

DISOCIACION CELULAR DE *BACTERIONEMA*
MATRUCHOTII.

AISLAMIENTO DE VARIANTES BACILARES
Y ESTREPTOCOCCICAS ESTABLES

—J. L. Streckfuss

—W. N. Smith

Las placas y cálculos dentales en desarrollo se caracterizan por la presencia de varios tipos morfológicos de microorganismos. Naeslund¹ consideró a la forma filamentososa como el principal componente implicado en los cálculos dentales. Mandel, Levy y Wasserman² reportaron que la flora de la placa de los cálculos en desarrollo abundaba en formas cocoides y que las formas filamentosas prevalecían después de la calcificación. Howell, Rizzo y Paul³ demostraron que los estreptococos eran numerosos en placas en desarrollo hasta las 4 semanas. De aquí en adelante, hasta los 3 meses, predominaban las formas filamentosas incluyendo *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israeli*, *Leptotrichia buccalis*, *Bacterionema matruchotii* y algunas especies no identificadas. Entre los organismos filamentosos grampositivos, *Bact. matruchotii* ha ganado importancia como habitante de la boca durante la última década, a partir de su clasificación en la familia Actinomycetaceae⁴. Se ha aislado frecuentemente de muestras dentales^{5, 6, 7}. Su capacidad para formar hidropatía intracelular^{8, 9, 10, 11}, una especie cristalina prominente en los cálculos dentales, puede indicar que este organismo está implicado en la calcificación de los cálculos dentales.

Según Gilmour¹², la reproducción de *Bact. matruchotii* tiene lugar por fragmentación de las formas filamentosas para dar formas bacilares, las cuales germinan para formar nuevos filamentos. En el presente estudio se demuestra que *Bact. matruchotii* también sufre una disociación celular y forma elementos móviles como parte de un complejo ciclo de crecimiento. La movilidad observada coincidió con la presencia de una variante bacilar y otras variantes estreptocóccicas aisladas de un cultivo de *Bact. matruchotii*.

Los cultivos líquidos originados de un solo filamento, denominado F₇, de *Bacterionema matruchotii* Richardson cepa 13 se

mantuvieron en crecimiento exponencial. Dos ml del cultivo se usaron para inocular 50 ml de caldo de infusión de cerebro-corazón [brain heart infusión (BHI) broth (Difco)]. Se removieron muestras a intervalos de 2 a 4 horas desde el tiempo cero hasta las 40 horas. Cada muestra fue examinada microscópicamente, en un campo oscuro y teñida con el Gram. Cada muestra se diluyó 10 veces con caldo BHI, y 0,1 ml de la dilución se distribuyó sobre agar BHI con una varilla de vidrio. Los cultivos en agar se incubaron durante 3 días a 37°C, después de los cuales se determinó el número de unidades formadoras de colonias (colony-forming units, CFU) por ml, para cada muestra periódica.

Crecimiento del filamento, F₇. El número de CFU/ml aumentó de 1×10^4 a 1×10^6 durante las primeras 32 horas de incubación, disminuyendo luego a 2×10^7 después de 40 horas. En algunas muestras, elementos móviles piriformes fueron evidentes desde las 12 horas. Estas formas aumentaron en número entre las 24 y las 40 horas, coincidiendo con la aparición de extremos redondeados alargados en algunos de los filamentos. Las muestras periódicas cultivadas en agar originaron colonias características durante las primeras 36 horas. Después de 36 y 40 horas, se encontraron colonias planas poco usuales con una frecuencia de 0,03 a 0,9 por ciento. Las colonias típicas de tres días, suspendidas en agua esterilizada filtrada y examinadas con el microscopio electrónico, contenían elementos piriformes. Estas formas midieron 0,75 micrones de longitud por 0,35 micrones de ancho y parecían poseer 3 estructuras como flagelos en el extremo apical. Las formas activas variaban morfológicamente desde las piriformes hasta un bacilo trífagelado de 2 micrones de longitud por 0,7 micrones de ancho. El examen de las colonias planas reveló formas difteroides. En estas colonias, las formas móviles escasearon y resultaron morfológicamente similares a las de los cultivos del filamento. El cultivo de las colonias planas en un medio líquido produjo bien un bacilo corto, denominado RF₇, bien estreptococos con diferentes perfiles fermentativos, denominados S₁, S₂ y S₃. Se eligieron RF₇ y S₁ como representantes de las variantes y su crecimiento se estudió de un modo similar al descrito para F₇.

Crecimiento de la variante bacilar, RF₇. El número de CFU/ml aumentó de 30 en el tiempo cero hasta 6×10^{10} después de 24 horas de incubación, pasando por un periodo de cre-

cimiento acelerado. A las 40 horas el número de CFU/ml había disminuido a $1,5 \times 10^8$. Durante las 24 horas iniciales se observaron bacilos individuales y en racimos. Después de las 28 y 40 horas la formación de racimos coincidió con el aumento de material capsular y la disminución del número de CFU/ml. Durante todo el período de crecimiento de 40 horas se observaron formas móviles semejantes a las de los cultivos F₇ y S₁. Las muestras periódicas cultivadas en agar BHI produjeron colonias uniformemente viscosas de color marrón claro, las cuales contenían bacilos o racimos de bacilos. Por examen en un campo oscuro se detectaron consistentemente elementos móviles piriformes. Con el microscopio electrónico se observaron estas formas: tenían 0,48 a 0,55 micrones de longitud por 0,30 a 0,31 micrones de ancho y parecían poseer 3 flagelos.

Crecimiento de la variante estreptocócica, S₁. El crecimiento de S₁ aumentó de 8×10^7 hasta un máximo de 5×10^{10} CFU/ml, durante las primeras 16 horas de incubación. De aquí en adelante, el número de CFU/ml disminuyó a 1×10^8 a las 32 horas, volviendo a aumentar a $1,5 \times 10^{10}$ después de 40 horas. El examen en campo oscuro de muestras periódicas mostró formas móviles ocasionales durante el ciclo de crecimiento, las cuales se semejaban a los elementos piriformes vistos en los cultivos F₇ y RF₇. Entre las 12 y 40 horas, las células se presentaron como cocos individuales, diplococos y racimos de estreptococos. Las muestras periódicas de las primeras 12 horas cultivadas en agar produjeron una mezcla de colonias planas y convexas después de 3 días de incubación. Las colonias planas formaban colonias-hijas y se hacían convexas después de 5 o más días de incubación. Entre las 12 y 36 horas, las colonias predominantes se elevaron y produjeron una zona de crecimiento secundario, de la cual también se desarrollaron colonias-hijas. En placas incubadas durante el período usual de 3 días, el fenómeno de la colonia-hija fue más pronunciado entre las 12 y 36 horas del período de muestreo. Cuando las placas del período completo de 40 horas se incubaron durante 5 a 7 días más, todas las colonias se disociaron y formaron colonias-hijas, incluyendo aquellas colonias que poseían esta capacidad latente. El centro de las colonias con colonias-hijas contenía principalmente formas filamentosas, junto con formas cocoides grandes, cocos y bacilos. La colonia-hija contenía principalmente formas coco-bacilares y la zona de crecimiento secundario estaba formada por estreptococos. Con el

examen en campo oscuro de las colonias diferenciadas se observaron formas movibles similares a las producidas en cultivos líquidos. Observada al microscopio electrónico, esta estructura era de forma similar, pero más pequeña que las derivadas de F_7 y RF_7 , midiendo 0,24 por 0,1 micrones. Con subcultivos repetidos, las formas movibles desaparecieron y S_1 perdió su capacidad de producir colonias disociadas.

Estudios inmunológicos. Con 0,1, 0,1 y 0,5 ml, respectivamente, de células de F_7 , RF_7 y S_1 suspendidas en solución salina normal (1×10^{10} CFU/ml) se inmunizaron conejos por inyección intramuscular los días 1, 18 y 25. Los días 77 y 87 se hicieron inyecciones adicionales de homogeneizados de células (0,2 a 0,3 por ciento de proteínas)¹³ en las venas marginales de la oreja. De sangre reunida a los 100 días después de la inyección inicial se obtuvo el antisuero para cada microorganismo. Las inmunoglobulinas se separan del antisuero por el método de Sinha y Reddy¹⁴ y se concentraron por tratamiento con Aquacide N° 2 (Calbiochem). Las globulinas-anticuerpo, así concentradas, se conjugaron con isotiocianato de fluoresceína (Difco) según el método de Coons¹⁵, modificado por Spendlove¹⁶, empleando el método directo de tinción. Una gran proporción de las células de colonias de F_7 , RF_7 y S_1 no presentaron fluorescencia al ser expuestas a los conjugados de anticuerpos fluorescentes (FA) homólogos. Los cuerpos de forma de cocos y los piriformes fueron componentes fluorescentes comunes en los 3 organismos. Ocasionalmente, se observó alguna forma bacilar que fluorescía en las preparaciones de F_7 y RF_7 . Al examinarlos en campo oscuro y al microscopio electrónico, las estructuras fluorescentes correspondieron estrechamente con las formas movibles previamente descritas. La tinción FA heteróloga de F_7 produjo una respuesta similar a la de las correspondientes reacciones homólogas. La fluorescencia entre F_7 y RF_7 fue uniformemente intensa. Cuando las células de F_7 o de RF_7 se hicieron reaccionar con el conjugado S_1 -FA, F_7 fluoresció débilmente y RF_7 reaccionó con una intensidad inferior a la respuesta homóloga. La reacción de los conjugados individuales con preparaciones de colonias planas revelaron únicamente algunas formas cocoides fluorescentes.

La inmunodifusión se realizó en una unidad NIL-Saravis con membranas de Celotat (Millipore), con buffer de fosfato

0.1 M, pH 7.0. Los pozos centrales se llenaron con 25 a 50 microlitros de globulina (5 por ciento de proteína) y los pozos periféricos con un volumen similar de antígeno (0.2 a 0.3 por ciento de proteína). La difusión se hizo a la temperatura ambiente durante 5 días. Las membranas se lavaron durante 1 a 2 horas con cambios múltiples de solución salina normal, se tiñeron con Ponceau S y se contratiñeron con nigrosina. Los resultados de la inmunodifusión apoyan las interacciones FA de los 3 organismos y establecieron una relación antigénica. El anticuerpo de F_7 produjo 7 bandas de precipitina (PB) homólogas, de las cuales 2 interaccionaron con RF_7 (débilmente visibles). El anticuerpo de RF_7 mostró 9 PB homólogas, de las cuales 1 interaccionó y 1 mostró identidad con F_7 , y un solo determinante unilateral de reactividad con S_1 . Por contraste, el anticuerpo de S_1 produjo 4 PB homólogas, pero no reaccionó F_7 , ni RF_7 .

Ensayos de fermentación. Se inocularon medios líquidos que contenían 25 g. de infusión de corazón, 3 g. de extracto de levadura (Difco) y 1 por ciento de carbohidratos, con 1 gota de cultivo en fase de crecimiento exponencial. Los carbohidratos ensayados fueron: sacarosa, glucosa, manosa, fructosa, maltosa, salicina, xilosa, rafinosa, sorbitol, lactosa, manitol e inulina. Para detectar la producción de gas se usaron tubos Durham. La producción de ácidos se midió con un pH-metro Beckman Zeromatic II en cultivos no-centrifugados, después de incubarlos 8 días a 37°C. Los perfiles fermentativos de F_7 y RF_7 fueron similares. Los gérmenes S difirieron de F_7 y RF_7 en que fueron capaces de fermentar lactosa (S_1), lactosa, rafinosa e inulina (S_2), y lactosa, rafinosa pero no inulina (S_3). Ninguno de los gérmenes produjo gas.

Este reporte describe la disociación celular de la forma filamentososa de *Bact. matruchotii* en variantes bacilares y estreptocócicas estables. Las variantes, que han permanecido estables durante 2 años, se formaron a partir de colonias planas no-usuales obtenidas de cultivos líquidos que contenían formas móviles. El descubrimiento de formas móviles en *Bact. matruchotii* indicó la posibilidad de que este organismo puede reproducirse tanto "vegetativamente" como "esporogénicamente". La reproducción vegetativa tuvo lugar en cultivos líquidos durante las primeras 12 horas, cuando el crecimiento consistió exclusivamente de formas bacilares y filamentosas no-móviles. La división celular

durante esta fase de crecimiento fue similar a la reportada por Gilmour¹², pasando a través de un proceso de septación del filamento, fragmentación en subunidades, producción de cuerpos de forma bacilar y emergencia de nuevos filamentos. Después de 12 horas, la movilidad de *Bact. matruchotii* se reflejó en un estado indefinido de esporogenia, aparentemente necesario para la producción de colonias planas. Las formas móviles fueron más numerosas en los cultivos líquidos después de una incubación prolongada y en colonias que cambiaron de una textura suave a una arrugada. El aislamiento de colonias planas fue sólo posible cuando las formas activas fueron numerosas. Mellon¹⁷ ha descrito para un organismo ramificado filamentos, colonias planas que crecen como un difteroido y son estables hasta por 5 años, las cuales son similares a las de *Bact. matruchotii*. Aunque no se había reportado anteriormente en *Bact. matruchotii*, la movilidad es común a varios géneros de *Actynomicetes*, en particular *Dermatophilus*¹⁸, *Actinoplanes*, *Ampullaria* y *Spirilospora*¹⁹. Las formas móviles también se encuentran en otros organismos ramificados filamentosos²⁰ y se describen como esporas flageladas en *Actynomicetes* no-clasificados²¹.

Los componentes esporógenos responsables de las colonias planas en *Bact. matruchotii* estaban aparentemente enmascarados por el crecimiento filamentos en cultivos en reposo. Bien las formas subfilamentosas degeneraban y eran eventualmente absorbidas al continuar el crecimiento como ocurre con algunas especies de *Nocardia*^{22, 23}, bien las condiciones ambientales promovían el estado filamentos y prevenían la expresión de las variantes. La supresión de la ocurrencia espontánea de RF₁ y S₁ durante el crecimiento filamentos se confirmó parcialmente al comparar sus velocidades de crecimiento. Las velocidades de crecimiento de las variantes fueron unas 2 veces mayor que la del filamento. De no haberse restringido su crecimiento, las variantes hubieran superado rápidamente al cultivo filamentos.

La persistencia de la movilidad en RF₁ después de repetidos subcultivos se consideró como una característica inherente transmitida por el filamento, la cual favorecía la disociación ulterior. Por contraste, la ausencia de movilidad de S₁ después de continuos subcultivos coincidió con una incapacidad para disociarse y formar colonias-hijas. La transición de filamento a S₁ fue com-

pleta como lo indica la morfología uniforme y una estabilidad que podría reflejar un tipo morfológico definitivo.

La falta de un efecto de dilución en la recuperación de colonias planas de F_7 indicó que las variantes se originaron de racimos de esporas liberados de esporangia rotas en el proceso de siembra en agar. Además, la actividad esporogénica en colonias típicas y planas de F_7 estuvo relacionada serológicamente a las variantes. Los conjugados de anticuerpos fluorescentes para RF_7 y S_1 reaccionaron con los elementos piriformes y cocoides y las colonias planas de F_7 . Las variantes estaban, por consiguiente, ligadas directamente a los componentes esporogénicos del filamento.

Las características fisiológicas e inmunológicas de los aislamientos indicaron que RF_7 estaba más estrechamente relacionado a F_7 que a S_1 . RF_7 y F_7 presentaron perfiles de fermentación similares y diferentes de los aislamientos estreptocócicos, tanto como grupos como individualmente. Las reacciones de inmunoprecipitinas mostraron que RF_7 formó un puente inmunológico entre F_7 y S_1 ; las dos formas que no interreaccionaron. Las reacciones FA también mostraron que RF_7 interreaccionó con F_7 y S_1 . Sin embargo, cuando las reacciones de FA e inmunoprecipitina se correlacionaron, la fluorescencia vista en las células F_7 expuestas al conjugado S,FA no dieron una correspondiente reacción de precipitinas. Esta fluorescencia formó un nexo directo entre F_7 y S_1 que de otro modo no fue detectable.

En base a las diferencias morfológicas, inmunológicas y fisiológicas, las variantes de *Bact. matruchotii* podrían considerarse especies filogenéticas distintas que comparten algunas características comunes. El bacilo, RF_7 , tiene características similares a *Actinomyces viscosus* y el estreptococo S_1 , características similares a *Streptococcus sanguis* (datos no publicados). Puesto que las variantes de *Bact. matruchotii* trascienden los límites morfológicos de la clasificación bacteriana, la forma filamentosa podría considerarse como un *individuum*²⁴ como las variantes representando un rango de formas disociadas sucesivas que describen separadamente las características biológicas inherentes del filamento.

La presente demostración de que *Bact. matruchotii* se disoció y produjo formas no-filamentosas sugiere que algunas de sus

variantes pueden pasar desapercibidas en muestras dentales y pueden confundirse con especies distintas.

Traducción al castellano:
Dr. Eovaldo Hernández.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — NAESLUND, C. "Studies of tartar formation". Acta Path. Microbiol. Scand. 3: 637-677, 1926.
- 2 — MANDEL, I. D., LEVY, B. M. and WASSERMAN, B. H. "Histochemistry of calculus formation". J. Periodont. 28: 132-137, 1957.
- 3 — HOWELL, A. Jr., RIZZO, A. and PAUL, F. "Cultivable bacteria in developing and mature dental calculus". Arch. oral Biol. 10: 307-313, 1965.
- 4 — GILMOUR, M. N., HOWELL, A. Jr. and BIBBY, B. G. "The classification of organisms termed *Leptotrichia* (*Leptothrix*) *buccalis*. I. Review of the literature and proposed separation into *Leptotrichia buccalis* Trevisan, 1879 and *Bacterionema* Gen. Nov., *B. matruchotii* (Mendel, 1919)". Comb. Nov. Bact. Rev. 25: 131-141, 1961.
- 5 — DAVIS, G. H. G. and BAIRD-PARKER, A. C. "The bacterial elements of materia alba". Br. dent. J. 106: 142-146, 1959.
- 6 — HOWELL, A. Jr., STEPHAN, R. M. and PAUL, F. "Prevalence of *Actinomyces israeli*, *A. naeslundii*, *Bacterionema matruchotii*, and *Candida albicans* in selected areas of the oral cavity and saliva". J. Dent. Res. 41: 1.050-1.059, 1962.
- 7 — SNYDER, M. L., BULLOCK, W. W. and PARKER, R. B. "Morphology of gram positive filamentous bacteria identified in dental plaque by fluorescent antibody technique". Arch. oral Biol. 12: 1.269-1.273, 1967.
- 8 — ENNEVER, J. "Intracellular calcification by oral filamentous microorganisms". J. Periodont. 31: 304-307, 1960.
- 9 — TAKAZOE, I. "Study on the intracellular calcification of oral aerobic leptotrichia". Shikwa Gakuho 61: 394-401, 1961.
- 10 — TAKAZOE, I., TAKEUCHI, T. and NAKAMURA, T. "A chemical investigation of the intracellular calcification of *Bacterionema matruchotii*". Bull. Tokyo Dent. Coll. 4: 61-75, 1963.
- 11 — RIZZO, A. A., MARTIN, G. R., SCOTT, D. B. and MERGENHAGEN, S. S. "Mineralization of bacteria". Science 135: 439-441, 1962.

- 12 — GILMOUR, M. N. "The classification of organisms termed *Leptotrichia* (*Leptothrix*) *buccalis*. II. Reproduction of *Bacterionema matuchotii*". *Bact. Rev.* 25: 142-151, 1961.
 - 13 — LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANELL, R. J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1961.
 - 14 — SINHA, R. C. and REDDY, D. V. R. "Improved fluorescen smear technique and its application in detecting virus antigen in an insect vector". *Virology* 24: 626-634, 1964.
 - 15 — COONS, A. H. "Histochemistry with labeled antibody". *Inter. Rev. Cytol.* 5: 1-23, 1956.
 - 16 — SPENDLOVE, R. S. "Methods in Virology" (edited by Maramorosch, K. and Koprowski, H.) Chap. 10, p. 475-520, Academic Press, 1967.
 - 17 — MELLON, R. R. "The polyphasic potencies of the bacterial cell; general biologic and chemotherapeutic significance". *J. Bacteriol.* 44: 1-26, 1942.
 - 18 — GORDON, M. A. "The genus *Dermatophilus*". *J. Bacteriol.* 88: 509-522, 1964.
 - 19 — FOLCH, J., LEE, M. and SLOANE-STANLEY, G. H. "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues". *J. Biol. Chem.* 226: 497-509, 1957.
 - 20 — JENSON, H. L. "The genus *Nocardia* (or *Proactinomyces*) and its separation from other Actinomycetales, with some reflection on the phylogeny of actinomycetes". *Symp. actinomycetales*, p. 69-88. *Its. Sanita*, Rome, 1953.
 - 21 — HIGGINS, M. L., LECHEVALIER, M. P. and LECHEVALIER, H. R. "Flagellated actinomycetes". *J. Bacteriol.* 93: 1.446-1.451, 1967.
 - 22 — CLARK, J. B. and FRADY, J. J. "Secondary life cycle of *Nocardia corallina*". *J. Bacteriol.* 74: 698, 1957.
 - 23 — HURST, V. "Morphologic instability of actinomycetes associated with enamel". *J. Dent. Res.* 29: 571-582, 1950.
 - 24 — HADLEY, P. B. "Bearing of dissociative variation on the species concept among *Schizomycetes*". *Third Intern. Congr. of Microbiol.*, N. Y., Rept. Proc., p. 158, 1939.
-