 52 (2 bandas), 67, 96, 143 y 153 %. La identificación de estas bandas de precipitación con las zonas penicilinasas-positivas de su misma movilidad se consiguió por la técnica descrita de combinación de los revelados químico e inmunológico sobre electroferograma primarios completos o secundarios tras del fraccionamiento a base de los pequeños cilindros de agar.

Todas las penicilinasas detectadas fueron capaces de inactivar penicilina V, ampicilina y feneticilina además de la penicilina G.

La metecilina y la cloxacilina no fueron inactivadas en absoluto a juzgar por los revelados microbiológicos y químicos. Sin

TABLA I
Esquema-clave del material analizado.

Microorganismo	Cultivo	Fracción
<i>Bacillus cereus</i> NRRL 569/H Cepa constitutiva	Constitutivo normal (H)*	Sobrenadante (S/H) Extracto celular (C/H)
	Constitutivo forzado (F)**	Sobrenadante (S/F) Extracto celular (C/F)
<i>Bacillus cereus</i> NRRL 569 Cepa inducible	Inducido (I)**	Sobrenadante (S/I) Extracto celular (C/I)
	Basal (B)*	Sobrenadante (S/B) Extracto celular (C/B)

* Sin adición de bencilpenicilina sódica; ** Estos cultivos se realizaron con adición de 10 uI/ml finales de bencilpenicilina sódica a las 6 horas de edad.

embargo, la oxacilina fue inactivada sólo por P-96 (tabla II).

Un hecho significativo tuvo lugar cuando se realizaron estas pruebas. En el revelado inmunológico efectuado en combinación con el químico, desaparecieron las bandas de precipitación cuando el antibiótico en contacto fue precisamente la meticilina o la cloxacilina y no sufrieron este efecto con ampicilina o feneticilina, fácilmente hidrolizables.

Las penicilinasas más sensibles a la acción del yodo fueron P-38 y P-52 que se inactivaron tras un baño de 14-16 minutos. P-96 requirió 30 minutos y P-67 y P-143 intervalos de tiempo intermedios entre ambos extremos (tabla II).

No pudo ser determinado si la desaparición de P-67 y P-143, siempre las de

menor superficie activa y quizás por tanto las de menor concentración, fue debida a su sensibilidad al yodo o bien a su pérdida hacia el baño exterior durante su prolongada inmersión. No obstante, P-38 y P-52 que ocupan una gran área en el electroferograma fueron, como hemos dicho, las primeras en perder su actividad.

Las diversas fracciones del gradiente continuo de sacarosa después de sometidas a ultracentrifugación fueron analizadas química e inmunológicamente. Por inmunoelectroforesis apareció la banda P-96 ampliamente distribuida desde $S_4 = 2,2$ hasta 14,4. P-67 se distribuyó entre 2,2 y 10,5; P-52 entre 2,7 y 7,2; P-38 entre 2,7 y 5,4; y solamente a 3,4 apareció también P-143. El revelado químico mostró una distribución idéntica, si bien ligera-

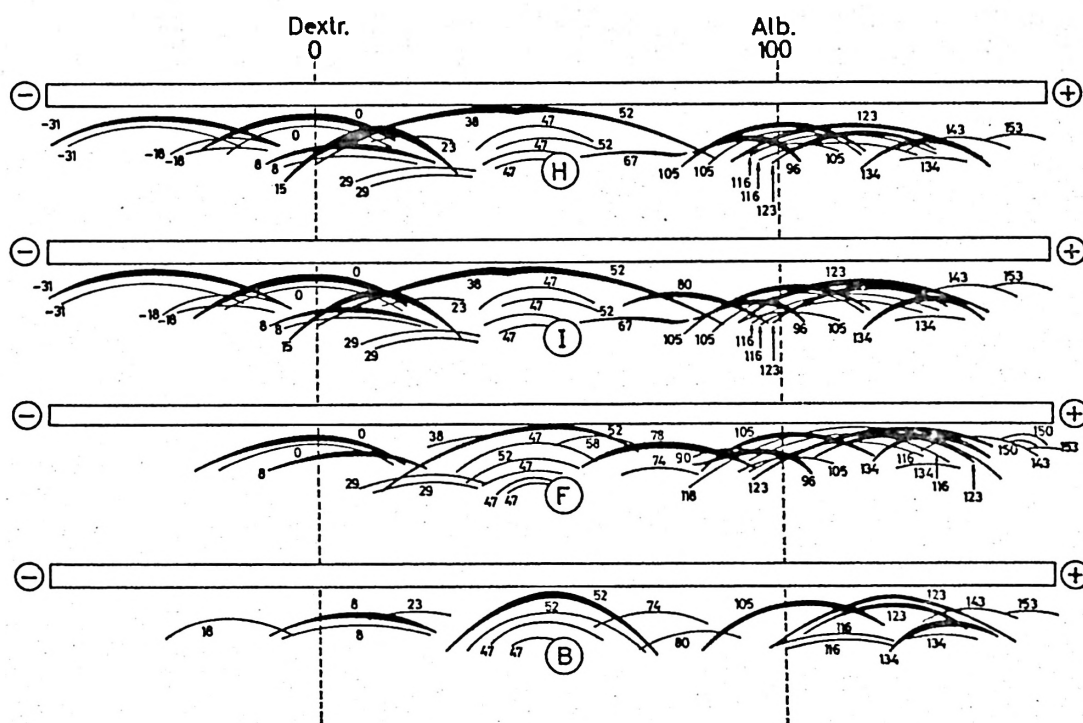


FIG. 1. Representación esquemática del análisis inmunoelectroforético del cultivo constitutivo (H), inducido (I), forzado (F) y basal (B) de las cepas constitutiva e inducible de *Bacillus cereus*, respectivamente NRRL 569/H y NRRL 569.

Los números indican la movilidad electroforética de cada banda de precipitación con respecto a la albúmina humana, considerada como 100.

TABLA II
Características de las penicilinasas constitutivas de *Bacillus cereus* NRRL 569/H.

	P-38 *	P-52 *	P-67 **	P-96***	P-143
Presentes en el sobrenadante, S/H.	+	+	+	+	+
Presentes en extracto celular, C/H.	+	+	+	+	*
Tiempo (minutos) inactivación por todo 0.0038 M.	15	15	20	30	20
Tiempo inactivación por calor:					
A 37° C (horas)	<24	<24	>48	>48	<24
A 56° C (minutos)	10	10	20	30	10
Tiempo (minutos) aparición en el revelado químico	>120	15	10	5	60
Tiempo (horas) aparición en inmu- noelectroforesis	3-4	3-4	8-10	8-10	>12
Coefficiente aproximado de sedimen- tación S_{40}	2,7-3,4	2,7-5,4	2,2-7,2	2,2-10,5	3,4

* Glicoproteínas. Comunidad antigénica parcial entre ambas y diferencia total con P-67 y P-96; ** Comunidad antigénica total con P-96; *** Capaz de inactivar oxacilina; * Solamente presente con certeza en inmunoelectroforesis.

mente menos amplia (tabla II); P-96 se encontró entre $S_4 = 2,2$ y $10,5$; P-67 entre $2,7$ y $7,2$; P-52 entre $2,7$ y $5,4$; P-38 entre $2,7$ y $3,4$, y P-143 solamente a $S_4 = 3,4$.

La permanencia de S/H a 37° C durante intervalos de hasta dos horas no produjo la inactivación de ninguna de las cinco penicilinasas ni la desaparición de ninguna de las bandas correspondientes. Cuando el tiempo se prolongó hasta veinticuatro horas a esta temperatura, no presentaron ni banda de precipitación ni actividad enzimática, P-38, P-52 y P-143, mientras P-67 y P-96 siguieron inalteradas (tabla II).

A la temperatura de 56° C todas las penicilinasas soportaron períodos de 0,5, 1, 1,5, 2 y 3 minutos. Después de 5 minutos desaparecieron P-38, P-52 y P-143 como bandas de precipitación, aunque el revelado químico persistía en su totalidad si bien mostraba áreas significativamente menos amplias. Después de 10 minutos desaparecieron todas las bandas de precipitación y quedó pequeña actividad solamente en P-67 y P-96. A los 20 minutos de comenzada la prueba, solamente perduraba P-96, que llegó a desaparecer por

completo cuando el tratamiento a 56° C se prolongó 30 minutos en total.

En la inmunoelectroforesis del sobrenadante constitutivo normal, S/H, las primeras bandas de precipitación que aparecieron fueron: P-38 y P-52. Bastaron para ello 3-4 horas de difusión a 36° C, momento en el que el resto de la placa permanecía en blanco. Después de 8-10 horas a 36° C se dibujaban con nitidez P-96 y P-67 y más tarde P-143 (tabla II).

Las bandas P-38 y P-52 fueron siempre las más próximas al canal del inunosuero y presentaron identidad antigénica parcial entre ellas. Por su parte entre P-67 y P-96 hubo comunidad antigénica total. Sin embargo, la diferencia inmunológica entre las familias de isopenicilinasas lentas (P-38/P-52) y rápidas (P-67/P-96) fue total, mientras que las tinciones específicas señalaron que solamente P-38 y P-52 tenían carácter de glicoproteínas.

PENICILINASAS PRESENTES EN OTROS PREPARADOS ENZIMÁTICOS. La valoración del extracto celular del cultivo constitutivo normal, C/H, fue 350 uP/ml. Poseía claramente diferenciadas en el revelado microbiológico P-38, P-52, P-67 y P-96 y por

TABLA III

Localización de cada una de las penicilinasas detectadas.

Fracción	uP/ml ⁺	P-38	P-52	P-67	P-78 *	P-80 **	P-96	P-143
S/H	6.600	×	×	×			×	×
S/I	4.000	×	×	×		×	×	×
S/F	5.600		×		×			×
S/B	Trazas		*					
C/H	350	×	×	×			×	*
C/I	250		×			×	×	*
C/F	300	*	×		×		×	*
C/B	nula		*			*		*

⁺ Valoración expresada en unidades según describen POLLOCK y TORRIANI (19); * Hallada únicamente en el cultivo constitutivo forzado (F), pero inmunológicamente idéntica a las del cultivo constitutivo normal (H); ** Hallada únicamente en el cultivo inducido (I) e inmunológicamente diferente a todas las restantes; * Solamente presente con certeza en inmuno-electroforesis.

inmuno-electroforesis se presentó además la banda P-143 (tabla III).

El sobrenadante, S/F, del cultivo forzado de la cepa constitutiva NRRL 569/H presentó una actividad de 5.600 uP/ml. Poseía P-52 y P-143, al igual que S/H; no poseía P-38, P-67 ni P-96 y, sin embargo, presentó una nueva penicilinasas de movilidad 78 % (P-78) (tabla III). Su velocidad de actuación en el revelado químico era significativamente superior incluso a P-96. La inmuno-electroforesis señaló asimismo la presencia de esta nueva penicilinasas, P-78, de movilidad electroforética distinta pero inmunológicamente igual a alguna de las constitutivas normales. Este hecho fue comprobado porque su banda de inmunoprecipitación apareció frente a los inmunosueros I-141 e I-144, que fueron obtenidos de conejos inmunizados con el cultivo constitutivo normal, H, y además S/H, fue capaz de absorber de ambos inmunosueros el anticuerpo correspondiente a P-78. La actividad como beta-lactamasas del extracto de células del cultivo constitutivo forzado, C/F, fue de 300 uP/ml. Sólo P-52 y P-96 estuvieron en cantidades suficientes para mostrar su actividad aunque se detectaron las bandas

de inmunoprecipitación características de P-38, P-78 y P-143 (tabla III).

La cepa *Bacillus cereus* NRRL 569, en cultivo inducido, presentó en su sobrenadante, S/I, 4.000 uP/ml. No sólo contenía todas las penicilinasas halladas en S/H, sino aun otra más de movilidad 80 % (P-80). Contrariamente a lo que podría parecer, esta nueva penicilinasas inducida no pudo igualarse a la constitutiva forzada, P-78, porque la banda de inmunoprecipitación correspondiente a P-80 apareció exclusivamente cuando se enfrentaron S/I y su inmunosero homólogo I-146 y la absorción de éste con S/H no hizo desaparecer dicha banda de inmunoprecipitación, P-80. Las mismas razones hicieron imposible igualar P-80 con cualquiera de las penicilinasas propias del cultivo constitutivo normal que, además, estuvieron presentes simultáneamente con P-80 en S/I (tabla III).

El extracto de las células inducidas, C/I, contenía 250 uP/ml. Se detectaron en él P-52, P-80 y P-96 como activas así como la banda de inmunoprecipitación correspondiente a P-143 (tabla III). No se detectaron beta-lactamasas ni en el sobrenadante, S/B, ni en el extracto celular, C/B,

del cultivo basal de *Bacillus cereus* NRRL 569. Sin embargo, S/B poseía la banda de precipitación correspondiente a P-52 y C/B la misma P-52, P-80 y P-143 (tabla III).

Mediante el empleo de sueros homólogos y heterólogos absorbidos se comprobó por inmunoelectroforesis que entre el cultivo normal de la cepa constitutiva (H), y el inducido de la cepa inducible (I), todos los antígenos fueron comunes excepto, precisamente, la banda penicilinasapositiva P-80 (fig. 1).

No ocurrió lo mismo entre el cultivo normal (H) y forzado (F) de la cepa constitutiva en lo que respecta a la distribución del inmunoelectroferograma (fig. 1), aunque todas las bandas de inmunoprecipitación detectadas fueron antigénicamente comunes con las constitutivas normales.

Las diferencias antigénicas entre el cultivo inducido (I) y basal (B) de la cepa inducible fueron muy significativas por pérdida acusada de antígenos detectados en el cultivo basal (fig. 1). Este cultivo basal fue el que menor comunidad antigénica presentó con cualquiera de los otros cultivos estudiados, sobre todo en su fracción sobrenadante, S/B.

Discusión

Según nuestras experiencias, el líquido extracelular del cultivo de la cepa constitutiva *Bacillus cereus* NRRL 569/H, presenta electroforéticamente una complejidad muy importante en su dotación de penicilinasas nunca admitida anteriormente (12, 13, 20).

CITRI (4) admite dos estados inmunológicos en las penicilinasas del *Bacillus cereus*, uno para las exocelulares (estado inmunológico alfa) y para las fácilmente separables de la célula (estado beta, inmunológicamente idéntico al alfa) y otro para las penicilinasas ligadas fuertemente a la célula (estado inmunológico gamma). La separación realizada por nosotros no admite dudas en cuanto a la localización de

las alfa-penicilinasas en nuestros sobrenadantes y de las gamma-penicilinasas en nuestros extractos celulares. Las beta-penicilinasas, con un 3-5 % de la actividad total (16) pueden haber sido recogidas como exopenicilinasas o perdidas en nuestros lavados pero nunca podrán encontrarse como endocelulares en nuestros extractos celulares. Pues bien, ninguna de nuestras endopenicilinasas, ya sea constitutiva o inducida, falta en el líquido extracelular correspondiente, lo que significa, en un estado inmunológico idéntico, que la condición de alfa-penicilinasas no puede ser admitida como criterio definidor de las exocelulares.

La sensibilidad al yodo, que caracteriza a las gamma-penicilinasas es más acentuada en la familia P-38/P-52 que en la P-67/P-96. Que las dos primeras isopenicilinasas sean efectivamente las consideradas hasta ahora como ligadas a la célula, estaría de acuerdo con su diferenciación inmunológica frente a P-67/P-96. La penicilinasasa P-96 debe ser considerada como exocelular típica ya que por dilución progresiva de los sobrenadantes fue siempre la última en desaparecer del bioautograma, cosa que no ocurrió con los extractos celulares.

Por otro lado, la familia P-38/P-52 presenta otras características físico-químicas que la diferencian de P-67/P-96, como son su menor velocidad de hidrólisis, su más rápida aparición en el inmunoforograma, su más estrecha distribución por centrifugación diferencial y su condición de glicoproteínas. Solamente P-96, además, es capaz de hidrolizar la oxacilina, en nuestras condiciones experimentales (tabla II).

La cepa inducible NRRL 569, cuando es realmente inducida por bencilpenicilina sódica, se iguala en su composición antigénica con la cepa constitutiva, excepto en una sola banda correspondiente a una nueva penicilinasasa P-80 (fig. 1) presente tanto en el sobrenadante como en el extracto celular. Este hecho explica la parcial neutralización cruzada de las penicilinasas in-

ducidas mediante el inmunosuero frente a las constitutivas (7) y las semejanzas siempre encontradas entre unas y otras (11, 15, 19, 20), al mismo tiempo que apoya la idea de que ambas se originen por el mismo mecanismo reprimido en el primer caso y liberado luego por el inductor (12). Sin embargo, la nueva penicilina formada en la inducción, parece indicar la puesta en marcha de un nuevo proceso, específico en este caso, lo que confirmaría la existencia de un doble control en el sistema sintetizador de penicilinas en el *Bacillus cereus* como señalan YIP y col. (25).

SAZ y LOWERY (22) admiten la no especificidad de las penicilinasas ni respecto a su inducibilidad ni a su sustrato. Así resultaría que más bien son enzimas propias del metabolismo de ciertos microorganismos que accidentalmente hidrolizan la penicilina, lo que estaría de acuerdo con su alto grado de heterogeneidad hallado por nosotros.

La presencia de penicilina durante el cultivo de la cepa constitutiva, apenas altera significativamente el nivel de penicilinasas formadas, como han observado DAY *et al.* (9), POLLOCK (17) y SHAH *et al.* (24). Sin embargo, según nuestros resultados, se produce cierta alteración en la «calidad» de ellas que se refleja al menos en un cambio de su movilidad electroforética, cosa que sucede también a otros componentes antigénicos de este cultivo. Tanto es así que se hace necesario admitir que existe mayor semejanza entre el cultivo constitutivo normal, H, y el inducido, I, que entre aquél y el constitutivo forzado, F, que se derivan de la misma cepa.

El análisis inmunoelectroforético del cultivo basal demuestra que éste posee una composición antigénica, común con otros cultivos, muy significativamente reducida. Su actividad como penicilinasas es tan pequeña que nos ha sido imposible conocer su distribución electroforética. La aparición de aquellas bandas de inmunoprecipitación clasificadas en otros preparados como beta-lactamasas nos permite

apuntar la posibilidad de su existencia en este basal, B.

El contacto de las penicilinasas con las penicilinas semisintéticas resistentes a ellas ha provocado lo mismo que la alta temperatura, la desaparición de las bandas de precipitación correspondientes a las penicilinasas inactivadas, lo cual confirma la hipótesis del cambio en la configuración de éstas según han afirmado CITRI y col. (5, 6, 21) y GOUREVITCH y col. (10).

Finalmente, los coeficientes de sedimentación hallados para nuestras penicilinasas crudas están de acuerdo significativamente con los que HALL (11) señala para las mismas muy purificadas.

Resumen

La combinación de tres métodos de revelado (microbiológico, químico e inmunológico) aplicados sobre la electroforesis en gel de agar de diversos preparados de cepas de *Bacillus cereus*, ha puesto de manifiesto la gran complejidad de su dotación de penicilinasas.

Todas las penicilinasas constitutivas e inducidas halladas en los extractos celulares, estuvieron también presentes en la fracción libre de células del cultivo correspondiente. Por otra parte la inducción de la cepa inducible con bencilpenicilina sódica dio lugar a las mismas penicilinasas constitutivas más otra, al parecer, propia y característica de la inducción.

Cuando la cepa constitutiva fue cultivada en presencia de la misma bencilpenicilina sódica, sus penicilinasas sufrieron alteración en algunas de sus características estudiadas, aunque inmunológicamente siguieron siendo reconocibles.

Se dan las movilidades electroforéticas de cada una de las 7 isopenicilinasas halladas, así como algunas de sus características físico-químicas que hacen posible su identificación.

Summary

Differentiation of Penicillinases in *Bacillus cereus*

Agar gel electrophoresis has been used to achieve the separation of beta-lactamas produced by two strains of *Bacillus cereus*. The detection and identification of

these enzymes was made by means of combining microbiological, chemical and immunological revelation of the electropherograms.

Bacillus cereus NRRL 569/H, constitutive strain, produced five exopenicillinases named P-38, P-52, P-67, P-96 and P-143, according to their electrophoretic mobility relative to that of the human albumin. Other physico-chemical characteristics (thermolability, sedimentation constant, inactivation by iodine, etc.) were also studied which allowed us to differentiate two isopenicillinase families which are immunologically completely different.

All cell-bound constitutive and induced penicillinases were also found in the corresponding cell-free supernatant fluid.

When the constitutive strain was cultured in presence of sodium benzylpenicillin, 10 uI/ml, no quantitatively significant change was observed in total penicillinase level. Nevertheless the electrophoretic distribution of exopenicillinases was altered in such a manner that it was not possible to recognize some normal constitutive ones while another «forced-constitutive» penicillinase (P-78) appeared. Its antigenic community with normal constitutive penicillinases was showed by heterologous absorption of antisera. Only in this forced-constitutive culture one cell-bound penicillinase was detected which was not present in the corresponding cell-free fluid.

The inducible strain *Bacillus cereus* NRRL 569 was also cultured both with and without sodium benzylpenicillin in the media. In the second case no penicillinases were found in the cell extract nor in the cell-free culture fluid.

Nevertheless, when effective induction was performed six isopenicillinases were detected five of which were the very same constitutive ones. The other one (P-80) seems characteristic and exclusive of induced culture. It presents immunological differences with respect to the other five induced penicillinases.

Bibliografía

1. ARCOS, J. M., y CHORDI, A.: *Ann. Inst. Pasteur*. En prensa.
2. ARCOS, J. M., y CHORDI, A.: *Microbiol. esp.*, 1968. (En prensa.)
3. BOWMAN, F. W.: *Antibiot. Chemoth.*, 10, 508, 1960.
4. CITRI, N.: *Bull. Res. Counc. of Israel*, 9A, 28, 1960.
5. CITRI, N., GARBER, N., and SELA, M.: *J. Biol. Chem.*, 235, 3454, 1960.
6. CITRI, N., and GARBER, N.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 4, 143, 1961.
7. CITRI, N., and STREJAN, G.: *Nature*, 190, 1010, 1961.
8. CHORDI, A., and KAGAN, I. G.: *J. Immunol.*, 93, 439, 1964.
9. DAY, R. A., and SHAH, R.: *Science*, 138, 1108, 1962.
10. GOUREVITCH, A., PURSIANO, T. A., and LEIN, J.: *Nature*, 195, 496, 1962.
11. HALL, J. R.: *Biochem. J.*, 62, 401, 1956.
12. KOGUT, M., POLLOCK, M. R., and TRIDGELL, E. T.: *Biochem. J.*, 62, 391, 1956.
13. PÉCHERE, J. P., and ZANEN, J.: *Nature*, 195, 805, 1962.
14. PERRET, C. J.: *Nature*, 174, 1012, 1954.
15. POLLOCK, M. R.: *J. Gen. Microbiol.*, 14, 90, 1956.
16. POLLOCK, M. R.: *J. Gen. Microbiol.*, 15, 154, 1956.
17. POLLOCK, M. R.: *CIBA Found. Symp. Drug. Resistance Microorganisms*, pág. 78, 1957.
18. POLLOCK, M. R.: *J. Pharmacol.*, 9, 609, 1957.
19. POLLOCK, M. R., and TORRIANI, A. M.: *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 237, 276, 1953.
20. POLLOCK, M. R., TORRIANI, A. M., and TRIDGELL, E. T.: *Biochem. J.*, 62, 387, 1956.
21. RON-ZANZIGER, E., and CITRI, N.: *Nature*, 198, 887, 1963.
22. SAZ, A. K., and LOWERY, D. L.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 15, 525, 1964.
23. SCHEIDEGGER, J. J.: *Internat. Arch. Allergy*, 7, 103, 1965.
24. SHAH, R., and DAY, R. A.: *Ohio J. Sci.*, 63, 217, 1963.
25. YIP, L. C., SHAH, R., and DAY, R. A.: *J. Bacteriol.*, 88, 297, 1964.