



DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA MEDICA

**"ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE ALCOHOLES PRIMARIOS
SOBRE LA VIABILIDAD DE STAPHYLOCOCCUS
AUREUS Y ESCHERICHIA COLI Y LA INTEGRIDAD
DE SUS RESPECTIVOS ESFEROPLASTOS"**

TESIS

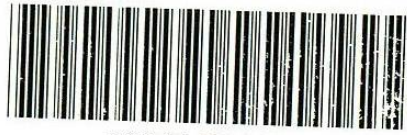
**QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

MA. ALICIA SUAREZ SEMOUR

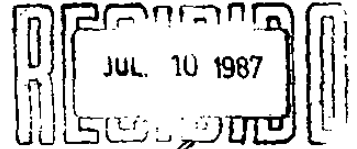
1979

TM
Z6658
FM
1979
.S9



1020150061

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA
DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS
POST GRADO



F S M A

n

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA MEDICA

"ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALCOHOLES PRIMARIOS SOBRE LA VIABILIDAD DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI* Y LA INTEGRIDAD DE SUS RESPECTIVOS ESFEROPLASTOS".

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias

PRESENTA

MA. ALICIA SUAREZ SEMOUR

1 9 7 9

297395

TH
Z6658
FM
1979
.59



El presente trabajo se llevó a cabo en el
Laboratorio de Microbiología de la Facul-
tad de Medicina de la U. A. N.L.

Bajo la dirección del

DR. MANUEL A. RODRIGUEZ Q.

"ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALCOHOLES PRIMARIOS SOBRE LA VIABILIDAD DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ESCHERICHIA COLI Y LA INTEGRIDAD DE SUS RESPECTIVOS ESFEROPLASTOS".

I N D I C E

	Página
Introducción.	1
Material y Métodos.	5
Resultados.	9
Discusión y Conclusiones.	72
Resumen.	78
Bibliografía.	81

INTRODUCCION

Desde hace bastante tiempo se ha estudiado el efecto antibacteriano de los alcoholes. Harrington y Walker en 1903 ensayaron el poder antibacteriano del etanol sobre diversas bacterias gram positivas y gram negativas. Sus estudios estaban dirigidos a determinar cuales eran las concentraciones necesarias para matar a diversas bacterias de importancia médica (12). En el año de 1943 Tanner y Wilson (24) ensayaron alcoholes de 1 a 11 carbonos por medio de una prueba de difusión en cilindros midiendo la zona de inhibición. Los resultados indicaron que el diámetro de las zonas aumentaban desde el etanol hasta el pentanol para luego decrecer con alcoholes de mayor peso molecular. Dagley y colaboradores (4) estudiaron el efecto de alcoholes, fenoles y otros compuestos sobre la curva de crecimiento de *Aerobacter aerogenes* en un medio sintético. Se demostró que algunos de estos agentes prolongaban la fase de adaptación y modificaban la pendiente de la curva de crecimiento, deduciendo que los alcoholes afectaban fundamentalmente los sistemas enzimáticos bacterianos responsables del metabolismo de aminoácidos y algunos - - otros compuestos por ellos estudiados. En 1961 González Barrera estudió el efecto de diversos solventes orgánicos sobre la viabilidad de bacterias gram positivas y gram negativas. Demostró que concentraciones de 20% fueron letales para bacterias gram positivas y gram negativas en alcoholes superiores a 3 carbonos; sin embargo alcoholes de 2 y 3 carbonos determinaban un efecto diferencial en el cual los cocos gram positivos tenían tendencia a sobrevivir por mas tiempo que las bacterias gram negativas, mientras que el metanol tenía un efecto casi nulo a esa concentración (11).

Posteriormente González en 1964 demostró que el efecto de estos alcoholes sobre células bacterianas, determinaba la fuga de componentes intracelulares que absorbían energía a los 260 y 280 nm. pudiendo construir espectrogramas en el ultravioleta que demostraba la salida de ácidos nucleicos y proteínas como resultado de la interacción de los alcoholes con las bacterias (10). También se demostró que la cantidad de componentes intracelulares que se fugaban era mayor en las bacterias gram negativas que en las gram positivas, lo cual acusaba ya un efecto diferencial en cuanto a los componentes superficiales de la bacteria (16). Puesto que esto proporcionaba evidencia de que estos agentes actuaban probablemente al nivel de la membrana citoplasmática, se iniciaron estudios con el propósito de determinar si eran alterados algunos mecanismos importantes, como la respiración terminal y el transporte de electrones. En este estudio se demostró que efectivamente, alcoholes de 1, 2 y 3 carbonos determinaban un efecto notable sobre la respiración bacteriana, disminuyéndola notablemente y con alcoholes de 4 ó más carbonos anulándola a una concentración de 20%. Se demostró que el efecto de estos alcoholes sobre la respiración bacteriana era mucho más importante sobre los bacilos gram negativos como *E. coli*, que sobre cocos gram positivos como *S. aureus* (22).

Así mismo, examinando los componentes fugados por acción de alcoholes de 1 a 4 carbonos se pudo apreciar una gran salida de aminoácidos, azúcares, fosfato inorgánico, aún con alcoholes de 1 a 2 carbonos, mientras que la salida de proteínas fué menos importante (23).

Los trabajos de Weibull en 1953 (25) permitieron la obtención de protoplastos de *B. megaterium* a través de tratamiento con lisozima y fué posible por primera vez hacer el estudio de compuestos sobre la membrana cito

plasmática, en ausencia de pared celular. Gilby y Few en 1959 iniciaron estudios sobre las propiedades osmóticas de protoplastos de *M. lysodeikticus* estudiando el efecto de detergentes iónicos a diferentes concentraciones (8). -- Ellos mismos en 1960 (9), determinaron el efecto de alcoholes primarios sobre los mismos protoplastos. Este fué el primer trabajo sobre el mecanismo de acción de estos agentes sobre la membrana citoplasmática, llegando a la conclusión de que estos agentes actuaban desorganizando los componentes lípideos de la membrana celular. Razin y Argman en 1963 (15) estudiaron también el efecto de alcoholes y otros agentes sobre protoplastos y esferoplastos. Fried en 1973 (6) estudió el efecto del etanol sobre esferoplastos de *E. coli*, observando una disminución inmediata en la velocidad de crecimiento de estos microorganismos.

Todos los estudios llevados a cabo sobre este tema fueron hechos a una sola concentración de los alcoholes. Se pensó que podrían dilucidarse las diferencias entre bacterias gram positivas y gram negativas, haciendo estudios cuantitativos en los cuales concentraciones diferentes de diversos alcoholes pudieran ser puestos en contacto con la misma población bacteriana para determinar las características de la curva de muerte a cada concentración. Así mismo, fué importante preparar esferoplastos de ambas especies y exponerlas a las mismas concentraciones de estos agentes y determinar espectrofotométricamente si había o no alteración estructural de la membrana citoplasmática, preferentemente demostrable a través de una lisis de los esferoplastos. Nuestro interés en la producción de esferoplastos resulta de investigar la participación de la pared celular en el mecanismo de acción de los alcoholes. Por tal razón este estudio se encaminó con el propósito de conocer si el efecto letal en las células enteras coincide con el daño a la mem-

brana citoplasmática de los esferoplastos, en cuyo caso se tendría que aceptar que la pared celular no ejerce ninguna acción protectora. Si por el contrario alguna de las especies tiene viabilidad mas prolongada a concentraciones mayores de algún alcohol que aquellas necesarias para romper su membrana citoplasmática, tendría que aceptarse que la pared celular ejerce una acción decisiva de protección de la membrana del esferoplasto, protegiéndola de su destrucción y además explicando de paso el fenómeno de sobrevivencia observado en estudios anteriores.

MATERIAL Y METODOS

Se usaron como organismos de prueba una cepa de *Escherichia coli* y otra de *Staphylococcus aureus*, ambas de la colección bacteriana del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Estas fueron mantenidas por pasajes mensuales en frascos de colección en agar infusión de cerebro y corazón adicionado de cistefina y conservadas bajo refrigeración.

A) EFECTO DE LOS ALCOHOLES PRIMARIOS DE 1 A 4 CARBONES Y SUS ISOMEROS SOBRE LA VIABILIDAD BACTERIANA.

Se tomó inóculo de los frascos de colección de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y se pasaron a tubos conteniendo 5 ml. de caldo de tripticasa y soya; los cuales fueron incubados a 37°C por 4 horas con el objeto de poner en plena actividad los sistemas metabólicos de las bacterias. De ahí se pasó un inóculo de 1 ml. a matraces Erlenmeyer de 250 ml. conteniendo 50 ml. del mismo medio el cual fué incubado en forma estática durante 14 a 16 horas.

El cultivo fué distribuído en tubos de 50 ml y centrifugado, el sobrenadante se eliminó y las células fueron lavadas dos veces con solución salina amortiguada 0.666 M a un pH de 7.0 El paquete celular fué suspendido en la misma solución de lavado hasta obtener una densidad óptica de 1.0 a una longitud de onda de 620 nanómetros.

Para cada molaridad de alcohol ensayada, se agregó la alicuota correspondiente, se añadió solución salina amortiguada hasta obtener 4 ml. de volumen total; en seguida se agregó 1 ml. de la suspensión bacteriana. Se to

maron alicuotas de 0.1 ml. y se hicieron cuentas viables por duplicado. Para el testigo se diluyó la suspensión 1:4. Se extendió el inóculo utilizando varillas dobladas y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se hizo el recuento y se seleccionaron aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias de - cada dilución y tiempo de exposición.

Los alcoholes ensayados fueron los siguientes: metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, butanol secundario y butanol terciario; se probaron diferentes molaridades, siendo la máxima aquella en la que todavía fué miscible el alcohol en estudio. Los tiempos de exposición -- fueron de 5, 10, 15 y 30 minutos.

B) EFECTO DE LOS ALCOHOLES PRIMARIOS DE 1 A 4 CARBONES Y SUS ISOMEROS SOBRE LA ESTABILIDAD DE SUS ESFEROPLASTOS.

Para la preparación de esferoplastos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se utilizaron diferentes técnicas. Para obtener los de *S. aureus* se utilizó la degradación enzimática de la pared celular mientras que para *E. coli* se inhibió la síntesis de la pared celular con ampicilina.

Preparación de esferoplastos de *S. aureus*:

Se tomó inóculo del stock, se pasó a tubos conteniendo 5 ml. de caldo triptícase y soya, se incubó por 5 hrs. a 37°C. De este cultivo se inoculó 1 ml. en 500 ml. del mismo medio, el cual fué incubado en forma estática a 37°C. durante 18 horas. Las células se separaron por centrifugación a - - 1085 G, se lavaron con solución salina 0.15 M amortiguada con TRIS a pH de -- 7.5; las células fueron suspendidas en la misma solución pero con sacarosa -- 1.4 M, hasta obtener una D.O. de 1.0 a 620 nanómetros.

Se agregó la enzima Lisostafina (18) en una concentración final de 5 mcg/ml., incubándose en baño de agua a 37°C por 2 horas. Los esferoplastos obtenidos se centrifugaron a 9750 G y se suspendieron en la misma solución amortiguadora con Sacarosa 1.4 M.

Preparación de esferoplastos de *E. coli*:

Para la preparación de los esferoplastos de *E. coli*, se utilizó la técnica descrita por Gebicki y James (7) modificada por nosotros. Se inocularon 0.4 ml. de un cultivo de 12 horas de la cepa original, en un matraz de 250 ml. conteniendo 20 ml. de caldo cerebro corazón precalentado a 37°C. Se incubó por 3 horas a 37°C para entrar en la fase exponencial; se hizo una dilución 1.5 en el mismo medio adicionado de MgSO₄ 0.004 M, sacarosa 0.7 M y Ampicilina a dar una concentración final de 100 mcg/ml. Después de 6 horas de incubación los esferoplastos obtenidos se separaron por centrifugación a 3020 G y se suspendieron en la solución amortiguadora conteniendo sacarosa 0.7 M, hasta obtener una D.O. de 0.8 a una longitud de onda de 640 nanómetros. Los esferoplastos se agitaron magnéticamente por 2 horas en ausencia de factores energéticos para completar la autodigestión de la pared celular.

Se siguió la formación de los esferoplastos en ambas especies, por microscopía de fase y se comprobó su sensibilidad al choque osmótico.

Diseño Experimental:

Para la exposición de los esferoplastos, a la acción de los alcoholes se varió la concentración de la sacarosa de tal forma que en cada tubo hubiera un volumen igual y mantener constante la presión osmótica del sistema. En el caso de *S. aureus* a una serie de tubos del espectrofotómetro con las diferentes concentraciones de los alcoholes se les agregó sacarosa

2.45 M hasta obtener una molaridad de 1.4 ajustándose el volumen final a 4 ml. con sacarosa 1.4 M. A todos los tubos se les agregó 1 ml. de esferoplastos. Para *E. coli* se siguió el mismo sistema excepto que la molaridad de la sacarosa se ajustó a 0.70.

Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro "Spectronic - 20" (Bausch & Lomb) a 640 nanómetros a los 5, 15, 30 y 60 minutos después de haber agregado los esferoplastos. Cada serie de concentraciones de alcohol -- fué llevada con un testigo de estabilidad de los esferoplastos.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se expresan en -- forma de gráficas; los de células enteras; viabilidad contra tiempo, para conocer el efecto de cada una de las molaridades utilizadas; así como también -- se graficó viabilidad contra molaridad, para visualizar la pendiente de la -- curva a dos tiempos determinados.

En lo referente a esferoplastos también fueron expresados en -- forma de gráfica los resultados: Densidad Optica contra tiempo y Densidad Optica contra molaridad con el mismo propósito que en células enteras. Finalmente se hicieron gráficas combinadas de células enteras y esferoplastos graficando viabilidad contra molaridad y Densidad Optica contra molaridad, comparando en la misma gráfica ambas especies bacterianas a un solo tiempo 5 minutos.

RESULTADOS

Se estudió en primer lugar el efecto de los alcoholes de 1 a 4 carbonos y sus isómeros sobre la viabilidad de *E. coli* y *S. aureus*, para determinar sus diferencias. En seguida se analizó el efecto de los mismos alcoholes sobre la integridad de sus esferoplastos midiendo su Densidad Óptica.

Los resultados de los recuentos bacterianos obtenidos al agregar 1 ml. de la suspensión original a 4 ml. de solución salina amortiguada -- fué para *E. coli* de 9.9×10^8 bacterias/ml. como promedio, siendo los recuentos mínimos de 8.6×10^8 y los máximos de 1.13×10^9 bacterias/ml. Para *S. aureus* se obtuvo un promedio de 5.6×10^8 bacterias/ml. con un mínimo de 2.0×10^8 y un máximo de 7.8×10^8 bacterias/ml. Estos recuentos fueron obtenidos cuando la suspensión fué ajustada a una D.O. de 1.0 a 620 nanómetros de longitud de onda. Estas fueron las cifras de la población bacteriana agregada a cada uno de los tubos que contenían las diferentes mezclas de alcohol y solución salina amortiguada.

El análisis del comportamiento de ambas especies bacterianas -- con los alcoholes ensayados pueden ser examinados en las gráficas 1-8, en donde en la ordenada aparece el logaritmo del número de bacterias viables y en las abscisas el tiempo en minutos. Se graficó tomando los tiempos de 5, 10 y 15 minutos porque como podrá observarse, el mayor efecto de los alcoholes sobre ambas especies, se logra desde los 5 minutos de exposición.

En la gráfica 1 podemos observar el efecto del metanol sobre poblaciones de *E. coli* y *S. aureus*: nótese que al ir aumentando la molaridad -- del alcohol, disminuye progresivamente la viabilidad haciéndose notable la diferencia para *E. coli* entre el 8.0 M y el 9.0 M, en donde la viabilidad dismi

nuve en dos logaritmos. *E. coli* sufre una mayor pérdida de su viabilidad que *S. aureus*, como puede observarse en el 9.0 M, la viabilidad es de 7.9×10^5 , mientras que *E. coli* es de 1.89×10^3 en la misma molaridad.

Si examinamos en la gráfica 2 el efecto del etanol para ambas especies, podemos observar una diferencia muy importante, mientras que para *E. coli* a una concentración de 4.0 M anula su viabilidad en una población original de 8.6×10^8 ; para *S. aureus* una concentración de 7.0 M se mantiene en 7.2×10^5 a los 15 minutos de exposición.

La gráfica 3 muestra el comportamiento para n-propanol, en donde podemos observar la disminución de viabilidad en ambos casos, siendo más notable para *E. coli* en donde la concentración de 2.5 M disminuye hasta 3.0×10^1 a los 5 minutos de exposición. Para ambas bacterias la concentración de 3.0 M anulan su viabilidad.

Como podemos observar en la gráfica 4, el efecto del iso-propanol es menor que en el n-propanol para *E. coli* la viabilidad va disminuyendo en forma más o menos paralela hasta una concentración de 2.5 M; sin embargo al exponer esta bacteria a una concentración de 3.0 M decae rápidamente la viabilidad. Para *S. aureus*, el efecto es menor y se observa una disminución constante hasta 3.0 M, pero concentraciones de 3.5 M mantiene todavía viables a los 5 minutos 8×10^1 bacterias.

La gráfica 5 muestra el efecto del n-butanol, en ambas bacterias puede observarse una disminución progresiva hasta la molaridad de 0.25, la concentración de 0.30 M disminuye la viabilidad hasta 2×10^1 para *E. coli*, mientras para *S. aureus* a esta molaridad, la viabilidad se mantiene en 5.4×10^4 . La diferencia letal de este alcohol para *E. coli* es de 0.35 M y para *S. aureus* es de 0.60 M; casi el doble de concentración.

Para iso-butanol en la gráfica 6 podemos observar algo parecido a lo que pasa con n-butanol, la disminución progresiva de la viabilidad en ambas bacterias la diferencia es que la concentración letal para *E. coli* es de 0.45 M y para *S. aureus* es la misma que con n-butanol 0.60 M.

En la gráfica 7 se observa que con este isómero la viabilidad se mantiene a concentraciones más altas que con los anteriores isómeros, la disminución de la viabilidad es progresiva al ir aumentando la concentración del alcohol, obteniéndose el efecto letal para *E. coli* 0.50 M y para *S. aureus* 0.75 M.

Cómo se muestra en la gráfica 8 el butanol terciario muestra un efecto letal menos importante; sin embargo, la acción sobre *E. coli* es más nociva que sobre *S. aureus*. El butanol secundario, el iso-butanol y el n-butanol, son los que siguen en ese orden su actividad letal.

Las gráficas 9-16 muestran el comportamiento de estos alcoholes en base a las diferentes molaridades utilizadas para cada uno de ellos. La línea punteada corresponde a una exposición de 5 minutos y la línea continua corresponde a los 30 minutos. Tiempos mínimo y máximo utilizados en este estudio.

En cada una de estas gráficas puede apreciarse que el mayor efecto del alcohol sobre las células ocurre a los 5 minutos ya que como puede observarse en las gráficas de 30 minutos, la diferencia no es significativa.

La gráfica 17 muestra a los dos isómeros n-propanol e iso-propanol a los 5 minutos de exposición para *E. coli*; como puede verse el efecto letal del n-propanol es un poco mayor que para el iso-propanol, siendo el efec-

to letal para ambos de 3.0 M.

La gráfica 18 compara los mismos isómeros, pero para *S. aureus*, aquí como puede verse la disminución de la viabilidad es casi paralela para ambos alcoholes hasta 2.5 M, pero al llegar a 3.0M el efecto es letal con n-propanol y no así para el iso-propanol, que a esa molaridad hay una concentración de 8.8×10^4 células.

La gráfica 19 compara los cuatro isómeros de los butanoles para *E. coli*. Como puede observarse hay una diferencia notable, ya que se muestra un efecto letal menos importante de acuerdo a su estructura molecular,

Si examinamos la gráfica 20 muestra el comportamiento del butanol y sus isómeros para *S. aureus*. Se observa algo semejante al caso de *E. coli*, con la diferencia de que el efecto letal de estos isómeros son a molaridades superiores a los de *E. coli*.

Las gráficas 21 y 22 muestran en resumen el efecto de los ocho alcoholes trabajados a un tiempo de 5 minutos para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. En estas gráficas puede observarse la disminución de viabilidad al ir aumentando el número de carbonos; puede apreciarse una relación entre el efecto de un isómero y su estructura molecular.

La tabla 1 muestra las concentraciones letales de cada alcohol para *E. coli* y *S. aureus*.

Las siguientes gráficas muestran el comportamiento de esferoplastos de *E. coli* y *S. aureus*, frente a las mismas concentraciones de alcohol que fueron usadas en el caso de células enteras. El parámetro utilizado en este caso fué la estabilidad del esferoplasto en un medio iso-osmótico mi

diendo la Densidad Optica antes y después de la exposición alcohólica a los 5, 15, 30 y 60 minutos.

La gráfica 23 muestra el comportamiento de poblaciones de esferoplastos de *E. coli* y *S. aureus* frente a metanol. Puede observarse que este alcohol no tiene efecto lítico.

La gráfica 24 muestra el efecto del etanol, las líneas expresan el comportamiento del valor numérico de la turbiedad, no hay efecto lítico, ya que como se observa en ningún momento ocurre una caída de Densidad Optica a cifras inferiores a las que tenía la suspensión original en ausencia del alcohol (testigo de estabilidad de esferoplastos). Puede observarse sin embargo, que la suspensión de esferoplastos de *S. aureus* aumenta el valor de la Densidad Optica, llegando a un máximo de turbiedad en el 2.0 M y luego descender. Esto probablemente está relacionado con cambios en tamaño del esferoplasto consecuentes a cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana. En el caso de *E. coli* se observa un fenómeno semejante observándose la mayor Densidad Optica en 7.0 M a los 5 minutos de contacto.

La gráfica 25 muestra el efecto del n-propanol, donde puede observarse que para *E. coli* el n-propanol es letal a concentraciones menores que el iso-propanol, como puede observarse en la gráfica 26. Una concentración superior a 0.5 M de n-propanol determina una lisis de los esferoplastos, mientras que la misma concentración de iso-propanol no tiene ningún efecto y se requieren concentraciones superiores a 1.2 M para alterar la integridad de los esferoplastos. Para *S. aureus* puede observarse gran aumento en la Densidad Optica provocada al hincharse las células y como se observa una concentración de 0.6 M provoca la ruptura de membranas. En el caso del iso-propanol, se requieren concentraciones superiores a 1.0 M para provocar la lisis de estas células.

Al observar la gráfica 27 vemos que el efecto del n-butanol sobre *E. coli* es más severo, ya que concentraciones de 0.20 M produce la lisis de estas células. Para *S. aureus* se requiere una molaridad de 0.30.

El comportamiento del iso-butanol en la gráfica 28 es muy semejante al n-butanol, ya que concentraciones superiores a 0.25 M determinan una lisis rápida para ambas células.

El butanol secundario es menos activo, como puede observarse en la gráfica 29, ya que se requieren concentraciones superiores a 0.4 M para *E. coli* y *S. aureus* para lograr la lisis de la membrana.

La gráfica 30 muestra el comportamiento del butanol terciario en donde puede observarse que para *E. coli* se requieren molaridades superiores a 0.7 M para que ocurra la lisis de los esferoplastos y para *S. aureus* ocurre algo semejante, observándose antes de la caída de la D.O., un gran aumento de la D.O. El butanol terciario es el menos efectivo de todos los isómeros.

Las gráficas 31-38 muestran el efecto de la molaridad sobre los esferoplastos a los 5 y 60 minutos, tiempos mínimos y máximos trabajados en estos experimentos.

En la gráfica 31 puede observarse que el metanol no tiene efecto lítico sobre ambos tipos de esferoplastos. Así mismo, en la gráfica 32 no hay efecto lítico, pudiendo observarse un aumento considerable en la D.O.

La gráfica 33 muestra la lisis ocurrida en el caso de *E. coli* con n-propanol, esta lisis va aumentando, al ir incrementándose la molaridad. Para *S. aureus*, la caída es más brusca.

Con el iso-propanol en la gráfica 34, el comportamiento es semejante al n-propanol, en cuanto a la caída progresiva, pero como podemos observar en esta gráfica la D.O. es mayor para *E. coli* y se requieren concentraciones superiores para alterar la integridad de los esferoplastos. Para *S. aureus* la lisis ocurre en la concentración de 1.5 M a diferencia del n-propanol -- que ocurre antes (1.0 M).

Las gráficas 35, 36, 37 y 38 muestran su comportamiento para cada uno de los isómeros del butanol, observándose que no hay diferencia significativa entre el tiempo inicial 5 minutos y el máximo estudiado 60 minutos.

Las gráficas 39 y 40 comparan el comportamiento del n-propanol é iso-propanol sobre sus esferoplastos, a un tiempo de 5 minutos. Aquí se observa claramente el mayor efecto del n-propanol el cual es letal a menores concentraciones que el iso-propanol.

La gráfica 41 muestra las diferencias en el comportamiento de esferoplastos de *E. coli* sobre los isómeros de butanol a los 5 minutos de contacto. Primeramente podemos observar que la pendiente de caída de la D.O. es de menor valor, se observa la misma distribución de las curvas; en las que n-butanol é iso-butanol son más activas, requiriéndose la misma concentración de ellos para iniciar la lisis. El butanol secundario y butanol terciario los siguen en efecto destructor sobre la membrana citoplasmática.

La gráfica 42 compara el efecto de estos mismos isómeros sobre *S. aureus*. El comportamiento del n- é iso-butanol es muy semejante, siendo estos dos los más letales. Por el contrario el butanol secundario es menos activo ya que se requieren concentraciones superiores y finalmente el butanol terciario es el menos efectivo de todos. Las gráficas 43 y 44 muestran el compor

tamiento de los ocho alcoholes para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.

De todos los experimentos sobre el efecto de alcoholes sobre los esferoplastos, se hicieron observaciones microscópicas con contraste de fase y se observó que cuando la D.O. se incrementaba, correspondía aparentemente a un aumento de volumen de los esferoplastos. Cuando la D.O. disminuía aproximadamente al mismo nivel de turbiedad con que se inició el experimento se observaron esferoplastos rotos y aparentemente vacíos, pero sin disolución de la membrana citoplasmática. Cuando la D.O. disminuía a cifras por debajo de la turbiedad inicial, se observaba una desaparición casi completa de los esferoplastos y seguramente correspondiente a la desintegración de la membrana citoplasmática.

Las gráficas 45-52 muestran el efecto de los alcoholes, sobre células enteras y esferoplastos de *E. coli* y *S. aureus* a los 5 minutos de contacto. En la gráfica 45 puede apreciarse que las células enteras de *E. coli* muestra una disminución en su viabilidad un poco mayor a la de *S. aureus*. El metanol no tiene efecto lítico sobre los esferoplastos.

La gráfica 46 muestra el efecto del etanol, las células enteras de *E. coli* son inhibidas a una molaridad de 4.0, sin embargo *S. aureus* se mantiene viable hasta 7.0 M. Los esferoplastos con este alcohol no muestran efecto lítico, mostrando que la muerte ocurrida a nivel de viabilidad no es causada por alteración a la membrana citoplasmática, sino probablemente a daño a nivel enzimático.

Para el n-propanol la viabilidad disminuye más rápidamente para la *E. coli*, sin embargo la dosis letal para ambos es de 3.0 M. Para los esferoplastos, podemos observar una disminución muy marcada para *S. aureus* a la

concentración de 1.0 M, sin embargo para *E. coli* la disminución de la D.O. -- ocurre más progresiva.

La gráfica 48 muestra que el iso-propanol causa menos daño en la viabilidad de *S. aureus*. Los esferoplastos de *S. aureus* muestran una caída - de la D.O. en 1.5 M. Ambas células son lisadas por este alcohol.

El efecto del n-butanol se muestra en la gráfica 49, en donde se observa la caída rápida de la viabilidad de *E. coli* mostrando para este alcohol una dosis letal de 0.35 M, para *S. aureus* también hay disminución progresiva de su viabilidad, siendo letal a 0.6 M. Los esferoplastos también son - lisados más rápidamente que los de *S. aureus*.

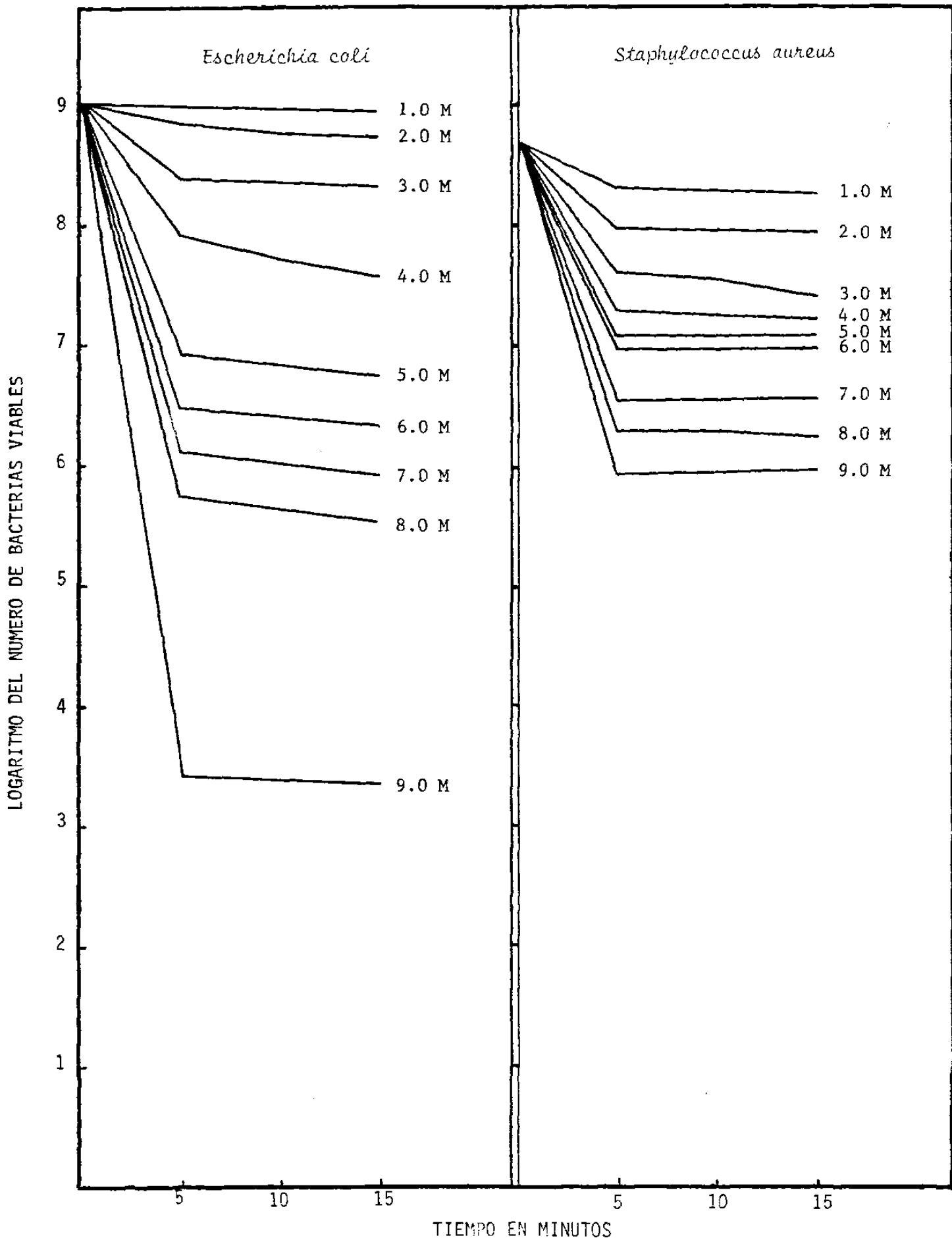
La gráfica 50 muestra el efecto del iso-butanol, la dosis letal para *S. aureus* es de 0.6 M. En los esferoplastos de *S. aureus* se observa una caída más rápida de la D.O. que en *E. coli*. Este mismo fenómeno puede ser observado en el resto de los isómeros.

La gráfica 53 compara el n é iso-propanol para ambos tipos de células, observándose el efecto menor del iso-propanol.

Las gráficas 54 y 55 comparan los cuatro isómeros del butanol, - observando la disminución del efecto letal y lítico el cual es muy semejante para n é iso-butanol. La acción del butanol secundario y butanol terciario - es menor a la de los alcoholes anteriores.

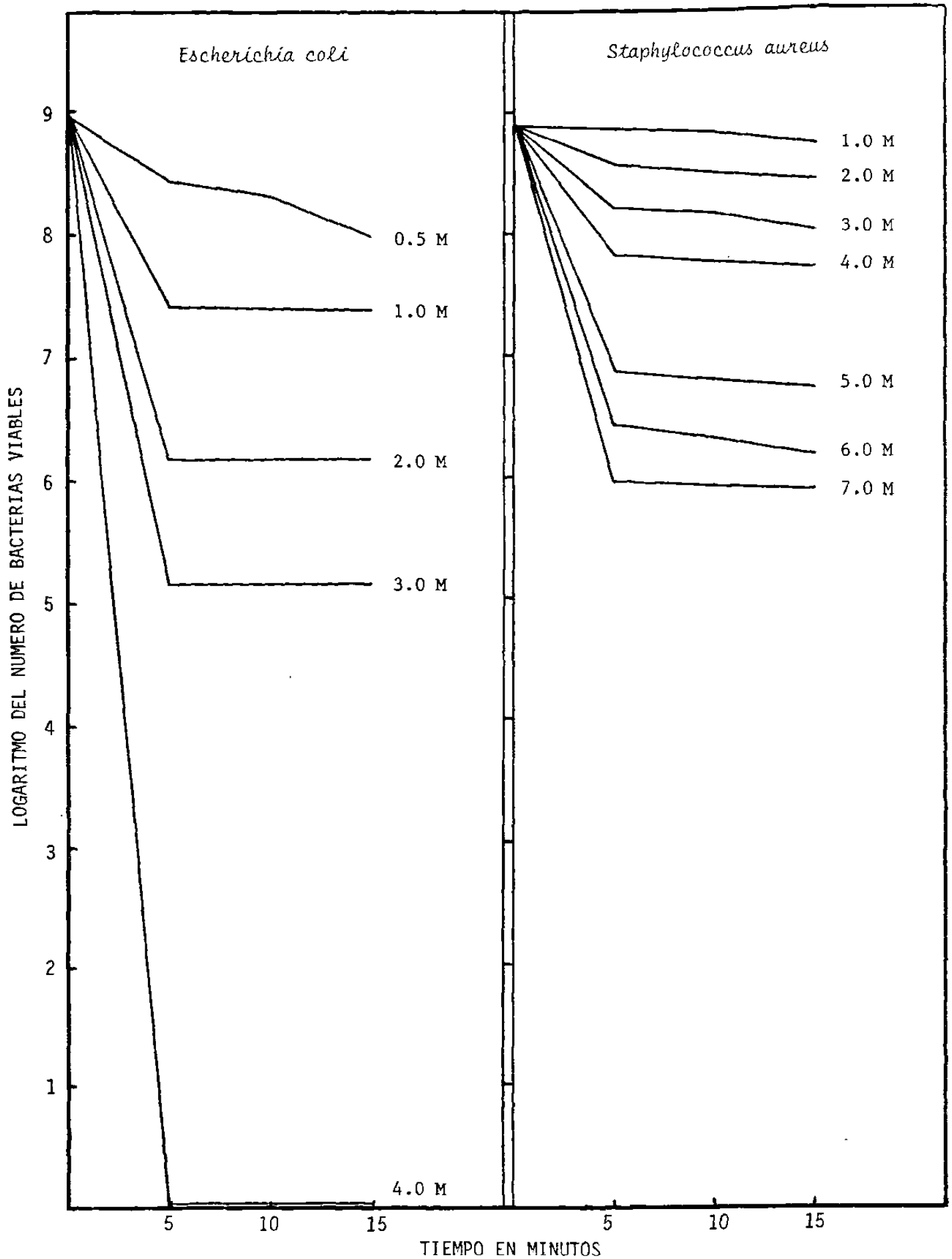
Finalmente las gráficas 56 y 57 comparan el efecto de todos los alcoholes ensayados para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. Observándose - que al aumentar el tamaño de la cadena la acción de estos alcoholes es mayor.

METANOL

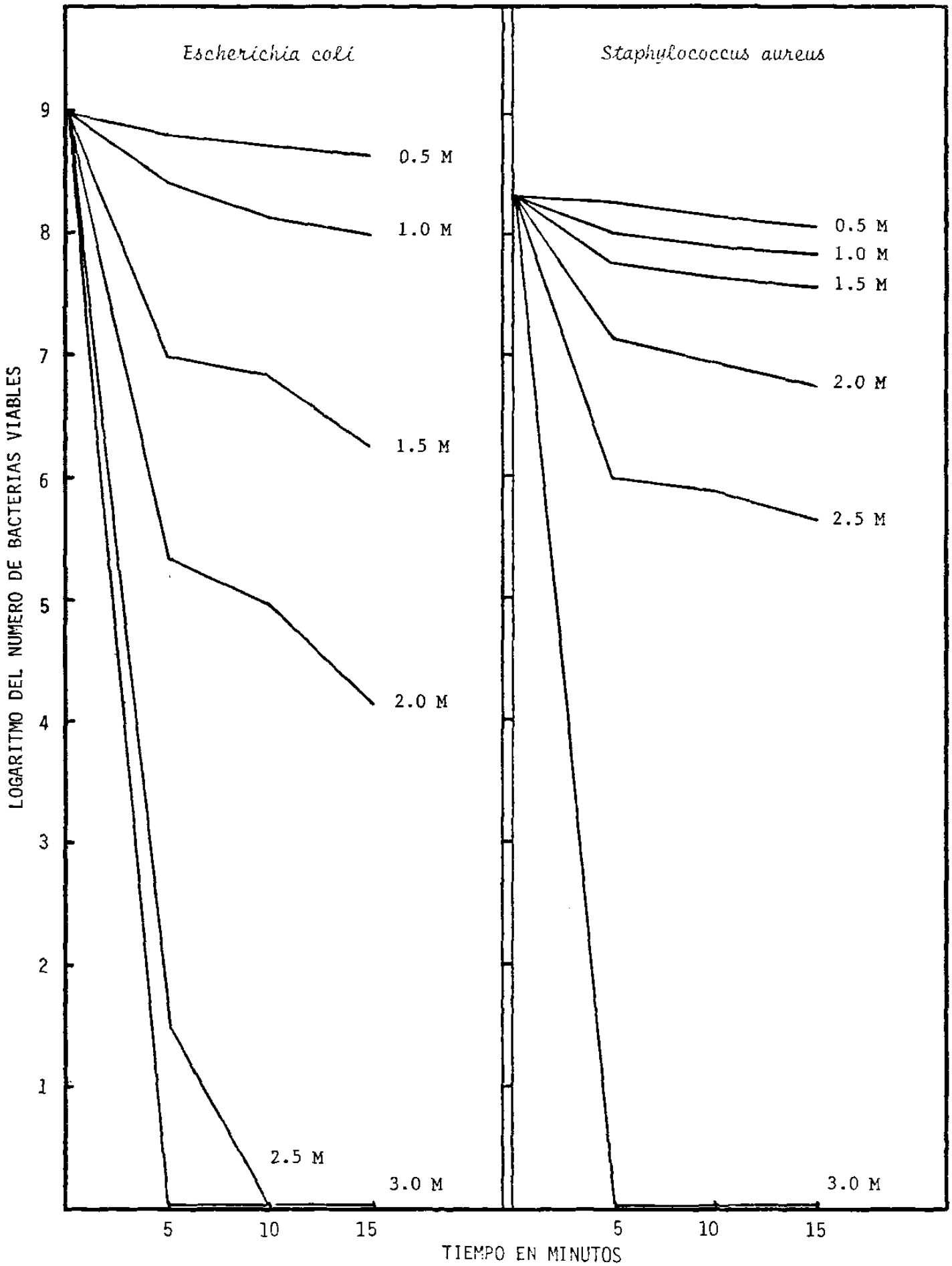


GRAFICA 2

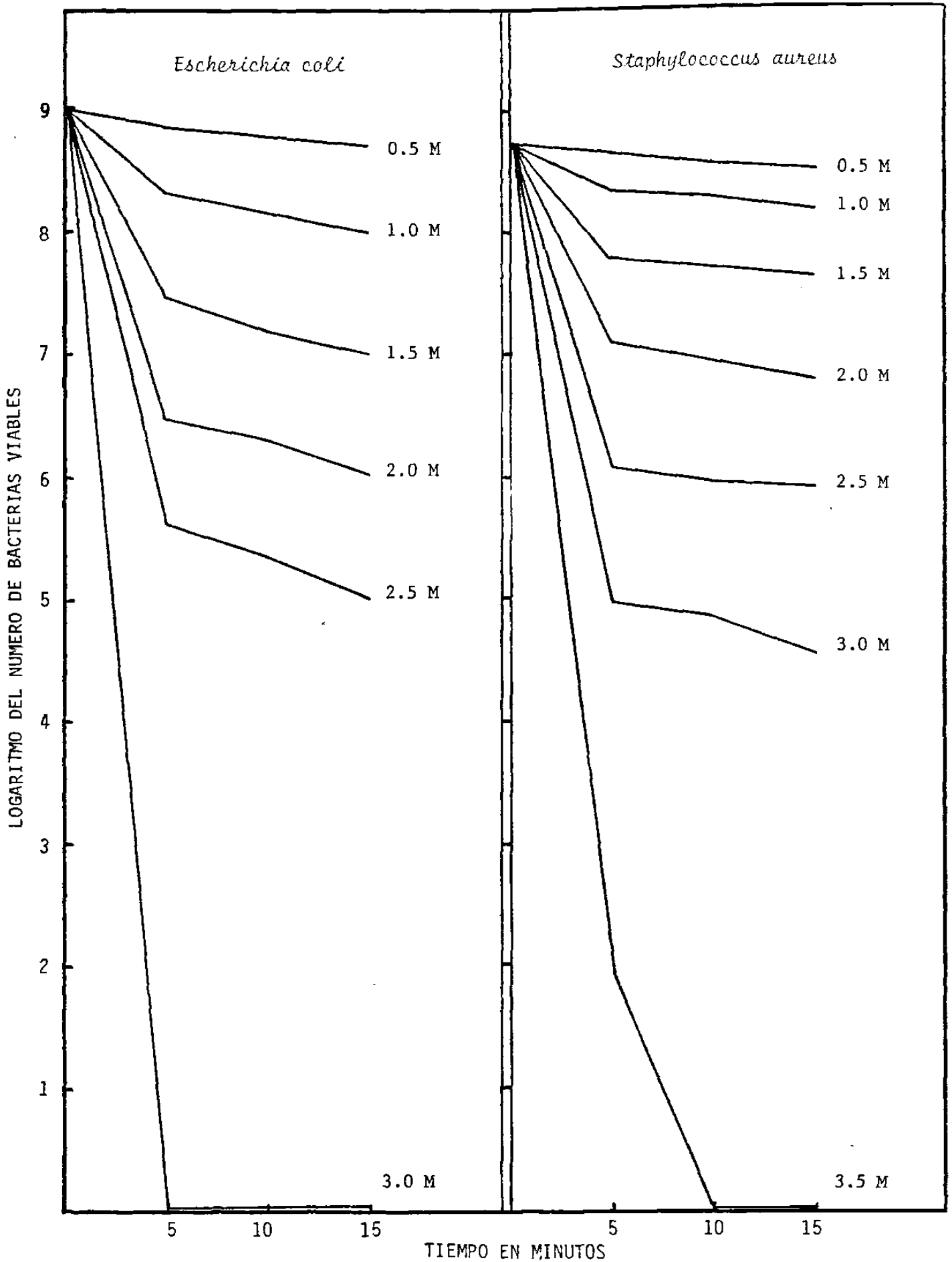
ETANOL



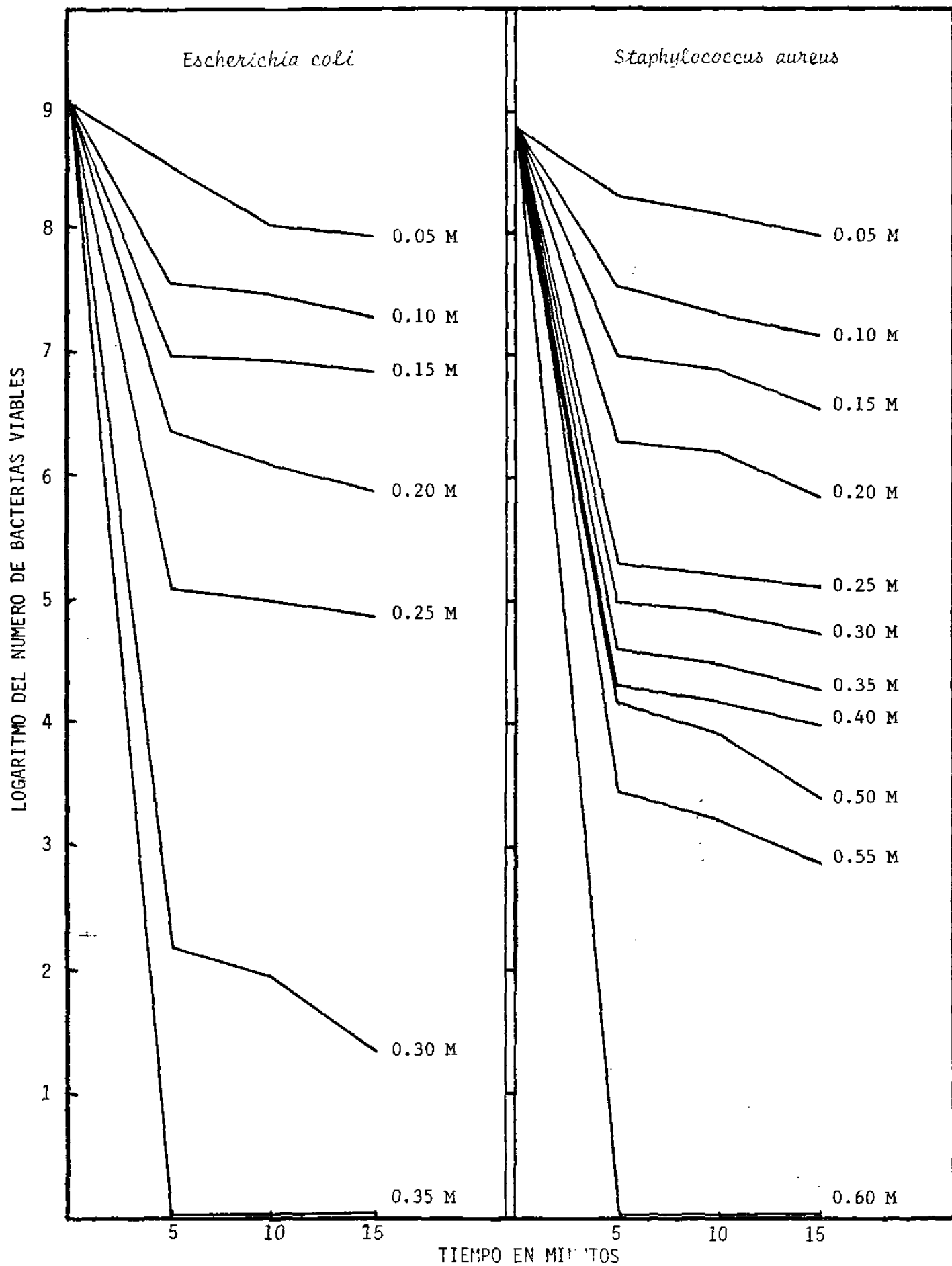
0.01
N-PROPANOL



GRAFICA 4
ISO-PROPANOL



67-130
N-BUTANOL



GRAFICA 6
ISO-BUTANOL

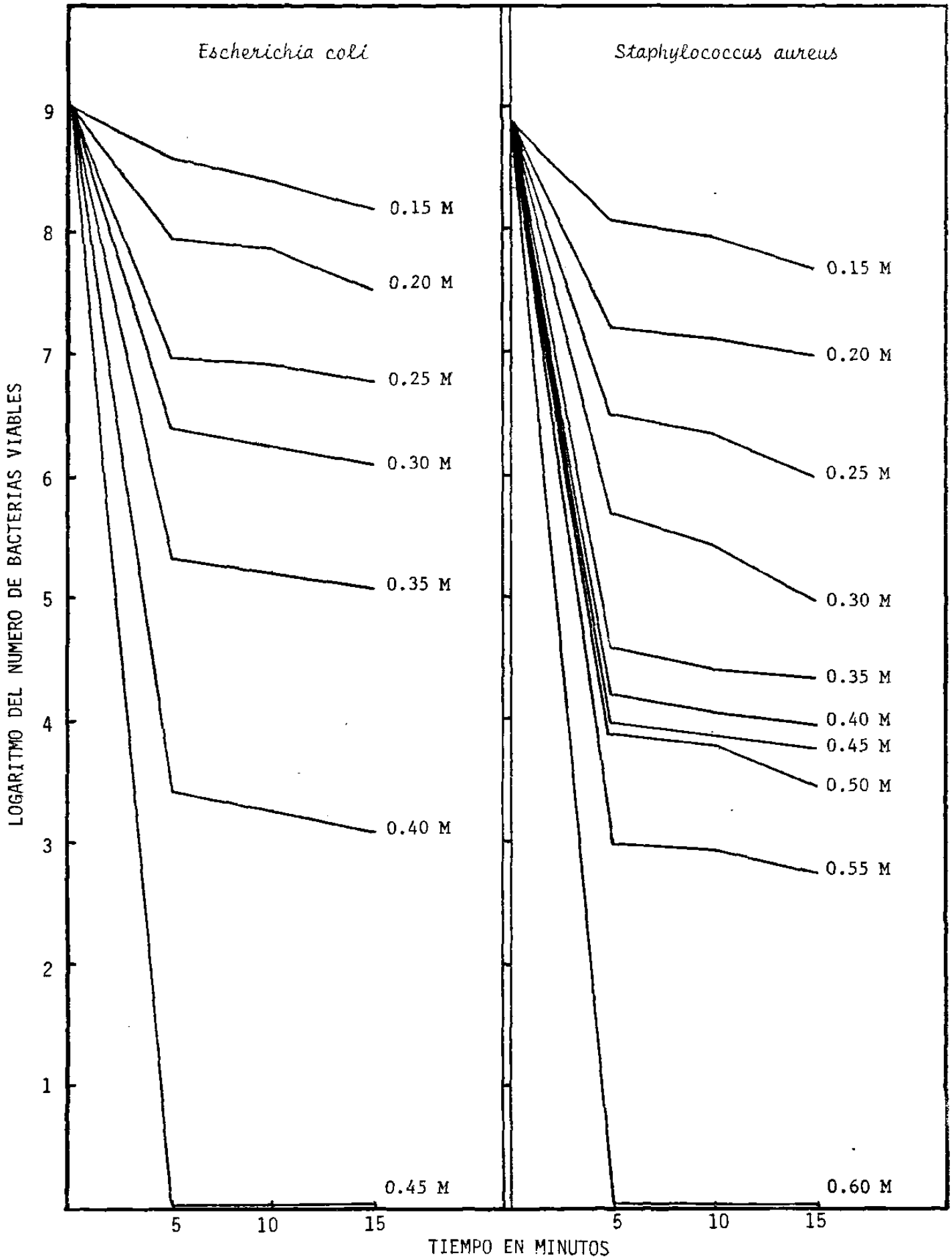
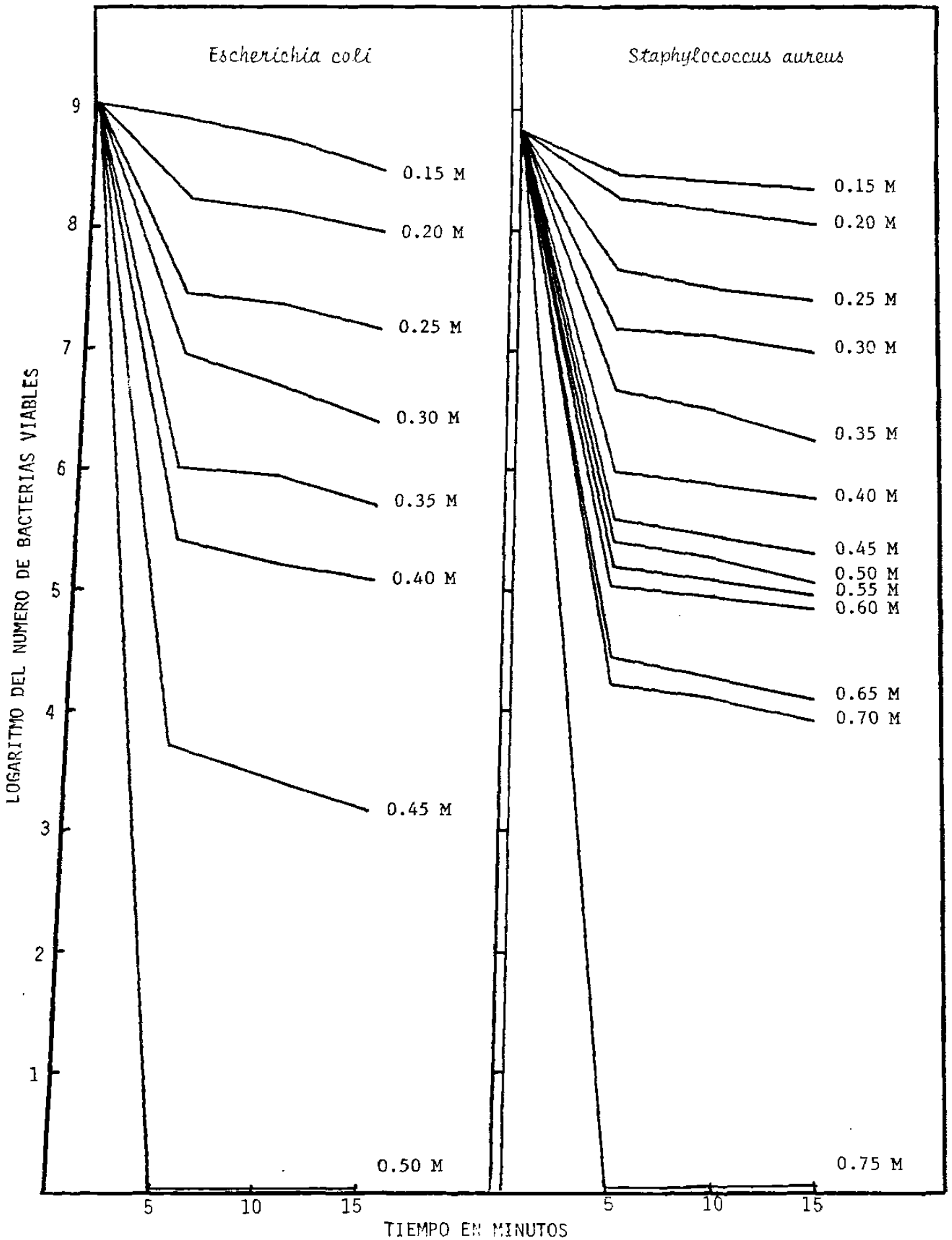
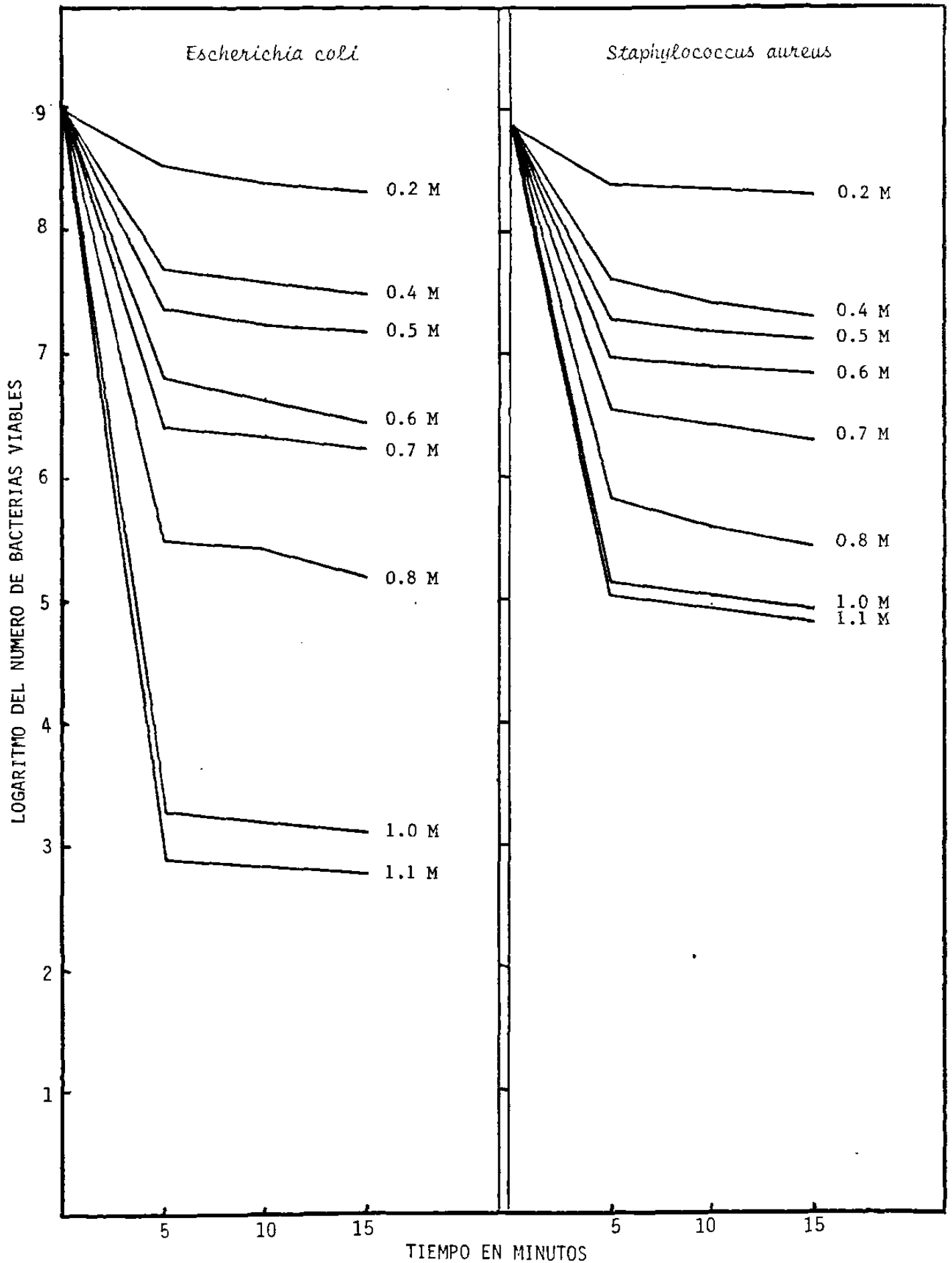
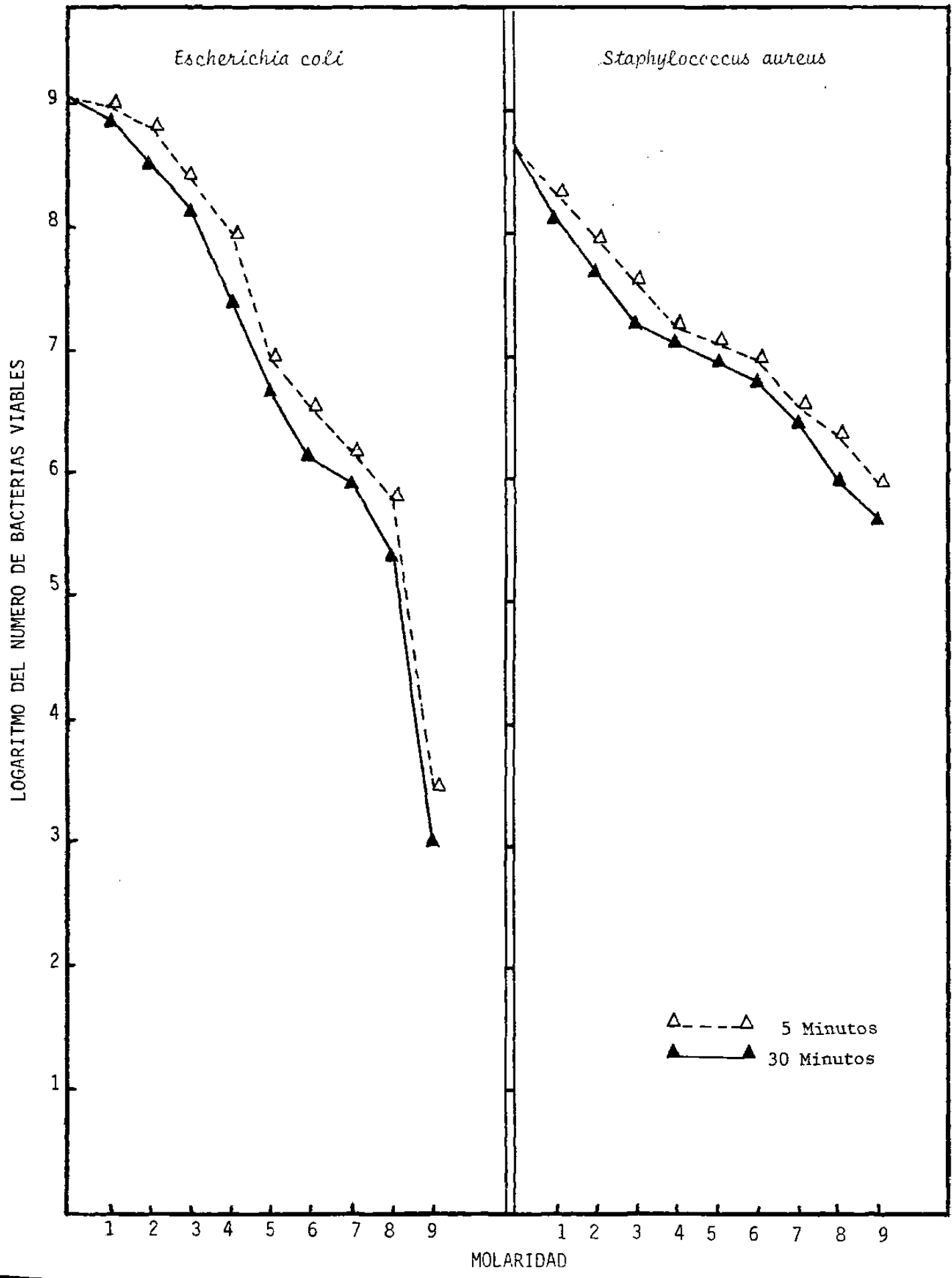


GRÁFICO 7
BUTANOL SECUNDARIO



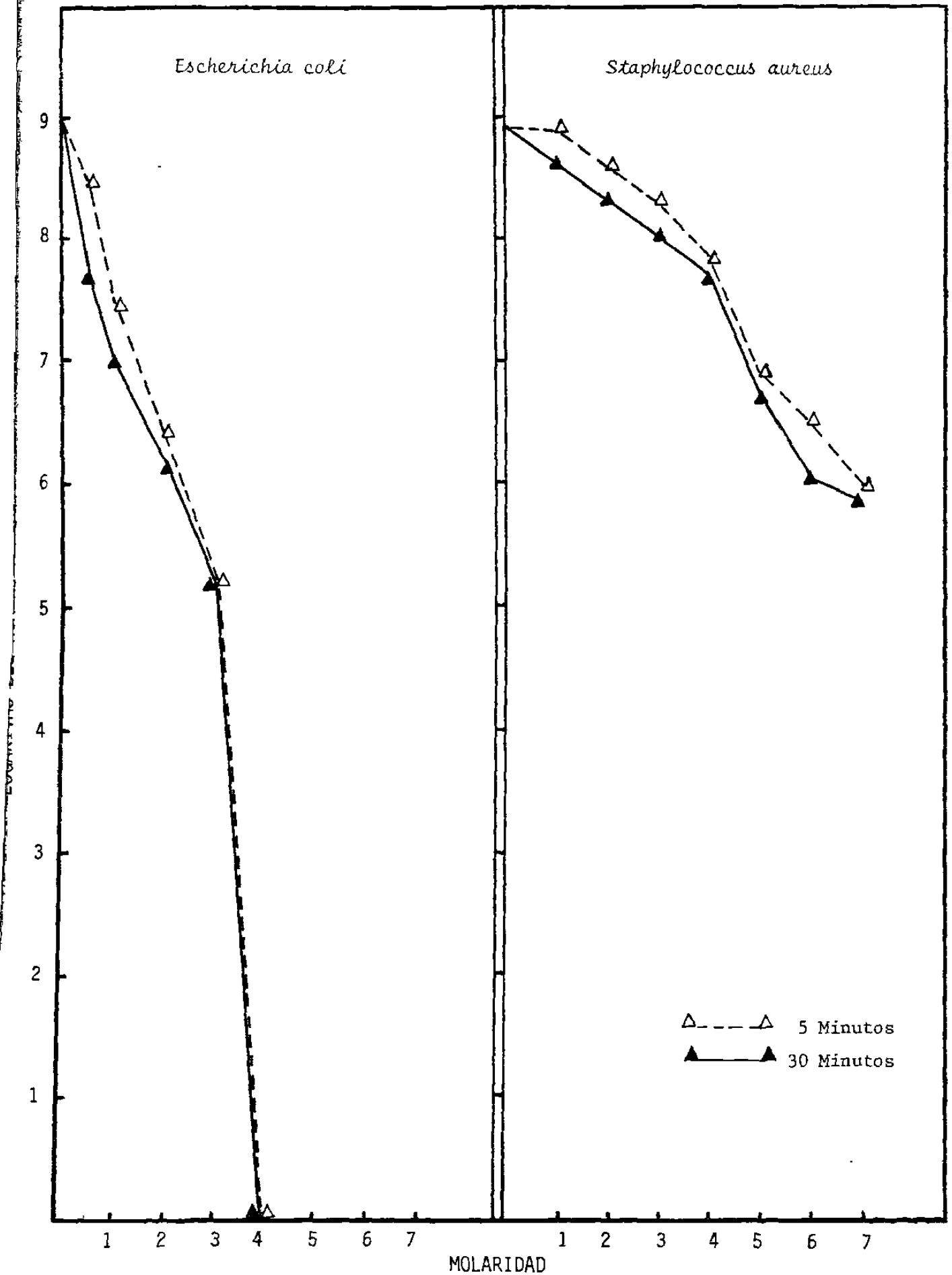
GRAFICA 8
BUTANOL TERCIARIO

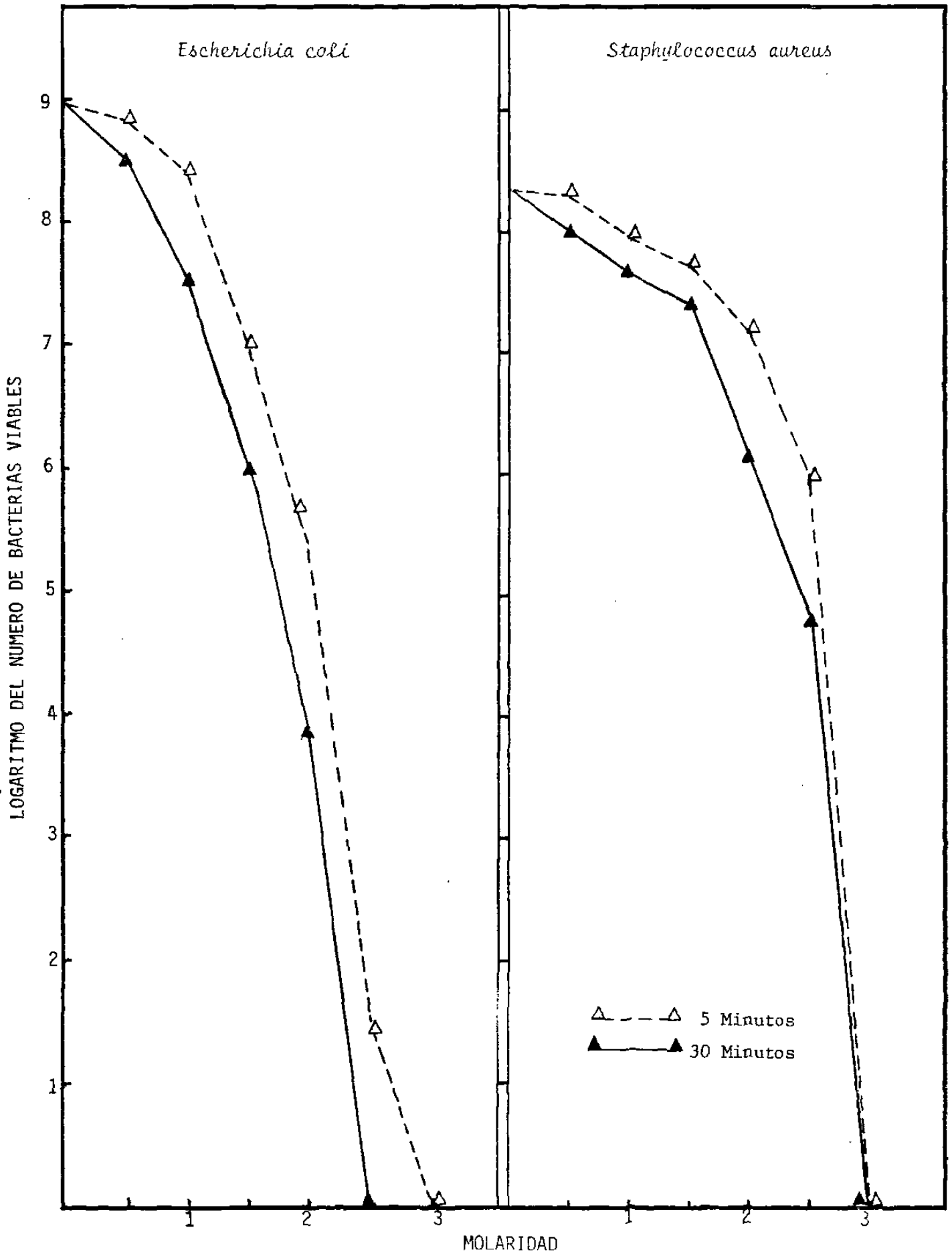




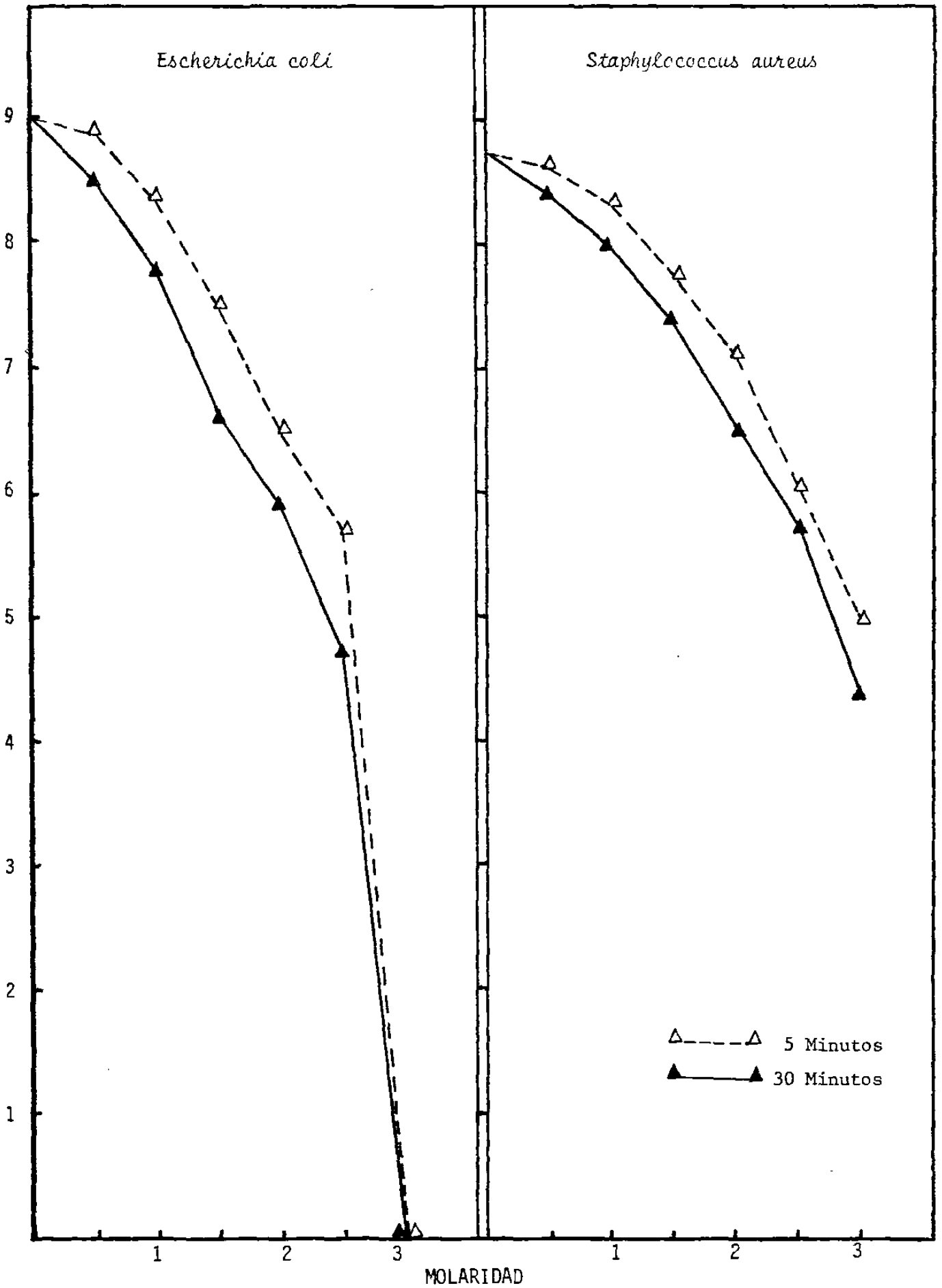
GRAFICA 10

ETANOL

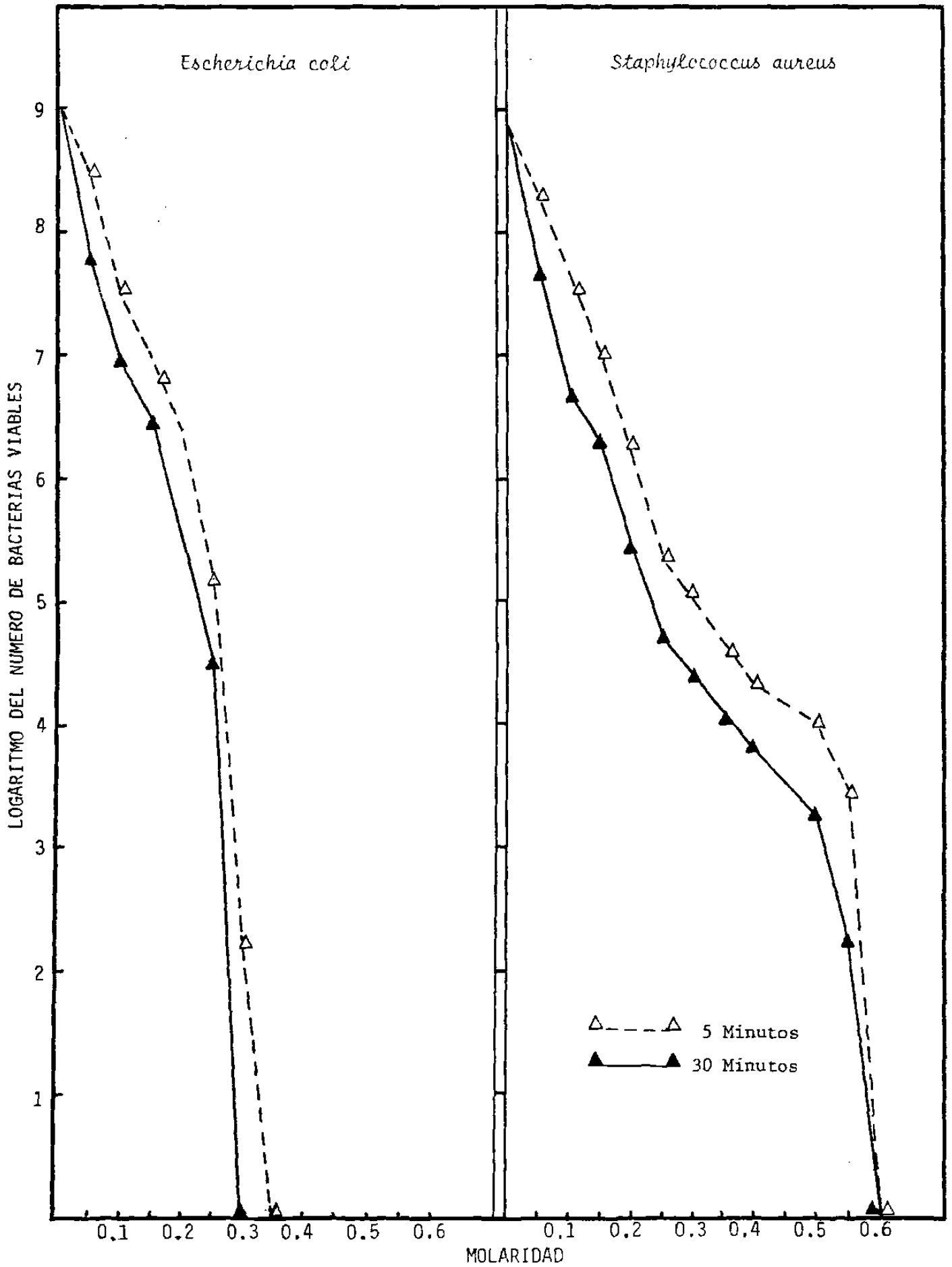


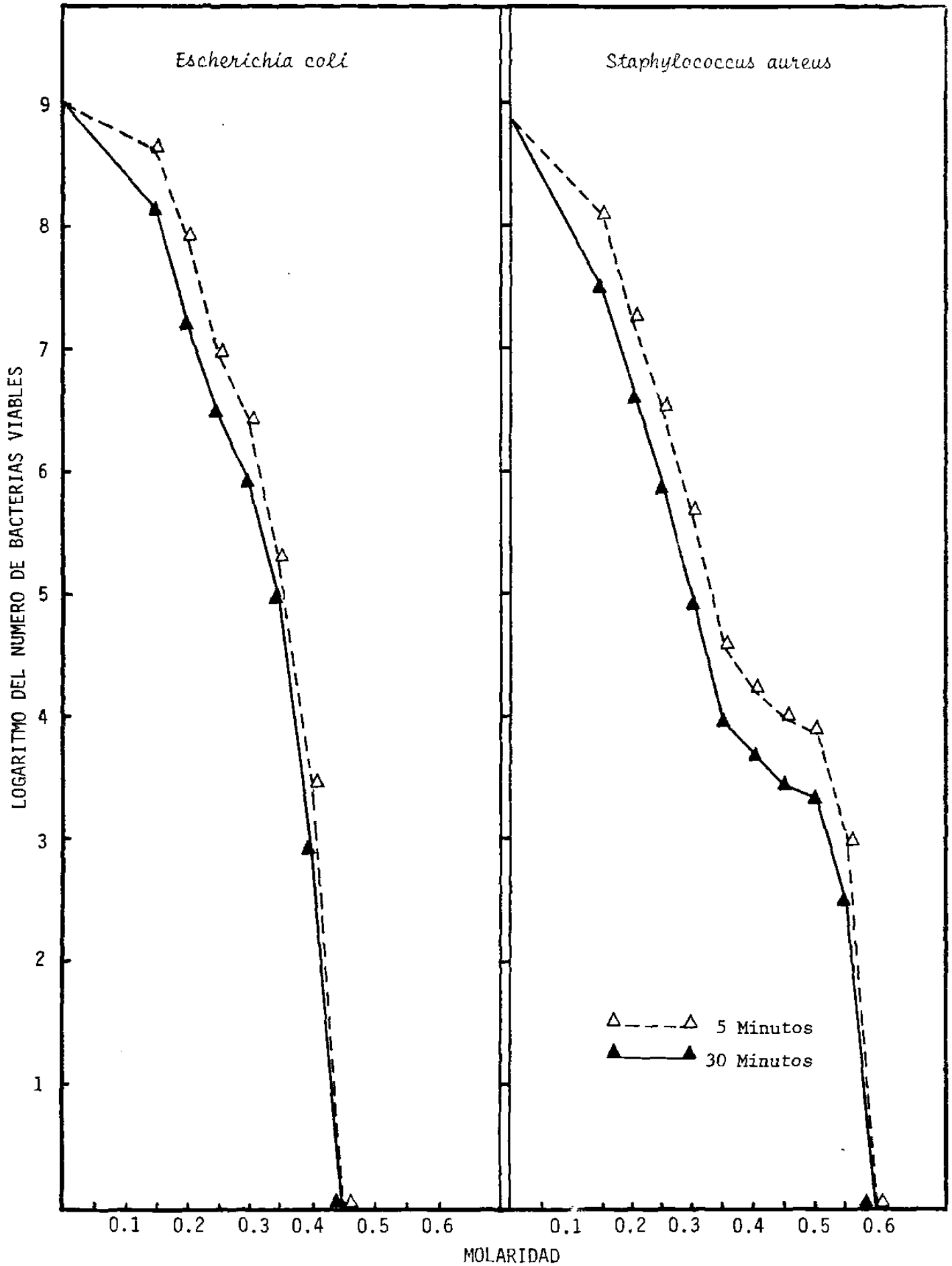


GRAFICA 12
ISO-PROPANOL

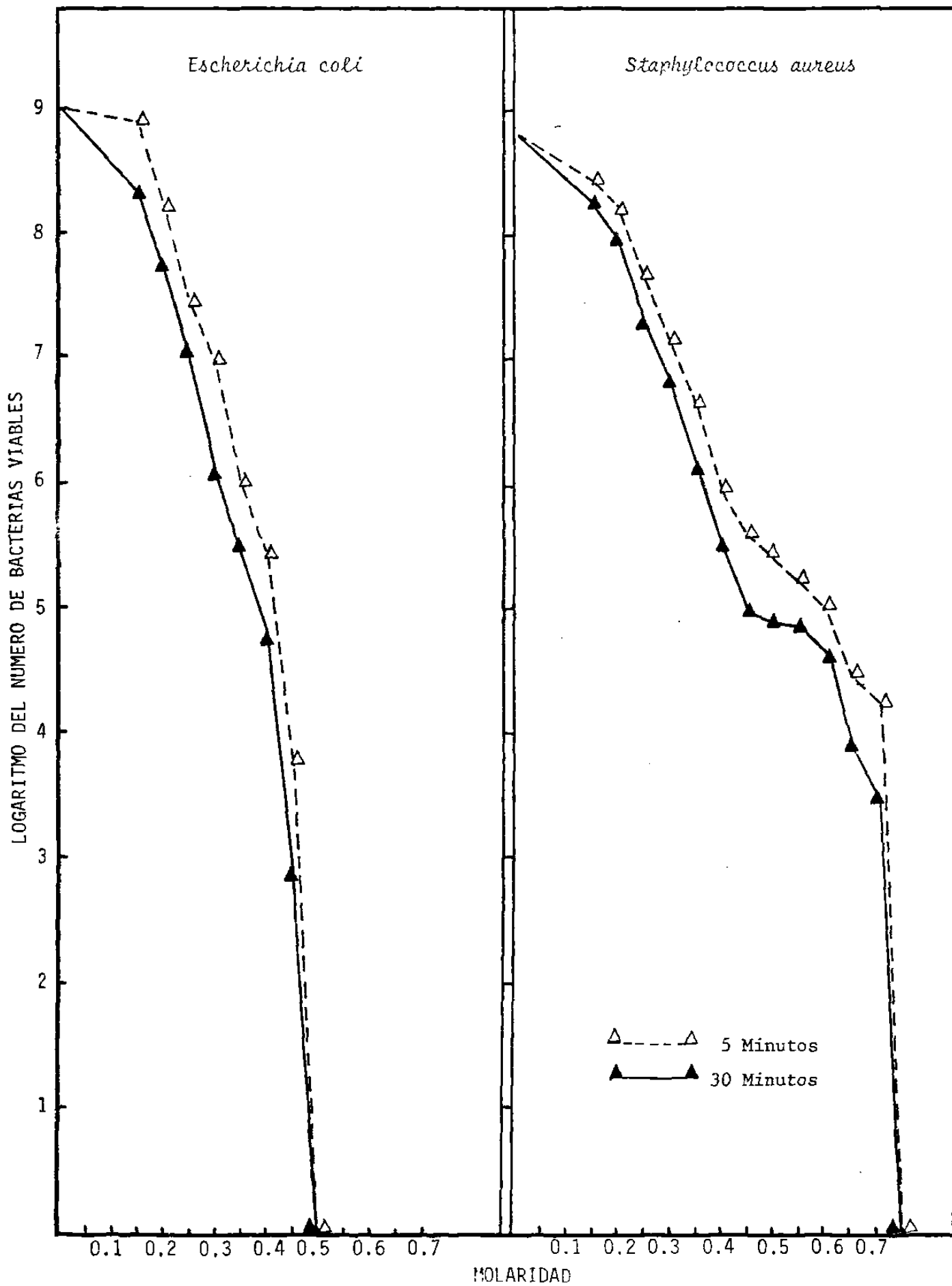


G... ..
N-BUTANOL

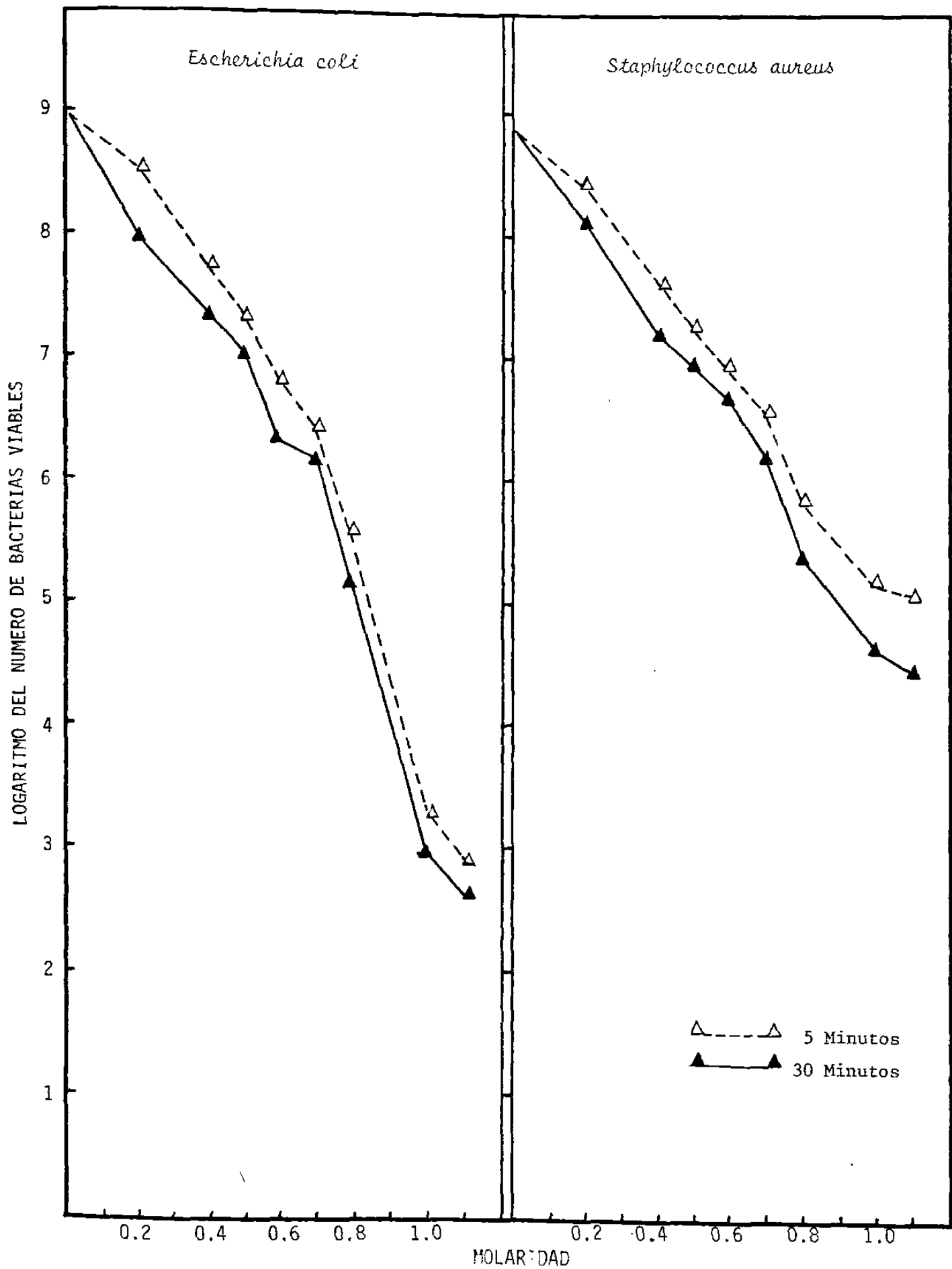




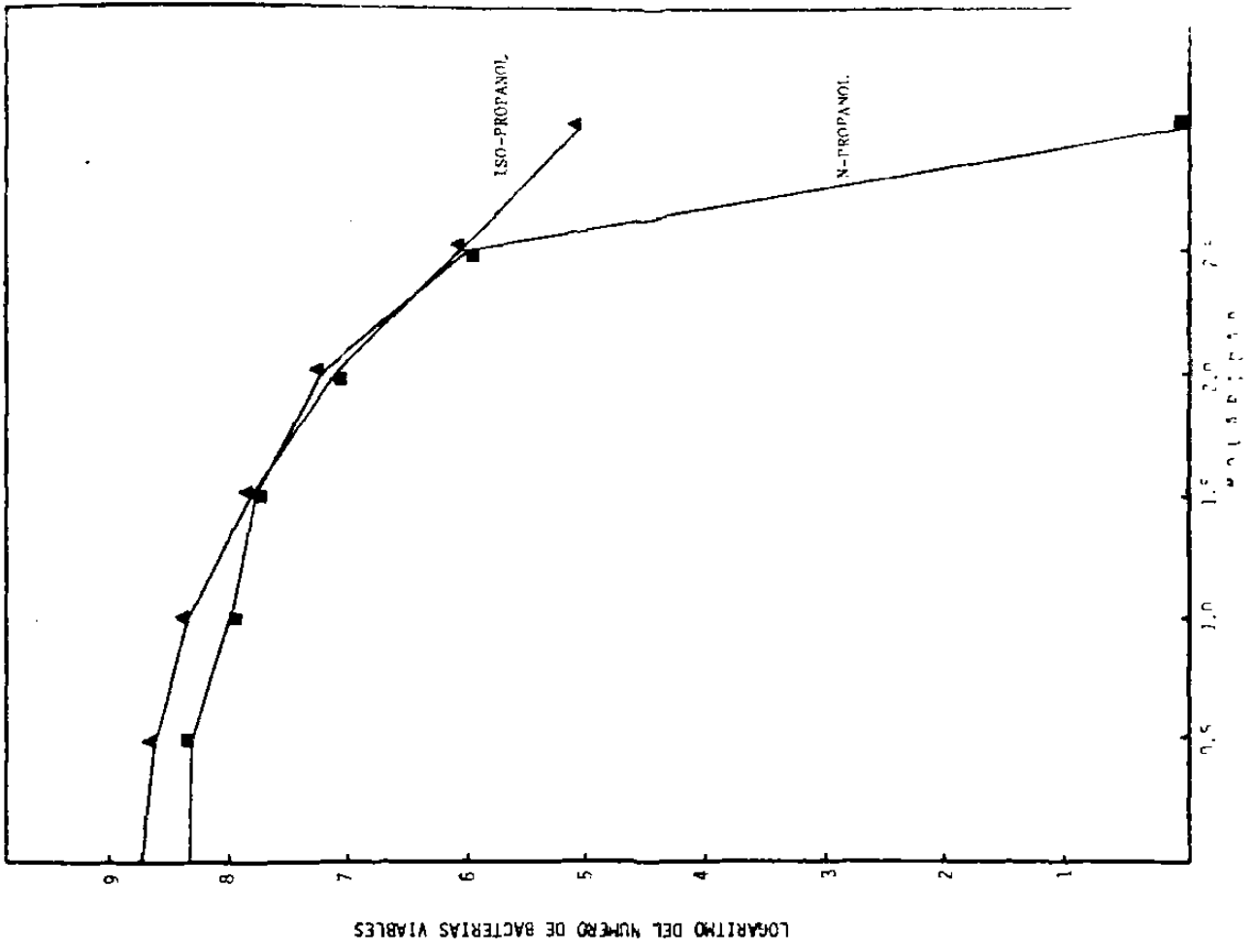
BUTANOL SECUNDARIO



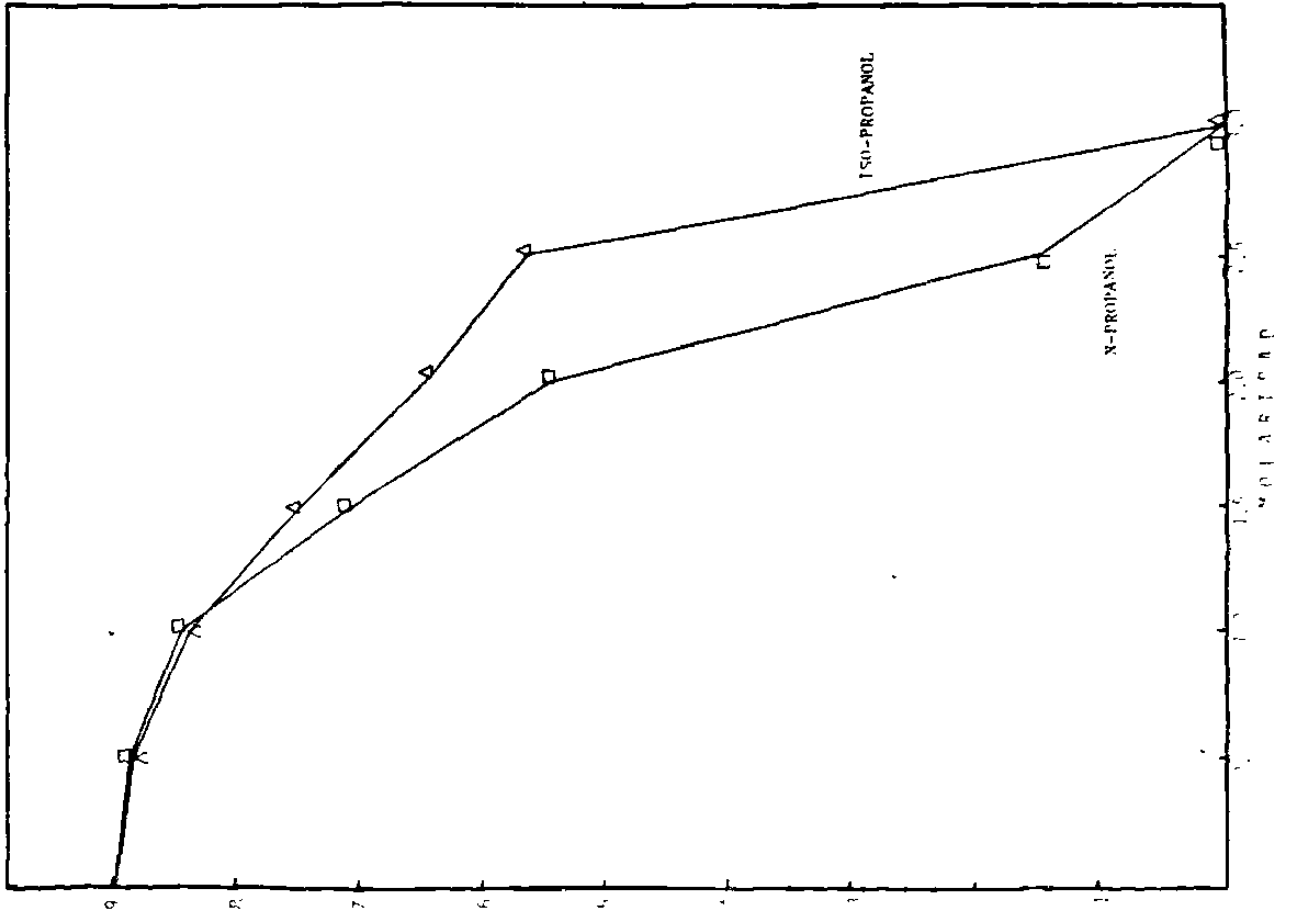
BUTANOL TERCIARIO



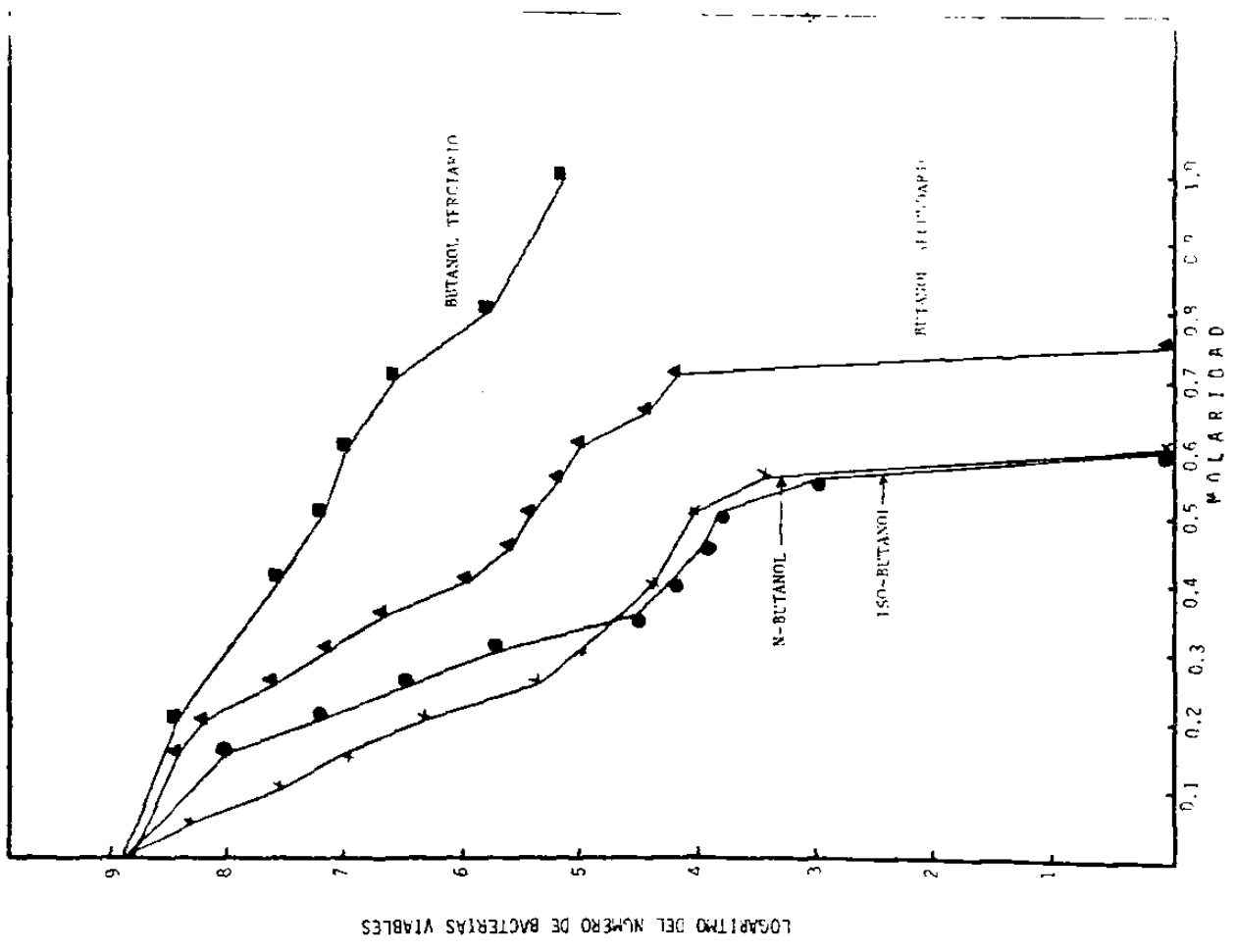
GRAFICA 18
STAPHYLOCOCCUS AUREUS



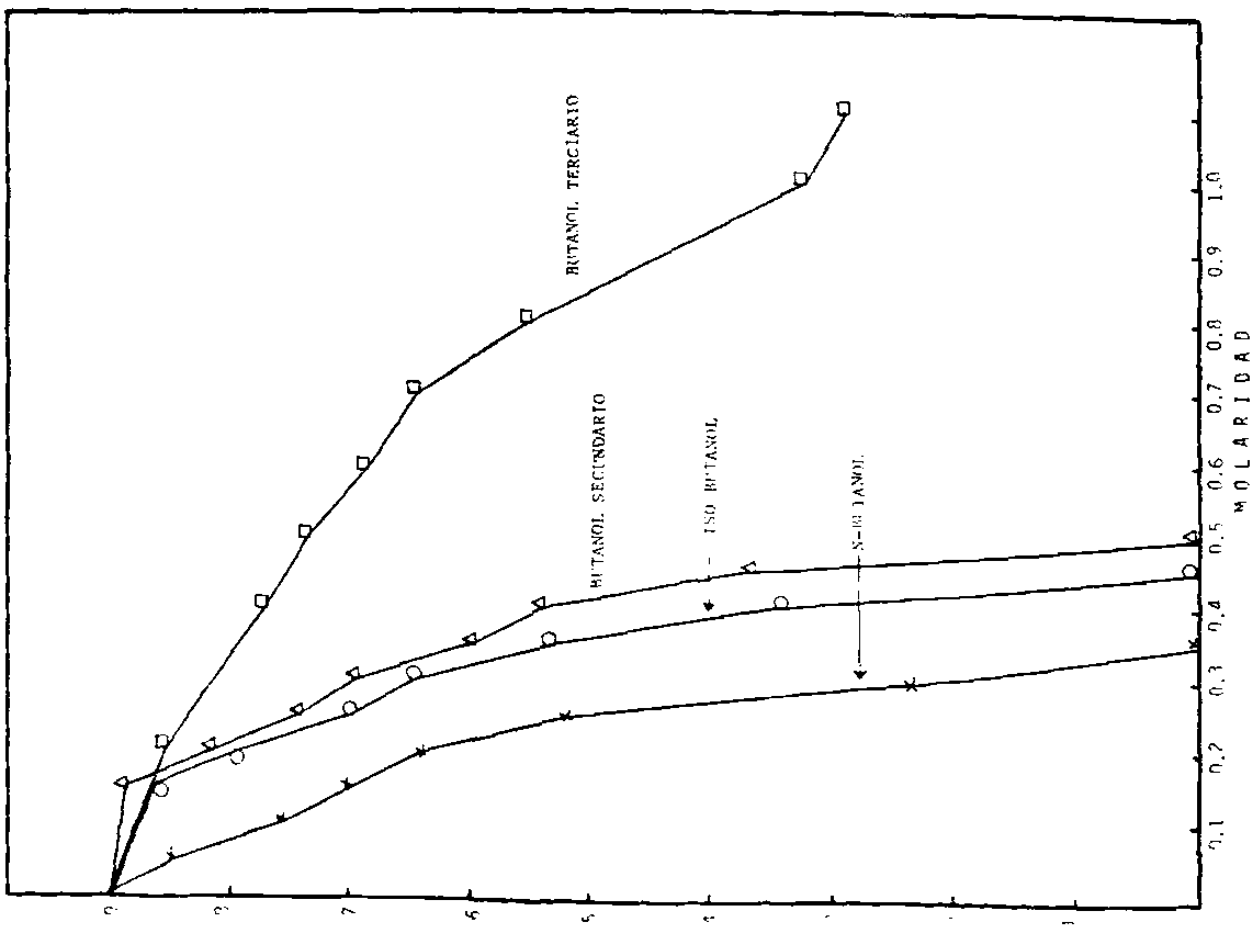
GRAFICA 17
ESCHERICHIA COLI



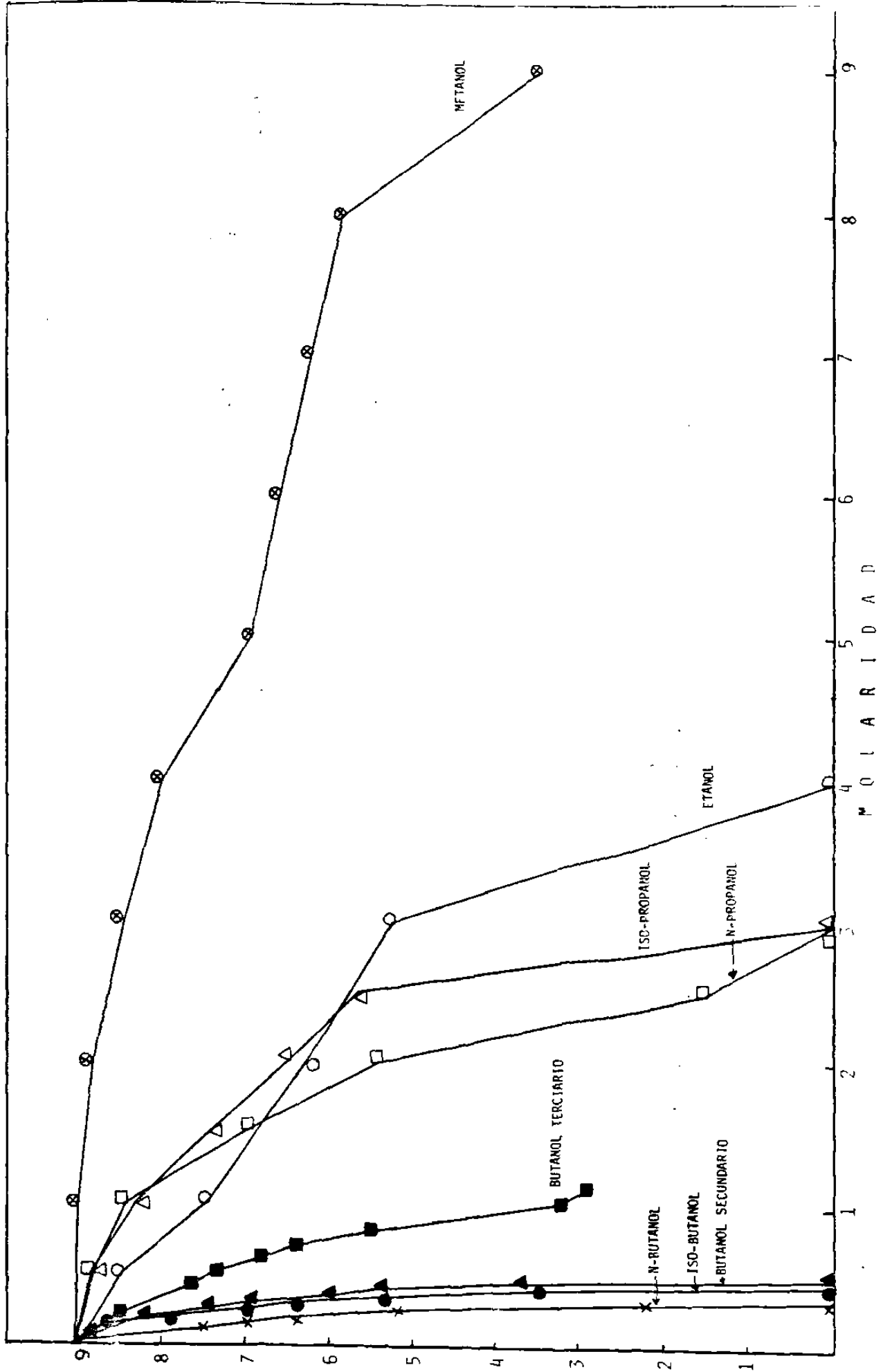
GRAFICA 20
STAPHYLOCOCCUS AUREUS



GRAFICA 19
ESCHERICHIA COLI

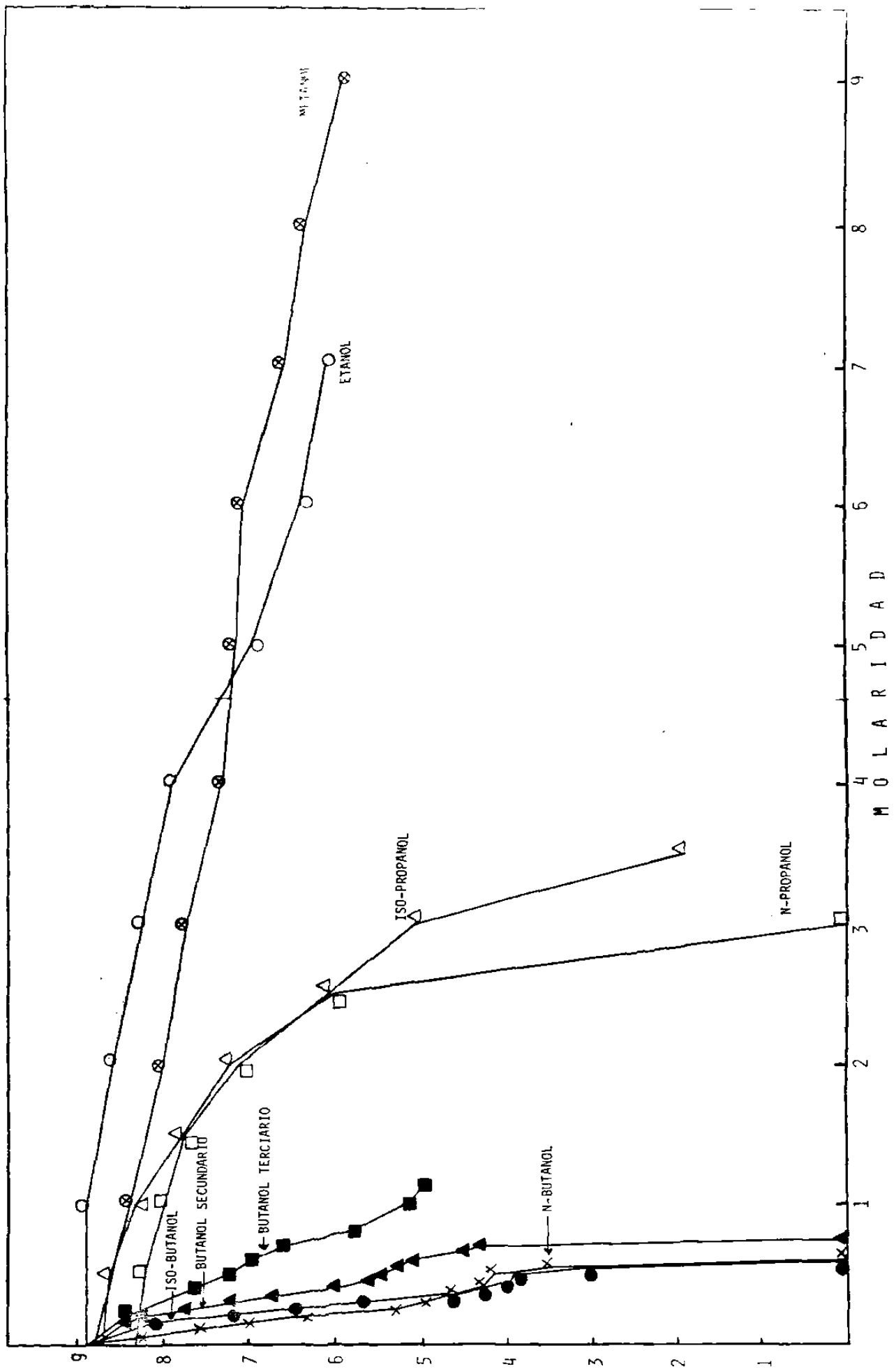


ESCHERICHIA COLI



FORMA LINDA DEL TITULO DE BACTERIAS VIBRANS

STAPHYLOCOCCUS AUREUS



FORMAS DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS: TABLAS

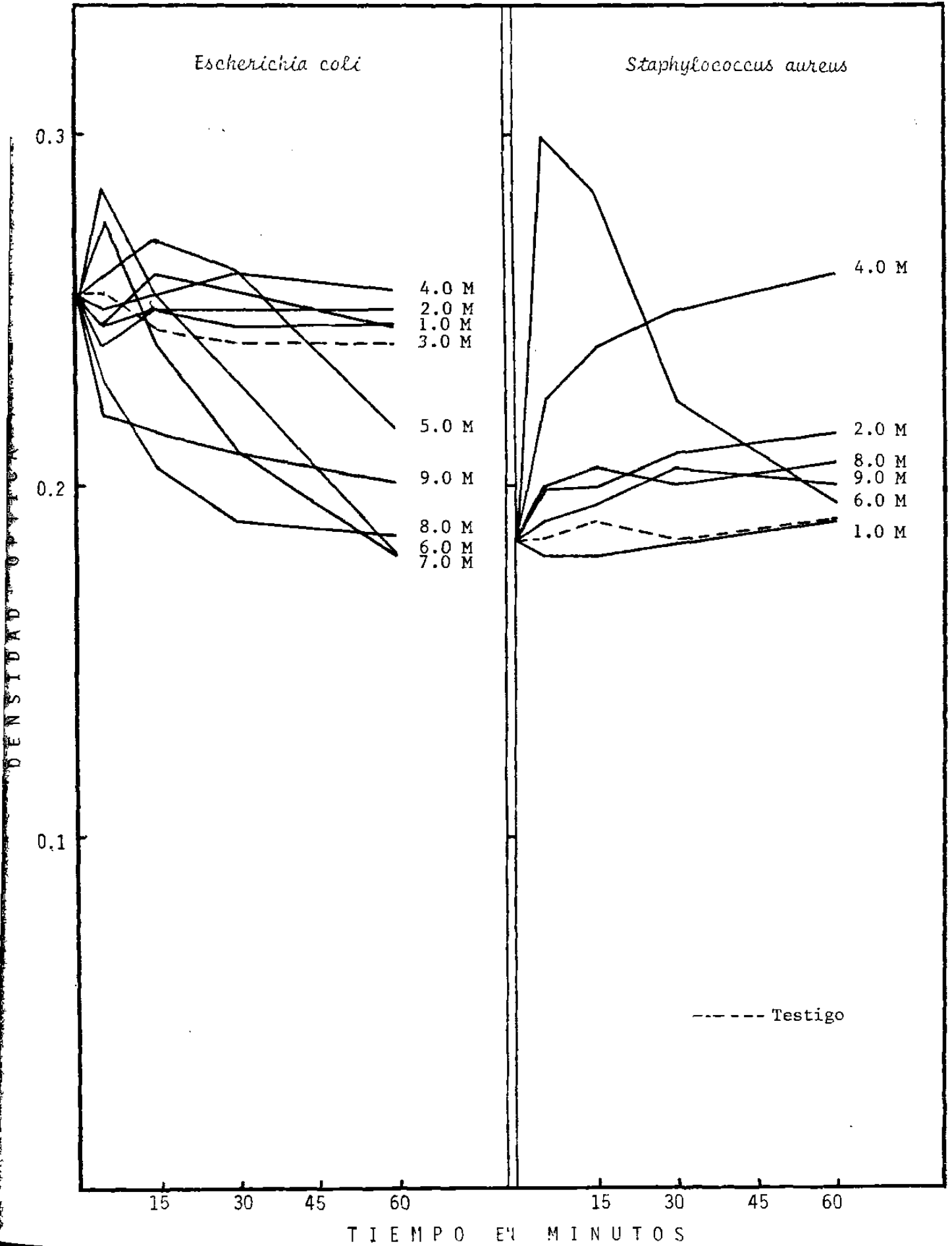
TABLA 1

CONCENTRACIONES LETALES DE ALCOHOLES PRIMARIOS

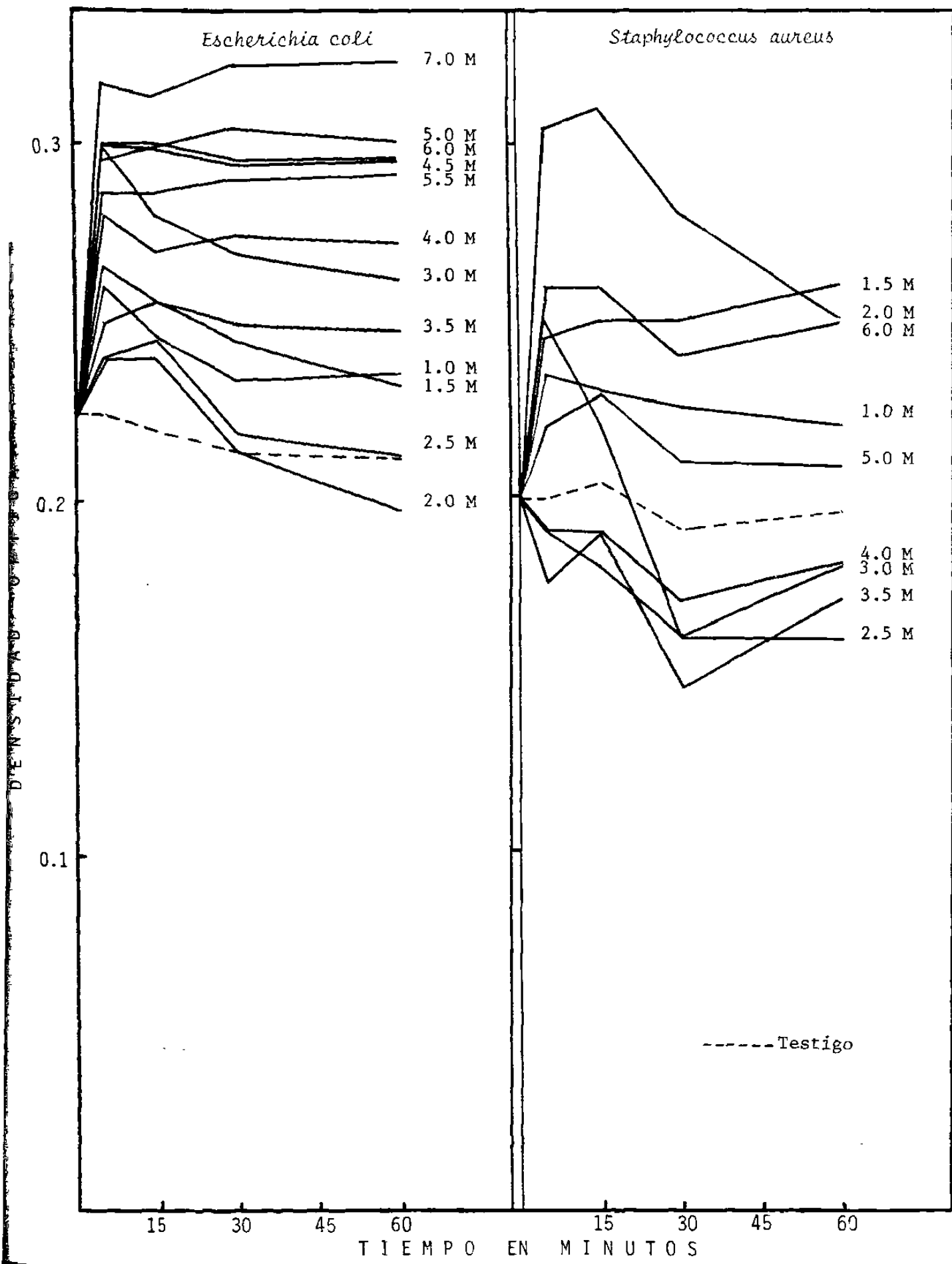
Alcohol	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Metanol	> 9.0 M	> 9.0 M
Etanol	4.0 M	> 7.0 M
N-Propanol	3.0 M	3.0 M
Iso-Propanol	3.0 M	3.5 M
N-Butanol	0.35 M	0.60 M
Iso-Butanol	0.45 M	0.60 M
Butanol Secundario	0.50 M	0.75 M
Butanol Terciario	> 1.10 M	> 1.10 M

> Indica que no se pudieron ensayar molaridades más altas por limitaciones de relación de proporción entre reactivos y células.

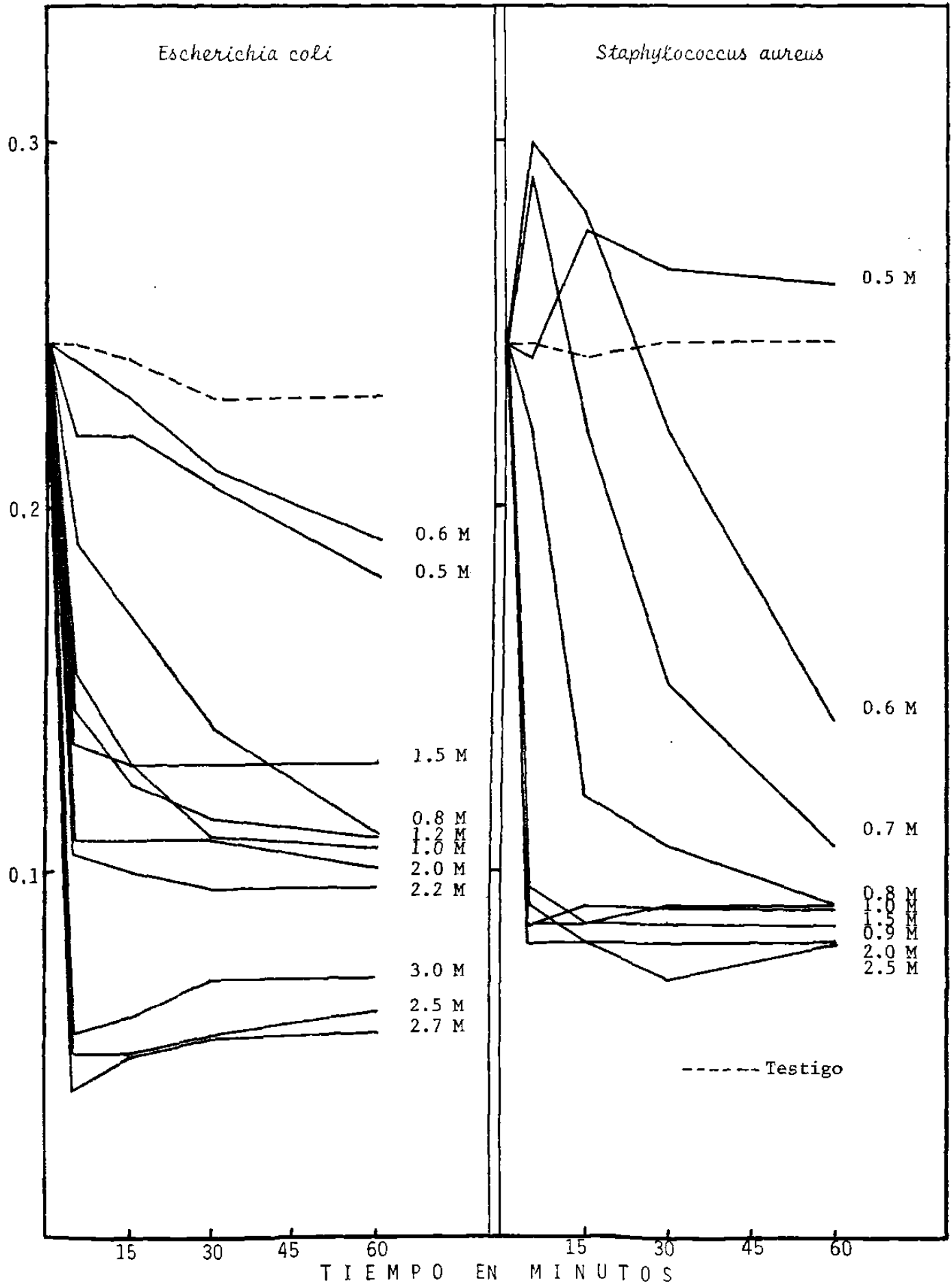
METANOL



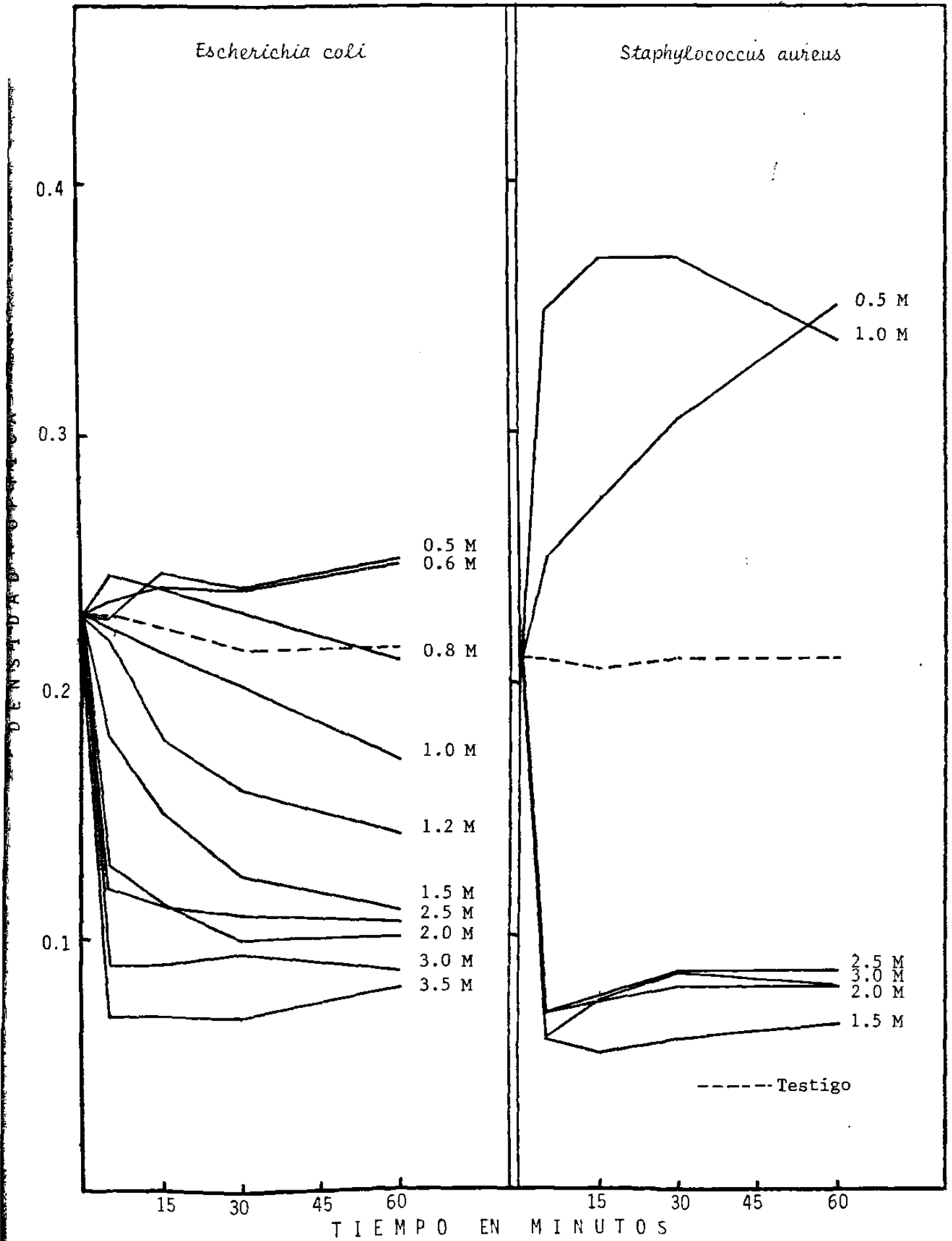
ETANOL

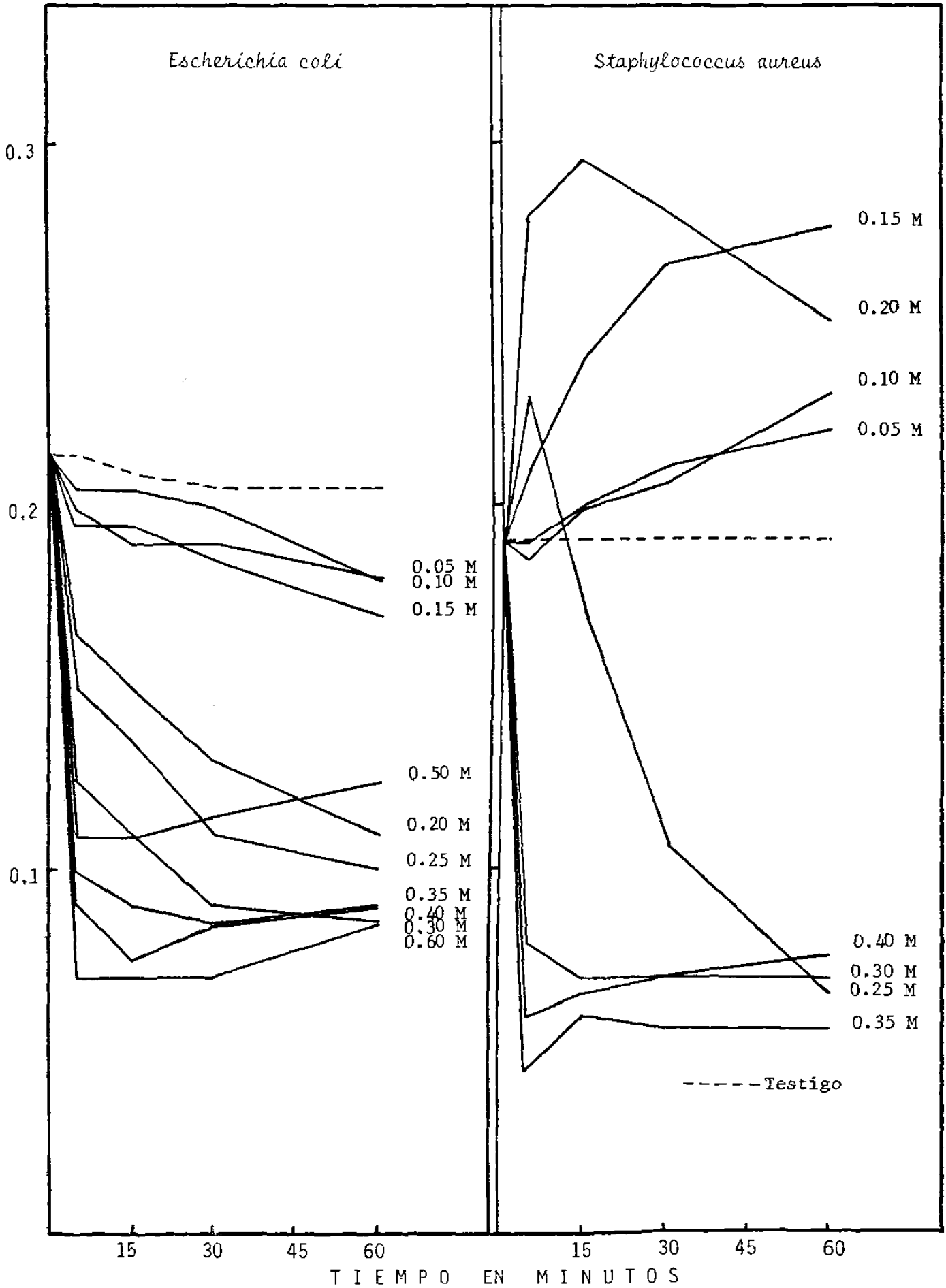


N-PROPANOL



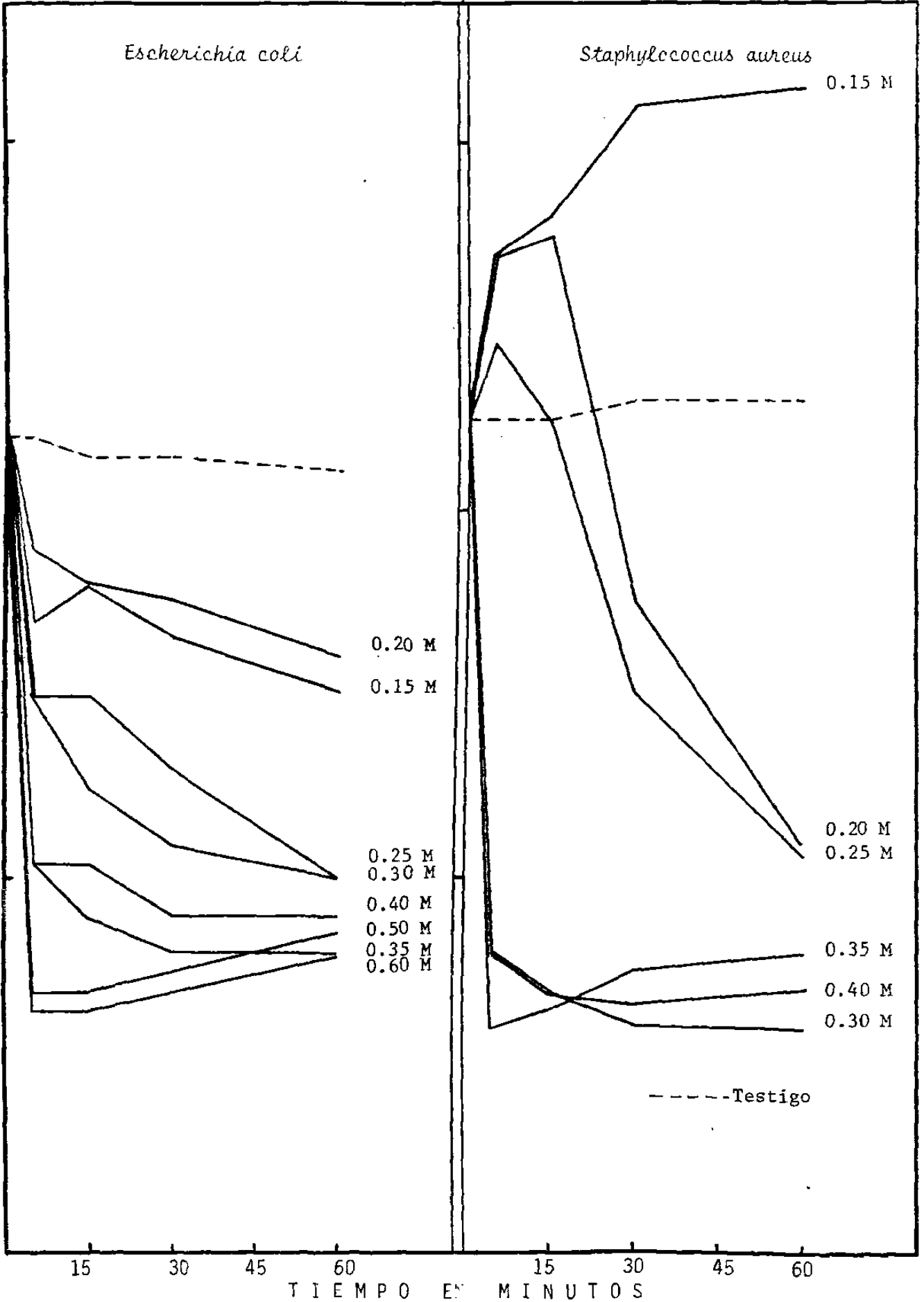
GRAFICA 26
ISO-PROPANOL



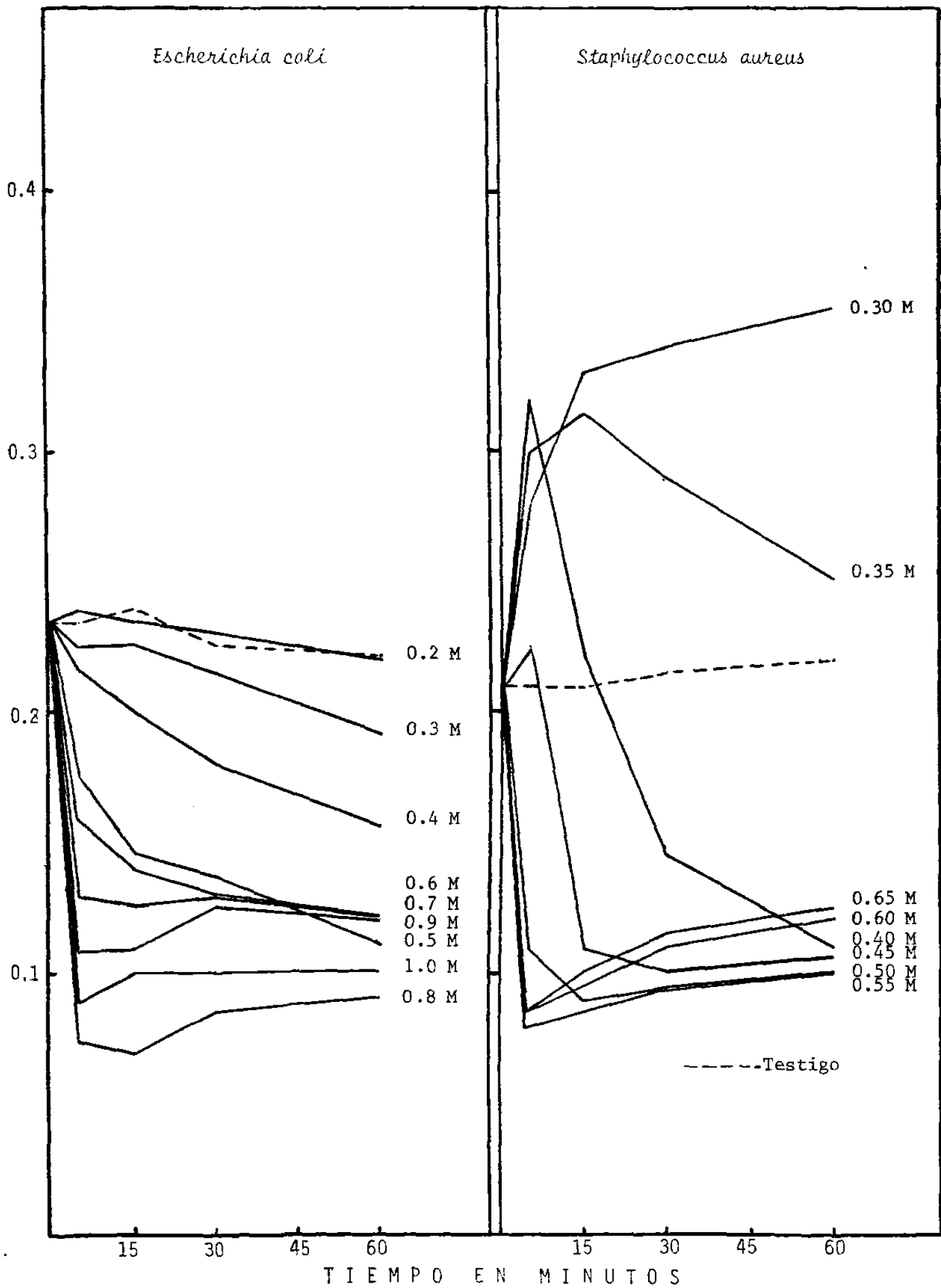


ISO-BUTANOL

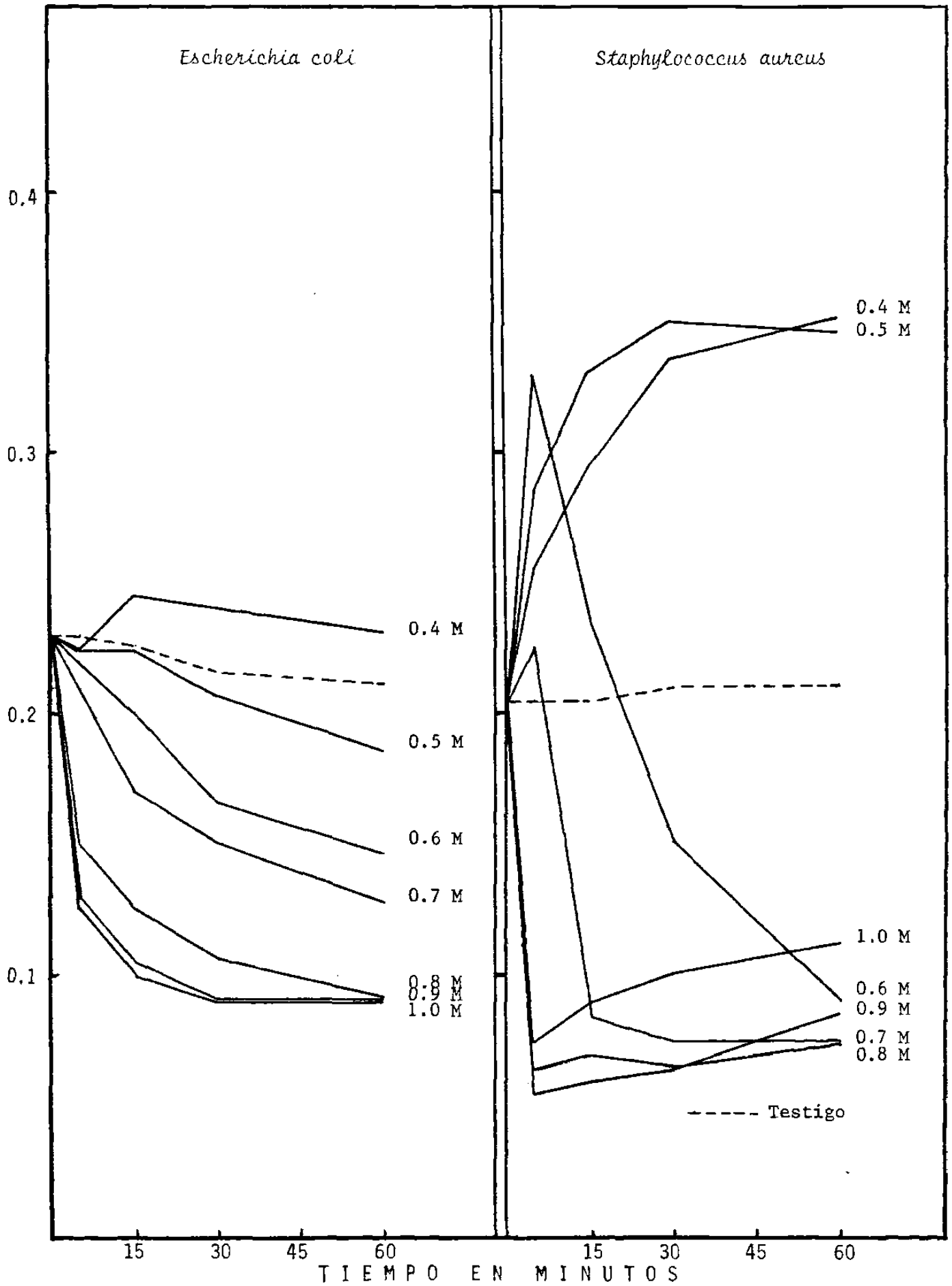
DENSIDAD OPTICA

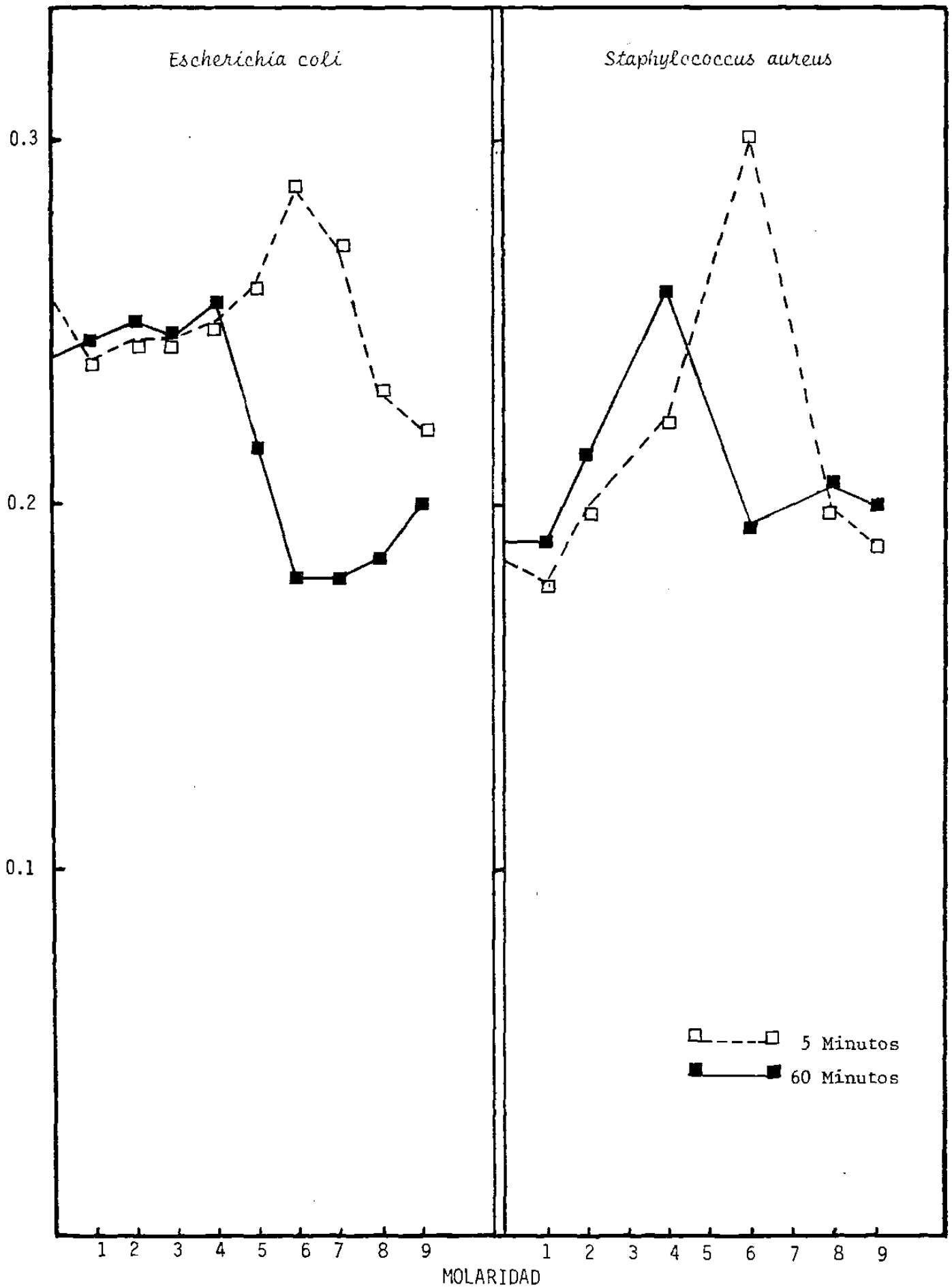


BUTANOL SECUNDARIO

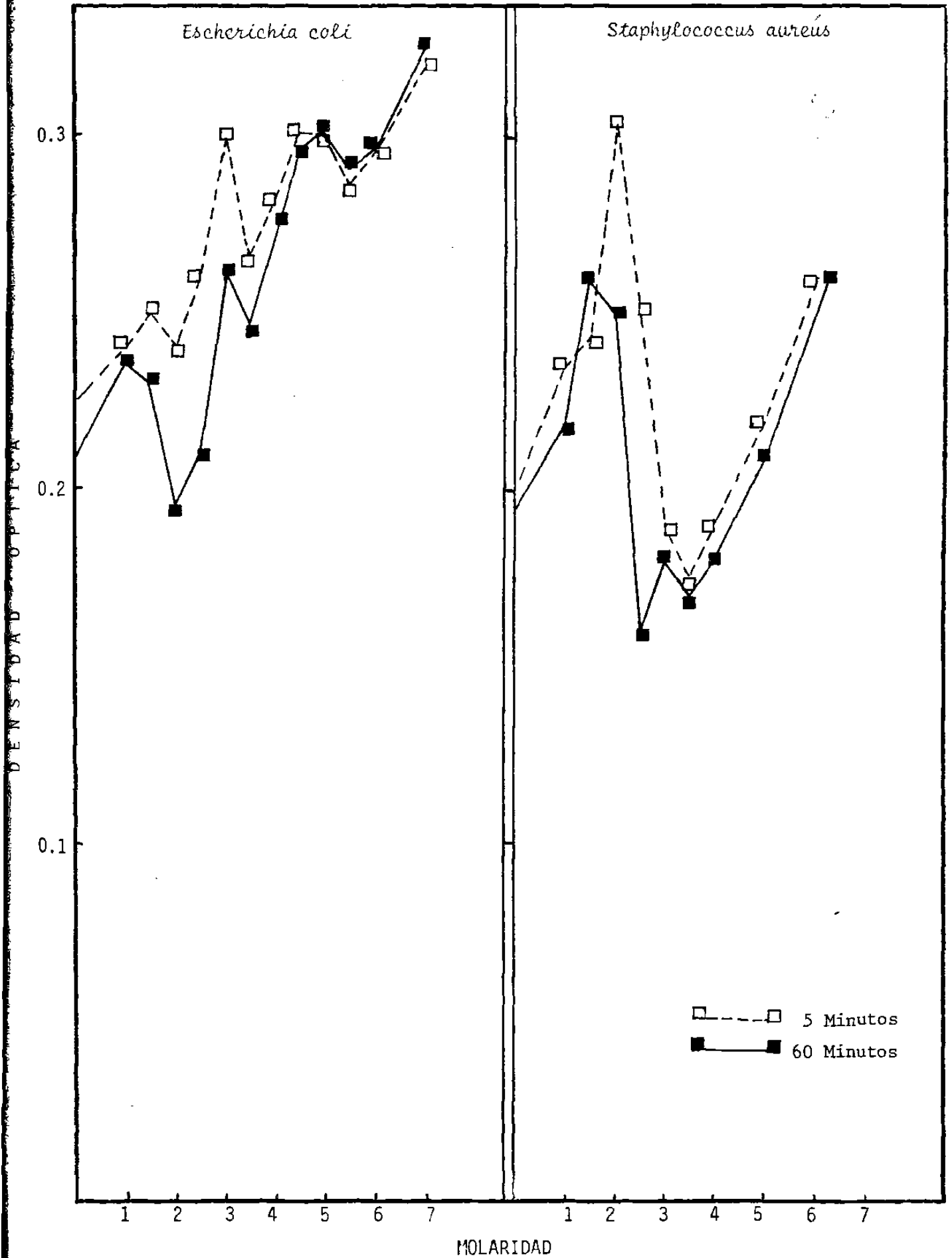


GARRISON 32
BUTANOL TERCIARIO

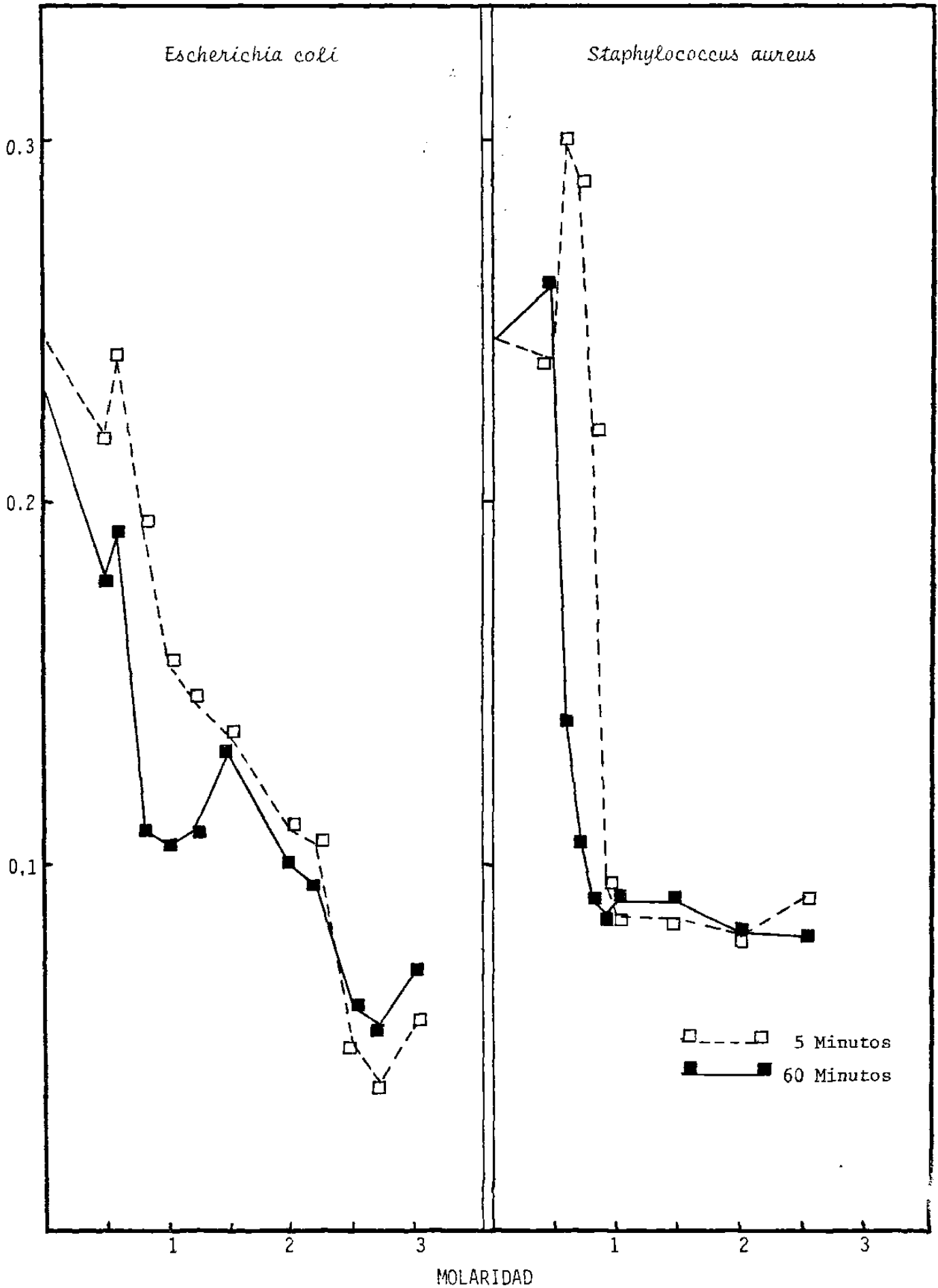




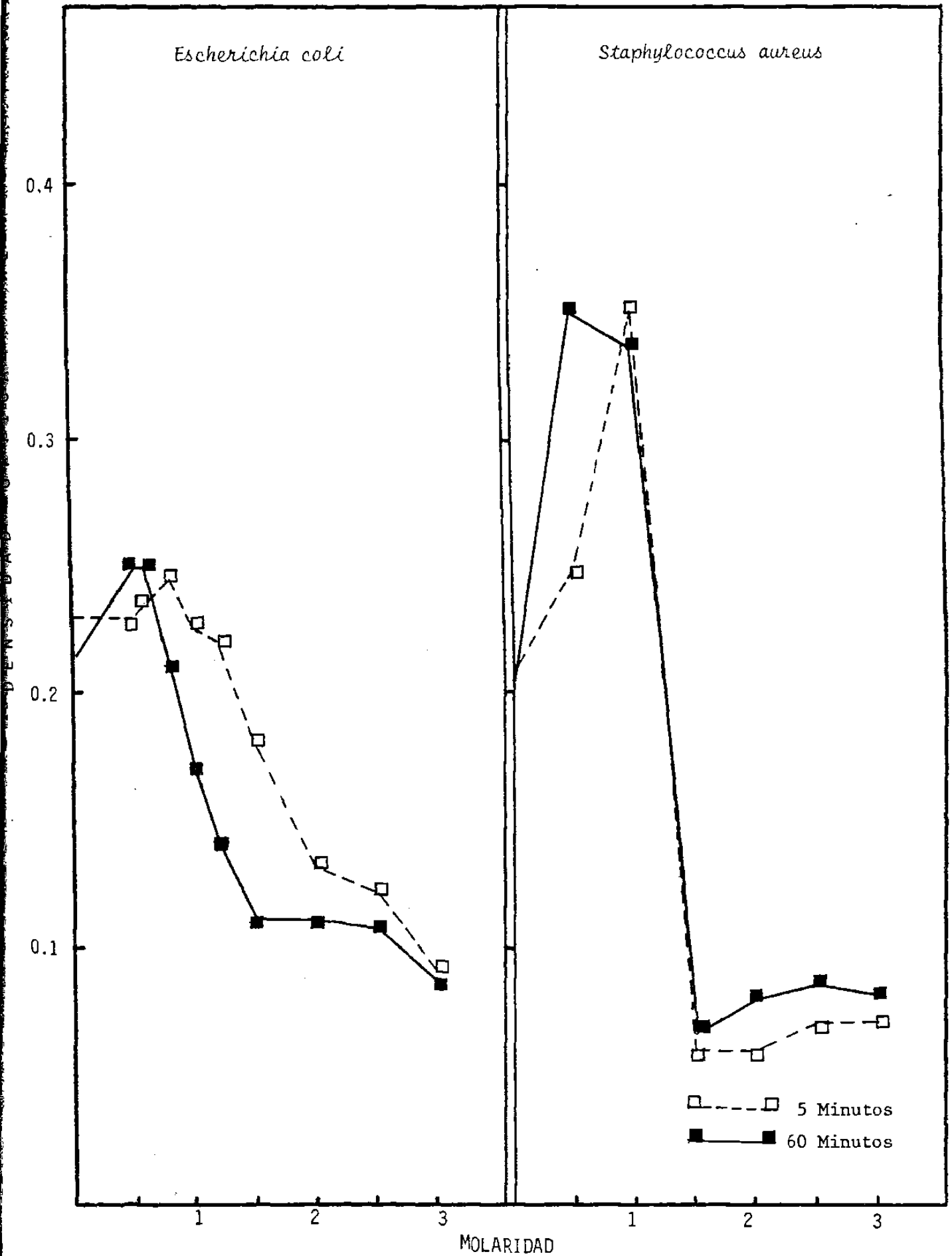
ETANOL



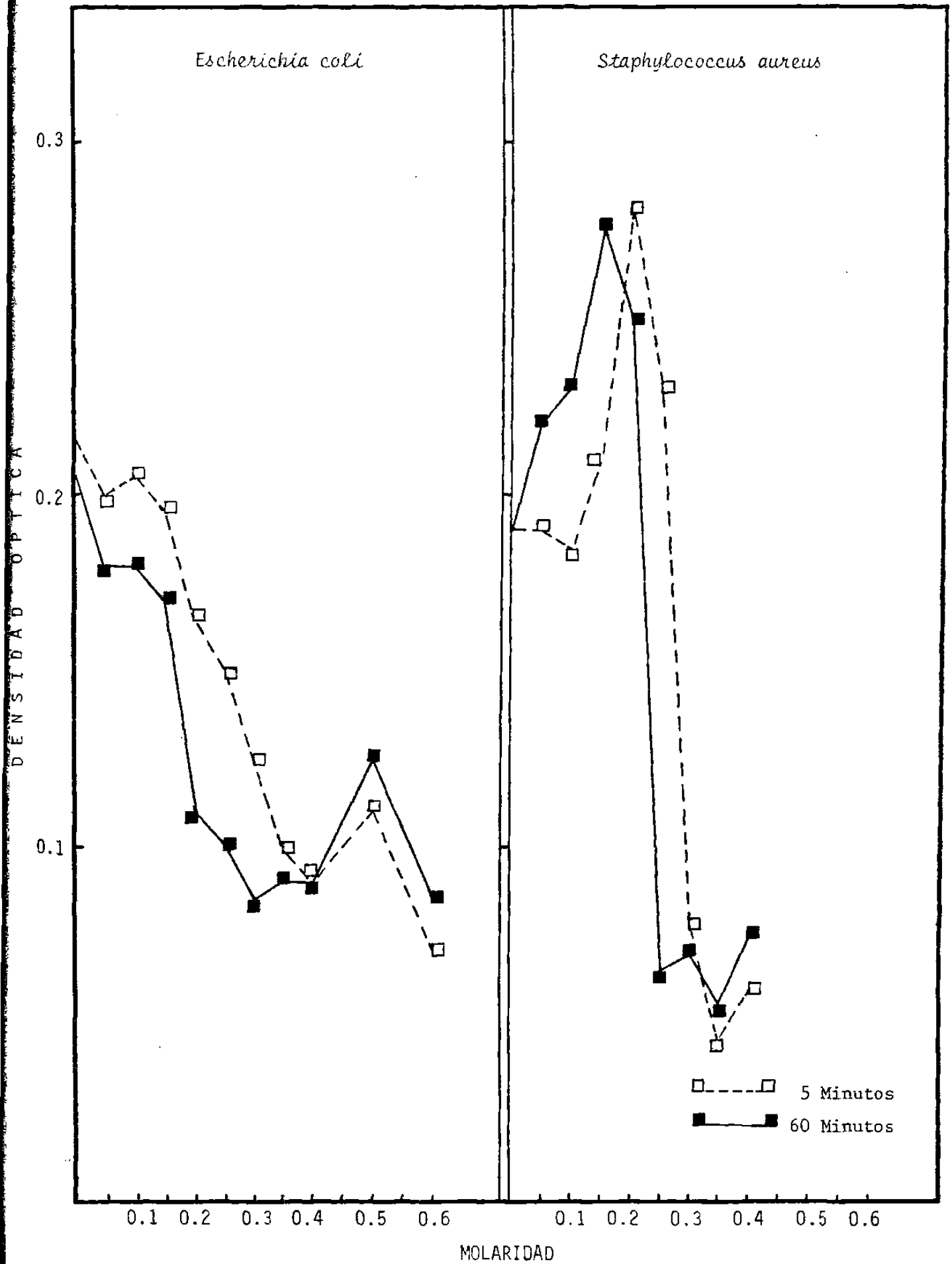
U-FIR
N-PROPANOL



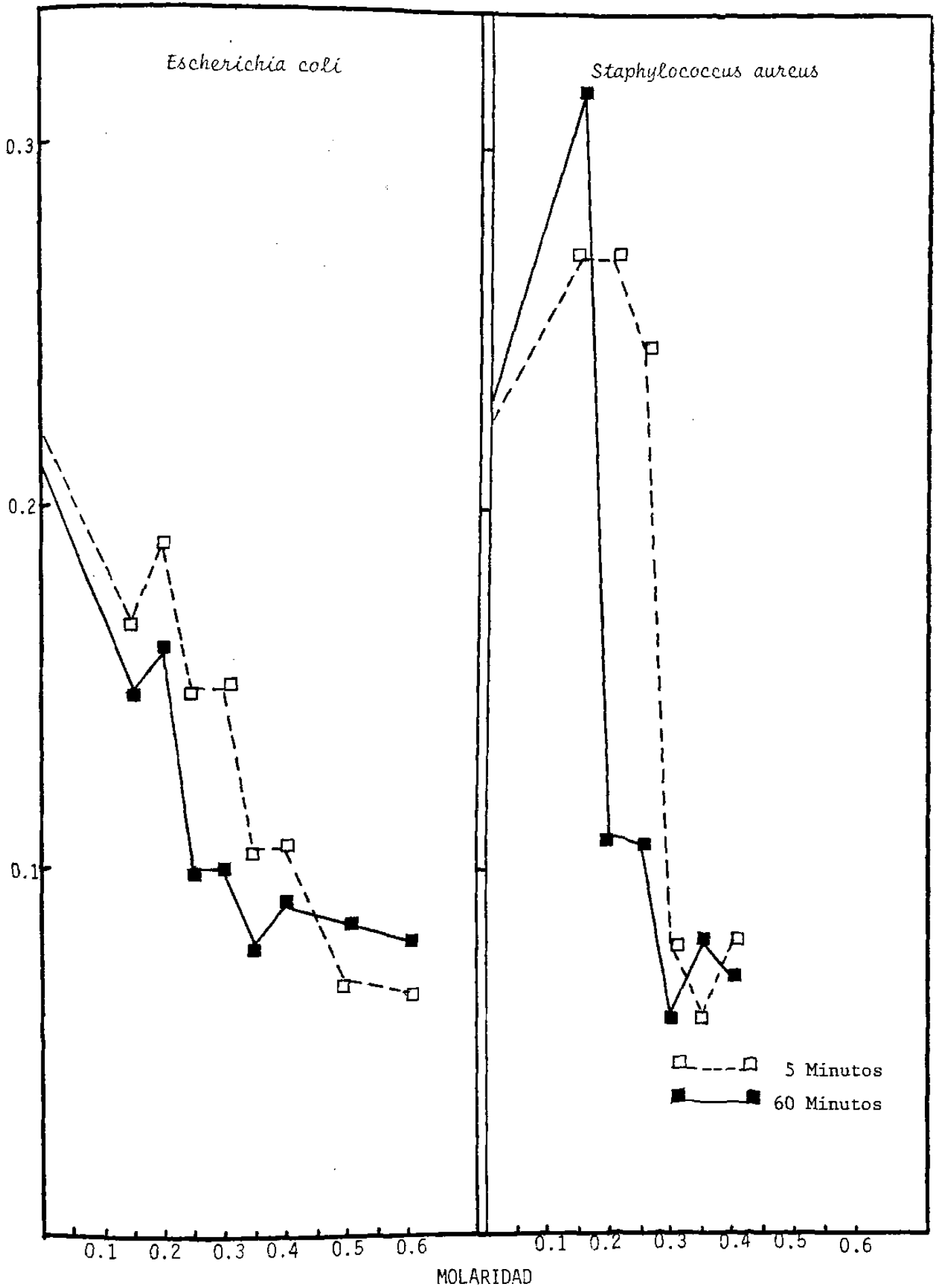
GRAFICA 34
ISO-PROPANOL



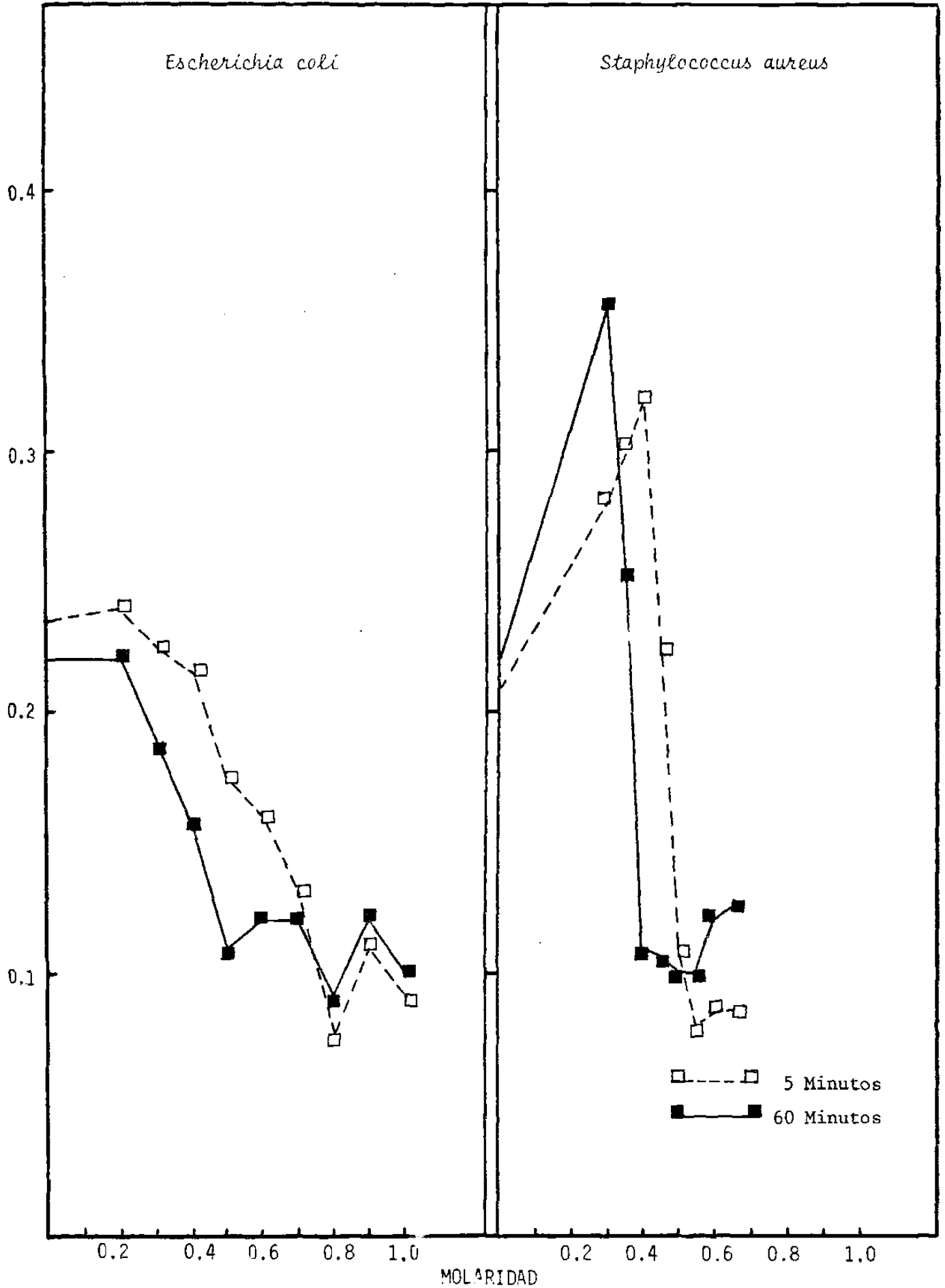
AFIUN
N-BUTANOL



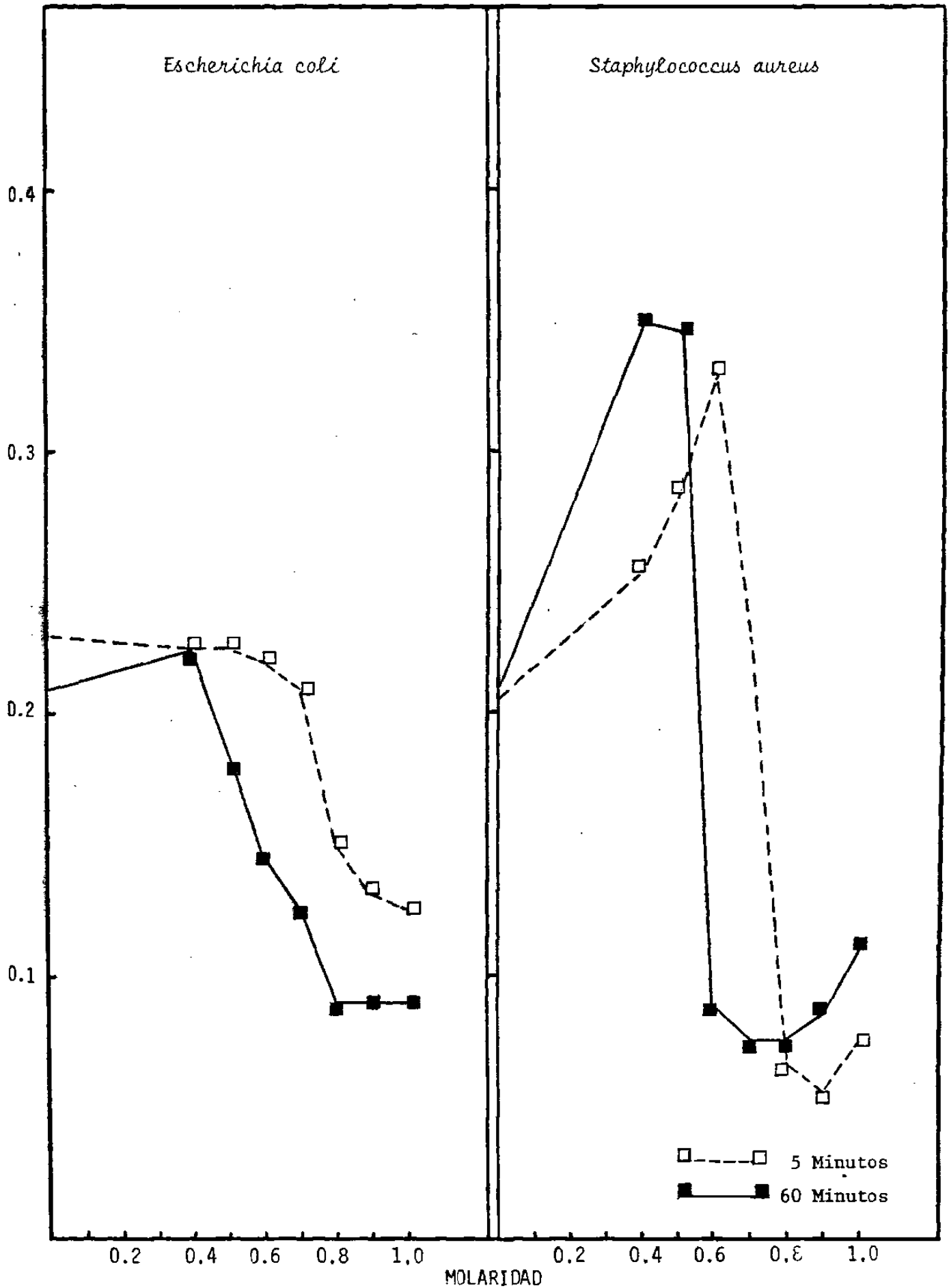
GRAFICA 36
ISO-BUTANOL



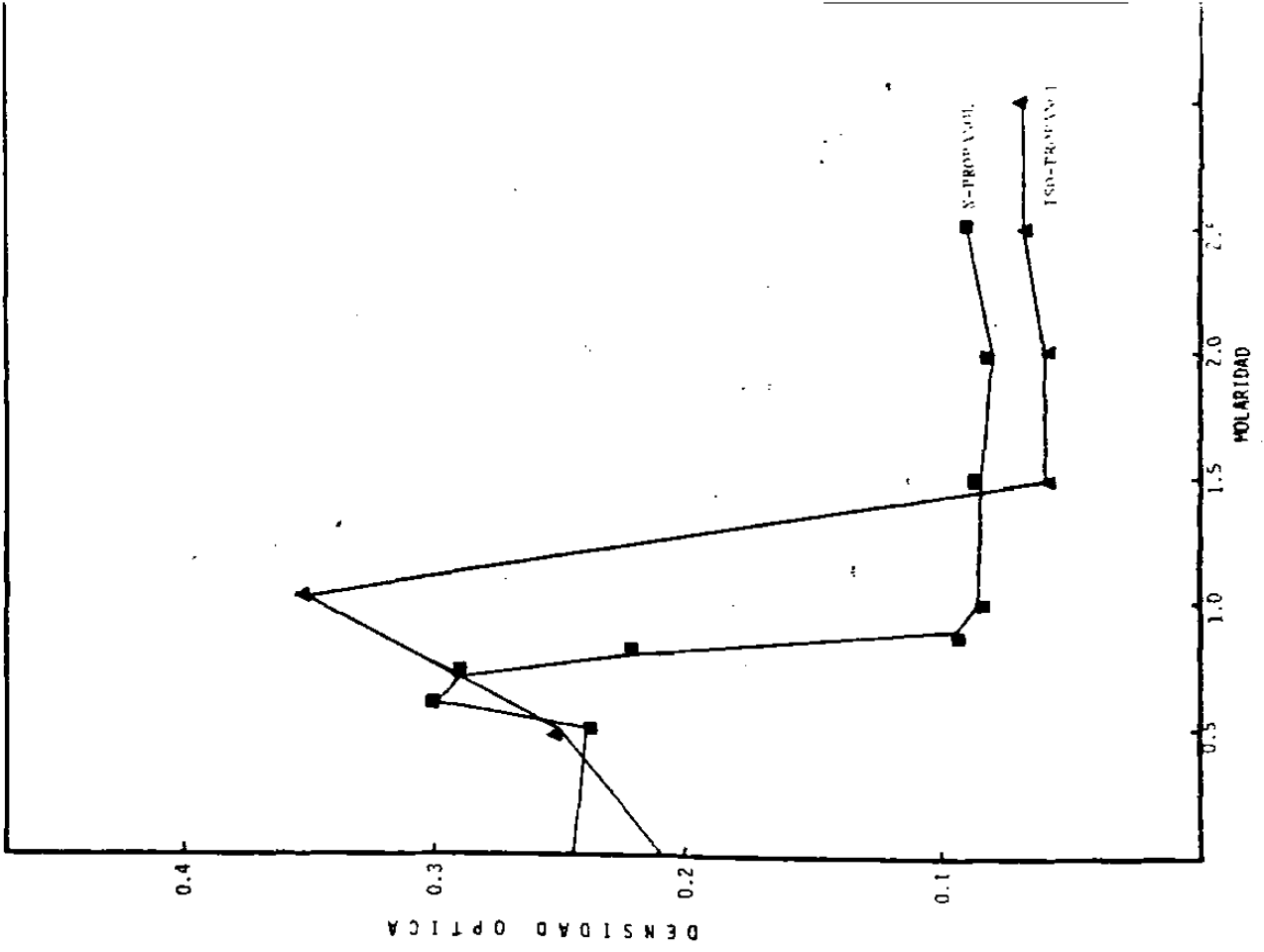
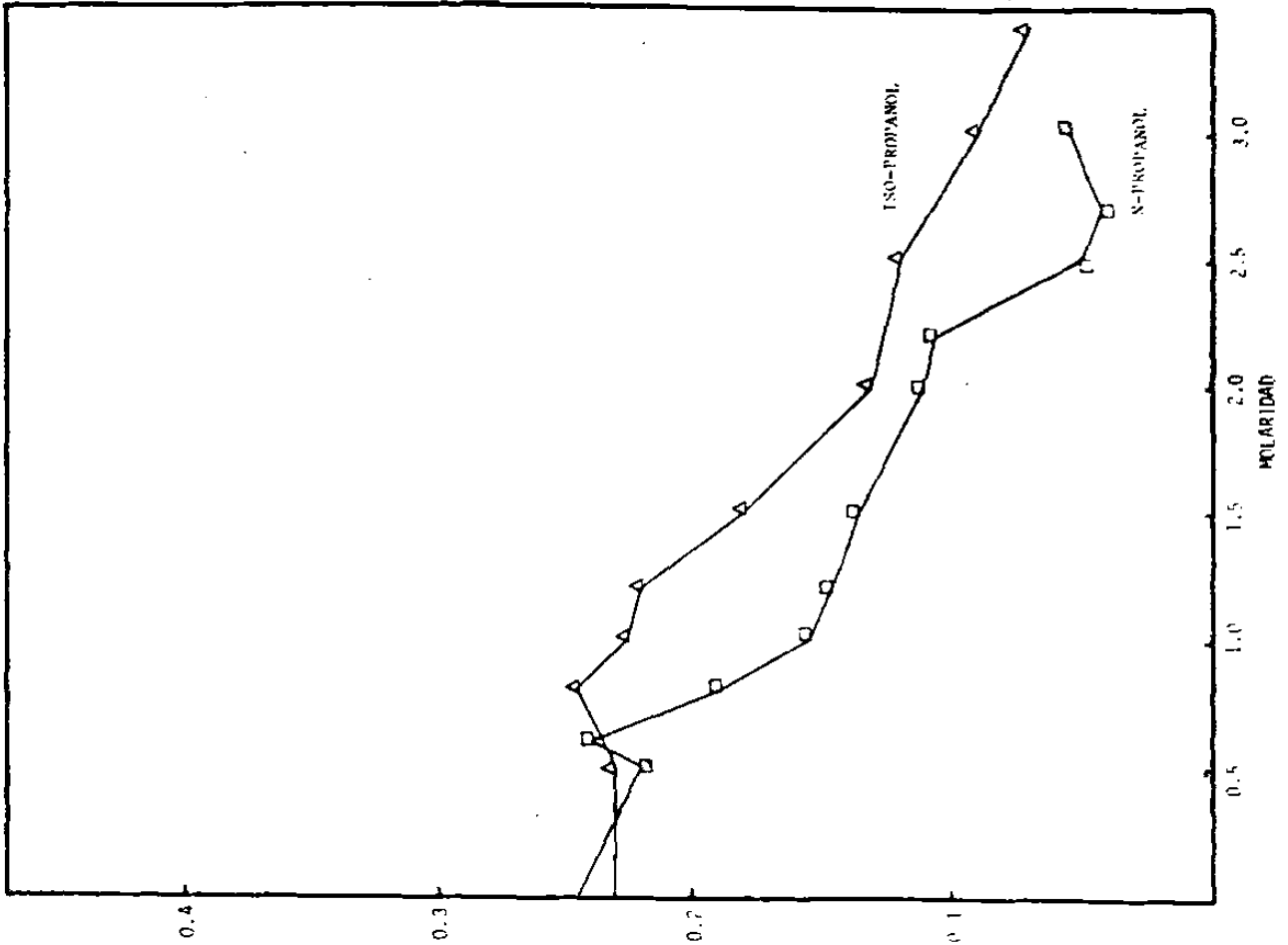
BUTANOL SECUNDARIO



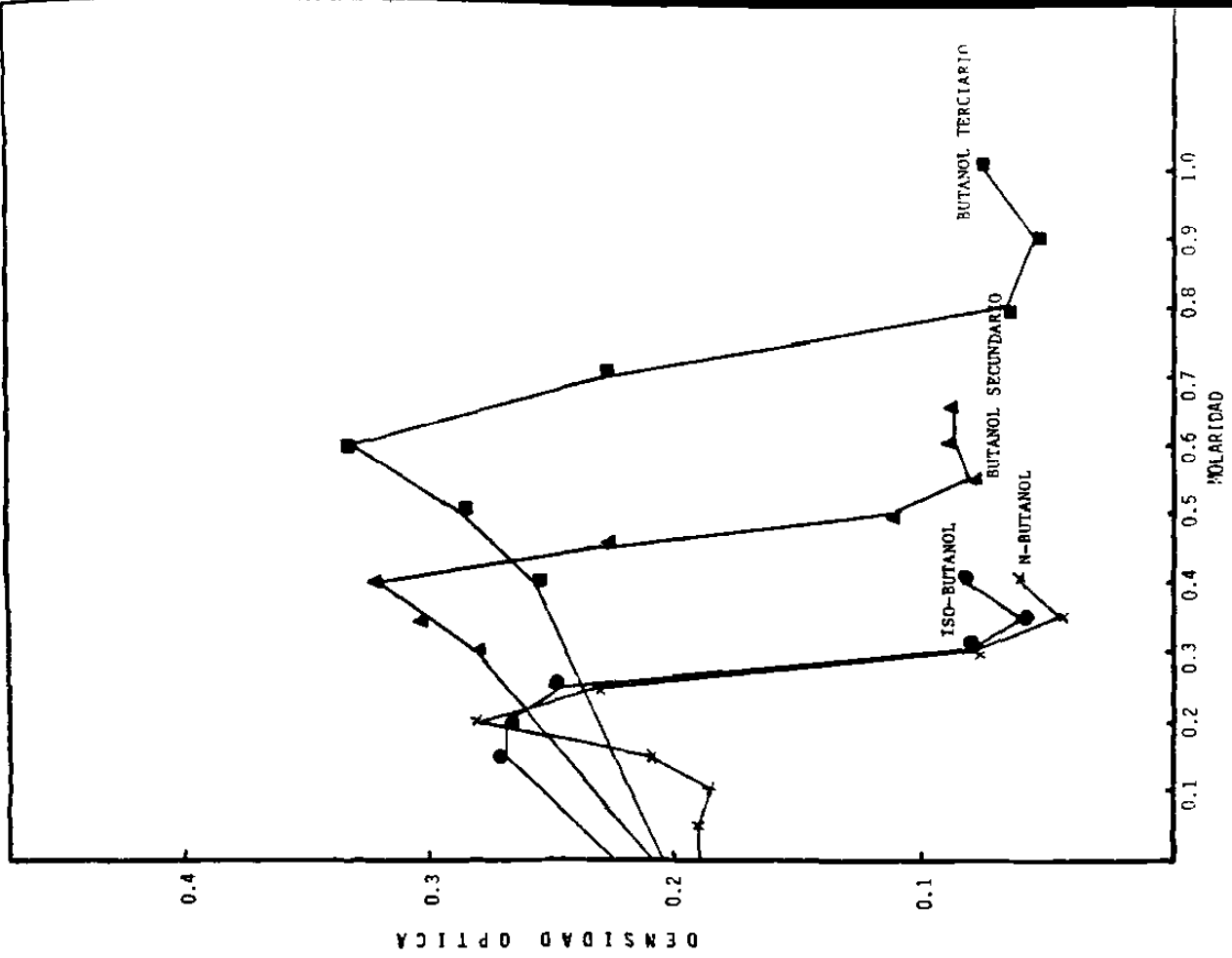
GRAFICA 38
BUTANOL TERCIARIO



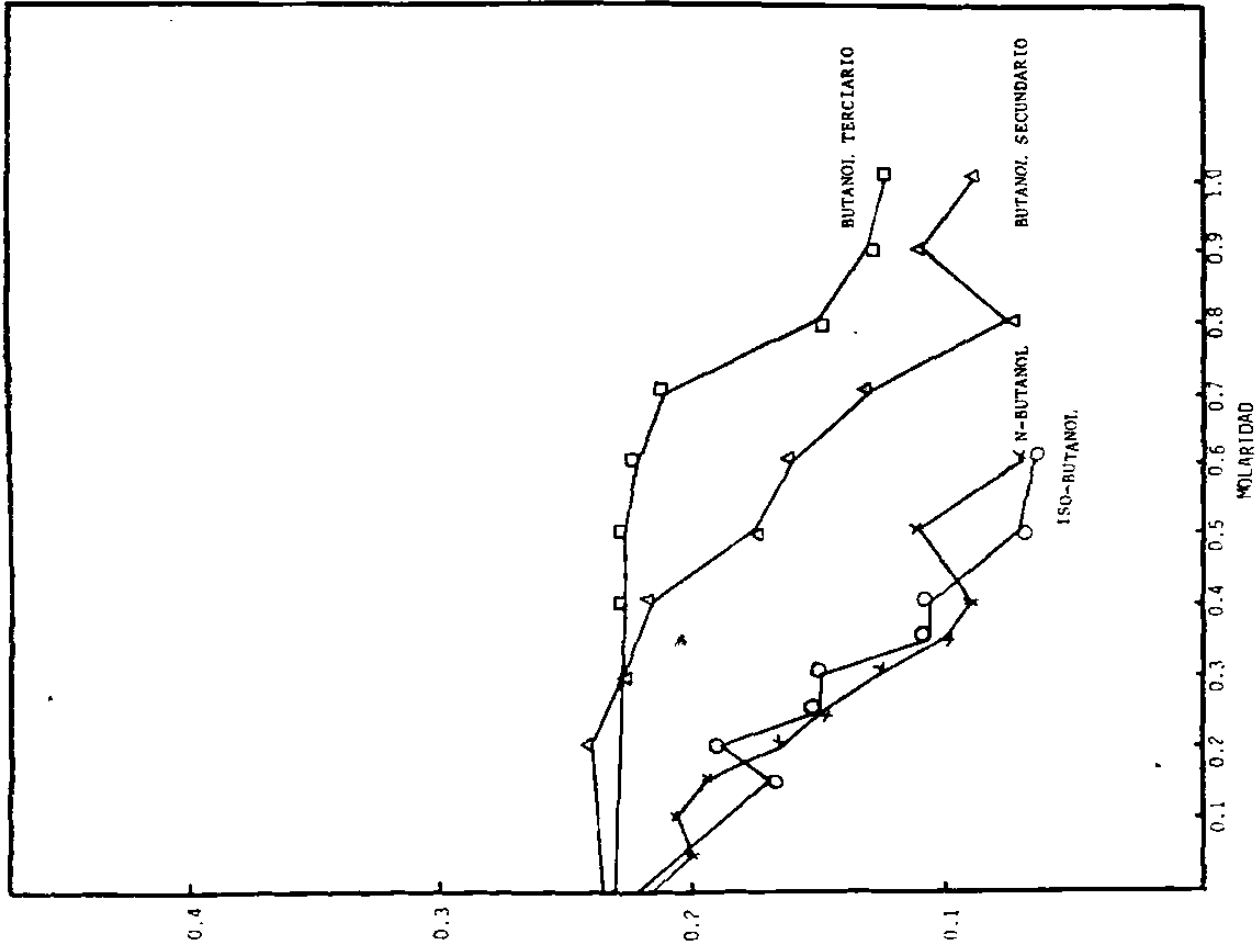
ESCHERICHIA COLI



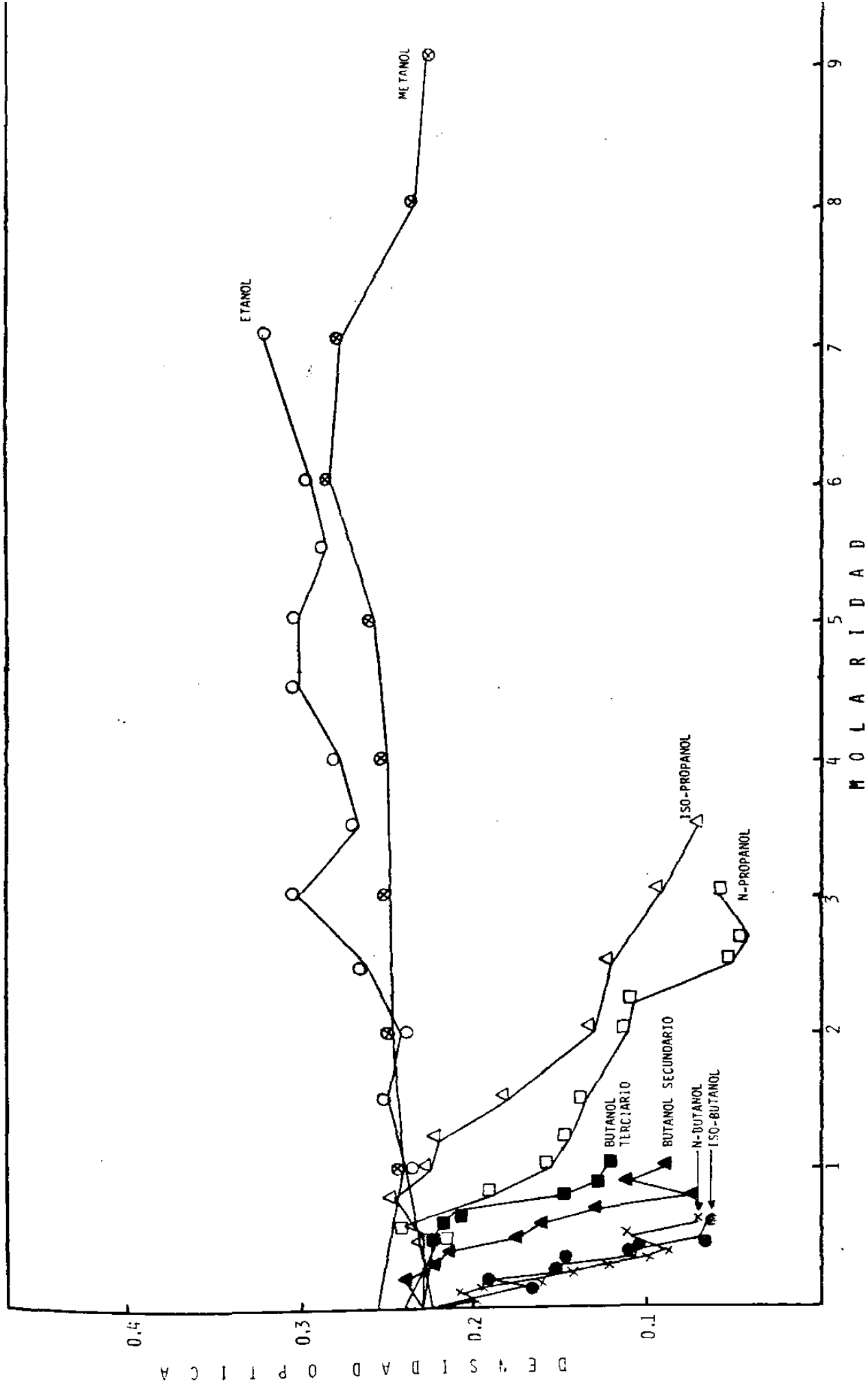
GRAFICA 42
STAPHYLOCOCCUS AUREUS



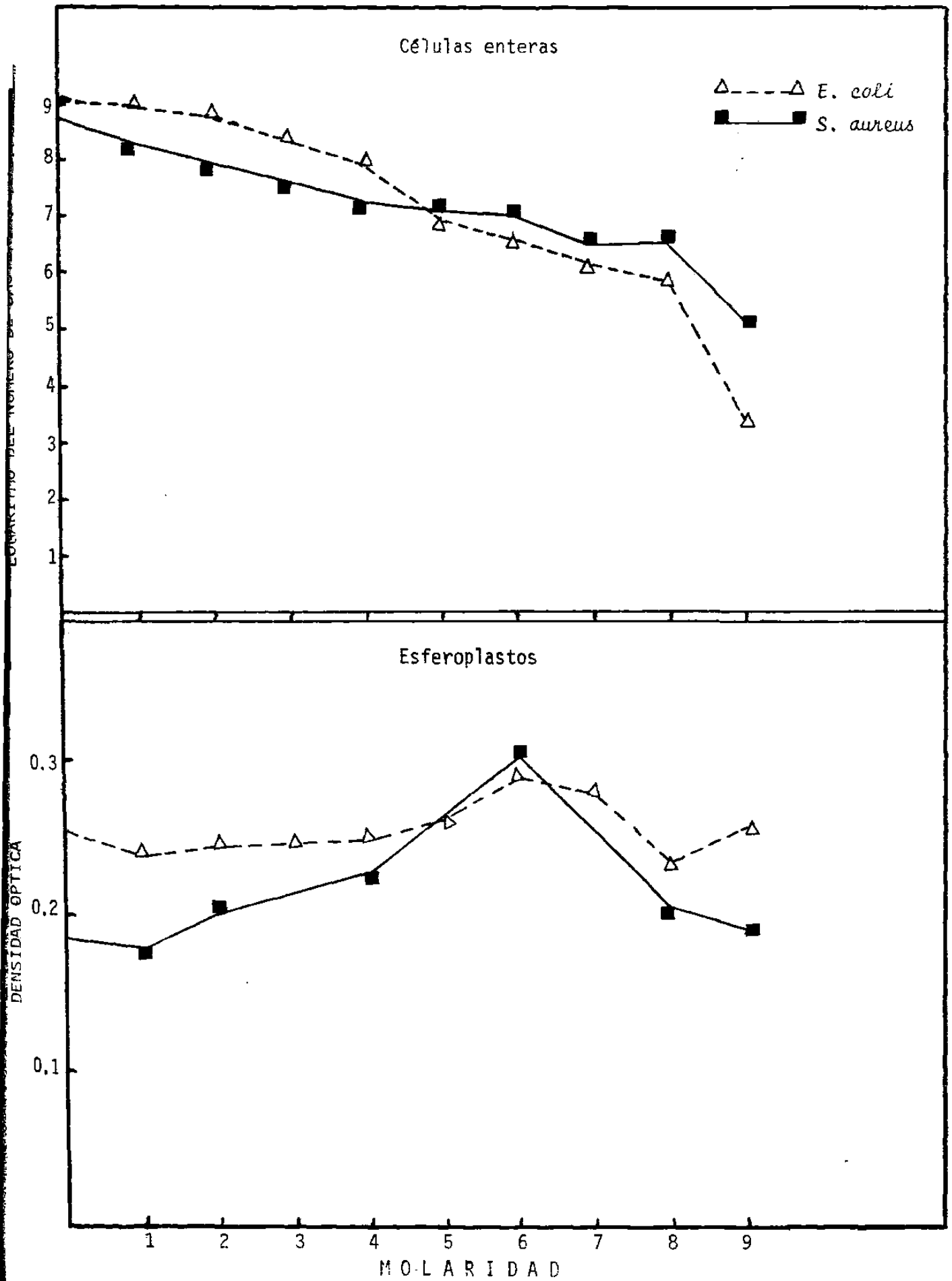
GRAFICA 41
ESCHERICHIA COLI



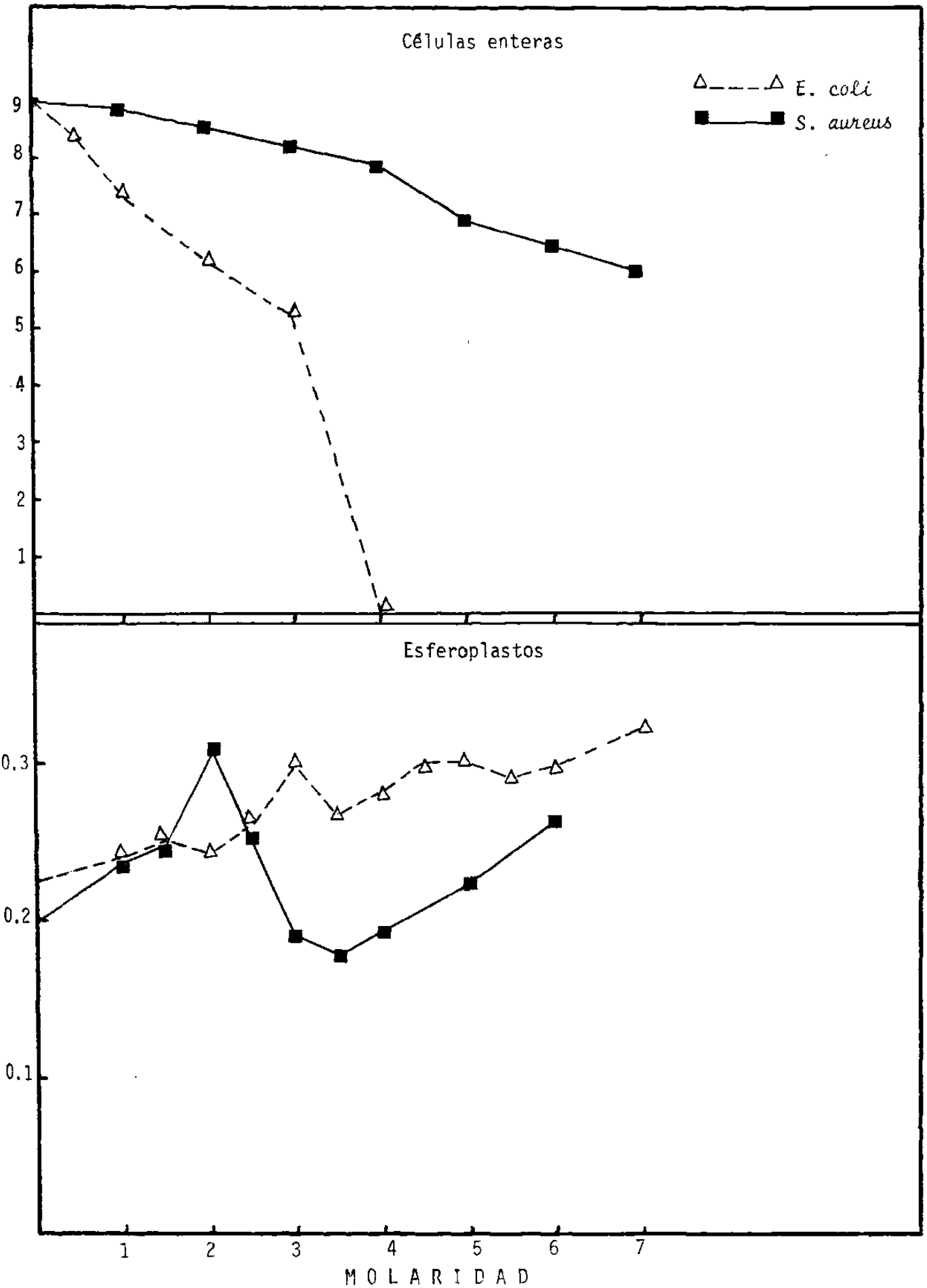
ESCHERICHIA COLI



GRAFICA 45
METANOL



ETANOL



GRAFICA 47
N-PROPANOL

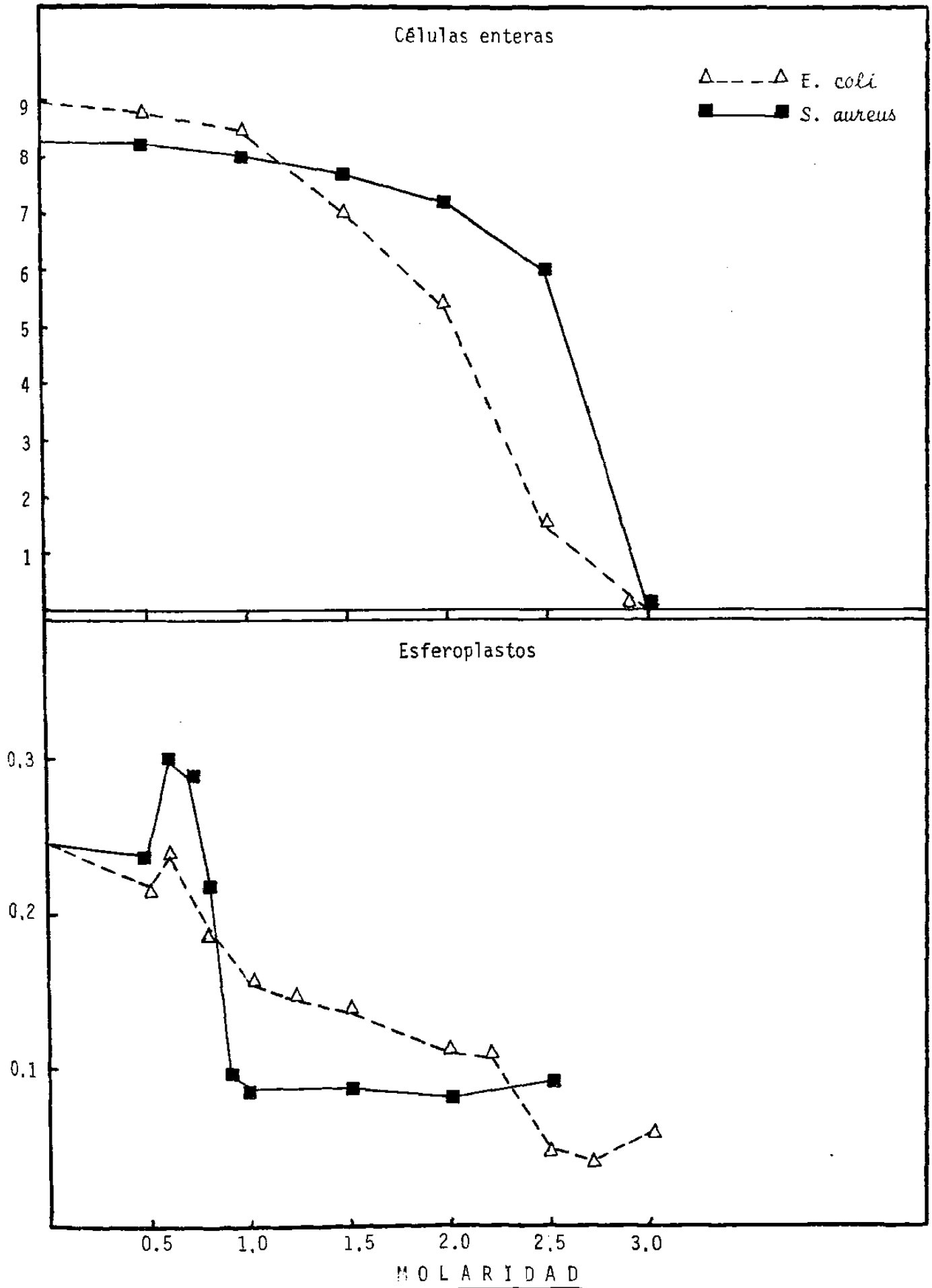
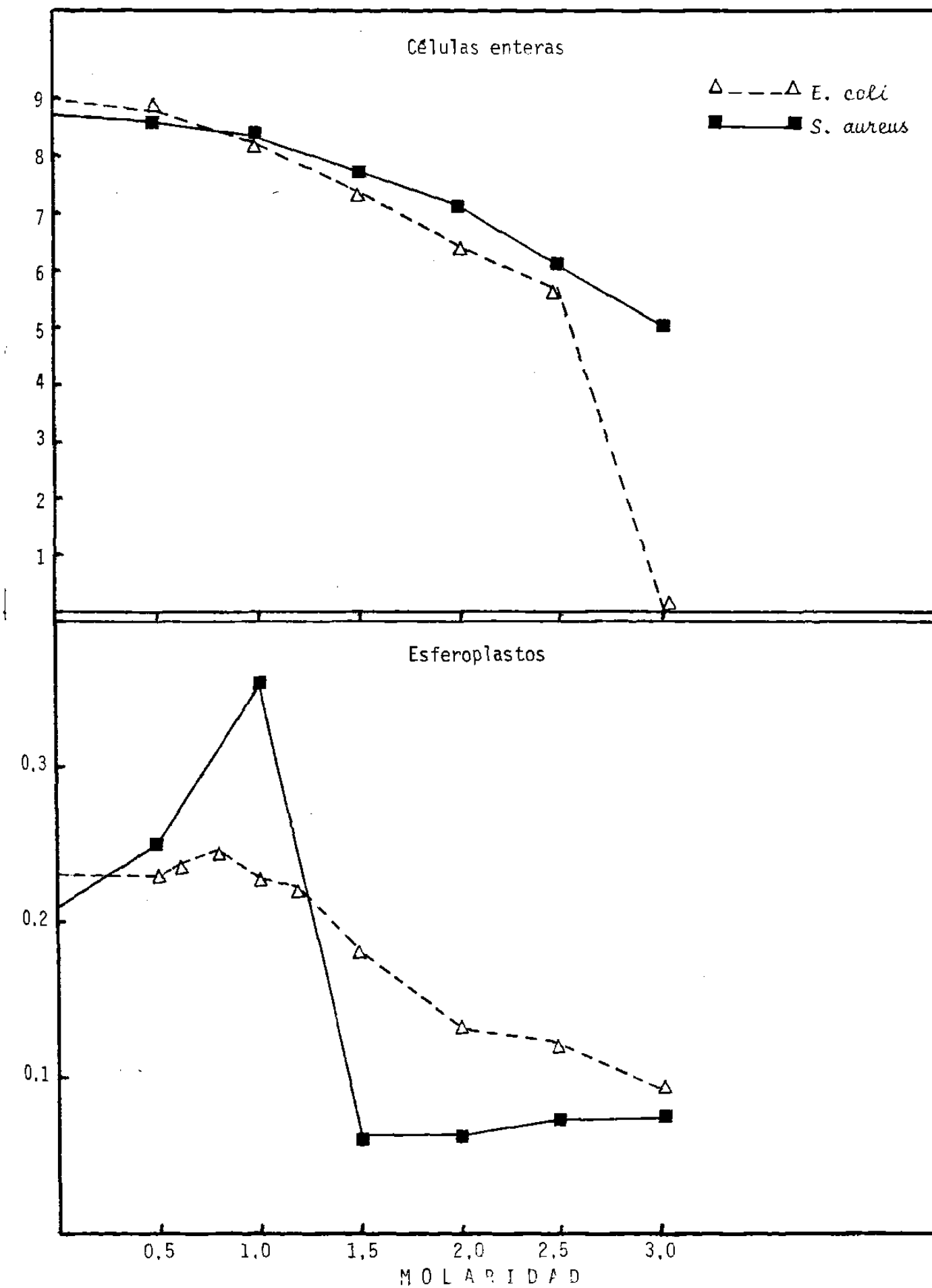


GRÁFICO 40
ISO-PROPANOL



GRÁFICA 49

N-BUTANOL

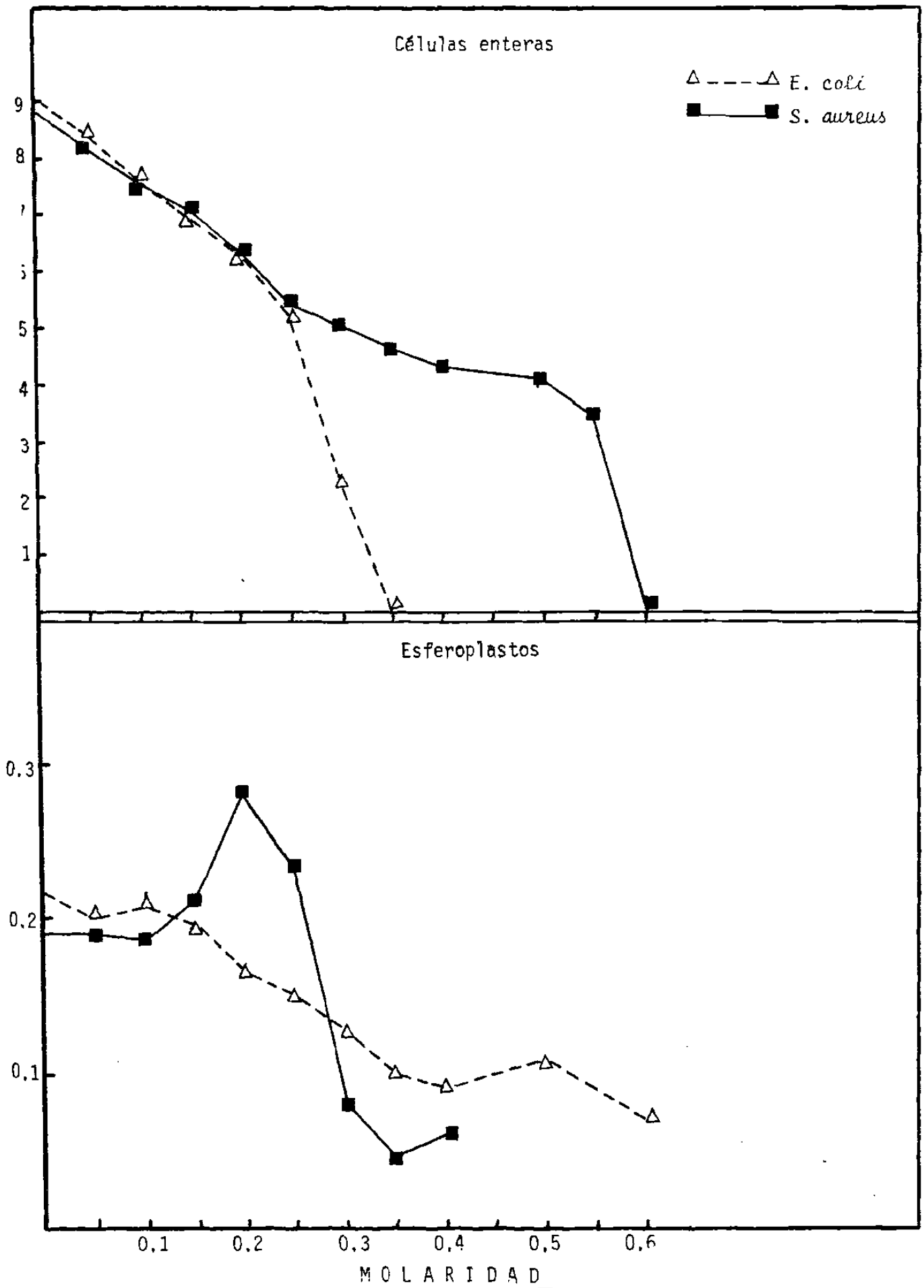
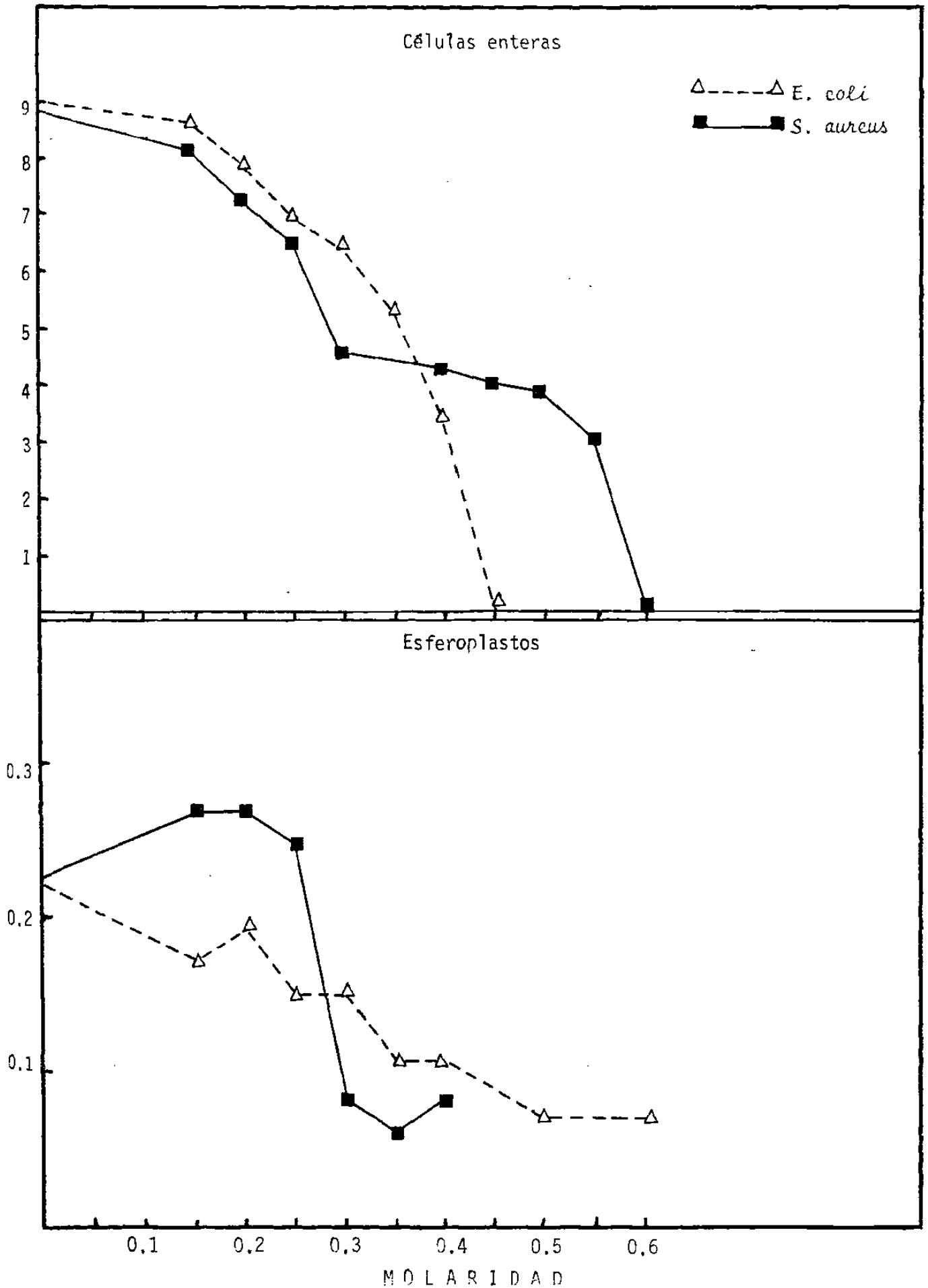
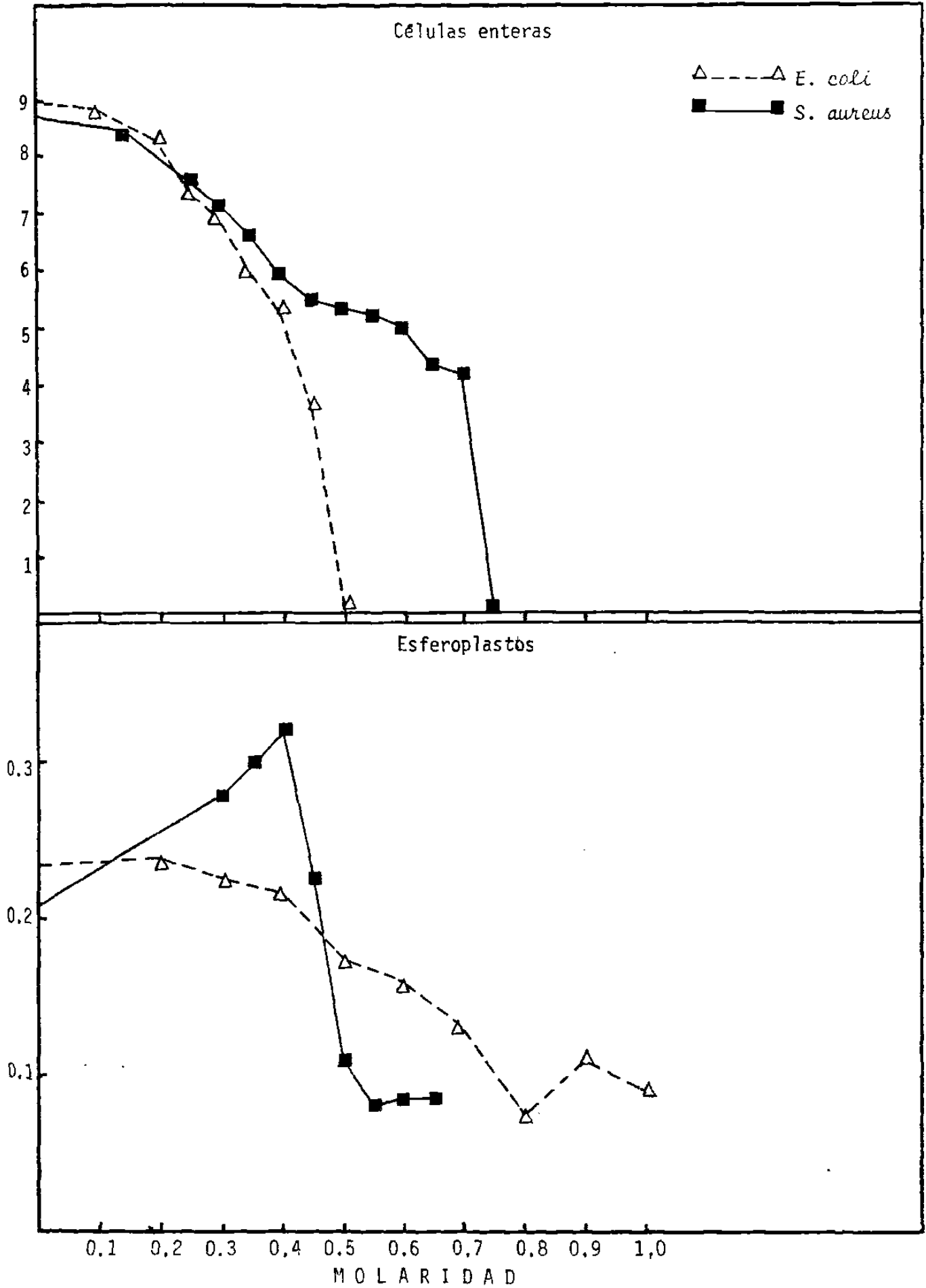


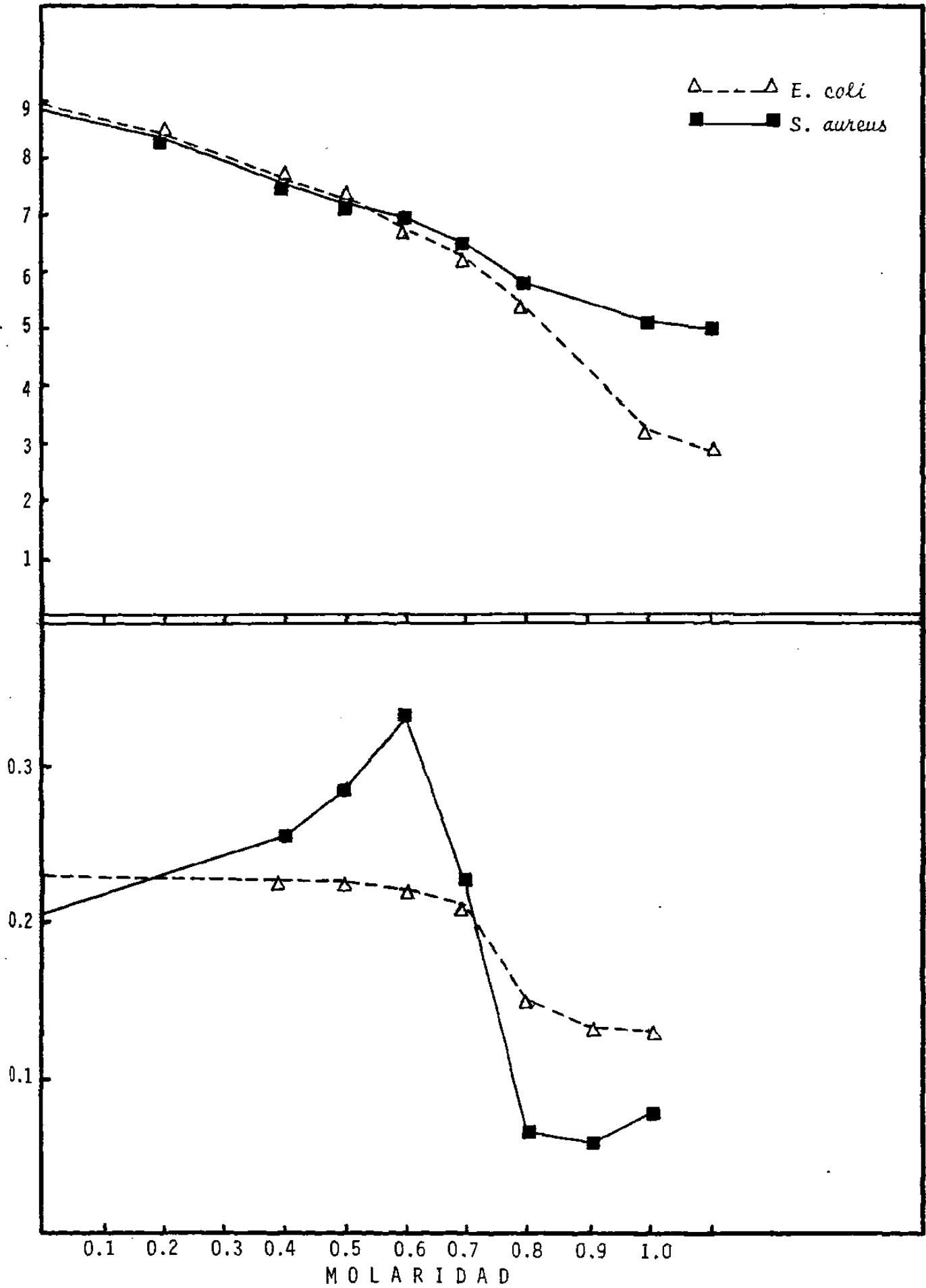
GRÁFICO
ISO-BUTANOL



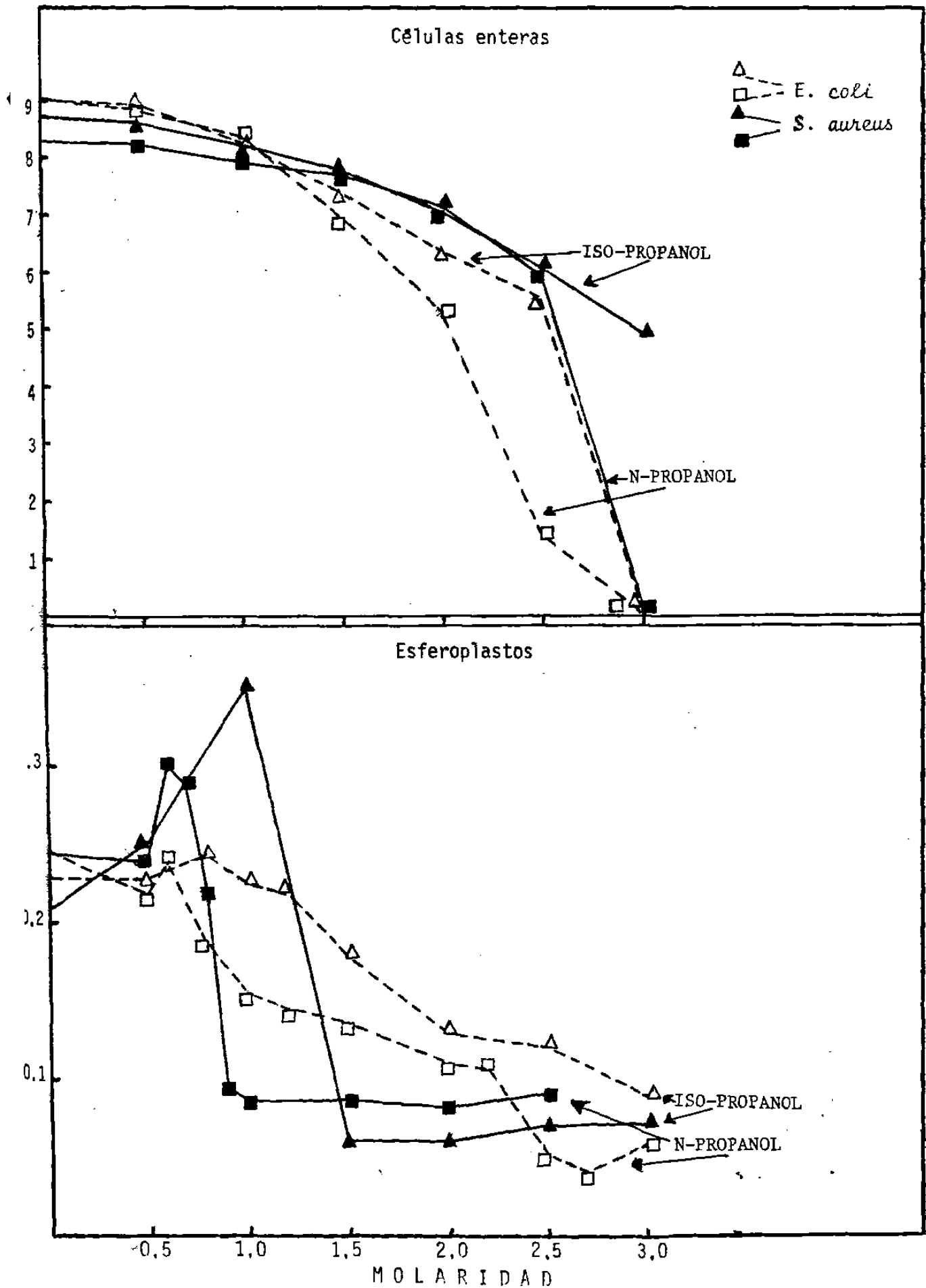
BUTANOL SECUNDARIO



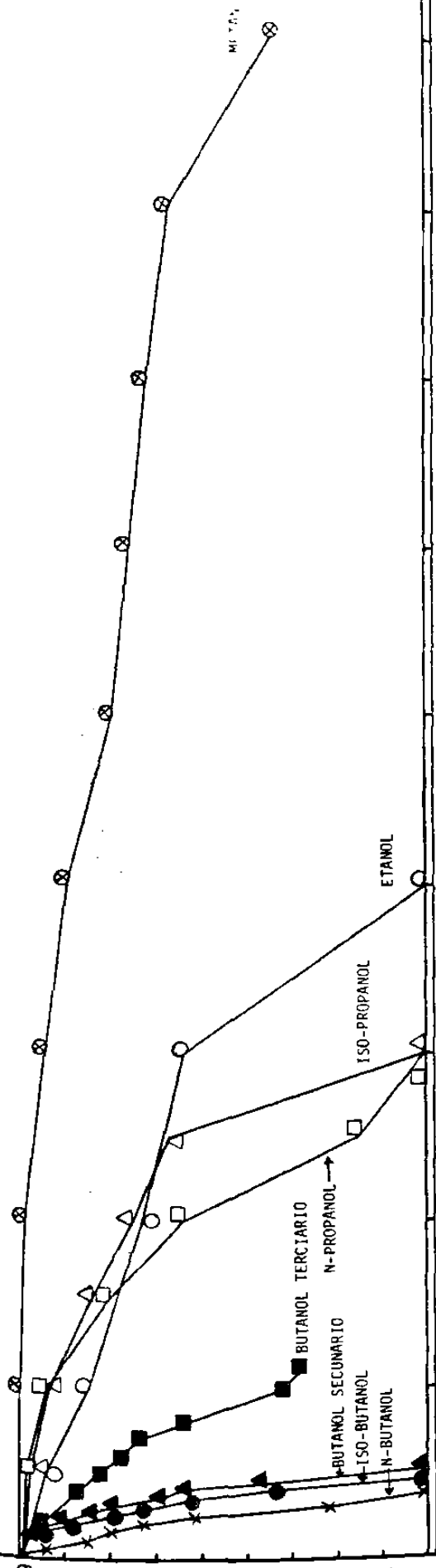
GRAFICA 52
BUTANOL TERCIARIO



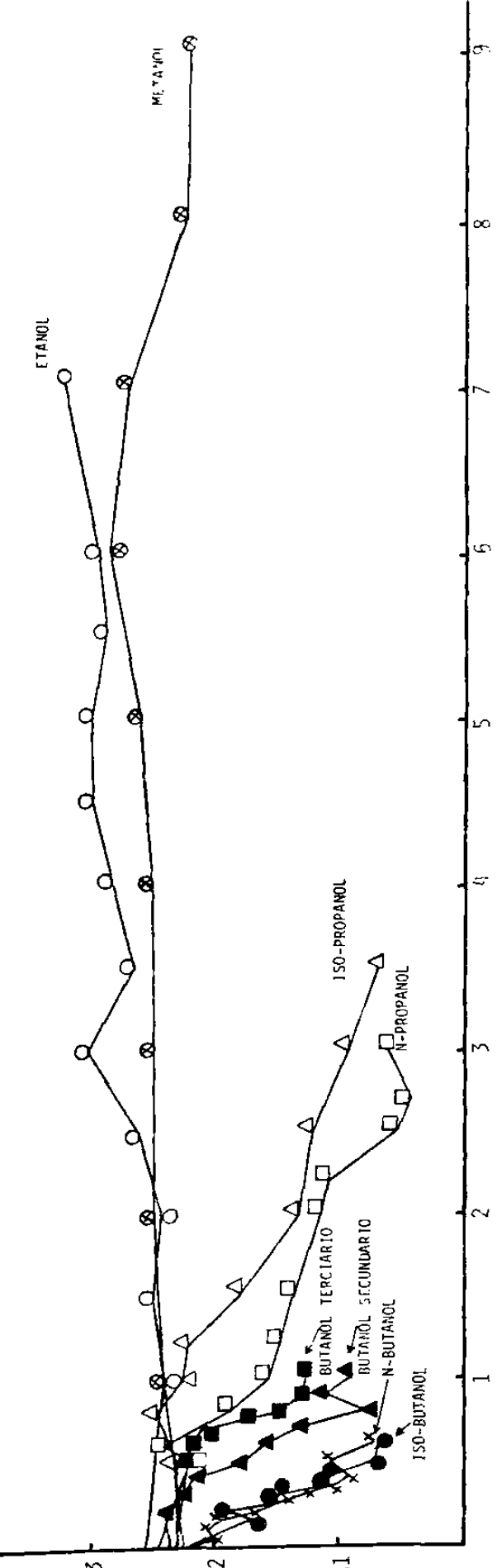
GRAFICA 53
N-PROPANOL E ISO-PROPANOL



LOGARITMO DEL NUMERO DE BACTERIAS VIABLES



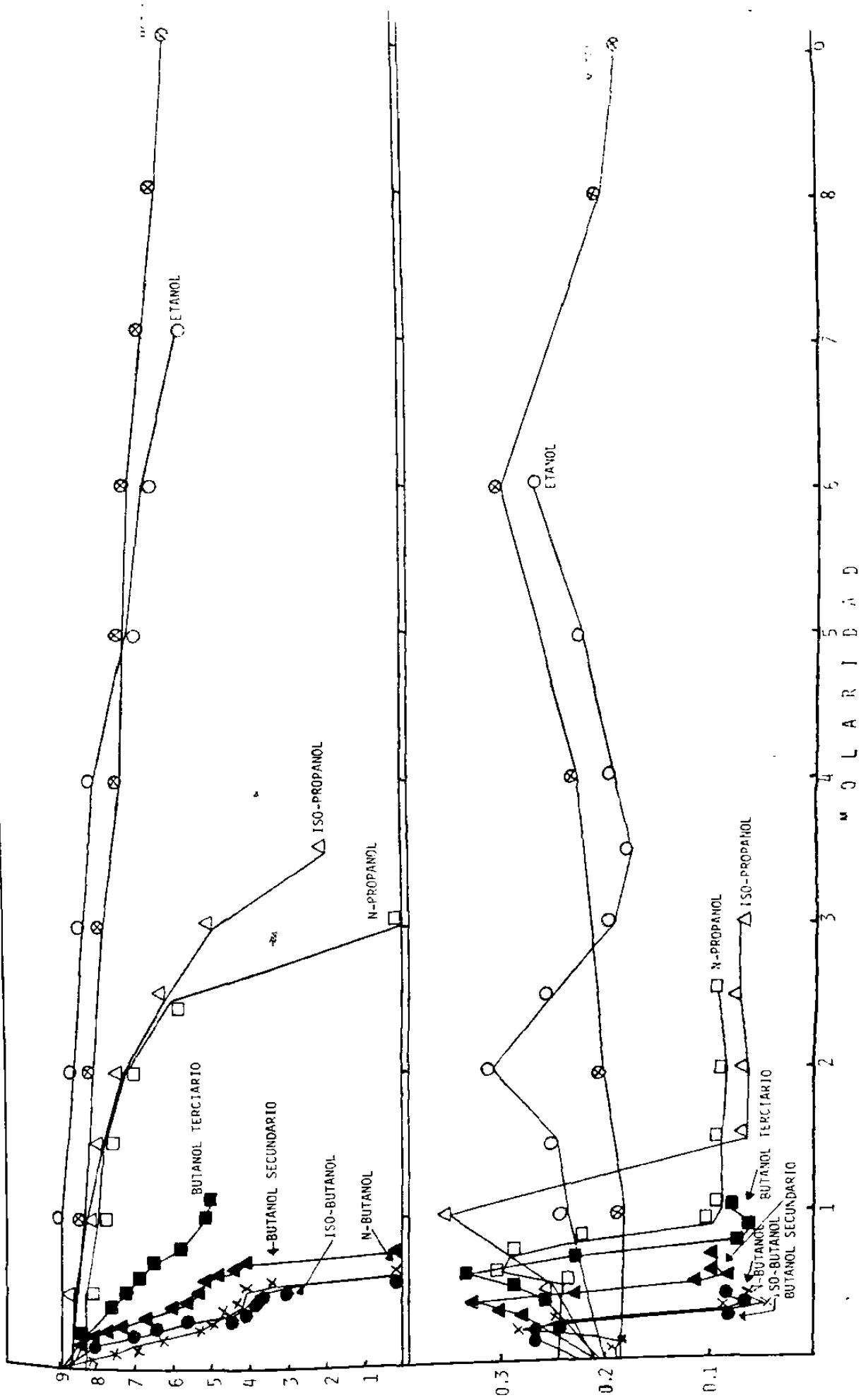
ENSIDAD OPTICA



MOLARIDAD

LOGARITMO DEL NÚMERO DE BACTERIAS VIABLES

DENSIDAD ÓPTICA



DISCUSION

Las diferencias de viabilidad y mayor resistencia a ser afectado en su respiración (22) y la menor fuga de componentes intracelulares de *S. aureus* comparada con *E. coli* (23) podría explicarse por las diferencias en estructura de pared celular y membrana citoplasmática. Estudios de la pared celular sugieren que hay dos componentes esenciales para mantener la rigidez de la célula en *E. coli*, una es el péptidoglican, el cual es susceptible a lisozima, la segunda es un fosfolípido el cual está unido covalentemente (26, 27). La pared celular constituida por lipopolisacárido, proteína y lípido. La membrana celular interna está compuesta de proteínas y lípidos; la composición en proteínas es diferente, como fué demostrado por Ames (1). La envoltura de *E. coli* exhibe áreas en las cuales la pared celular y la membrana citoplasmática están íntimamente asociadas (2). Una proteína de peso molecular 44,000 fué demostrada como componente mayor en la pared celular (20, 21). El ensamble de la membrana externa es única porque el lipopolisacárido y lípidos son sintetizados en la membrana interna y pueden ser trasladados a la membrana externa, la cual está separada de la interna por el peptidoglican de la pared celular. La membrana externa localizada por fuera del peptidoglican en las bacterias gram negativas es una barrera de permeabilidad parcial. La membrana interna o citoplasmática es una barrera de la permeabilidad y es responsable del transporte (13). La pared celular actúa como un cedazo molecular con un límite de exclusión cerca 550-650 daltons (5), por lo cual moléculas de bajo peso molecular como los alcoholes estudiados pasan fácilmente a través de ella.

Al examinar el efecto del metanol sobre *E. coli*, podemos apre-

ciar que esta bacteria es mas susceptible que *S. aureus*. Sin embargo concentraciones de 9.0 M demuestran un efecto mínimo. Estudios con microscopía de fases de los esferoplastos de *E. coli* y *S. aureus* demostraron que permanecían íntegros o ligeramente aumentados de tamaño.

El etanol tiene efecto letal a concentraciones de 4.0 M para *E. coli*, mientras que concentraciones de 7.0 M solo disminuyen la viabilidad de *S. aureus*. Los esferoplastos de *E. coli* con este alcohol, no muestran efecto lítico, por el contrario los de *S. aureus* presentan cambios en su D.O. compatibles con alteraciones de su membrana citoplasmática. El efecto letal de este alcohol sobre la viabilidad de *E. coli* y el no haber lisis de sus esferoplastos, indica que este alcohol no afecta su membrana citoplasmática, la diferencia en viabilidad probablemente sea debida a alteraciones a nivel de enzimas ya que se ha demostrado en bacterias gram negativas, enzimas asociadas a la pared y una variedad de enzimas degradativas, estas moléculas se han localizado ambas en el espacio periplásmico y en la superficie de la célula.

Las enzimas asociadas incluyen desoxirribonucleasa, ribonucleasa, 3'-nucleotidasa, 5'-nucleotidasa, uridina 5'-difosfatasa, adenosina 5'-difosfato y algunas otras (3). Esta asociación de enzimas con los componentes de la pared celular fué demostrada por Schlesinger al preparar esferoplastos de *E. coli* y encontrar en el medio subunidades inactivas de estas proteínas (19). Observaciones hechas por Mohan (14) de la lisis de *E. coli* por enzimas autolíticas, llevan a especular que la capa externa es separada de la capa interna por hidrólisis de uniones covalentes débiles, exponiendo la capa de mucopéptido interna a futuras degradaciones. Probablemente las enzimas autolíticas y el efecto del etanol sobre las proteínas encontradas en el espacio periplásmico y la pared celular, impidan la multiplicación de *E. coli*.

Los propanoles muestran uno de los efectos más importantes sobre estas dos especies bacterianas, *E. coli* fué más susceptible que *S. aureus*, -- así mismo pudo apreciarse que el iso-propanol es menos efectivo que el n-propanol, tanto sobre la viabilidad de ambas especies como sobre sus respectivos esferoplastos.

Al examinar el efecto del butanol y sus isómeros, podemos ver -- que para el n-butanol puede apreciarse una disminución progresiva de la viabilidad para ambas bacterias, demostrándose mayor sensibilidad en el gran negativo que en el gram positivo. La pendiente del iso-butanol y butanol secundario son paralelas y se repite el fenómeno de mayor letalidad en *E. coli*. El butanol terciario muestra un efecto letal menos importante.

El efecto de la estructura de una molécula puede ser analizada con este alcohol. Apréciase un efecto letal progresivo en la secuencia n-butanol, iso-butanol, butanol secundario y butanol terciario. Para *E. coli* se observa claramente esta secuencia; sin embargo, en *S. aureus*, el comportamiento de n é iso-butanol es muy semejante.

Si se compara la concentración a la cual los esferoplastos de *E. coli* y *S. aureus* inician su lisis, apreciada por la caída de la D.O. puede observarse que la pendiente de lisis de los esferoplastos de *S. aureus* es de mayor valor que la de *E. coli*, lo cual sugiere una acción más lenta de estos alcoholes sobre *E. coli*. Estas diferencias del comportamiento de los esferoplastos pueden ser debidas a las diferentes técnicas con que se obtuvieron. En el caso de *S. aureus* fueron obtenidos por métodos enzimológicos muy efectivos en retirar la pared celular; en el caso de *E. coli* no se conoce ninguna enzima que logre el mismo resultado y tuvo que recurrirse a antibióticos inhi

bidores de la biosíntesis de la pared celular que no quitan la pared ya formada. El resultado fué que los esferoplastos de *E. coli* quedaron con un residuo de un 20-25% de pared y probablemente debido a esto no se observan los -- cambios osmóticos tan dramáticos que se ven en el caso de *S. aureus*.

Microscópicamente pudo observarse que cuando se llega a concentraciones de 0.2-0.4 M en el caso de *S. aureus*, los esferoplastos desaparecen completamente, demostrando que los alcoholes tienen una acción disolvente de los componentes de la membrana citoplasmática. Por el contrario en el caso de *E. coli* concentraciones superiores a 0.3 M mostraron una degradación más lenta, muchos de ellos fueron disueltos, pero quedaron muchos restos de material celular que no pudo ser disuelto. La interpretación que se da a estos hallazgos es de que la diferente forma de obtener los esferoplastos determinan estas diferencias, esa turbidez residual determina que las curvas de lisis sean diferentes.

Las membranas de los esferoplastos de *S. aureus* son disueltas a una concentración de 0.3 M con n-butanol, por lo tanto es obvio que la célula entera no sería viable a esa concentración, sin embargo, las células enteras son muertas cuando se llega a una molaridad de 0.6; esto demuestra cierta acción protectora de la pared celular de *S. aureus* sobre sus esferoplastos. Esto no ocurre en el caso de células enteras y esferoplastos de *E. coli*, ya que concentraciones de 0.6 M de n-butanol determinan una lisis completa de los esferoplastos, mientras que las células enteras son muertas a una concentración de 0.35 M; lo cual en este caso el efecto protector de la pared celular es escaso o nulo. Lo mismo ocurre con iso-butanol, butanol secundario y butanol terciario solo que a diferentes concentraciones.

Es importante hacer notar que a medida que se aumenta el número de carbonos en la molécula del alcohol, disminuye la concentración necesaria para matar la población bacteriana. Las diferencias entre metanol y etanol, no son importantes en el caso de *S. aureus*, pero sí para *E. coli*. Esto pone de manifiesto que las diferencias en la constitución de la pared celular bacteriana de ambas especies deben ser tomadas en cuenta para explicar el mecanismo de acción de estos alcoholes. El incrementar un carbono más, como en los propanoles se reflejan en un incremento de su poder letal, ya que se requieren concentraciones menores del alcohol para ejercer su acción letal. Si agregamos a esa cadena de tres carbonos, uno más para formar butanol, encontramos un mayor índice de mortalidad, dependiendo de donde se agrega ese carbono. Si se agrega para dar un n-butanol, el cambio de mortalidad es muy dramático, ya que de 3.0 M para n-propanol para ejercer acción letal, cambia a 0.35 ó 0.60 M dependiendo si se trata de *E. coli* ó *S. aureus*. El agregar un carbono en posición lateral y terminal no modifica mucho el comportamiento de la molécula. El agregar un metilo parece tener un efecto más definitivo, haciendo que el alcohol sea menos dañino sobre las membranas bacterianas; esto se ve en el butanol secundario, en el cual la concentración letal para *E. coli* se incrementa a 0.5 M. Para *S. aureus* se requieren concentraciones de 0.75 M para causar la muerte de la población bacteriana.

Es importante la diferencia de la estructura de la pared celular entre *E. coli* y *S. aureus*, así como la distribución espacial que tengan los cuatro carbonos que forman la molécula del butanol. Esto es importante para el butanol terciario; en este isómero, tres metilos están distribuidos simétricamente alrededor de un átomo de carbono y la otra valencia está ocupada por un hidróxilo. La disminución de lo largo de la cadena hidrofóbica

de este isómero lo hace más hidrosoluble pero menos liposoluble, lo cual se refleja en que su acción letal sobre *E. coli* y *S. aureus* es muy pobre.

El observar el comportamiento de la acción letal de estos alcoholes tanto sobre células enteras como sobre sus esferoplastos y al examinar la cinética de sus efectos, así como el comportamiento de los diversos isómeros hace suponer, que los alcoholes utilizados tienen como sitio de acción primaria la membrana citoplasmática.

La imagen que se tiene para explicar la acción antibacteriana de estos alcoholes primarios, es que estas moléculas pasan fácilmente la estructura de la pared celular (5) y se distribuye en los sitios expuestos de la membrana citoplasmática. Allí reaccionan con los componentes proteínicos que se intercalan en las moléculas de los fosfolípidos y dependiendo de la concentración y de la estructura del alcohol, causan un desarreglo de las moléculas de este componente, determinando un desajuste de sus posiciones. Este desarreglo determina además, el rompimiento de las fuerzas intermoleculares y permiten la formación de soluciones de continuidad muy importante que causa la fuga de componentes intracelulares, tales como aminoácidos, fosfatos inorgánicos, azúcares, ácidos ribonucléicos solubles y algunos otros - - (17, 23). Así mismo, esta alteración estructural de la membrana separa o desconecta las enzimas responsables del transporte de metabolitos y desencadena las diversas enzimas responsables de la respiración terminal. El resultado final de toda esta interacción es que la célula quede vacía de metabolitos intermediarios y es incapaz de incorporar metabolitos contra gradiente, así como de trasladar sus electrones y protones a un aceptor terminal como puede ser el oxígeno. Esto paraliza la respiración terminal y afecta también la fosforilación oxidativa, lo cual termina de mostrar el esquema de un detrimento metabólico incompatible con la vida bacteriana.

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el papel que juega la pared celular como mecanismo protector en la viabilidad bacteriana de *E. coli* y *S. aureus* por la acción de alcoholes primarios, se diseñaron experimentos que consistieron en exponer poblaciones de estas bacterias a diferentes concentraciones de metanol, etanol, propanol, butanol y sus isómeros. Se determinó la cuenta viable antes y después de la exposición alcohólica a intervalos de 5, 10, 15 y 30 minutos. Se graficó viabilidad contra tiempo a los 5, 10 y 15 minutos, así como viabilidad contra molaridad a los 5 y 30 minutos de contacto.

Además se prepararon esferoplastos de ambas bacterias, las cuales fueron expuestas a las mismas concentraciones de los alcoholes mencionados. Se estudió su comportamiento por espectrofotometría y microscopía a los 5, 15, 30 y 60 minutos. Se estudió su comportamiento por modificaciones de la D.O.

Los resultados con células enteras demostraron que el efecto de metanol sobre ambas especies fué muy ligero, ya que concentraciones tan altas como 9.0 M no eliminaron la población bacteriana. El etanol tuvo efecto diferencial sobre estas bacterias. Concentraciones de 7.0 M casi no afectaron la viabilidad de *S. aureus*; sin embargo, para *E. coli* concentraciones de 4.0 M fueron letales.

El n-propanol eliminó a ambas especies en una concentración de 3.0 M. Para el iso-propanol se requirieron concentraciones más altas para lograr el mismo efecto. *E. coli* fué más susceptible que *S. aureus*.

Para n-butanol se requieren concentraciones de 0,35 M y 0,60 M para obtener efecto letal. Para el iso-butanol de 0,45 M y 0,60 M para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. El butanol secundario es menos agresivo y se requieren concentraciones de 0,50 M para *E. coli* y 0,75 M para *S. aureus*. Por último el butanol terciario demuestra un efecto más discreto sobre ambas especies ya que concentraciones de 1,10 M no son capaces de eliminar a la población bacteriana.

El comportamiento de los esferoplastos de *E. coli* y *S. aureus* se graficó D.O. contra tiempo, a los 5, 15, 30 y 60 minutos; así como D.O. contra molaridad a dos tiempos 5 y 60 minutos.

Los resultados mostraron que el metanol no produjo ningún efecto importante sobre la membrana citoplasmática de ambos esferoplastos. Con el etanol si se demostraron variaciones en la D.O. de la población, mostrando los esferoplastos de *S. aureus* cambios más dramáticos que los de *E. coli*.

Los propanoles se comportan en una forma semejante a las células enteras. El iso-propanol fué menos agresivo que el n-propanol. Las pendientes de las caídas de la D.O. son de más alto valor para *S. aureus*, que para *E. coli*.

En los butanoles se pudo observar que los esferoplastos de *S. aureus* tuvieron una caída brusca de la D.O.; sin embargo, para *E. coli* la iniciación de la pendiente de lisis se presentó a concentraciones semejantes a los de *S. aureus* pero con pendientes de menor valor. De los butanoles n é iso-butanol fueron los más activos, requiriéndose concentraciones tan bajas como 0,25 M para iniciar lisis. En el caso de butanol secundario se necesitaron concentraciones de alrededor de 0,40 M. El butanol terciario

rio fué el menos agresivo, se necesitaron concentraciones de alrededor de --
0.6 M.

Estos datos permiten concluir que los alcoholes primarios incrementan su poder letal a medida que se alarga la cadena de carbonos. Así mismo se pudo demostrar que entre más ramificado esté un alcohol, menor es su efecto sobre la viabilidad de células enteras o sobre su membrana citoplasmática.

Al comparar la concentración de cada alcohol a la cual se inicia la caída de la D.O. en los esferoplastos de *E. coli* y *S. aureus* puede -- apreciarse que es semejante a pesar de la metodología diferente de su preparación. La pérdida o no de su viabilidad parece depender más de las caracteristicas estructurales de la pared celular bacteriana. La pared de *S. aureus* por su entrelazamiento molecular, determina una mayor rigidez de ésta y por lo tanto ofrece mayor protección a la membrana citoplasmática. En el caso de *E. coli* la pared celular presenta una estructura menos rígida y por lo tanto menos protectora sobre la membrana de esta especie.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ames, G.F.L.; Spudich, E.N. and Nikaido, H. 1974. Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipo-polysaccharide mutations. *J. Bacteriol.* 117: 406-416.
- 2.- Bayer, M.E. 1968. Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 53: 395-404.
- 3.- Costerton, J.W.; Ingram, J.M. and Cheng, K.J. 1974. Structure and function of the cell envelope of gram negative bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38 (1): 87-110.
- 4.- Dagley, S.; Dawes, E.A. and Morrison, G.A. 1950. Inhibition of growth of *Aerobacter aerogenes*: Mode of action of phenols, acetone and ethyl acetate. *J. Bacteriol.* 60: 369-379.
- 5.- Decad, G.M. and Nikaido, H. 1976. Outer membrane of gram negative bacteria XII Molecular sieving function of cell wall. *J. Bacteriol.* 128 (1): 325-336.
- 6.- Fried, V.A. and Novick, A. 1973. Organic solvents as probes for the structure and function of the bacterial membrane: effects of ethanol on the wild type and on ethanol-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 114 (1): 239-248.
- 7.- Gebicki, J.M. and James, A.M. 1960. The preparation and properties of spheroplasts of *Aerobacter aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 23: 9-18.
- 8.- Gilby, A.R. and Few, A.V. 1959. Osmotic properties of protoplasts of *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Gen. Microbiol.* 20: 321-327.

- 9.- Gilby, A.R. and Few, A.V. 1960, Lysis of Protoplasts of *Micrococcus lysodeikticus* by alcohols, *J. Gen. Microbiol.* 23: 27-38.
- 10.- González, A. 1964. Efecto de alcoholes sobre la viabilidad de bacterias gram positivas y negativas, III Estudio de fuga de componentes intracelulares, Tesis Profesional, Universidad Labastida, Fac. de Ciencias Químicas, Monterrey, N.L.
- 11.- González, M.G. 1961 Efecto de diversos solventes orgánicos sobre la viabilidad de bacterias gram positivas y negativas, Tesis Profesional, Universidad Labastida, Fac. de Ciencias Químicas, Monterrey, N.L.
- 12.- Harrington, C. and Walker, H. 1903. The germicidal action of alcohol. *Boston Med. and Surg. Jour.* 148: 458-552. Tomado de Morton H.E. Alcohols. In antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization, G.F. - Reddish, Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 1957.
- 13.- Kulpa, Ch.F. and Leive, L. 1976. Mode of insertion of lipopolysaccharide into the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 126 (1): 467-477.
- 14.- Mohan, R.R. ; Kronish, D.P.; Pianotti, R.S.; Epstein, R.L. and Schwartz, B.S. 1965. Autolytic mechanism for spheroplast formation in *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 90 (5): 1355-1364.
- 15.- Razin, S. and Argaman, M. 1963. Osmotic lysis of Mycoplasma, bacterial protoplasts, spheroplasts and L-form by various -- agents. *J. Gen. Microbiol.* 30: 155-172,
- 16.- Rfos, L.M. y Rodríguez, M.A. 1966. Velocidad de fuga de materiales - intracelulares de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* causada por alcoholes primarios, Trabajo presentado en el VI Congreso Nacional de Microbiología, A.M.M. Hermosillo, Son.

- 17.- Romero, M.C. 1969. Identificación de algunos componentes intracelulares que escapan como resultado de la acción de alcoholes primarios sobre células de *Escherichia coli* y -- *Staphylococcus aureus*.
Tesis Profesional, Universidad Labastida. Fac. de Ciencias Químicas, Monterrey, N.L.
- 18.- Schindler, C.A. and Schuhardt, V.T. 1964. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for *Staphylococcus*.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 51: 414-421.
- 19.- Schlesinger, M.J. 1968. Secretion of alkaline phosphatase subunits by spheroplasts of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 96: 727-733.
- 20.- Schnaitman, C.A. 1970. Examination of the protein composition of the cell envelope of *Escherichia coli* by polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Bacteriol. 104: 882-889.
- 21.- Schnaitman, C.A. 1970. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 104: 890-901.
- 22.- Suárez, S.A. 1965. Efecto de alcoholes de diferente peso molecular sobre la respiración de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
Tesis Profesional, Universidad de Nuevo León. Fac. de Ciencias Químicas, Monterrey, N.L.
- 23.- Suárez, S.A. 1968. Fuga de componentes intracelulares como consecuencia de la acción de alcoholes primarios: identificación de algunos de los componentes encontrados en el sobrenadante de poblaciones de *S. aureus* y *E. coli* expuestos a alcoholes primarios.
Trabajo aún no publicado.
- 24.- Tanner, F.W. and Wilson, F.L. 1943. Germicidal action of aliphatic alcohols.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med, 52: 138-140.

- 25.- Weibull, C. 1953. The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme.
J. Bacteriol. 66: 688-695.
- 26.- Weidel, W.; Frank, H. and Martin, H.H. 1960. The rigid layer of the cell wall of *Escherichia coli* strain.
B. J. Gen. Microbiol. 22: 158-166.
- 27.- Weinbauam, G.; Rich, R. and Fischman, D.A. 1967. Enzyme induced for mation of spheres from cells and envelopes of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 93 (5): 1693-1698.

