

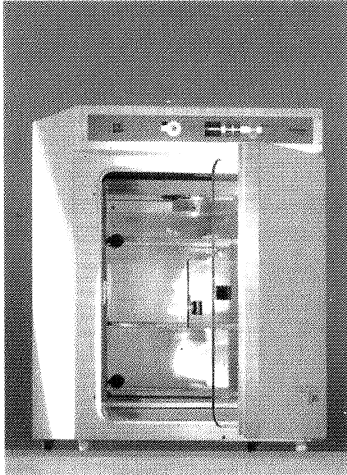
Volumen 10, nº 1 y 2
Marzo y Junio 1994
ISSN 02 13-4101

PUBLICACION DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGIA

Microbiología



Incubador de CO2 BB-16 Hemos incubado el huevo de Colón



En esta nueva generación de aparatos nos hemos concentrado especialmente en las características de funcionamiento esenciales. Naturalmente no hemos hecho ninguna concesión en lo referente a la calidad de nuestros aparatos.

Sencillo y funcional

Las características técnicas de la BB 16 han sido estudiadas para facilitar el trabajo al usuario para las aplicaciones de rutina. Este aparato no representa complicaciones en su manejo, y está equipado con los dispositivos de seguridad necesarios.

Pequeño y compacto

La BB16 necesita poco sitio. Especialmente diseñado para espacios reducidos, el montaje especial de su puerta permite su colocación prácticamente a ras de los muebles de laboratorio.

Next to in vivo

Un sistema de medición de CO2 de nueva creación, basado en la medición de la termoconductividad, asegura un valor pH estable de larga duración, incluso en el rango inferior de CO2.

Equipamiento orientado a la aplicación

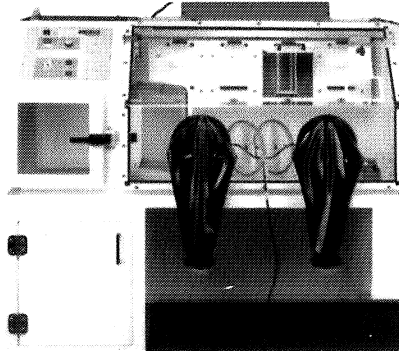
Para condiciones especialmente estables se puede instalar, sobre demanda, una puerta de vidrio subdividida dotada de 3 pequeñas puertas, que permite un acceso segmentado.

Técnicas para el futuro

La BB-16 Function Line posee la acreditada calidad de Heraeus: Es un incubador con el que Ud. podrá contar también en el próximo milenio.

Camara para el cultivo de Anaerobios Mod. WA 6200

- Trabajo sin guantes
- Manejo simple
- Visión óptima
- Control completamente automático
- Incubador integrado hasta 70° C
- Exento de condensación
- Conexión para dos tipos de gas
- Sistema completo



Para trabajos en atmósfera exenta de oxígeno.

Cabina de flujo laminar para aplicaciones en el campo de la microbiología, genética, farmacia, microbiología médica en una atmósfera exenta de oxígeno. Apropriada para sobreinoculación de microorganismos sensibles al contacto con el oxígeno. Perfectamente adecuada para su empleo en laboratorios para la comprobación de la calidad de medicamentos y productos químicos que exigen atmósferas controlables, así como para la producción de componentes electrónicos en atmósfera de gas protector.

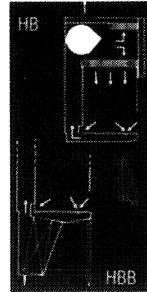
Construcción

Construcción en acero inoxidable barnizada con cristal frontal de plexiglás y dos aperturas con cierre para trabajar sin guantes. Incubador de aerobios hasta 70° C integrado y controlado por microprocesador, así como disyuntor de sobre-temperatura ajustable. Esclusa de anaerobios integrada, con carro móvil para la introducción de las muestras. Control de vacío completamente automático para el gas. Cierre automático de la esclusa. Sistema automático de regulación de la humedad del aire. Dispositivo de seguridad manométrico de la cámara.

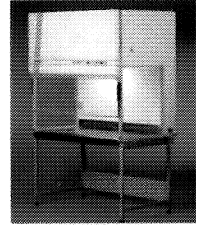
Probablemente la mejor cabina de flujo laminar del mundo

HB/HBB Cabinas de seguridad clase II

Seguridad clase II con 2 juegos de filtros HEPA para máxima protección al producto, operario y medio ambiente. Verificador y construida según todas las normas internacionales.



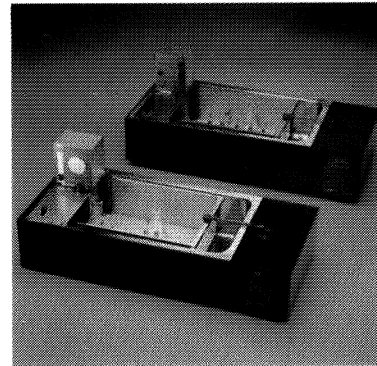
- Diseño insuperable y confortable para el usuario
- Bajo nivel de ruido
- Fácil mantenimiento, filtros fácilmente intercambiables
- Alarma de seguridad
- Mesa de acero inoxidable
- Laterales en cristal para mejor iluminación
- Para usarse en laboratorios P-3



El modelo HBB tiene un sistema de filtros HEPA debajo de la mesa, proporcionando un filtrado extra de aire. Corta distancia entre la parte superior de la mesa y el 1° filtro HEPA lo que proporciona una mínima área contaminada.

Heto es mucho más!

Adicionalmente al amplio rango de baños presentados en este catálogo HETO ofrece más equipos para control de muestras. Aquí introducimos baños de agitación, baños termostatzados y mezcladores de muestras.



Hetomix

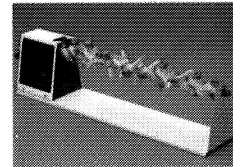
Heto ofrece un amplio rango de baños de agitación y completo rango de accesorios para el equipamiento completo del baño. El baño de agitación Heto combinado con termostato Heto proporciona un sistema de control de temperatura preciso entre -25° C y +110° C.

Preguntar por catalogo adicional.

Baños de agua termostatzados

Para altas temperaturas o tareas básicas de regulación Heto ofrece un rango de baños de agua termostatzados con rasgos desde ambiente hasta +100° C. Con compensación de agua evaporada. Existe un amplio rango de tapas y accesorios.

Preguntar por catalogo adicional.



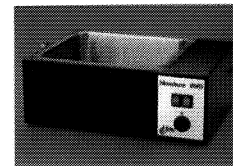
Mezcladores de muestra:

Un amplio rango de mezcladores p rotación y tareas de agitación. Capacidad hasta 150 tubos simultáneamente adaptable a casi todo tipo de muestras.

- Tubos Eppendorf
- Tubos conicos
- Cajas Petri
- Tubos de recogida de sangre
- Soporte de protamuestras

Con lectura digital de velocidad y tiempo velocidades extra 1-45 RPM. Amplio rango anillos para muestras opcionales.

(Preguntar por catalogo adicional).



Heraeus, S. A.
C/ Manuel Tovar, 24
28034 - Madrid

Para mayor información, recortar este cupón y remitir a:

Nombre.....

Empresa.....

Dirección Dpto.

C. P. Provincia

Teléfono de contacto

Incubador de CO2 BB-16 Cabina Flujo Laminar Camara de Anaerobios Termostatos

Baños con Agitación Agitadores de Tubos Baños de Agua

Ref. Revista: MICROBIOLOGIA

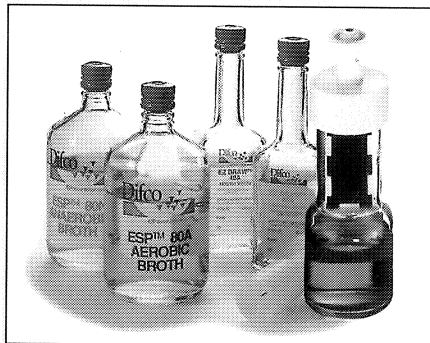
Hemocultivos ESP

LA NUEVA
TECNOLOGIA
CONDUCE A
UNA MAYOR
RAPIDEZ

ESP ofrece lectura
continua, no invasiva,
de los hemocultivos
con automatización
total y monitorización
tanto de consumo como
de producción
de cualquier gas.

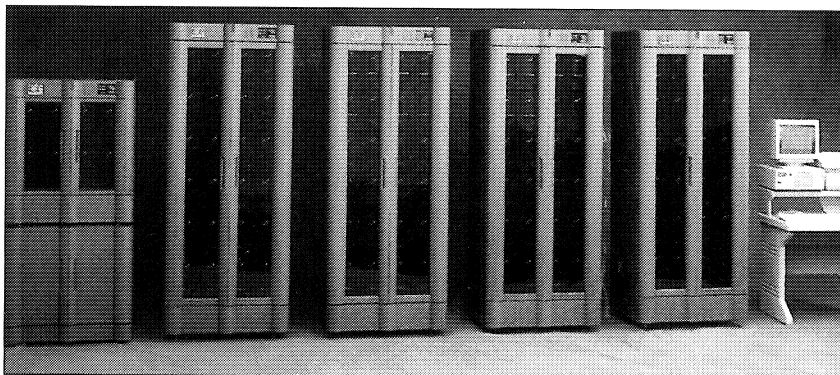
Configuraciones

El sistema de Hemocultivos ESP, se
ajusta con precisión a su volumen
de trabajo. Los instrumentos están
disponibles en dos tamaños, 128 y 384
botellas. El ordenador controla hasta 5
instrumentos de cualquier capacidad.

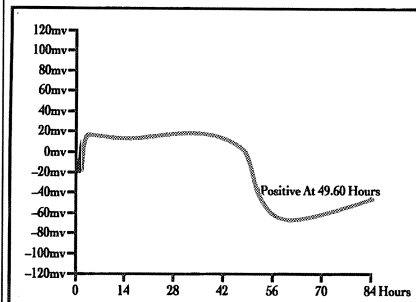


Formatos de botellas

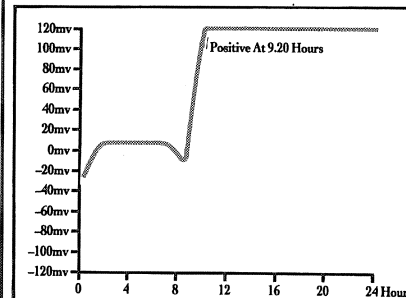
Los medios de nuevo desarrollo se
ofrecen en una selección de tamaños.
La botella de 30 ml. acepta muestras entre
0,1 y 10 ml. La botella pediátrica acepta
hasta 5 ml. en extracción directa.
La botella bifásica contiene además una
lengueta con Agar Chocolate y Sabouraud
Dextrose.



Cryptococcus neoformans



Klebsiella pneumoniae



Mayor recuperación. Mayor rapidez

Los sensores están continuamente monitorizando tanto el consumo como la producción
cualquier gas de forma que los positivos son detectados antes que con sistemas que
monitorizan la producción de CO₂.

DISTRIBUIDOR PARA ESPAÑA:



FRANCISCO
SORIA MELGUIZO, S. A.

Caramuel, 38 - 28011 MADRID
Tel: 464 04 50 - 464 05 00 - Fax: 464 04 50

MICROBIOLOGÍA SEM

Publicación de la Sociedad Española de Microbiología

Editorial Board/Consejo Editorial*

Editor-in-Chief/Director-Coordinator

Ricard Guerrero, Universidad de Barcelona

Bacterial Taxonomy/Taxonomía Bacteriana

Antonio Ventosa, Universidad de Sevilla

Hans G. Trüper, University of Bonn, FRG

Environmental Microbiology/Microbiología Ambiental

Víctor Campos, Universidad Católica de Valparaíso, Chile

José M. López Pila, Institute for Environmental Hygiene, Berlin, FRG

Food Microbiology/Microbiología de los Alimentos

M. Luisa García López, Universidad de León

D. A. A. Mossel, Eijkman Foundation for Medical Research, Utrecht, Netherlands

Industrial Microbiology/Microbiología Industrial

Paloma Liras, Universidad de León

Manuel Benjamín Manzanal, Universidad de Oviedo

Microbial Biochemistry and Physiology/Bioquímica y Fisiología Microbianas

Germán Larriba, Universidad de Extremadura, Badajoz

Miquel Viñas, Universidad de Barcelona

Microbial Ecology/Ecología Microbiana

Juan J. Borrego, Universidad de Málaga

Juan Iriberry, Universidad del País Vasco

Microbial Genetics/Genética Microbiana

Moselio Schaechter, Tufts University, Boston, USA

Josep Casadesús, Universidad de Sevilla

Medical Microbiology/Microbiología Clínica

José Claudio Pérez Díaz, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

Manuel de la Rosa, Hospital Virgen de las Nieves, Granada

Morphology and Ultrastructure/Morfología y Ultraestructura

Enrico Cabit, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Isabel Esteve, Universidad Autónoma de Barcelona

Mycology/Micología

Salomón Bartnicki-García, University of California-Riverside, USA

José M. Torres-Rodríguez, Universidad Autónoma de Barcelona

Virology and Immunology/Virología e Inmunología

Esteban Domingo, Centro de Biología Molecular, CSIC-UAM, Madrid

Mariano Esteban, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

Former Editors-in-Chief/Directores-Coordenadores anteriores

Rubens López García, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

Juan A. Ordóñez, Universidad Complutense de Madrid

* See addresses in pp. 209–210.

Dirección: Sociedad Española de Microbiología. Hortaleza, 104
28004 Madrid (España). Tel. (91) 308 23 22. Ext. 211.

Aparecen cuatro números al año (1994), que se integran en un volumen.

Precio de suscripción anual. Año 1994: España 8.000 ptas. (IVA incluido);

Europa 88 US \$. Resto países 99 US \$

IMPRIME: Graesal, Madrid.

DEPOSITO LEGAL: M-30455-1985.



EDITORIAL GARSÍ, S.A.
GRUPO MASSON

Edita: EDITORIAL GARSÍ, S. A. Juan Bravo, 46. 28006 Madrid.
Teléfono (91) 402 12 12. Avda. Príncipe de Asturias, 20.
08012 Barcelona. Teléfono (93) 415 45 44.

APP
ASOCIACION
DE PRENSA
PROFESIONAL

Editor-in-Chief/Director-Coordenador:

Ricard Guerrero, Universidad de Barcelona

Secretary General/Secretario General:

Jordi Mas-Castellà, Universidad de Barcelona

Members/Miembros:

Jordi Barbé, Universidad Autónoma de Barcelona

Josep Guarro, Universidad Rovira Virgili, Reus (Tarragona)

Enric Herrero, Universidad de Lleida

Josep M. Monfort, IRTA, Monells (Girona)

Emili Montesinos, Universidad de Girona

Carles Pedrós-Alió, Instituto de Ciencias del Mar, CSIC, Barcelona

Guillem Prats, Universidad Autónoma de Barcelona

Managing Coordinator/Coordinación General:

Carmen Chica

Staff Editor/Organización y Asesoramiento:

Mercè Piqueras

Editorial Office/Dirección editorial:

Microbiología SEM

Apartado 16009

08080 Barcelona

Tel . +34-3-4482373. Fax +34-3-3341079

E-mail: guerrero@porthos.bio.ub.es

Han colaborado en la preparación de este número **10** (1 y 2):

Maria Rosa Blanch (1947-1994)

Josep Company

David Isamat

Josep Julve

Eulàlia Massana

Ramon Massana

Sebastián Méndez

Jordi Urmeneta

La revista *Microbiología SEM* y la Sociedad Española de Microbiología agradecen la ayuda recibida de distintas personas y centros de la **Universidad de Barcelona**.

Guidelines for Authors:

Information about the Journal, including guidelines on the preparation and submission of manuscripts, is published on pp. 207–208 of this issue, and may also be obtained from the Editorial Office.

ÍNDICE

	Página
Editorial	5
Presentación. <i>Gómez-Lus, R.</i>	7
New pathogens and old resistance genes. <i>Davies, J.</i>	9
Enzimas líticas del sistema de neumococo. <i>López, R., García, J. L., Ronda, C., García, E., García, P.</i>	13
Patogeneicidad y genes capsulares de neumococo. <i>García, E., García, P., López, R.</i>	19
The yeast cell cycle: positive and negative controls. <i>Aldea, M., Casas, C., Gallego, C., Espinet, C., Herrero, E.</i>	27
Intracellular glycosylation and active efflux as mechanisms for resistance to oleandomycin in <i>Streptomyces antibioticus</i> , the producer organism. <i>Salas, J. A., Hernández, C., Méndez, C., Olano, C., Quirós, L. M., Rodríguez, A. M., Vilches, C.</i>	37
Agrupación de los genes de biosíntesis y resistencia a antibióticos β -lactámicos en actinomicetos productores de cefamicina. <i>C. Liras, P., Coque, J. J. R., García-Calzada, J., Pérez Llarena, F. J., Cardoza, R. E.</i>	49
Molecular fingerprinting of <i>Salmonella typhimurium</i> by IS200-typing as a tool for epidemiological and evolutionary studies. <i>Soria, G., Barbé, J., Gibert, I.</i>	57
Electrotransformation of <i>Yersinia ruckeri</i> by plasmid DNA. <i>Cutrín, J. M., Conchas, R. F., Barja, J. L., Toranzo, A. E.</i>	69
Distribución y caracterización fenotípica de <i>Yersinia</i> en muestras de origen humano y ambiental. <i>Castillo, F. J., Larraz, V., Lafarga, M. A., Navarro, M., Gómez-Lus, R.</i>	83
Bioensuciamiento de tubos en cambiadores de calor. <i>Montero, F., Pintado, J. L.</i>	93
Nuevas aplicaciones de las técnicas submicroscópicas en el estudio del biodeterioro producido por talos liquénicos. <i>Ascaso, C., Wierzchos, J.</i>	103
Mecanismos de corrosión microbiana sobre los materiales pétreos. <i>Gómez-Alarcón, G., de la Torre, M. A.</i> ..	111
Biocorrosion produced by <i>Thiobacillus</i> -like microorganisms. <i>López, A. I., Marín, I., Amils, R.</i>	121
Microbial degradation of poly- β -hydroxyalkanoates. <i>Mas-Castellà, J., Lafuente, R., Urmeneta, J., Goodwin, S., Guerrero, R.</i>	131
Transporte a grandes distancias de contaminantes atmosféricos y sus efectos sobre los ecosistemas. <i>Guardans, R., Gimeno, B. S.</i>	145
Degradación de derivados del petróleo por <i>Acinobacter calcoaceticus</i> MM5. <i>Marín, M. M., Ortiz, M. L., Laborda, F.</i>	159
Diseño de medios de enumeración de bacterias patógenas alóctonas de aguas naturales. <i>Borrego, J. J.</i>	169
Medios de cultivo para la detección e identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> . <i>de la Rosa, M., Pérez, M., Carazo, C., Pareja, L., Orts, A., Cantudo, P.</i>	181
Culture media and Chaos theory—predicting the unpredictable. <i>Bridson, E. Y.</i>	187
A new approach in bacteriology with chromogenic media. <i>Doléans, F.</i>	195
¿Cómo dice?	203
Veíamos ayer	205
Guidelines for authors/Normas para los autores	207
Editorial Board addresses/Direcciones de los miembros del Consejo Editorial	209

CONTENTS

	Page
Editorial [In Spanish]	5
Presentation. <i>Gómez-Lus, R.</i> [In Spanish]	7
New pathogens and old resistance genes. <i>Davies, J.</i>	9
Lytic enzymes of the pneumococcus system. <i>López, R., García, J. L., Ronda, C., García, E., García, P.</i> [In Spanish]	13
Pathogenicity and capsular genes of pneumococcus. <i>García, E., García, P., López, R.</i> [In Spanish]	19
The yeast cell cycle: positive and negative controls. <i>Aldea, M., Casas, C., Gallego, C., Espinet, C., Herrero, E.</i>	27
Intracellular glycosylation and active efflux as mechanisms for resistance to oleandomycin in <i>Streptomyces</i> <i>antibioticus</i> , the producer organism. <i>Salas, J. A., Hernández, C., Méndez, C., Olano, C., Quirós, L. M.,</i> <i>Rodríguez, A. M., Vilches, C.</i>	37
Clustering of biosynthesis genes and resistance to β -lactam antibiotics in actinomycetes cephamycin C producers. <i>Liras, P., Coque, J. J. R., García-Calzada, J., Pérez Llarena, F. J., Cardoza, R. E.</i> [In Spanish]	49
Molecular fingerprinting of <i>Salmonella typhimurium</i> by IS200-typing as a tool for epidemiological and evolutionary studies. <i>Soria, G., Barbé, J., Gibert, I.</i>	57
Electrotransformation of <i>Yersinia ruckeri</i> by plasmid DNA. <i>Cutrín, J. M., Conchas, R. F., Barja, J. L.,</i> <i>Toranzo, A. E.</i>	69
Distribution and phenotypic characterization of <i>Yersinia</i> from human and environmental samples. <i>Castillo, F. J.,</i> <i>Larraz, V., Lafarga, M. A., Navarro, M., Gómez-Lus, R.</i> [In Spanish]	83
Biofouling in heat exchangers. <i>Montero, F., Pintado, J. L.</i> [In Spanish]	93
New applications of submicroscopic techniques to biodeterioration produced by lichen thalli. <i>Ascaso, C.,</i> <i>Wierzchos, J.</i> [In Spanish]	103
Mechanisms of microbial corrosion on stone. <i>Gómez-Alarcón, G., de la Torre, M. A.</i> [In Spanish]	111
Biocorrosion produced by <i>Thiobacillus</i> -like microorganisms. <i>López, A. I., Marín, I., Amils, R.</i>	121
Microbial degradation of poly- β -hydroxyalkanoates. <i>Mas-Castellà, J., Lafuente, R., Urmeneta, J., Goodwin, S.,</i> <i>Guerrero, R.</i>	131
Long distance transport of atmospheric pollutants and its effect on the ecosystems. <i>Guardans, R.,</i> <i>Gimeno, B. S.</i> [In Spanish]	145
Fuel oil biodegradation by <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> MM5. <i>Marín, M. M., Ortiz, M. L., Laborda, F.</i> [In Spanish]	159
Media for counting allochthonous pathogenic bacteria in natural waters. <i>Borrego, J. J.</i> [In Spanish]	169
Culture media for detection and identification of <i>Streptococcus agalatae</i> . <i>de la Rosa, M., Pérez, M.,</i> <i>Carazo, C., Pareja, L., Orts, A., Cantudo, P.</i> [In Spanish]	181
Culture media and Chaos theory—predicting the unpredictable. <i>Bridson, E. Y.</i>	187
A new approach in bacteriology with chromogenic media. <i>Doléans, F.</i>	195
Other sections	203

Editorial

Poco antes de empezar la preparación de este número doble de *Microbiología SEM* cayó en mis manos un artículo reciente de la revista *Science International* (publicación del International Council of Scientific Unions, ICSU), que llevaba por título “¿Por qué producir revistas científicas en América Latina?” La autora, Ana María Cetto, de México, analiza la situación de las publicaciones científicas en Latinoamérica y no duda en defender los criterios que en su día (1950) llevaron a la fundación de las dos revistas sobre las que centra su estudio: *Acta Physiologica Latinoamericana* y *Revista Mexicana de Física*. Esos criterios fueron, por una parte, la existencia de producción original importante y suficiente, y, por otra, el deseo de dar a conocer el trabajo de investigación que se realizaba en el país. La autora, finalmente, concluye que fomentar la publicación científica propia contribuye al desarrollo científico y general de los países implicados. Está claro que ese desarrollo dependerá también de muchas otras cosas, como la preparación y dedicación del personal investigador y los recursos presupuestarios dedicados, pero, y ésta es la idea que origina este comentario, potenciar la publicación científica en el propio país, no puede dejar de tener una repercusión positiva.

El artículo citado me interesó desde el primer momento, entre otras razones por el paralelismo que podía encontrarse con las dos preguntas que nos hemos hecho tantas veces: ¿por qué *publicar* revistas nacionales? y ¿por qué publicar *en* revistas nacionales? Máxime cuando nos hemos pasado años convencidos y convenciendo a nuestros colegas de la conveniencia de publicar en revistas internacionales. Y lo seguimos estando y haciendo.

La Sociedad Española de Microbiología, la SEM, actualmente con más de dos mil socios, puede considerarse una buena representación de la microbiología de nuestro país —reconociendo, por supuesto, que no todos los microbiólogos españoles pertenecen a ella y que existen otras asociaciones de microbiología cuyo enfoque específico casa mejor con las orientaciones profesionales de sus asociados—. La SEM, por otra parte, está a punto de cumplir cincuenta años, ya que fue fundada en 1946. Estas consideraciones conllevan las siguientes reflexiones: ¿Por qué no considerar la revista un instrumento de comunicación científica entre las personas interesadas por la microbiología general en nuestro país? ¿Por qué no puede ser un medio donde mostrar qué líneas de trabajo se están cultivando, qué proyectos están desarrollando sus miembros —que son una parte significativa de los microbiólogos españoles— y, por supuesto, qué están haciendo otros profesionales de la microbiología, aunque no sean miembros de la SEM?

Ese criterio, que emprendieron y han mantenido los anteriores directores-coordinadores de *Microbiología SEM*, Rubens López García (desde 1985 a 1989) y Juan Antonio Ordóñez (desde 1989 hasta 1993), es el punto de partida de la presente etapa. La cuestión es sencilla; si el nivel de la investigación en microbiología en nuestro país goza de prestigio fuera de nuestras fronteras, si nuestros científicos participan en proyectos y comités internacionales, ¿por qué no aspirar a que las publicaciones nacionales tengan un nivel digno?

Exponer a través de la revista el trabajo actual en microbiología en nuestro país interesa muy especialmente a los científicos más jóvenes, a quienes resulta importante conocer la actividad que se lleva a cabo en los distintos centros nacionales. Constituye, a la vez, un estímulo para el intercambio y la ampliación de conocimientos sobre temas concretos. Los que hemos participado en los Ciclos de Conferencias de Iniciación a la Investigación en Microbiología, que la SEM ha organizado durante cuatro años, valoramos muy positivamente esa iniciativa, no tanto por las conferencias y clases que cada profesor ha desarrollado, sino por la apertura de horizontes que supusieron para unos jóvenes a punto de empezar su período de formación investigadora.

Del prestigio científico de la revista somos todos responsables. Los autores, que pueden enviar artículos de una calidad aceptable, sin pensar que al publicar en una revista nacional desciende su prestigio o condenan su trabajo al anonimato. Los revisores, a los que se somete el control y evaluación de los artículos, que pueden realizar una labor insustituible en la mejora del trabajo con sus comentarios y sugerencias. Los editores, ofreciendo una revista de periodicidad constante, presentación moderna, fácil lectura y lenguaje correcto. Y los lectores, buscando los artículos que puedan interesarles, apreciando la revista y viendo en ella el vínculo que la SEM quiere establecer. Más que un planteamiento exigente, esta propuesta pretende marcar unos objetivos a los que no debemos renunciar, ni los autores potenciales, ni los sacrificados y anónimos revisores, ni, por supuesto, el equipo al que la SEM ha confiado llevar adelante la revista.

Ricard Guerrero

Director-Coordinador

Presentación

En este número de la revista, que se presenta ahora a los miembros de la Sociedad Española de Microbiología, se incluyen artículos procedentes de las ponencias y mesas redondas del XIV Congreso Nacional de Microbiología, celebrado en Zaragoza del 8 al 11 de septiembre de 1993. Los temas corresponden a las sesiones del programa científico sobre *Resistencia a antibióticos en actinomicetos, Biodeterioro, Evolución genética de la resistencia a antibióticos, Infecciones gastrointestinales, Perspectivas de los medios de cultivo, Diseño de nuevos antifúngicos y Patogeneicidad de estreptococos.*

Con anterioridad a la celebración del congreso, el Director-Coordinador de la revista *Microbiología SEM*, Juan Antonio Ordóñez, de la Universidad Complutense de Madrid, sugirió que se podría publicar un número con los trabajos de algunos simposios y mesas redondas que previamente seleccionarían los organizadores y el Comité Científico del congreso. Se aceptó la idea y, junto con Ricard Guerrero, de la Universidad de Barcelona, que sucedía a Juan Antonio Ordóñez como Director-Coordinador de la revista, se comunicó a los coordinadores de los simposios y mesas redondas seleccionados. Se trataba de que los ponentes invitados de esas sesiones, una vez celebrado el congreso, enviaran sus contribuciones en forma de artículos para publicarlos en la revista. El resultado está a la vista y me satisface presentarlo. Yo, que en esta misma presentación hablo del esfuerzo que requiere la organización de un congreso científico, estoy convencido de que también ha sido más que considerable el de la preparación del número y, por eso, quiero agradecer a los editores de la revista su deferencia y el trabajo realizado. Y no voy a olvidarme de los autores de los artículos, los verdaderos protagonistas de la publicación, a quienes con la misma simpatía y amistad agradezco su colaboración.

Los artículos que se incluyen representan una buena parte de las líneas de trabajo que se desarrollan en distintos centros españoles y, en gran medida, corresponden a temas en los que se centra actualmente la investigación en microbiología. Son trabajos de genética y biología molecular, de ecología microbiana, de microbiología clínica, de biodeterioro, y una parte final dedicada a medios de cultivo. Hay también espacio para la reflexión sobre los efectos controvertidos de los avances científicos: este artículo inicial está a cargo de Julian Davies, uno de los conferenciantes invitados, gran amigo personal y de otros microbiólogos españoles. Son en total veinte aportaciones que compendian una labor extensa, intensa, de calidad y de completa actualidad.

En la actividad de la Sociedad Española de Microbiología, nuestra SEM, han destacado siempre los congresos nacionales de microbiología, que desde 1969 se celebran cada dos años. De aquella fecha de 1969, y de aquel congreso en Madrid, los que asistimos podemos recordar hoy el carácter casi fundacional de una actividad que ha continuado hasta nuestros días y que, en su última edición, he tenido el honor de presidir y organizar con la inestimable colaboración

de muchos colegas, que a la vez son amigos. Es evidente, lo digo por experiencia, que poner en marcha una reunión científica de esta magnitud exige un gran esfuerzo y responsabilidad por parte de muchas personas, y durante un tiempo prolongado. Puedo decir que todas ellas dedicaron su tiempo y su trabajo con ilusión, entusiasmo y generosidad, contribuyendo así al éxito de nuestro congreso. Por ello, una vez más, quiero agradecerles muy sinceramente la valiosa ayuda que me han brindado.

Desde aquel año de 1969 ha transcurrido un cuarto de siglo, que ha sido testigo del progreso de la microbiología y, a la vez, de nuestra multidisciplinaria SEM, gracias al extraordinario avance de la ciencia y de la tecnología, que ha influido tanto en la investigación biológica como en la clínica. En un ambiente dinámico, y por ello capaz de hacer frente a dificultades de todo tipo, se ha fortalecido el espíritu de colaboración entre los investigadores, estableciéndose objetivos comunes y proyectos conjuntos, todo lo cual ha dado lugar a un provechoso intercambio de ideas y de información científica. A través de sus miembros, la SEM se ha integrado en este movimiento y su progreso es en parte consecuencia de una fructífera colaboración entre investigadores extranjeros y españoles. La labor de algunos de esos investigadores extranjeros ha quedado formalmente reconocida al haberlos incorporado a esa querida familia de socios de honor de nuestra SEM. Por otra parte, además de una obligación moral, constituye para mí una satisfacción haber contado en el congreso con la presencia de muchos de los investigadores que más han contribuido al avance de la microbiología española.

Esta XIV edición del congreso ha mantenido la tendencia de elevada participación y multidisciplinaria, satisfaciendo así los deseos de todos los organizadores de esta actividad. El programa científico, compuesto de 4 conferencias plenarias, 23 simposios y 8 mesas redondas, dio cabida a 160 ponencias y 460 comunicaciones, entre presentaciones orales y paneles, todo lo cual refleja la vitalidad y dinamismo de los diferentes campos y aplicaciones de la microbiología en nuestro país.

Con la publicación de este número de la revista *Microbiología SEM* culmina aquella actividad que tuve el honor de presidir. Amplío ahora mi reconocimiento a todos los que han contribuido a su preparación, además de a los editores y autores, a quienes ya he mencionado. Coincidiendo con la idea de los colegas con quienes lo planeamos, me parece la mejor manera de dejar constancia de la labor científica que se está llevando a cabo en la microbiología española.

Rafael Gómez-Lus

Presidente del XIV Congreso Nacional de Microbiología
Zaragoza, 1994

New pathogens and old resistance genes

Julian Davies

Department of Microbiology, University of British Columbia, Vancouver, B. C. , Canada

Summary

In the past fifty years the treatment and ecology of infectious diseases has evolved greatly. The major changes have come as the development of “new” pathogens which are usually “old” pathogens in new guises. The chief environmental factor responsible for this change is the use of antimicrobial agents. It is estimated that more than 10^9 kg of antibiotic have been produced and used since the early 1959’s. In spite of this threat, bacterial pathogens have not only survived, but even flourished. It is now too late to reverse this trend, since the treatment of infectious diseases relies heavily on antibiotics and there is a well-established pool of antibiotic resistance genes in nature. Hospital are unique, varied ecological niches for microbial diversity, and we know little about where resistance genes come from or the pathways by which these genes are passed around the bacterial population. Since less than 10% of the bacterial species on earth can be identified, we are ignorant of a large component of the factors responsible for health, disease and antibiotic resistance. What can we look forward to? There has been much talk of reemerging pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, enterococci and various fungi. These organisms have surfaced because of their ability to survive in hostile environments (antibiotics, antiseptics). We should anticipate the reappearance of other such organisms, and clinicians and the pharmaceutical industry should be prepared for this. Now it is the time to get profit from the lessons of the past, which, together with better knowledge of microbial biochemistry and ecology, must be applied to the problems of infectious diseases.

Key words: Microbial diseases, antimicrobial agents, antibiotics, drug design, multidrug resistance.

Correspondence to: Julian Davies. Department of Microbiology. University of British Columbia, 300-6174 University Blvd. Vancouver, B.C., Canada V6T 1Z3. Tel.: 1-604-8223308. Fax: 1-604-8226041. E-mail: davies1@cbdn.ca.bitnet

Resumen

En los últimos cincuenta años, el tratamiento y la ecología de las enfermedades infecciosas ha experimentado un gran desarrollo debido principalmente a la aparición de “nuevos” patógenos que, por lo general, son “viejos” patógenos con nuevos estilos. El principal factor ambiental responsable de esta situación ha sido el uso de agentes antimicrobianos. Se calcula que desde 1959 se han producido y utilizado más de 10^9 kg de antibióticos. A pesar de ello, los patógenos bacterianos no sólo han logrado sobrevivir, sino que incluso su número ha ido en aumento. Es demasiado tarde para contrarrestar este hecho, ya que el tratamiento de las enfermedades infecciosas se basa esencialmente en los antibióticos y, por otra parte, en la naturaleza existe una gran reserva de genes de resistencia. Los hospitales son nichos ecológicos variados y únicos de diversidad microbiana, pero sabemos muy poco del origen de los genes de resistencia y de las vías metabólicas por las cuales estos genes se transfieren de unas bacterias a otras. Puesto que han sido identificadas menos del 10% de las especies bacterianas de la Tierra, se desconocen los principales factores responsables de la salud, la enfermedad y la resistencia a antibióticos. ¿Podremos llegar a descubrirlos? Se ha hablado mucho de la reaparición de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, enterococos y varios hongos; organismos que han resurgido gracias a su capacidad de supervivencia en ambientes hostiles (antibióticos, antisépticos). Podemos anticipar la reaparición de otros organismos parecidos y tanto los hospitales como las industrias farmacéuticas tendrían que prepararse para ello. Es hora de aprender las lecciones del pasado y de aprovechar el conocimiento de la bioquímica microbiana y la ecología para resolver los problemas de las enfermedades infecciosas.

New pathogens and old resistance genes. An overview

The last fifteen years have seen a major revolution in medical science. In particular, advances in cellular immunology have been nothing short of miraculous. Immunology has now become a true biochemical science. With the availability of many cytokines in pure form because of the application of recombinant DNA techniques, it is possible to construct many of the pathways and cascades involved in immune recognition and response.

Some of the proteins that have been produced in large quantity have become successful therapeutic agents, earning billions of dollars in sales. Recombinant DNA approaches have also provided safe and effective vaccines, such as that for hepatitis B, now manufactured by genetically engineered yeast.

There is an enormous pool of antibiotic resistance genes in nature. Although found principally in antibiotic-producing organisms and clinically-isolated bacteria, there are many other sources of resistance genes. In addition, recent studies indicating frequent and promiscuous gene transfer between distantly related bacterial species are consistent with the occurrence of

illegitimate exchanges in nature (5). Flux within this pool is responsible for the dissemination and evolution of antibiotic resistance genes. Mutation—the bacterial β -lactamases being a good example (1, 4)—also plays an important role in the generation of resistance determinants with new specificities.

Nucleotide sequence and protein sequence analyses are providing preliminary information on the evolution of antibiotic resistance genes. More extensive studies of this type will provide information on origins and pathways of transfer.

With respect to biological function, are all the antibiotic resistance genes, in antibiotic-producing organisms, genuine resistance determinants? Obviously some of them must be; it is reasonable to assume that they prevent suicide of the producing host (2). Since the so-called resistance genes are identified by cloning and expression in a sensitive host, we may be identifying expression of a different phenotype in this background. Enzymic modification of antibiotic may be functionally related to biosynthesis, regulation or transport. Nonetheless these genes contribute to the resistance pool, and molecular analyses are essential if we want to understand where antibiotic resistance genes come from, and to predict the appearance of clinically significant resistance phenotypes.

However, in spite of these advances and applications there has been very little influence of modern technology in the treatment of microbial diseases. This is a disturbing fact; the problems are very difficult, but there has been reduced effort in research in this area during the same period of advances in biotechnology. There is much talk of rational drug design but one cannot be rational unless a good target has been identified. It is not easy to identify novel approaches in the design of antimicrobial agents.

Thus, we are left with the old warhorses: the macrolides, tetracyclines, aminoglycosides, penicillins and cephalosporins, and microbes have become more adept at becoming resistant to these antibiotics with the result that life-threatening infections by multidrug resistant bacteria are increasingly evident (3).

In the case of the enterococci and staphylococci, physicians world-wide recognise the magnitude of the problem, and hope that effective new agents will be provided soon. Putting a new resistance gene in an old pathogen creates new pathogens! How will we get these new compounds? While it is not possible to predict where they might come from, it is reasonable to suppose that a major factor in the discovery of new antimicrobial agents will be **microbiology**. In this field also, genetic engineering approaches have provided critical new knowledge of the nature of pathogens and the way in which they are able to cause infection. Foremost in this respect there are studies of intracellular pathogens. Bacteria such as *Listeria*, *Mycobacterium*, *Shigella*, *Salmonella*, etc., have evolved specific mechanisms to survive inside human host cells and exert their virulence as a result of this parasitism. Microbial diseases of this type may well become more significant as the human population increases in age, and changing social conditions and behavioural patterns favour certain immunodepressed states that permit increased susceptibility to a variety of infections (AIDS and drug dependence, for example).

In summary, the situation seems somewhat bleak when we consider that on the one hand, the human population is becoming more at risk, that bacterial pathogens are becoming increasingly antibiotic resistant, but there are precious few novel antimicrobial agents on the horizon.

The answer will lie in getting a better knowledge of the enemy having a more complete understanding of what a pathogen is and what it does. Only as we expand our knowledge in this way will it be possible to identify and exploit new targets in the treatment of infection. Perhaps the field of the infectious disease treatment will have more to finding ways of disarming pathogens rather than inhibiting their growth or killing them with antibiotics. Is it possible that such an approach would reduce the selection pressure for antibiotic resistance? An important set of goals for microbiology would be increased knowledge of microbial metabolism, host/pathogen interactions, disease processes, drug action and drug resistance.

The answer lies, obviously, in the field of microbiology—we have so much to learn. There are great opportunities for research in all aspects of the subject that will certainly bring benefit to many fields of enterprise, not just health, but environment, agriculture, evolution, to name a few. In order to do this, we as microbiologists, must devise novel—and I mean novel—ways of studying microbes in their natural environments. How can we understand microbes when current procedures permit the identification of less than 5% of the terrestrial population and even less of the aquatic population! Better knowledge of microbial diversity means better knowledge of the molecular diversity associated with this—which means novel structures for antibiotics.

Microbiology is a field with an exciting future, but this will only be realised with imagination. The existing technology has failed, it is up to us to come up with new ideas—what are you waiting for?

References

1. Blázquez, J., Baquero, M.-R., Cantón, R., Alós, I., Baquero, F. (1993). Characterization of a new TEM-type β -lactamase resistant to clavulanate, sulbactam and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2059–2063.
2. Davies, J. (1992). Another look at antibiotic resistance. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1553–1559.
3. Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375–382.
4. Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1991). More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1697–1704.
5. Mazodier, P., Davies, J. (1991). Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 147–171.

Enzimas líticas del sistema de neumococo

Rubens López,* José L. García, Concepción Ronda, Ernesto García,
Pedro García

Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

Summary

The cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages provide a reliable experimental model to support the extended idea concerning the modular organization of most proteins. The comparative analysis of the deduced amino acid sequences of these enzymes, as well as the construction of functional chimeric phage-bacterial enzymes, demonstrate that the C-terminal domain, which contains a large number of repeated amino acid motifs, is the substrate-binding domain, whereas the N-terminal domain provides enzymatic specificity. The development of chimeric proteins from genes encoding enzymes that specifically degrade cell wall of bacteria belonging to different genera (e.g. *Streptococcus* and *Clostridium*), supports the hypothesis concerning domainal interchange as a driving force for the construction of novel functional proteins that bacteria might create to allow them to become adapted to new environmental situations.

Key words: Pneumococcus, phages, autolysins, modular evolution.

Resumen

Las enzimas líticas de pared de *Streptococcus pneumoniae* y sus bacteriófagos proporcionan un excelente modelo experimental para apoyar la hipótesis generalizada de que la mayor parte de las proteínas poseen una organización modular. El análisis comparativo de las secuencias deducidas de aminoácidos de estas enzimas y la construcción de enzimas quiméricas funcionales fago-bacteria, demuestran que el dominio terminal de estas proteínas, que contiene un gran número de motivos de aminoácidos repetidos, interviene en funciones de reconocimiento del sustrato, mientras que el dominio N-terminal proporciona la especificidad enzimática. El desarrollo de proteínas quiméricas a partir de genes que codifican enzimas que

* *Correspondence to:* Rubens López. Depto. de Microbiología Molecular. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Velázquez, 144. 28006 Madrid. Tel.: 91-5611800. Fax: 91-5627518.

degradan específicamente paredes celulares de bacterias de diferentes géneros (p. e. *Streptococcus* y *Clostridium*), favorece la hipótesis de que el intercambio de dominios constituye la fuerza impulsora para la construcción de nuevas enzimas funcionales, que las bacterias podrían crear para adaptarse a nuevas situaciones ambientales.

Introducción

Las autolisinas son enzimas que degradan diversos enlaces en el peptidoglicano de la pared celular, por lo que puede causar la lisis y, consecuentemente, la muerte celular. Según el tipo de enlace que reconocen, se las clasifica como muramidasa (lisozimas), glucosaminidasas, amidasa y endopeptidasas. La amplia distribución de estas enzimas en los microorganismos ha llevado a proponer que las enzimas líticas participan en una serie de funciones biológicas, como son la síntesis de la pared bacteriana, la separación de las células hijas al final de la división celular, la transformación genética, la movilidad celular, etc. (13). Asimismo, se ha sugerido que las autolisinas son responsables de los efectos bacteriolíticos y bactericidas, causados por los antibióticos beta-lactámicos (11). No obstante, en la mayor parte de los casos, hasta hace pocos años se carecía de pruebas directas que permitieran apoyar la intervención de las autolisinas en tales funciones, ya que una asignación precisa de las mismas pasaba necesariamente por la obtención de mutantes, genéticamente bien caracterizados, en los genes que codifican las enzimas líticas. Por otra parte, muchos bacteriófagos poseen genes que codifican enzimas líticas que degradan la pared bacteriana, y sobre los cuales se poseía una información muy limitada, particularmente en el caso de los fagos que infectan a bacterias Gram-positivas. En *Streptococcus pneumoniae* se había observado que la autolisina de la célula huésped también participaba en la liberación de la descendencia fágica (16), lo que constituyó una primera indicación sobre una hipotética correlación evolutiva entre enzimas del huésped y del parásito.

El gen *lytA* que codifica la principal enzima autolítica de neumococo, bioquímicamente caracterizada como una amidasa (12), constituye el primer ejemplo de clonación de una enzima autolítica (7), y ha servido como punto de partida para establecer sus funciones biológicas precisas (17). Asimismo, ha servido para aislar, identificar y clonar diversos genes que codifican enzimas líticas de fagos de diferentes familias, lo cual ha expuesto relaciones genéticas y evolutivas muy peculiares entre *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos. Todo ello constituye uno de los mejores ejemplos en favor de la teoría de la evolución modular de las proteínas (2).

Resultados

El uso del gen *lytA* como sonda genética constituyó un punto de partida para demostrar que el genoma de varios fagos líticos y atemperados de neumococo contenían regiones que presentaban una elevada similitud con el gen que codificaba la principal autolisina de

neumococo (8, 9). El análisis de las secuencias nucleotídicas de los genes *cpl-1* y *cpl-9*, que codifican las enzimas líticas de los fagos Cp-1 y Cp-9 respectivamente, ha demostrado que sus estructuras primarias son virtualmente idénticas y que codifican lisozimas que presentan una dependencia estricta de la presencia de colina en su sustrato natural, la pared de neumococo, para desarrollar su actividad (12). Por el contrario, la lisozima del fago Cp-7, era capaz de degradar paredes de neumococo que contenían colina o etanolamina (un análogo estructural de la colina) en la pared celular en ensayos in vivo e in vitro (10). Esta característica se correlacionaba con un drástico cambio en la estructura primaria del dominio C-terminal de la enzima. Además, los genes *hbl* y *ejl*, aislados a partir de dos fagos atemperados de familias diferentes, codificaban amidasas que presentaban una dependencia absoluta de la presencia de colina para ejercer su actividad enzimática y poseían una gran similitud estructural con la región C-terminal de la autolisina de neumococo y de las enzimas líticas de los fagos que presentaban dependencia de colina (14).

El análisis global de estos resultados sugirió la existencia de una organización modular de las enzimas líticas de *S. pneumoniae* y de sus bacteriófagos, donde el centro activo se localizaría en el dominio N-terminal, mientras que el dominio C-terminal estaría implicado en funciones de reconocimiento del sustrato (8, 10). En base a esta hipótesis surgió la idea de que estos dominios podrían ser intercambiables, propiciando de este modo la posibilidad de preparar enzimas quiméricas funcionales que combinaran las propiedades bioquímicas propias de las enzimas parentales de los fagos de neumococo y de la bacteria huésped. Nuestros resultados han demostrado que la construcción de enzimas quiméricas activas era factible tanto entre enzimas que compartían regiones de gran similitud en la estructura primaria como entre aquellas que están codificadas por genes no homólogos (5, 6).

Estos resultados constituyen una prueba experimental directa en favor de la organización modular de las enzimas líticas del sistema de neumococo. Como confirmación de tales resultados, recientemente se ha conseguido clonar las regiones de los genes *lytA* y *cpl-1*, que codifican el módulo C-terminal de sus respectivas enzimas (18), así como las regiones de los genes *lytA*, *cpl-1* y *cpl-7* que codifican el dominio N-terminal de esos genes (19), y se ha podido demostrar que tales dominios funcionan independientemente entre sí, aunque su acción combinada reporta, desde el punto de vista evolutivo, indudables ventajas en lo que se refiere a su actividad enzimática.

Una organización estructural similar a la de las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos ha sido propuesta para una muramidasa de *Clostridium acetobutylicum*, una especie donde se ha demostrado que algunas de sus cepas también contienen, al igual que el neumococo, colina como componente de la pared celular. Recientemente, se ha conseguido la construcción de una enzima quimérica combinando el dominio C-terminal de la lisozima CPL1 del fago Cp-1 de neumococo y el dominio N-terminal de la lisozima de *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Fig. 1). Este resultado proporciona una prueba experimental sobre la observación de que grandes regiones del genoma, que pueden abarcar dominios funcionales completos, pueden combinarse durante el proceso evolutivo para dar lugar a una proteína con una conformación específica estable y con una nueva función biológica (4).

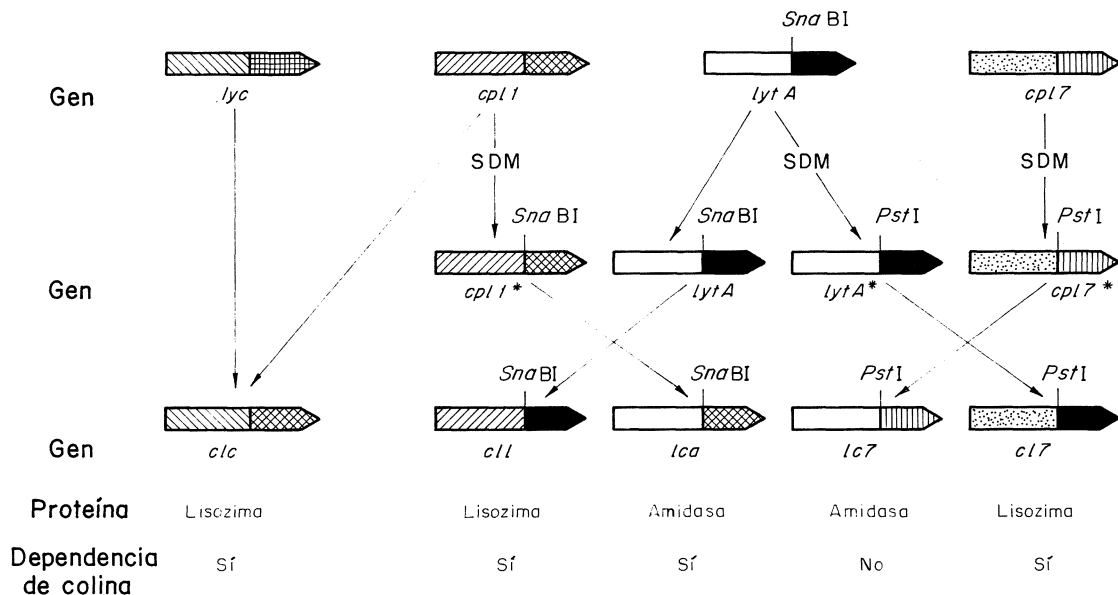


Fig. 1. Representación esquemática de la organización modular de los genes que codifican las enzimas del sistema de neumococo y del gen *lyc* que codifica la lisozima de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 y construcción de los genes quiméricos. Las flechas representan los genes líticos y la dirección de transcripción. Los asteriscos indican las nuevas secuencias de restricción creadas por mutagénesis dirigida (SDM).

Discusión

Se ha propuesto que algunos genes fágicos considerados esenciales, como parece ser el caso de los genes líticos, se han originado a partir de genes bacterianos (3). En este sentido se ha demostrado en el laboratorio la recombinación de genes entre fagos y bacterias en sistemas como *Bacillus subtilis* y *S. pneumoniae* (15, 20). Los resultados presentados aquí sugieren que este tipo de acontecimiento genético se vería facilitado, en el caso del neumococo, por el hecho de que los genes que codifican las enzimas líticas de huésped y parásito presentan, en la composición de nucleótidos, la mayor similitud que se ha descrito en la literatura hasta el momento (14), pudiendo ser éste el principal instrumento que introdujese variabilidad en los genes que codifican tales enzimas. La organización modular que proponemos para estos genes facilita un gran número de combinaciones estructurales y podría constituir un modelo ampliamente extendido en muchos tipos de microorganismos, como se viene demostrando en distintos casos estudiados en los últimos años (21, 22). La construcción reciente de enzimas quiméricas activas a partir de genes que codifican enzimas que degradan específicamente

paredes celulares de bacterias pertenecientes a diferentes familias, en este caso *S. pneumoniae* y *C. acetobutylicum*, proporciona una base experimental más amplia a la hipótesis de que este intercambio de dominios favorece la construcción de nuevas proteínas funcionales. Aunque es sabido que el polisacárido capsular de neumococo constituye el principal factor de virulencia de esta bacteria, se ha apuntado recientemente que la amidasa también contribuye, entre otros factores, a esta virulencia (1). La creación de enzimas quiméricas como las descritas aquí podrían ser ejemplos de las alteraciones que pueden sufrir en la naturaleza, a través de mecanismos simples de recombinación, los genes que intervienen en procesos que influyen directamente en la patogenicidad de algunos microorganismos, permitiéndoles adaptarse a nuevas condiciones ambientales.

Asimismo, nuestros resultados favorecen la hipótesis de que los dominios N-terminales de las enzimas líticas podrían haber constituido, en el curso de la evolución, proteínas independientes. El hecho de que tales dominios presenten una baja actividad catalítica cuando se clonan de forma independiente, en comparación con las enzimas que poseen los dos dominios, sugiere que la adquisición del dominio C-terminal representaría una ventaja para aquellas enzimas que interactúan con sustratos poliméricos, como es el caso de la pared bacteriana, lo que permitiría una mejora en su eficiencia catalítica.

Bibliografía

1. Berry, A. N., Lock, R. A., Hansman, D., Paton, J. C. (1989). Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**, 2324–2330.
2. Botstein, D. (1980). A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **354**, 484–492.
3. Campbell, S. (1988). Phage evolution and speciation. *In*: R. Calendar (ed.), *The bacteriophages*, pp. 1–14. Plenum, New York.
4. Croux, C., Ronda, C., López, R., García, J. L. (1993). Interchange of functional domains switches enzyme specificity: construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. *Mol. Microbiol.* **9**, 1019–1025.
5. Díaz, E., López, R., García, J. L. (1990). Chimeric phage-bacterial enzymes, a clue in the molecular evolution of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8125–8129.
6. Díaz, E., López, R., García, J. L. (1991). Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J. Biol. Chem.* **266**, 5464–5471.
7. García, E., García, J. L., Ronda, C., García, P., López, R. (1985). Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 225–230.
8. García, E., García, J. L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J. M., López, R. (1988). Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 914–918.
9. García, J. L., García, E., Arrarás, A., García, P., Ronda, C., López, R. (1987). Cloning, purification, and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *J. Virol.* **61**, 2573–2580.
10. García, P., García, J. L., García, E., Sánchez-Puelles, J. M., López, R. (1990). Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene* **86**, 81–88.
11. Handwerker, S., Tomasz, A. (1985). Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Rev. Infect. Dis.* **7**, 368–386.

12. Höltje, J. V., Tomasz, A. (1976). Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol. Chem.* **251**, 4199–4207.
13. López, R., García, J. L. (1990). El sistema lítico de *Streptococcus pneumoniae* y de sus bacteriófagos: un modelo de evolución molecular. *In: Casadesús, J., Ruiz-Berraquero, F. (eds.), Microbiología 1990*, pp. 98–106. Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla.
14. Romero, A., López, R., García, P. (1990a). Characterization of the pneumococcal bacteriophage HB-3 amidase: cloning and expression in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **64**, 137–142.
15. Romero, A., López, R., García, P. (1990b). Sequence of the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage HB-3 amidase reveals high homology with the major host autolysin. *J. Bacteriol.* **172**, 5064–5070.
16. Ronda, C., López, R., Tapia, A., Tomasz, A. (1977). Role of the pneumococcal autolysin (murein-hydrolase) in the release of progeny bacteriophage and in the phage induced lysis of the host cell. *J. Virol.* **21**, 366–374.
17. Ronda, C., García, J. L., García, E., Sánchez-Puelles, J. M., López, R. (1987). Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.* **164**, 621–624.
18. Sánchez-Puelles, J. M., Sanz, J. M., García, J. L., García, E. (1990). Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene* **89**, 69–75.
19. Sanz, J. M., Díaz, E., García, J. L. (1992). Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal murein hydrolases. *Mol. Microbiol.* **6**, 921–931.
20. Stroynowsky, I. T. (1981). Distribution of bacteriophage Y3T homologous deoxyribonucleic acid sequences in *Bacillus subtilis* 168, related bacteriophages, and other *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* **148**, 91–100.
21. Wang, X., Wilkinson, B. J., Jayaswal, R. K. (1991). Sequence analysis of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. *Gene* **102**, 105–109.
22. Yother, J., Briles, D. E. (1992). Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J. Bacteriol.* **174**, 601–609.

Patogeneicidad y genes capsulares de neumococo

Ernesto García,* Pedro García, Rubens López

Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

Summary

Pneumococci remain to be one of the most prominent human pathogens. Increasing efforts are being dedicated to the development of improved vaccines with wider specificity. Since a clear understanding of the genetics of capsular types in *Streptococcus pneumoniae* is missing, our efforts are oriented to characterize, at the molecular level, the genes involved in capsular polysaccharide biosynthesis. We have cloned and sequenced a chromosomal DNA fragment of a clinical isolate of type 3 pneumococcus and showed that it contains a type 3 specific gene as well as genes common to other serotypes.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, virulence, capsular genes, cloning, antibiotic resistance.

Resumen

El neumococo es una bacteria patógena de importancia creciente a causa de la aparición de resistencias frente a los antibióticos β -lactámicos. Dadas las dificultades que están surgiendo en el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo, se está estudiando la posibilidad de elaborar vacunas que, además de una mezcla de polisacáridos capsulares, incluyan ciertas proteínas de *S. pneumoniae* que juegan un importante papel en la patogeneicidad. Como la biología molecular de los genes capsulares del neumococo era prácticamente desconocida, se han estudiado una serie de estirpes isogénicas que han permitido la clonación y secuenciación de algunos genes implicados en la biosíntesis del polisacárido capsular de esta especie.

* *Correspondence to:* Ernesto García, Depto. de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez, 144. 28006 Madrid. Tel.: 91-5611800. Fax: 91-5627518.

Introducción

El neumococo (*Streptococcus pneumoniae*) es una bacteria comúnmente conocida por sus implicaciones patógenas y que, a pesar del desarrollo de la antibioterapia, sigue siendo una causa muy importante de morbilidad y mortalidad incluso en los países desarrollados (Tabla 1). Aparte de los pacientes inmunocomprometidos, los dos grupos de riesgo más importantes son la población infantil y las personas de edad avanzada. Asimismo, el continuo avance del SIDA ha convertido también a los individuos afectados por esta enfermedad en blanco de las infecciones causadas por *S. pneumoniae*. Se ha observado que el neumococo es responsable de, al menos, un tercio de los procesos agudos de otitis media en niños. Si se tiene en cuenta que la otitis media recurrente está considerada, incluso en los países desarrollados, como una de las causas principales de pérdida permanente de la capacidad auditiva, y que aproximadamente el 70% de los niños padece una enfermedad de este tipo durante el primer año de su vida y una tercera parte de ellos sufren dos o más recidivas, resulta evidente la importancia que posee este microorganismo. Por otra parte, se ha observado que aunque el neumococo es responsable de solamente el 10% de los casos de meningitis [por detrás de *Haemophilus influenzae* (46%) y del meningococo (27%)], su mortalidad (28%) supera, no obstante, la de los otros dos patógenos.

Una de las razones que justifican estos datos epidemiológicos es la elevada capacidad colonizadora que posee esta bacteria, que hace que buena parte de la población, sobre todo la infantil, sea portadora del microorganismo (3). El 59% de los niños son colonizados por el neumococo durante las dos primeras semanas después del nacimiento. Se ha observado, además, que un mismo individuo puede ser colonizado sucesiva, e incluso simultáneamente,

TABLA 1
INCIDENCIA DE *S. pneumoniae* EN LA PATOGENIA HUMANA

-
- 1.- Las principales enfermedades causadas por neumococo son neumonías, bacteriemias, meningitis y otitis medias.
 - 2.- *S. pneumoniae* infecta a 100 millones de personas anualmente, con una tasa de mortalidad, en países no desarrollados, del 10% (35).
 - 3.- La neumonía es la cuarta causa de mortalidad en el mundo (4,8 millones). Un millón de niños menores de 5 años fallecen anualmente de neumonía neumocócica (40).
 - 4.- El 10–25% de todas las neumonías y el 25–60% de las extrahospitalarias son causadas por *S. pneumoniae*.
 - 5.- Un 10% de las meningitis son debidas a algún neumococo, con una tasa de mortalidad del 30%.
 - 6.- Un 20% de los niños menores de 3 años padecen uno o más episodios de otitis media causada por *S. pneumoniae*. Esta enfermedad es causa frecuente de la pérdida de audición.
-

por neumococos de varios tipos capsulares. Por otra parte, hay que tener en cuenta que este microorganismo posee una gran capacidad de transmisión de unos individuos a otros; utilizando técnicas de identificación clonal se ha podido demostrar la diseminación de algunos clones particulares entre diferentes países muy alejados entre sí (28, 42).

Afortunadamente, el neumococo ha sido tradicionalmente muy sensible a la penicilina, y durante muchos años éste ha sido el antibiótico de elección. Sin embargo, en el transcurso de los últimos quince años, el número de aislamientos de neumococos resistentes a los antibióticos β -lactámicos ha crecido de manera espectacular, y este hecho está ocasionando una preocupación creciente (1, 2). El aislamiento de neumococos resistentes a la penicilina se remonta a 1967, cuando se detectó una estirpe parcialmente resistente en Australia. La alarma surgió, no obstante, en 1977, cuando empezaron a aparecer neumococos altamente resistentes a la penicilina en Sudáfrica, dándose la particularidad de que algunos de ellos eran además resistentes a otros antibióticos (22). Estudios epidemiológicos indican que España es uno de los países con una tasa mayor de cepas altamente resistentes a la penicilina, habiéndose descrito que el 44% de las cepas aisladas en 1989 mostraba una resistencia entre moderada ($> 0.1 \mu\text{g/ml}$) y alta ($\geq 2 \mu\text{g/ml}$), cuando dicho valor era 10 años antes de aproximadamente un 6% (12). Estos elevados niveles de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos se acompañan, además, de un incremento de la resistencia a otros agentes antimicrobianos, principalmente tetraciclina y cloranfenicol.

La progresiva incapacidad de tratamiento que ha impuesto la aparición de las resistencias a antibióticos (30) ha obligado a volver la vista hacia el empleo de vacunas antineumococo. El principal factor de patogenicidad del neumococo es la cápsula, que protege a este microorganismo de los mecanismos fagocíticos del huésped (9, 37). Esta envuelta de naturaleza polisacáridica fue posiblemente observada ya por Pasteur (34), quien, junto a Sternberg, fue el descubridor del neumococo. Pero hasta algunos años después no se empezó a vislumbrar su enorme diversidad. Así, en 1935 se conocían hasta 32 tipos capsulares diferentes y, en la actualidad, se reconocen más de 80 (24, 44). Desde los estudios de Griffith (16), en los que se demostró la posibilidad de transformar entre sí los tipos capsulares de neumococo, pasando por el descubrimiento por Avery et al. de que el DNA —y no las proteínas como se creía hasta entonces— constituía la base genética de la herencia (4, 26), durante la década de 1960 y comienzos de la de 1970 se observó, confirmando los resultados de Griffith, que el neumococo es capaz de transformarse in vivo (32, 33). Coffey et al. (8) han observado que un aislado clínico multirresistente de serotipo 23F ha cambiado este tipo capsular al 19F como resultado, posiblemente, de un proceso de transferencia horizontal de los genes correspondientes a este último serotipo. Otro posible intercambio de genes capsulares, en este caso entre los serotipos 7B y 14, ha sido encontrado muy recientemente (20). No obstante, hay que admitir que, dada la carencia de conocimientos sobre la genética molecular de los genes capsulares de neumococo, otras explicaciones, alternativas a la ya mencionada transferencia horizontal de genes capsulares, podrían ser igualmente válidas.

Los estudios genéticos sobre los factores que determinan la formación de cápsula en *S. pneumoniae* son muy escasos y fueron llevados a cabo casi en su totalidad antes de 1970 (véase 24, para una revisión). Además, aunque la composición química de la mayoría de los

polisacáridos capsulares del neumococo está bien establecida (44), los aspectos bioquímicos responsables de la biosíntesis de los mismos son muy poco conocidos y, en esencia, se reducen a los serotipos 1 y 3 (27). Actualmente, se ha desarrollado una vacuna antineumococo comercial que está compuesta de una mezcla de los 23 polisacáridos capsulares más frecuentes en clínica (19, 31), aunque, según los lotes, también parece contener otros polisacáridos de pared como contaminantes (43). No obstante, aunque estudios recientes han demostrado la relativa eficacia de esta vacuna (41), es bien conocido el hecho de que los niños menores de tres años no responden inmunológicamente frente a antígenos de tipo polisacárido (17). Por otra parte, las personas de edad avanzada muestran una capacidad inmunológica disminuida frente a la vacuna (29) y, además, no todos los antígenos capsulares —incluso los presentes en la vacuna— son igualmente inmunogénicos, ni siquiera en individuos inmunocompetentes. Aunque el desarrollo de la vacuna polivalente ha contribuido al control de la enfermedad, se ha insistido en la necesidad de desarrollar vacunas mejoradas que contengan antígenos comunes a todos los serotipos o serogrupos conocidos, capaces de proteger a las poblaciones con alto riesgo de contraer la enfermedad (7), o vacunas conjugadas polisacárido-proteína, que se ha comprobado que son inmunogénicas en la población infantil. Además, resulta conveniente el empleo de proteínas de neumococo que, como la neumolisina o la autolisina principal, juegan un papel importante en la virulencia de este microorganismo (5, 6). En este sentido, la creación de proteínas quiméricas entre la neumolisina y la autolisina (39) puede presentar indudables ventajas terapéuticas en un futuro próximo.

A la vista de lo expuesto, resulta obvia la necesidad de poseer un mejor conocimiento molecular de los genes responsables de la síntesis del polisacárido capsular de neumococo, lo que se ha visto dificultado por los numerosos problemas encontrados en la clonación de genes de neumococo, que, en su mayor parte, persisten todavía (11). Asimismo, es conocido el hecho de que, contrariamente a las estirpes de laboratorio, que son en su mayoría rugosas (es decir, carentes de cápsula), los neumococos aislados en clínica suelen ser no transformables debido a que, por razones mal comprendidas, no sintetizan factores de competencia. Además, la presencia de cápsula supone una dificultad añadida para la entrada del DNA transformante (47).

Resultados

Para poder abordar el estudio molecular de los genes implicados en la síntesis del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* se ha partido de tres premisas: (i) Las estirpes capsuladas (lisas) deben ser fácilmente distinguibles de las carentes de cápsula (rugosas). La reacción de hinchamiento capsular, o “quellung”, se utiliza en el laboratorio para la identificación microscópica del antígeno capsular (24), pero este método no sirve para diferenciar colonias lisas y rugosas en las placas de Petri. Por ello, se utilizó como punto de partida neumococos de serotipo 3, que sintetizan una gran cantidad de polisacárido, y que permiten una rápida identificación por simple inspección visual de las placas de cultivo (Fig. 1). (ii) Los mutantes rugosos que se empleen como receptores en experimentos de transformación genética no deben diferir, a ser posible, en más de un carácter de la cepa capsulada parental cuyos genes son objeto

de estudio. Para ello, se han aislado mutantes no capsulados surgidos espontáneamente, en lugar de recurrir a mutagénesis química o, por ejemplo, a transposones (45). El aislamiento de mutantes rugosos se llevó a cabo en placas de agar-sangre, sobre las que el neumococo desarrolla una cápsula conspicua (Fig. 1). Pero, debido a la potente actividad lítica de la principal autolisina de *S. pneumoniae* (14), las colonias se autolisan —y consecuentemente comienzan a dejar de ser viables— pasadas unas 24 horas de incubación a 37°C. Para evitarlo, y permitir así el aislamiento de los mutantes rugosos, se introdujo una deleción en el gen *lytA* (que codifica la autolisina) por transformación genética con el plásmido pGL32 (23). (iii) Como ya se ha indicado, las estirpes capsuladas (e incluso algunas no capsuladas) de origen clínico no son, por lo general, transformables (47). Por ello, tuvimos que construir estirpes capsuladas usando como receptoras otras cepas de laboratorio carentes de cápsula y altamente competentes, en su mayoría, procedentes de la estirpe D39 de tipo 2. Experimentos ya clásicos han puesto de manifiesto que, en este tipo de transformaciones, se produce el reemplazamiento del gen o genes capsulares del receptor por los del DNA transformante, de tal manera que los transformantes capsulados tipo 3 son indistinguibles, en lo que a la cápsula se refiere, de la cepa parental donadora del DNA (25).

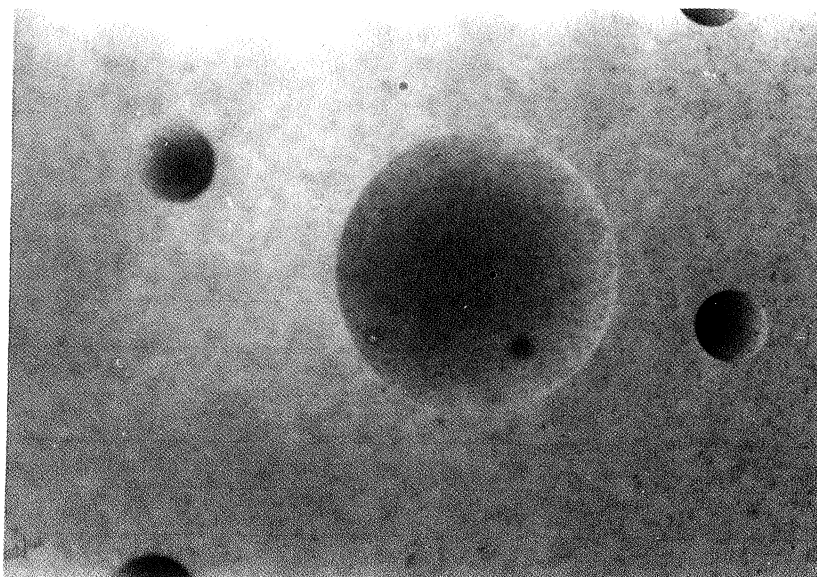


Fig. 1. Morfología típica de una colonia de neumococos capsulados ($S3^+$) obtenida por transformación con DNA de la estirpe 406 ($S3^+$) como donador y M24 ($S3^-$) como receptor (colonias pequeñas).

Con estas premisas, se construyó la estirpe M24 ($S3^-$), que fue usada como receptora en experimentos de transformación. En primer lugar se utilizó DNA de la estirpe capsulada ($S3^+$) de origen clínico, denominada 406, previamente digerido con diferentes enzimas de restricción. Esto nos permitió determinar que un fragmento *ScaI* de aproximadamente 2,5 kb era capaz de transformar la estirpe M24 al fenotipo capsulado. Este fragmento de restricción fue clonado en *Escherichia coli*, utilizando como vector el plásmido pUC18 (15). Experimentos de

transformación genética empleando fragmentos de restricción del plásmido recombinante pLGL1, que contiene el fragmento *ScaI* antes mencionado, indicaron que la mutación presente en la cepa rugosa M24 era complementada por un fragmento de restricción específico, el cual fue secuenciado. Se pudo determinar que este fragmento de DNA codificaba una proteína incompleta, en cuyo extremo N-terminal se localizaba un motivo típico de unión de NAD⁺, característico de las enzimas de tipo deshidrogenasa (46). Además, esta misma zona de la proteína mostró una semejanza significativa con la región correspondiente de la GDP-manosa deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* (10), que está implicada en la síntesis del polisacárido capsular de esta especie. Esta bacteria es responsable de la mayor parte de las complicaciones en pacientes aquejados de fibrosis quística.

Como quiera que en la síntesis del polisacárido capsular de tipo 3, la enzima clave parece ser la UDP-glucosa deshidrogenasa (27), se planteó la posibilidad de que este gen, al que se denominó *cap3-1*, codificara la enzima. Experimentos más recientes (C. Arrecubieta, comunicación personal) parecen confirmar esta suposición. Además, la determinación de la secuencia de nucleótidos adyacentes al gen *cap3-1* ha demostrado la existencia de semejanzas significativas con otros genes capsulares de *Streptococcus agalactiae* (38). Se ha podido comprobar, mediante experimentos de “dot blot”, que estos genes parecen estar también presentes en estirpes de neumococo pertenecientes a otros serotipos, mientras que el gen *cap3-1* sólo hibridó con DNAs extraídos de cepas tipo 3 y 5, que poseen ácido glucurónico en el polisacárido capsular (44). Estos resultados sugieren que la estructura del genoma capsular de neumococo puede ser análoga a la encontrada en bacterias Gram–negativas, donde los genes responsables de la biosíntesis y polimerización de los eslabones monosacarídicos se encuentran flanqueados por los implicados en la translocación de la cápsula a la superficie celular y en su modificación posterior (13, 21, 36).

Puesto que la cápsula del neumococo es el principal factor de la virulencia de este microorganismo (18), el conocimiento de su biología molecular proporcionará información acerca de blancos potenciales para futuras terapéuticas. Los datos que hemos presentado constituyen un primer paso en la elucidación de los mecanismos que hacen de *S. pneumoniae* un microorganismo tan devastador.

Bibliografía

1. Appelbaum, P. C. (1987). World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**, 367–377.
2. Appelbaum, P. C. (1992). Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 77–83.
3. Austrian, R. (1986). Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J. Antimicrob. Chemother.* **18** (Suppl. A), 35–45.
4. Avery, O. T., MacLeod, C. M., McCarthy, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. I. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**, 137–157.
5. Berry, A. M., Lock, R. A., Hansman, D., Paton, J. C. (1989). Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**, 2324–2330.

6. Berry, A. M., Paton, J. C., Hansman, D. (1992). Effect of insertional inactivation of the genes encoding pneumolysin and autolysin on the virulence of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Microb. Pathog.* **12**, 87–93.
7. Broome, C. V., Breiman, R. F. (1991). Pneumococcal vaccine: past, present, and future. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1506–1508.
8. Coffey, T. J., Dowson, C. G., Daniels, M., Zhou, J., Martin, C., Spratt, B. G., Musser, J. M. (1991). Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **5**, 2255–2260.
9. Cross, A. S. (1990). The biologic significance of bacterial encapsulation. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **150**, 87–95.
10. Deretic, V., Gill, J. F., Chakrabarty, A. M. (1987). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcription regulation of the *algD* gene. *Nucleic Acids Res.* **15**, 4567–4581.
11. Dillard, J. P., Yother, J. (1991). Analysis of *Streptococcus pneumoniae* sequences cloned into *Escherichia coli*: effect of promoter strength and transcription terminators. *J. Bacteriol.* **173**, 5105–5109.
12. Fenoll, A., Martín Bourgon, C., Muñoz, R., Vicioso, D., Casal, J. (1991). Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979–1989. *Rev. Infect. Dis.* **13**, 56–60.
13. Frosch, M., Weisgerber, C., Meyer, T. F. (1989). Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1669–1673.
14. García, E., García, J. L., Ronda, C., García, P., López, R. (1985). Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 225–230.
15. García, E., García, P., López, R. (1993). Cloning and sequencing of a gene involved in the synthesis of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 188–195.
16. Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg. (London)* **27**, 113–159.
17. Heilmann, C. (1990). Human B and T lymphocyte responses to vaccination with pneumococcal polysaccharides. *APMIS* **15**, 5–23.
18. Johnston, R. B., Jr. (1991). Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev. Infect. Dis.* **13** (Suppl. 6), S509–S517.
19. Jorgensen, J. H., Howell, A. W., Maher, L. A., Facklam, R. R. (1991). Serotypes of respiratory isolates of *Streptococcus pneumoniae* compared with the capsular types included in the current pneumococcal vaccine. *J. Infect. Dis.* **163**, 644–646.
20. Kell, C. M., Jordens, J. Z., Daniels, M., Coffey, T. J., Bates, J., Paul, J., Gilks, C., Spratt, B. G. (1993). Molecular epidemiology of penicillin-resistant pneumococci isolated in Nairobi, Kenya. *Infect. Immun.* **61**, 4382–4391.
21. Kroll, J. S., Zamze, S., Loynds, B., Moxon, E. R. (1989). Common organization of chromosomal loci for the production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **171**, 3343–3347.
22. Klugman, K. P. (1990). Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin. Microb. Rev.* **3**, 171–196.
23. López, R., Sánchez-Puelles, J. M., García, E., García, J. L., Ronda, C., García, P. (1986). Isolation, characterization and physiological properties of an autolytic-defective mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 237–242.
24. Lund, E., Henrichsen, J. (1987). Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods Microbiol.* **12**, 241–262.
25. Mäkelä, P. H., Stocker, B. A. D. (1969). Genetics of polysaccharide biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **3**, 291–322.

26. McCarthy, M., Avery, O. T. (1946). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *J. Exp. Med.* **83**, 89–96.
27. Mills, G. T., Smith, E. E. (1962). Biosynthetic aspects of capsular formation in the pneumococcus. *Brit. Med. Bull.* **18**, 27–30.
28. Muñoz, R., Coffey, T. J., Daniels, M., Dowson, C. G., Laible, G., Casal, J., Hakenbeck, R., Jacobs, M., Musser, J. M., Spratt, B. G., Tomasz, A. (1991). Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **164**, 302–306.
29. Musher, D., Luchi, M. J., Watson, D. A., Hamilton, R., Baughn, R. E. (1990). Pneumococcal polysaccharide vaccine in young adults and older bronchitics: determination of IgG responses by ELISA and the effect and adsorption of serum with non-type-specific cell wall polysaccharide. *J. Infect. Dis.* **161**, 728–735.
30. Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064–1073.
31. Nielsen, S., Vinther, Henrichsen, J. (1992). Capsular types of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and CSF during 1982–1987. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 794–798.
32. Ottolenghi-Nightingale, E. (1969). Spontaneously occurring bacterial transformations in mice. *J. Bacteriol.* **100**, 445–452.
33. Ottolenghi-Nightingale, E. (1972). Competence of pneumococcal isolates and bacterial transformation in man. *Infect. Immun.* **6**, 785–792.
34. Pasteur, L. (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull. Acad. Mid. (Paris) (serie 2)* **10**, 94–103.
35. Robbins, A., Freeman, P. (1988). Obstacles for developing vaccines for the third world. *Sci. Am.* **259**, 126–133.
36. Roberts, I. S., Mountford, R., Hodge, R., Jann, K. B., Boulnois, G. J. (1988). Common organization of gene clusters for production of different capsular polysaccharides (K antigens) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 1305–1310.
37. Roberts, I. S., Saunders, F. K., Boulnois, G. J. (1989). Bacterial capsules and interactions with complement and phagocytes. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 462–464.
38. Rubens, C. E., Heggen, L. M., Haft, R. F., Wessels, M. R. (1993). Identification of *cpsD*, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci. *Mol. Microbiol.* **8**, 843–855.
39. Sánchez-Puelles, J. M., Sanz, J. M., García, J. L., García, E. (1992). Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* **203**, 153–159.
40. Shann, F. (1990). *Pneumococcus* and influenza. *The Lancet* **335**, 898–901.
41. Shapiro, E. D., Berg, A. T., Austrian, R., Schroeder, D., Parcells, V., Margolis, A., Adair, R. K., Clemens, J. D. (1991). The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1453–1460.
42. Soares, S., Kristinsson, K. G., Musser, J. M., Tomasz, A. (1993). Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J. Infect. Dis.* **168**, 158–163.
43. Sørensen, U. B. S., Henrichsen, J. (1984). C-polysaccharide in a pneumococcal vaccine. *APMIS* **92**, 351–356.
44. van Dam, J. E. G., Fleer, A., Snippe, H. (1990). Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *A. van Leeuwenhoek* **58**, 1–47.
45. Watson, D. A., Musher, D. M. (1990). Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect. Immun.* **58**, 3135–3138.
46. Wierenga, R. K., Terpstra, P., Hol, W. G. J. (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding bab-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**, 101–107.

The yeast cell cycle: positive and negative controls

Martí Aldea,* Cèlia Casas, Carme Gallego, Carme Espinet, Enric Herrero

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida

Summary

Cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae* is exerted mainly at the START point in the G1 phase of the cycle. At this point, yeast cells check physiological signals and external parameters such as nutrient availability or the presence of sexual pheromones, before proceeding to next stages of the cycle. G1 cyclins regulate START by activating Cdc28, the p34 protein kinase, involving physical association between the cyclin and the kinase catalytic subunit. As a consequence of the accumulation and subsequent degradation of G1 cyclins, a peak of p34 protein kinase activity is reached before START, which would regulate the pass through this point by phosphorylating specific substrates. Here we review the molecular aspects of START and the mechanisms, both positive and negative, that regulate this cell cycle point. We also describe a new gene that links nutrient availability to G1 cyclin expression and the possible connections with the Ras-cAMP pathway.

Key words: Cell cycle, yeast, Rcs1, START.

Resumen

El control del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae* tiene lugar principalmente en un punto de la fase G1 del ciclo denominado START. Es en este momento cuando las células de esta levadura comprueban e integran señales fisiológicas, como la disponibilidad de nutrientes o la presencia de feromonas, antes de proceder a las siguientes fases del ciclo. Las ciclinas G1 regulan START al activar Cdc28, la proteína quinasa p34, mediante asociación física entre las ciclinas y la subunidad quinasa. Como consecuencia de la acumulación y subsiguiente degradación de las ciclinas G1, se obtiene un máximo de actividad quinasa p34 justo antes de START, que a su vez sería la responsable de desencadenar un conjunto de procesos por fosforilación de sustratos específicos. En este trabajo se revisan los aspectos

* *Correspondence to:* Martí Aldea. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Facultat de Medicina. Universitat de Lleida. Rovira Roure, 44. 25198 Lleida. Tel.: 973-702409. Fax: 973-702426.

moleculares involucrados en START y los mecanismos, positivos y negativos, que regulan este punto del ciclo celular. Además, se describe un nuevo gen que relaciona la disponibilidad de nutrientes con la expresión de ciclinas G1, y se discute su posible interrelación con las vías Ras-cAMP.

Introduction

The cell cycle consists in the assembly of a number of processes by which a mother cell replicates itself into two daughter cells. Among them, DNA replication and mitosis define two clearly distinct phases in the eukaryotic cell cycle: the S period for DNA replication and the M period for mitosis and cytokinesis. These phases are separated by two gaps that close the cycle, called G1 and G2. All cells divide following a similar version of the typical cycle as defined by these four periods, although their length and timing may differ considerably among cell types.

Much advance in the knowledge of the cell cycle at the molecular level has come from the study of yeast, in which genetic manipulation is much easier than in higher eukaryotic cells. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* are unicellular fungal eukaryotes with a relatively small DNA content and still their cycle is very similar to that of more complex eukaryotic cells. Knowing the mechanisms by which eukaryotic cells regulate their cycle has a double interest: oncogenesis is a process deeply related to cell cycle control and this implication will eventually help to develop strategies against cancer. Besides, establishing key differences between fungi and higher eukaryotes with regard to cell cycle regulation may also contribute to the development of new therapeutic drugs against fungal infections. For a more comprehensive view of cell cycle regulation, the reader is addressed to reviews published recently by Cross et al. (6), Forsburg and Nurse (12) and Reed (26).

Similarly to higher eukaryotes, *S. cerevisiae* regulates the cell cycle primarily at a late point in the G1 stage of the cycle, called START. At this point, yeast cells check physiological signals and external parameters such as nutrient availability or the presence of mating pheromones, before proceeding to next stages of the cycle. In other words, it is only at this point that yeast cells are able to take different development options, i.e. conjugate to enter the diploid cycle, undergo meiosis to come back to a haploid cycle, or stop growth when nutritionally deprived (Fig. 1). Once cells have traversed START three different processes are initiated: DNA replication, bud formation and spindle-body duplication. The fact that the mitotic spindle is initiated so early makes the S and M phases overlap so that the G2 phase of the typical cell cycle becomes insignificant in *S. cerevisiae*.

Molecular apparatus of START and positive controls

Several G1 cyclins are involved in yeast cell cycle control at START: *CLN1* and *CLN2* cyclins are highly homologous to each other and partially homologous to the product of *CLN3* (5, 16, 21). These three G1 cyclins show distant homology with cyclins of higher eukaryotes,

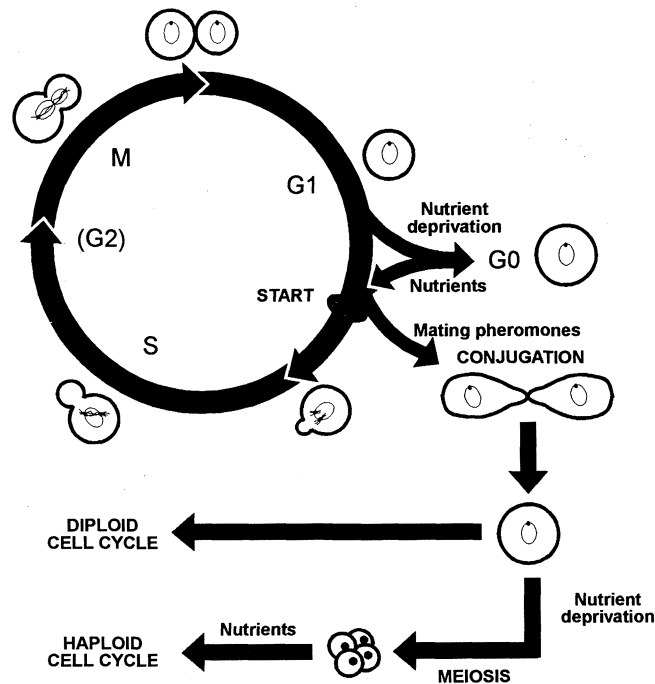


Fig. 1. The *Saccharomyces cerevisiae* life cycle. Haploid and diploid cell cycles are essentially similar and the two cell types grow and divide by budding through the four phases of the typical eukaryotic cell cycle. Cell cycle arrest by mating pheromones and conjugation are unique features of the haploid cell cycle. In addition, while haploid cells enter a G0 state nutritionally deprived, diploid cells are committed to a meiotic cycle and sporulation.

and may be functionally redundant in regulating START, since only one of the three genes must remain functional for cells be able to pass START and remain viable (28). More recently, three new putative G1 cyclins have been found, although their specific role *in vivo* is not so well characterized as that of the *CLN* cyclins; they are the products of *HCS26* (23), *CLB5* and *CLB6* (11, 29).

CLN cyclins regulate START by activating a p34 protein kinase, the product of the *CDC28* gene of *S. cerevisiae* (27). Activation involves physical association between the cyclin and the kinase catalytic subunit. Thus, it has been demonstrated that Cln2 and Cln3 are unstable proteins that form complexes with Cdc28 (7, 34, 37). The amounts of Cln1 and Cln2 fluctuate along the cell cycle reaching a maximum at G1 (33, 37). Since this oscillation parallels the fluctuation of the respective mRNAs, Cln1 and Cln2 appear to be subject to transcriptional regulation. In contrast, the levels of the *CLN3* transcript and product (33) are constant throughout all stages of the cell cycle. Based on this fact, as well as on other differences in the control of G1 cyclins (8, 22, 35), it has been proposed that Cln3 is not a G1 cyclin redundant to Cln1 and Cln2, but instead an upstream activator of the latter two cyclins (33). As a consequence of the accumulation and subsequent degradation of at least Cln1 and Cln2 at late G1, a peak of Cdc28 protein kinase activity is reached before START, which would regulate the pass through this point by phosphorylating specific substrates (Fig. 2).

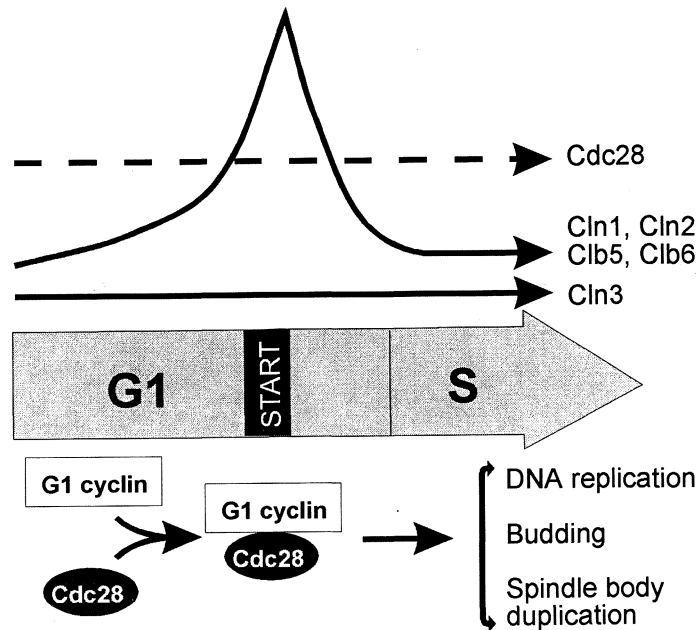


Fig. 2. G1-cyclin expression at START. While Cln3 levels are constant, all other G1-cyclins (Cln1, Cln2, Clb5 and Clb6) accumulate during G1 to activate the Cdc28 kinase by direct association. Once a critical amount of the Cdc28-G1 cyclin complexes is attained, cells are irreversibly committed to start a new cell cycle, and at least three different processes are initiated: DNA replication, budding and spindle-body duplication.

Yeast cells lacking two of the three *CLN* cyclins (28) or containing hyperstable mutant *CLN2* or *CLN3* cyclins (5, 28, 21, 30) are respectively larger or smaller than wild type cells, which reflects the rate-limiting role of G1 cyclins at START. Oscillation of Cln1 and Cln2 through the *S. cerevisiae* cell cycle depends upon the products of *SWI4* and *SWI6*. The promoter regions of *CLN1* and *CLN2* contain a number of SCB elements (Swi4-Swi6 cell cycle box, CACGAAA) that are recognized by protein complexes containing Swi4 and Swi6 (22, 23). In *swi4* and *swi6* mutants, transcription of *CLN1* and *CLN2* is reduced but not eliminated (22). However, the periodicity of transcription of these cyclin genes is lost in *swi6* mutants (10, 19), indicating that integrity of the SCB-binding factor seems to be essential for oscillatory expression of *CLN1* and *CLN2*. Recent experiments demonstrate that Swi4 and Swi6 proteins carry out separate functions in the SCB-binding complex, Swi4 being the component directly responsible of SCB binding and Swi6 being the responsible for transcriptional periodicity (1, 25). *SWI4* transcription is itself cell cycle regulated (2) through promoter elements that are *SWI6*-dependent (13). Based on genetic experiments, it has been proposed (8, 22, 23) that Cln1/Cln2, Swi4/Swi6 and Cdc28 form a positive feed-back loop that would explain the sudden increase of G1 cyclin activities at START (Fig. 3).

While SCB elements seem to be only required to produce a burst of *CLN* expression at START, the MCB sequence (*MluI* cell cycle box, ACGCGTNA) is responsible for temporal expression of another pair of G1 cyclins, *CLB5* and *CLB6* (29), and other genes involved in DNA replication (17), including *POL1* (DNA polymerase alpha) and *TMP1* (thymidylate synthetase). MCB elements are bound by Mbp1, a protein similar to Swi4, and Swi6 (18), which confers temporal expression to the genes driven by MCB elements (Fig. 3).

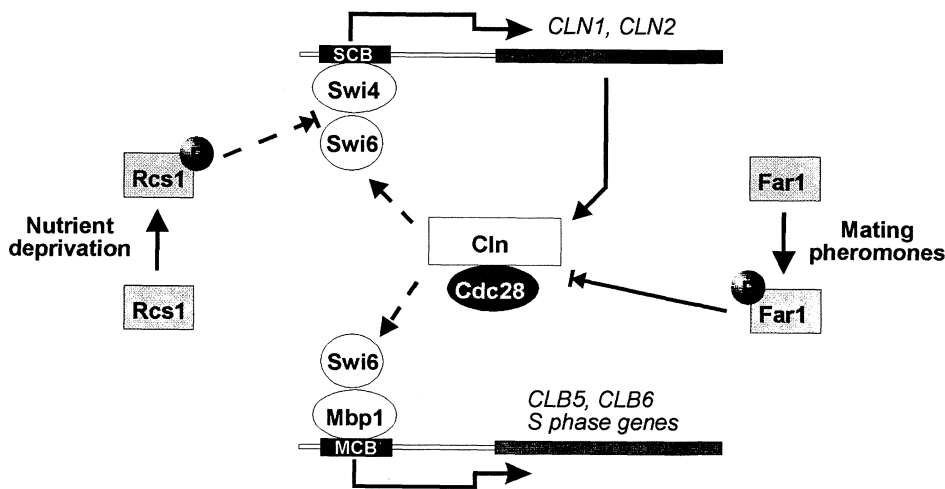


Fig. 3. The molecular network of START. G1-cyclin accumulation at START occurs as a result of a positive feed-back loop involving the Cdc28 kinase, Cln1 and Cln2, and the Swi4 and Swi6 transcriptional factors. After a first increase in Cln activity (perhaps mediated by Cln3), the resulting activity of the Cdc28-Cln complex would activate, by a yet unknown mechanism, the Swi4-Swi6 transcriptional complex, which would in turn increase Cln levels to close the positive feed-back loop. At the same time, the Cdc28-Cln complex would activate the Mbp1-Swi6 transcription factor to increase transcription of several genes involved in DNA replication. It is not known whether Clb5 and Clb6 cyclins also participate in the Cln feed-back loop or if they perform a similar loop through MCB. Cell cycle arrest produced by mating pheromones leads to phosphorylation of Far1, which blocks Cln accumulation by direct association to the Cdc28-Cln complex. In contrast, the phosphorylated form of Rcs1 produced by nutrient starvation would arrest cell cycle at START by blocking the Swi4-Swi6 transcription factor.

G1 arrest and negative controls

G1 cyclin expression, the rate-limiting process for traversing START, has been shown to respond to those circumstances by which yeast cells take alternative developmental fates. On the one hand, mating pheromones produce a G1 arrest to proceed to the formation of a diploid

cell (Fig. 1), which will eventually enter the diploid cell cycle. On the other hand, nutrient deprivation also causes a G1 arrest. Haploid cells respond to nutrient deprivation by entering a resting state, the G0 phase, and diploid cells commit their cycle to meiosis and spore formation, which will enter the haploid cell cycle once nutrients are present again (Fig. 1). Two pathways have been implicated so far in repressing G1 cyclin expression when yeast cells are challenged to the corresponding mating pheromone (the STE signal transduction pathway), or when deprived from nutrients (the *RAS*-cAMP pathway).

The signal transduction pathway activated by mating pheromones (see 20 for a review) is initiated by binding of the pheromone to an integral membrane receptor protein that is coupled to a heterometric G protein. Signal propagation takes place by an unknown mechanism that induces a MAP-kinase system, which is directly involved in the activation of several proteins by phosphorylation (Fig. 4). Regarding cell cycle arrest, the last kinase, Fus3, phosphorylates Far1 and a transcriptional factor coded for by *STE12*, which in turn increases the expression levels of the *FAR1* gene. Finally, the phosphorylated form of Far1 is able to bind to Cdc28-Cln complexes (24) thus presumably blocking G1-cyclin accumulation at the feed-back loop level (Fig. 3).

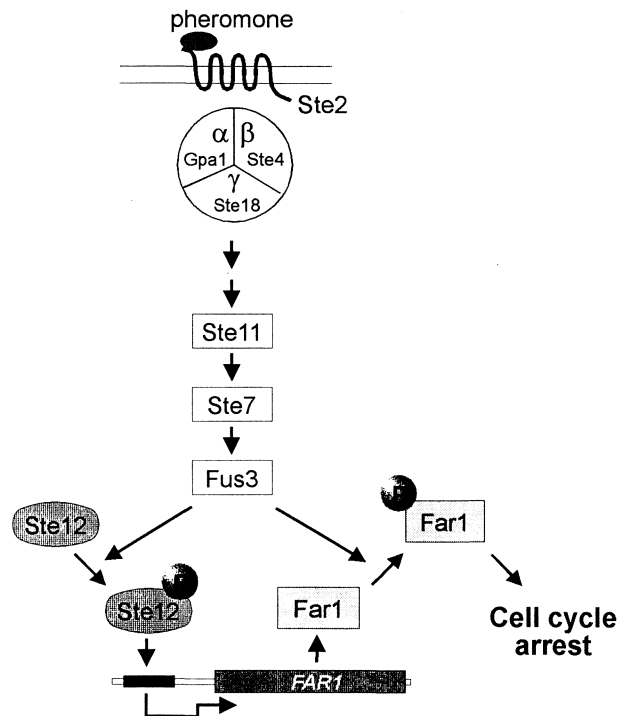


Fig. 4. The mating pheromone pathway. Mating pheromones activate a transmembrane receptor, Ste2, which transmits the signal through a trimeric G protein to what appears to be a MAP kinase cascade comprising Ste11, Ste7 and Fus3. Regarding only cell cycle arrest, the Fus3 kinase produces a dual effect: increased levels of Far1 by activation of the Ste12 transcriptional factor and, also, phosphorylation of Far1, which then blocks G1-cyclin accumulation producing a cell cycle arrest.

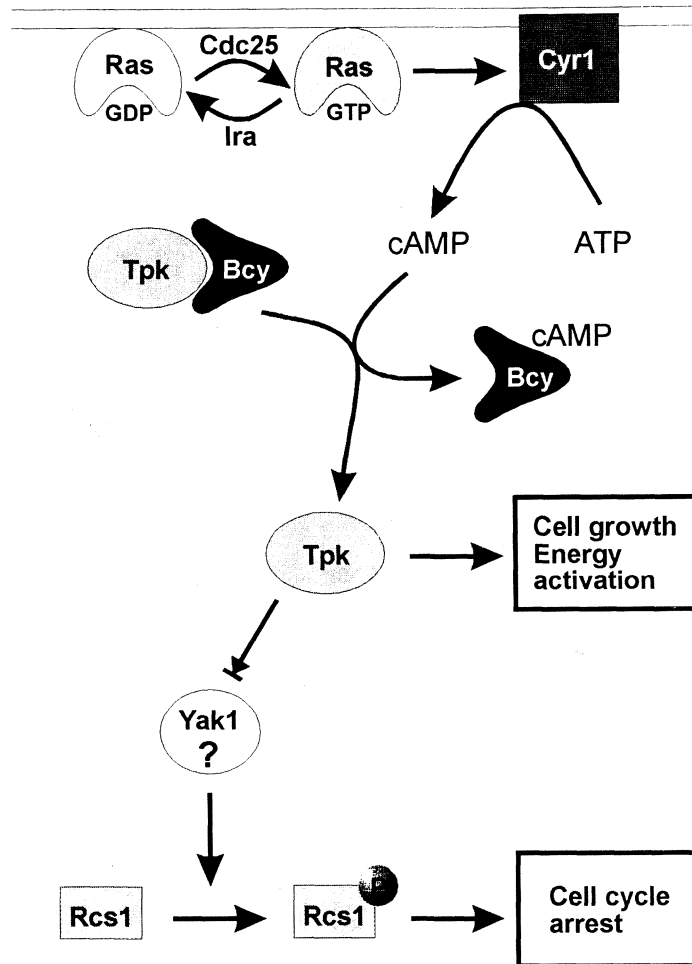


Fig. 5. The *RAS*-cAMP pathway. Nutrient availability seems to be sensed in yeast cells by different mechanisms that have not been well characterized yet. In any event, the presence of nutrients such as glucose correlates with a high level of the Ras protein in its activated form, i.e. coupled to GTP. Two antagonistic factors are involved in Ras activation: Cdc25 is the exchange factor required to activate Ras, and the Ira proteins modulate the intrinsic GTPase activity of Ras to return to its non active form, i.e. coupled to GDP. The signal is transmitted to Cyr1, the yeast adenylyl cyclase, to reduce high intracellular levels of cAMP, which activates the Tpk protein kinase by association to a repressor subunit called Bcy. Tpk is responsible for the activation of a number of metabolic enzymes related to cell growth but there is no evidence for a direct link between Tpk activity and G1-cyclin expression. Our observations suggest that Tpk could antagonize a different protein kinase, perhaps Yak1, which would be responsible for Rcs1 phosphorylation and, as a consequence, produce a cell cycle arrest when the *RAS*-cAMP pathway is being turned off by nutrient starvation.

Although pathways linking nutrient deprivation to cell cycle control have not been well characterized yet, it is clear that changes in the activity of the *RAS*-cAMP pathway (32, 36) play an important role in cessation of proliferation when yeast cells are nutritionally deprived. This pathway leads to activation of the cAMP-dependent protein kinase A (Tpk), which directly regulates the activity of other proteins by phosphorylation (Fig. 5). However, it is not known at present whether a *RAS*-mediated regulation of G1-cyclin expression exists (3, 31). *RCSI* is a *S. cerevisiae* gene first identified by its implication in cell size control (15). Recently, we have found that G1-cyclin expression is downregulated by the *RCSI* gene product when glucose is being exhausted from the growth medium, and that this repression takes place when the Rcs1 protein becomes phosphorylated (to be published elsewhere). In addition, yeast cells lacking Rcs1 do not show stable transcriptional complexes on SCB, suggesting that Rcs1 is directly involved with both Swi4 and Swi6 in G1-cyclin regulation at the transcriptional level (Fig. 3). The fact that the *RAS*-cAMP pathway is progressively turned off when nutrients are becoming limiting suggests that Rcs1 could be phosphorylated by a kinase antagonistic to Tpk, whose activity could be in turn downregulated by Tpk. Such a kinase may well be Yak1 (Fig. 5), which is induced by phosphorylation in many instances of early arrest in G1 (14). We do not know at present whether Yak1 is the direct responsible for Rcs1 phosphorylation, but we have preliminary data suggesting that this may hold true at least in conditions where the *RAS*-cAMP pathway is being inactivated.

Similar roles for Far1, Rcs1 and the retinoblastoma protein

Both Far1 and Rcs1 are involved in restraining cell growth under special circumstances in yeast, and the two proteins do so by direct interaction with the key molecules that govern the cell cycle control at START. A functional homologue, the retinoblastoma protein (Rb), exerts a very similar role in regulating cell cycle entry in human cells (see 4 for a review), although its precise role at the molecular level has not been established yet. The Rb protein is temporally phosphorylated after mitogen stimulation (9), this process being analogous to the phosphorylation of Far1 and Rcs1. However, there are some interesting differences that may reflect particular needs of the yeast and human cell cycles. While Far1 and Rcs1 arrest cell cycle progression under their phosphorylated forms, Rb exerts its blocking effect only in the unphosphorylated state. Yeast cells normally tend to enter the cell cycle as long as nutrients are available and mating is not possible. Under these conditions, both Far1 and Rcs1 would remain in the "normal" unphosphorylated state. On the contrary, the majority of cells in a multicellular organism must rest in a quiescent state regarding cell division and, in this situation, Rb would also remain unphosphorylated to block entry into the cell cycle.

Acknowledgments

We thank Lidia Piedrafita for excellent technical assistance. This work was supported by grant PB91-0237 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología to E. H.; C. C. and C. G. acknowledge fellowships from the Universitat de Lleida and the Spanish Government, respectively.

References

1. Andrews, B. J., Moore, L. A. (1992). Interaction of the yeast Swi4 and Swi6 cell cycle regulation proteins in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11852–11856.
2. Breeden, L., Mikesell, G. (1991). Cell cycle-specific expression of the *SWI4* transcription factor is required for the cell cycle regulation of *HO* transcription. *Genes Dev.* **5**, 1183–1190.
3. Broach, J. R. (1991). *RAS* genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. *Trends Genet.* **7**, 28–33.
4. Cobrinik, D., Dowdy, S. F., Hinds, P. M., Mittnacht, S., Weinberg, R. A. (1992). The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends Biol. Sci.* **17**, 312–315.
5. Cross, F. (1988). *DAF1*, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **8**, 4675–4684.
6. Cross, F., Roberts, J., Weintraub, H. (1989). Simple and complex cell cycles. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 341–395.
7. Cross, F. R., Blake, C. M. (1993). The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. *Mol. Cell Biol.* **13**, 3266–3271.
8. Cross, F. R., Tinkelenberg, A. H. (1991). A potential positive feedback loop controlling *CLN1* and *CLN2* gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* **65**, 875–883.
9. De Caprio, J. A., Furukawa, Y., Ajchenbaum, F., Griffin, J. D., Livingston, D. M. (1992). The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1795–1798.
10. Dirick, L., Moll, T., Aver, H., Nasmyth, K. (1992). A central role for *SWI6* in modulating cell cycle start-specific transcription in yeast. *Nature* **357**, 508–513.
11. Epstein, C. B., Cross, F. R. (1992). CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev.* **6**, 1695–1706.
12. Forsburg, S. L., Nurse, P. (1991). Cell cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 227–256.
13. Forster, R., Mikesell, G. E., Breeden, L. (1993). Multiple *SWI6*-dependent *cis*-acting elements control *SWI4* transcription through the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **13**, 3792–3801.
14. Garret, S., Menold, M. M., Broach, J. R. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* *YAK1* gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **11**, 4045–4052.
15. Gil, R., Zueco, J., Sentandreu, R., Herrero, E. (1991). *RCSI*, a gene involved in controlling cell size in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 1–14.
16. Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Richardson, H. E., de Barros-Lopes, M., Reed, S. I. (1989). A family of cyclin homologs that control the G₁ phase in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6255–6259.
17. Johnston, L. H., Lowndes, N. F. (1992). Cell cycle control of DNA synthesis in budding yeast. *Nucleic Acid Res.* **20**, 2403–2410.
18. Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H., Nasmyth, K. (1993). A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G₁ to S phase. *Science* **261**, 1551–1557.
19. Lowndes, N. F., Johnson, A. L., Breeden, L., Johnston, L. H. (1992). *SWI6* protein is required for transcription of the periodically expressed DNA synthesis genes in budding yeast. *Nature* **357**, 505–508.
20. Marsch, L., Neiman, A. M., Herskowitz, I. (1991). Signal transduction during pheromone response in yeast. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 699–728.
21. Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., Futcher, A. B. (1988). The *WHI*⁺ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.* **7**, 4335–4346.

22. Nasmyth, K., Dirick, L. (1991). The role of *SWI4* and *SWI6* in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* **66**, 995–1013.
23. Ogas, J., Andrews, B. J., Herskowitz, I. (1991). Transcriptional activation of *CLN1*, *CLN2*, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by *SWI4*, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* **66**, 1015–1026.
24. Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G., Herskowitz, I. (1993). *FAR1* links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* **73**, 747–760.
25. Primig, M., Sockanathan, S., Aver, H., Nasmyth, K. (1992). Anatomy of a transcription factor important for the start of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **358**, 593–597.
26. Reed, S. I. (1992). The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 529–561.
27. Reed, S. I., Hadwiger, J. A., Lorincz, A. T. (1985). Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene *CDC28*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4055–4059.
28. Richardson, H. E., Wittenberg, C., Cross, F., Reed, S. I. (1989). An essential G₁ function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell* **59**, 1127–1133.
29. Schwob, E., Nasmyth, K. (1993). *CLB5* and *CLB6*, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **7**, 1160–1175.
30. Sudbery, P. E., Goodey, A. R., Carter, B. L. A. (1980). Genes which control proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **288**, 401–404.
31. Thevelein, J. M. (1992). The *RAS*-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antoine van Leeuwenhoek* **62**, 109–130.
32. Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **50**, 277–287.
33. Tyers, M., Tokiwa, G., Futcher, B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G₁ cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.* **12**, 1955–1968.
34. Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R., Futcher, B. (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J.* **11**, 1773–1784.
35. Valdivieso, M. H., Sugimoto, K., Jahng, K. Y., Fernandes, P. M. B., Wittenberg, C. (1993). *FAR1* is required for posttranscriptional regulation of *CLN2* gene expression in response to mating pheromone. *Mol. Cell Biol.* **13**, 1013–1022.
36. Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **57**, 383–401.
37. Wittenberg, C., Sugimoto, K., Reed, S. I. (1990). G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34^{CDC28} protein kinase. *Cell* **62**, 225–237.

Intracellular glycosylation and active efflux as mechanisms for resistance to oleandomycin in *Streptomyces antibioticus*, the producer organism

José A. Salas,* César Hernández,¹ Carmen Méndez, Carlos Olano, Luis M. Quirós, Ana M. Rodríguez, Carmen Vilches

Área Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo

Summary

Resistance to macrolides in producing organisms can be achieved by target site modification, intracellular inactivation of the antibiotic or active efflux mechanisms for the excretion of the antibiotic. The oleandomycin producer, *Streptomyces antibioticus*, possesses oleandomycin-sensitive ribosomes all along the cell cycle. However, it contains an intracellular glycosyltransferase capable of inactivating oleandomycin in the presence of UDP-glucose as cofactor. The correspondent gene (*oleD*) has been cloned and sequenced and the glycosyltransferase purified. Two other genes (*oleB* and *oleC*) that confer oleandomycin resistance have been cloned and characterized and both encode ABC (ATP-Binding Cassette) transporters. These may constitute the excretion mechanism throughout which the glycosylated oleandomycin is excreted. A second enzyme activity has been purified from culture supernatants of the oleandomycin producer that releases the glucose from the inactive glycosylated oleandomycin generating active antibiotic. This enzyme would probably catalyse the last step in the biosynthesis of oleandomycin.

Key words: Macrolides, antibiotic resistance, *Streptomyces*, efflux mechanism, glycosylation.

Resumen

Los organismos productores de macrólidos son resistentes al antibiótico que producen modificando el sitio de acción, inactivando intracelularmente el mismo mediante un mecanismo activo de excreción del antibiótico. El productor de oleandomicina, *Streptomyces antibioticus*,

* *Correspondence to:* José A. Salas. Área Microbiología. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. 33006 Oviedo. Tel.: 985-103652. Fax: 985-5103534.

¹ *Present address:* Dpto. de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D. F.

posee ribosomas sensibles a oleandomicina a lo largo del ciclo de desarrollo. Sin embargo, contiene una glucosiltransferasa intracelular capaz de inactivar oleandomicina en presencia de UDP-glucosa como cofactor. El gen correspondiente (*oleD*) ha sido clonado y secuenciado y la glucosiltransferasa purificada. Otros dos genes (*oleB* y *oleC*) que confieren resistencia a oleandomicina han sido clonados y caracterizados. Ambos codifican proteínas de transporte («ABC transporters: “ATP-Binding Cassette”») y pueden representar el mecanismo de excreción a través del cual se excreta la oleandomicina inactiva glucosilada. Se ha purificado una segunda actividad enzimática de los sobrenadantes de cultivos del productor de oleandomicina, capaz de liberar la glucosa de la oleandomicina glucosilada generando antibiótico activo. Esta enzima podría probablemente catalizar el último paso en la biosíntesis de oleandomicina.

Introduction

Macrolides constitute a group of antibiotics characterized by containing a macrocyclic lactone ring. The different families of macrolides differ in the number of elements in the lactone ring and in the sugars or amino sugars which are attached to it. Some examples of macrolides (Fig. 1) are methymycin (12-membered), erythromycin and oleandomycin (14-membered) and carbomycin, spiramycin and tylosin (16-membered), many of which have clinical applications in the treatment of several bacterial infections. They are inhibitors of protein synthesis by interacting with the 50S ribosomal subunit. Biologically, they are synthesized mainly by actinomycetes belonging to the genera *Streptomyces*, *Saccharopolyspora* and *Micromonospora*. They belong to the polyketide family since their lactone skeleton is synthesized by successive condensation of acyl-derivatives in a series of reactions catalysed by a polyketide synthase (Fig. 1).

Antibiotic producers synthesizing autotoxic molecules must face the problem of self-resistance during antibiotic biosynthesis. To achieve this they have developed several strategies: modification of the antibiotic target site, synthesis of the antibiotic as an inactive molecule and active efflux mechanisms for the secretion of the antibiotic (for a review see reference 2). Oleandomycin is a macrolide antibiotic structurally closely related to erythromycin. It contains a 14-membered lactone ring (oleandolide) with one amino sugar (desosamine) and one sugar (oleandrose) attached. In this paper we reviewed the different resistance mechanisms developed by macrolide producers and especially how the oleandomycin producer, *Streptomyces antibioticus*, defends itself against the potential effects of its toxic product.

Resistance involving methylation of rRNA is extended among macrolide producers

The first resistance mechanism described in macrolide producers was that responsible for erythromycin resistance in *Saccharopolyspora erythraea*, formerly *Streptomyces erythreus* (17). This organism possesses ribosomes that are constitutively resistant to erythromycin due

to the presence of a ribosomal methylase. This enzyme dimethylates a single adenine residue (A-2058) in the 23S rRNA (18). The gene encoding this methylase (*ermE*) was cloned and characterized (20) and found to be the only resistance gene in this organism (24). However, in the last few years, some examples have been described where are several genes conferring macrolide resistance in a macrolide producer and many of these genes have been cloned and characterized (Table 1). In *S. fradiae*, a tylosin producer, four resistance genes have been cloned (1, 27) and at least two of them (*tlrA* and *tlrD*) codify ribosomal modifying methylases. Both methylases introduce methyl groups in the same residue of the 23S rRNA (A-2058) but there are two important differences between them: the *tlrA* product is inducible and dimethylates A-2058 (25) while the *tlrD* product is constitutive and monomethylates A-2058 (27). Another gene (*carB*) from a carbomycin producer, *S. thermotolerans*, also monomethylates A-2058 and the ribosomal resistance phenotype that generates clearly resembles that of *ermE* (3,26). However, not all macrolide producers seem to possess a ribosomal resistance mechanism. Ribosomes of *S. antibioticus*, oleandomycin producer, bind tritiated oleandomycin at the same extent than those of *S. albus* G (an oleandomycin sensitive specie) (5). In addition, the activity of the ribosomes in a coupled transcription-translation system was inhibited by oleandomycin

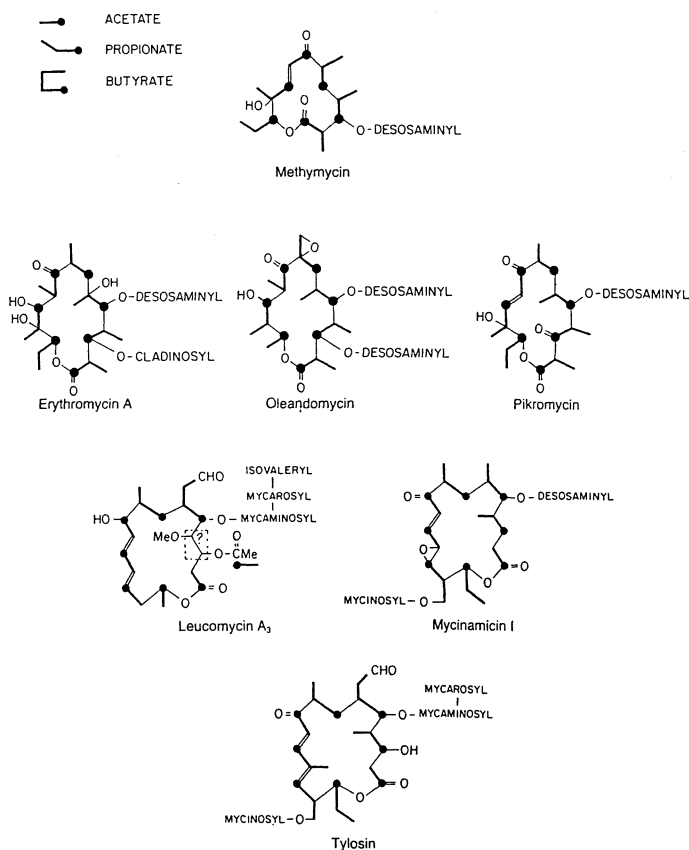


Fig. 1. Molecular structures of different macrolides showing the acyl-derivatives forming part of the lactone ring.

TABLE 1
MACROLIDE RESISTANCE GENES FROM MACROLIDE PRODUCERS

Producer	Gene	Resistance mechanism	References
<i>Sac. erythraea</i>	<i>ermE</i>	Ribosomal methylase	17, 20
<i>S. thermotolerans</i>	<i>carA</i>	Active efflux	16
	<i>carB</i>	Ribosomal methylase	3
<i>S. ambofaciens</i>	<i>srmA</i>	Unknown	13
	<i>srmB</i>	Active efflux	6, 13
	<i>srmC</i>	Unknown	13
<i>S. fradiae</i>	<i>tlrA</i>	Ribosomal methylase	25
	<i>tlrB</i>	Unknown	1
	<i>tlrC</i>	Active efflux	15
	<i>tlrD</i>	Ribosomal methylase	27
<i>S. antibioticus</i>	<i>oleA</i>	Unknown	14
	<i>oleB</i>	Active efflux	12, 14
	<i>oleC</i>	Active efflux	14
	<i>oleD</i>	Glycosylation	8

independently of the phase of the growth curve and even when the ribosomes were obtained during oleandomycin biosynthesis (5). These results suggest that *S. antibioticus* should have another resistance mechanism different from target site modification.

***S. antibioticus* presents a triphasic pattern of resistance**

Cultures of *S. antibioticus* are highly resistant to oleandomycin (MIC >200 µg/ml) but they are not cross-resistant to other macrolides. When growth is initiated with a spore suspension as inoculum, the growth curve shows a typical triphasic pattern of resistance: spores and old oleandomycin-producing mycelium are highly resistant to oleandomycin, while young non-producing mycelium is sensitive (21). Thus, spores turn sensitive to oleandomycin during germination and resistance develops immediately before oleandomycin biosynthesis starts.

Inactivation of oleandomycin by glycosylation in *S. antibioticus*

Recently, a new resistance mechanism has been reported in *S. antibioticus*. We have found (22) that cell-free extracts of this organism possess the ability of inactivating oleandomycin when the extracts are supplemented with UDP-glucose as cofactor. Oleandomycin is not the

only macrolide that can be inactivated by this glycosyltransferase (Table 2). Macrolides of different number of elements in the lactone ring can be inactivated: methymycin (12-membered), oleandomycin and lankamycin (14-membered) and rosaramicin (16-membered). However, an essential required requisite is the existence of a free 2'-hydroxyl group in the desosamine attached to the lactone ring but as a monosaccharide and not as part of a disaccharide (Table 2). The involvement of this hydroxyl group in the inactivation was demonstrated by the absence of inactivation of troleandomycin (a triacetylated oleandomycin derivative) that possesses an acetyl group in substitution of the 2'-hydroxyl group. The enzyme has been recently purified as a polypeptide of approximately 51 kD (L. M. Quirós and C. Hernández, unpublished results). A 3.4 kb DNA region from *S. antibioticus* containing the glycosyltransferase gene (*oleD*) has been cloned and sequenced (8). Analysis of the sequence revealed the presence of three translationally coupled open reading frames (Fig. 2): (i) the first one (ORF1) shows six transmembrane domains characteristic of integral membrane proteins and an amino acid sequence characteristic of integral inner-membrane proteins; (ii) the second one (ORF2) possesses a leader peptide characteristic of secreted proteins and a lipid attachment site motif which is present in prokaryotic membrane lipoproteins containing a signal peptide which is cleaved by a specific lipoprotein signal peptidase; (iii) the third one (*oleD*) encodes the glycosyltransferase directly responsible for the inactivation of oleandomycin.

TABLE 2
SUBSTRATE PROFILE OF THE *S. antibioticus* GLYCOSYLTRANSFERASE

Macrolide	Ring ¹	2' -OH ²	Inactivation ³
Methymycin	12	+ , M	+
Oleandomycin	14	+ , M	+
Troleandomycin	14	- , M	-
Erythromycin	14	+ , M	-
Lankamycin	14	+ , M	+
Carbomycin	16	+ , D	-
Josamycin	16	+ , D	-
Niddamycin	16	+ , D	-
Relomycin	16	+ , D	-
Rosaramicin	16	+ , M	+
Spiramycin	16	+ , D	-
Tylosin	16	+ , D	-

¹ Number of elements in the lactone ring.

² Presence (+) or absence (-) of a free 2'-OH group in the desosamine moiety of the macrolide, forming part of a monosaccharide (M) or a disaccharide (D).

³ Inactivation of the macrolides was tested by bioassay against *Micrococcus luteus* or by the transfer of ³H-glucose from UDP-³H-glucose.

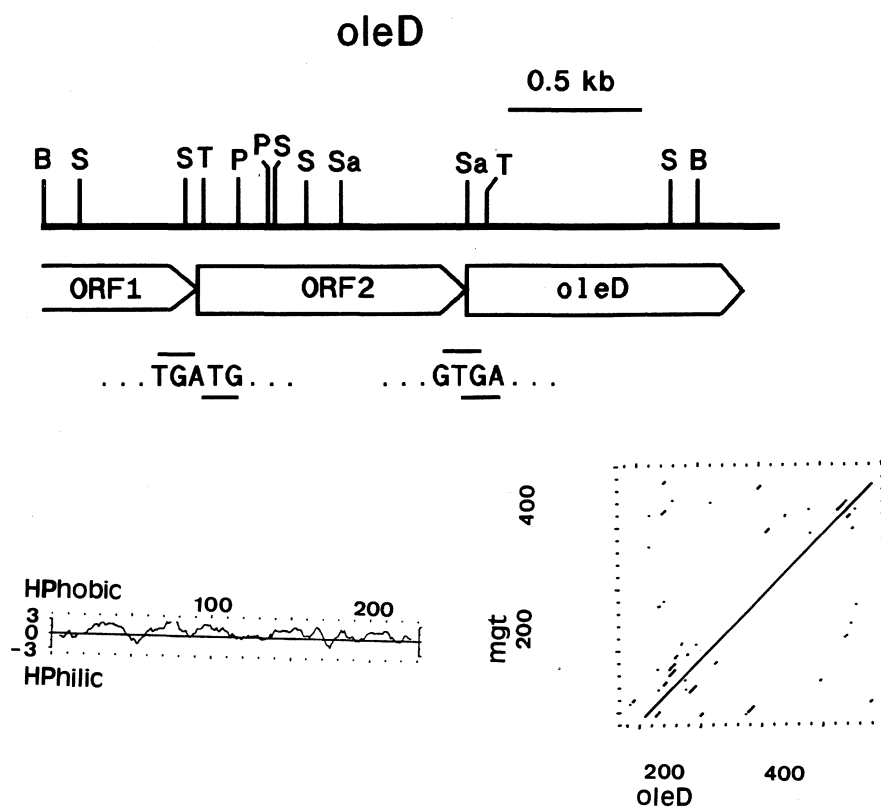


Fig. 2. Genetic organization of the *oleD* region. The different ORFs present in the sequenced DNA are indicated and the overlapping between the stop and starting codons of the different genes. The low left part of the figure shows the hydrophobicity profile of ORF1. The low right part shows a DOTPLOT alignment between the *oleD* gene and a macrolide glycosyltransferase (*mgt*) from *S. lividans* (11).

Extracellular reactivation of oleandomycin by *S. antibioticus*

Interestingly, a second enzyme activity is detected in the culture supernatants of *S. antibioticus* (22). This activity is capable of acting on the inactive glycosylated oleandomycin releasing the glucose moiety and therefore recovering the antibiotic activity. This enzyme activity has been purified from the culture supernatants of *S. antibioticus* (L. M. Quirós and C. Hernández, unpublished results) as a polypeptide of 87 kD. During purification, a second peak of activity can also be detected containing a polypeptide of 34 kD. Recent experimental evidence suggests that this polypeptide could correspond to a degradation product originated by the action of a specific protease on the larger polypeptide (L. M. Quirós, unpublished observations). This reactivating activity appeared in the culture supernatants immediately before oleandomycin biosynthesis begins. An interesting feature of this reactivating activity is the substrate specificity. In contrast to the glycosyltransferase that can act on several macrolides, the reactivating activity is much more specific and, among different glycosylated macrolides, only reactivates glycosylated oleandomycin.

	Walker Motif A	Loop 3	Walker Motif B
	GxxGxGK	SxG	hhhHDEPT
<i>drrA</i>	GLVYGILGPNAGKSTTIRMLATLLRPDGG ...	YSGMRRRLDIAASIVVTPDELLLEDEPTTGLD	
<i>msrA</i> (N)	FEKIALIGGNGTGKTTLLNMQTKKPESG ...	MSGGKAKYKLANVISNYSPIILLLEDEPTNHL	
<i>msrA</i> (C)	GKNIALVGANGVGKTTLEAIYHQIEGDC ...	LSGGERTKLSLAVLFSTKANMLLEDEPTNFD	
<i>tlrC</i> (N)	GEKAGIIGDNGAGKSTLLRLLAGEERPDA ...	LSGGERSRLALAAATLASQPPELLLEDEPTN	
<i>tlrC</i> (C)	AERLLITGPNAGKSTLLSVLAGELESPDAG ...	LSYGQRRRIELARLVSEPVQLLLEDEPTNHL	
<i>carA</i> (N)	GEKVGVIIDNGSGKSTLIKLIAGREQPDNG ...	LSGGERSRLALAAATLASEPELLLEDEPTN	
<i>carA</i> (C)	GERLLVTGPNAGKSTLLRVLSGELEPD ...	LSYGQRRRIELARLVTEFPVLLLEDEPTN	
<i>srmB</i> (N)	GEKVGVIIDNGSGKSTLLKILAGRVEPDNG ...	LSGGERSRLALAAATLASSPELLLEDEPTN	
<i>srmB</i> (C)	GERLLVTGPNAGKSTLLRVLSGELEPD ...	LSYGQRRRIELARLVSDPMDLLEDEPTN	
<i>oleB</i> (N)	GERVGIIGENGSGKSTLLRMLAGVDRPD ...	LSGGEQARLNLAACLLAASPOLMLLEDEPT	
<i>oleB</i> (C)	GERILITGHNGAGKSTLLRVLAGDLAPDQ ...	LSTGQLRRLALARLLRDPADLLEDEPTN	
<i>oleC</i>	GTVMVGLGPNAGKSTLVRILSTLITPDSG ...	YSGMRRRLDLAASMIGRPAVLYLLEDEPT	

Fig. 3. Alignment of the amino acid sequence around the Walker motifs of different ABC transporters involved in macrolide resistance. x indicates any amino acid. h indicates a hydrophobic amino acid. N and C indicate the aminus and carboxy termini of the proteins. *carA*, carbomycin resistance in *S. thermotolerans* (16); *drrA*, daunorubicin resistance in *S. peucetius* (7); *srmB* spiramycin resistance in *S. ambofaciens* (6); *tlrC* tylosin resistance in *S. fradiae* (15); *oleB*, oleandomycin resistance in *S. antibioticus* (12); *oleC*, oleandomycin resistance in *S. antibioticus* (14).

Efflux mechanism for excretion of glycosylated oleandomycin and impermeability to oleandomycin

Another contribution to oleandomycin resistance in *S. antibioticus* comes from the existence of active efflux mechanisms that could export the inactive glycosylated oleandomycin and also pumping out the active oleandomycin coming back to the cell. From a library of *S. antibioticus* chromosomal DNA in the *Streptomyces* multicopy plasmid vector pIJ702 we have cloned three different nonoverlapping DNA fragments that confer resistance to oleandomycin in *S. lividans* and in *S. albus* G (14). Two of these clones have been sequenced and found that the resistance genes (*oleB* and *oleC*) encode proteins belonging to the ABC transporters superfamily (ATP-Binding-Cassette) also known as traffic ATPases (9, 10). These proteins are characterized by containing a conserved amino acid region of about 200 amino acids long which represents the ATP-binding domain and that includes two well-conserved motifs designated as Walker A and B (23). They utilize the energy from ATP hydrolysis to pump substrates across the membrane against a concentration gradient and participate either in the import or in the export of many different compounds (sugars, amino acids, oligopeptides, drugs, antibiotics, ions, proteins, etc). The ABC transporters require the participation of four membrane-associated domains: two highly hydrophobic domains, each normally containing six membrane-spanning segments, and two hydrophilic domains peripherally located at the cytoplasmic face of the membrane and that contain the ATP-binding domain and the ability to couple ATP hydrolysis to the transport process. The two ABC transporters of *S. antibioticus* encoded by *oleB* and *oleC* are different both in structure and organization. The *oleB* product is a polypeptide of about 62 kD that contains a duplicated ATP-binding domain with two Walker A and two Walker B motifs (12) while the *oleC* product (about 35 kD) contains a single ATP-binding domain (14) with one Walker A and B motifs (Fig. 3). The *oleC* gene shows a great similarity with a gene involved in resistance to daunorubicin in *S. peucetius* (7) and is translationally coupled to another gene (ORF5) encoding a protein which presents six

membrane-spanning segments and possibly is an integral membrane protein (Fig. 4). In contrast, no gene encoding a membrane protein was found adjacent to *oleB* (Fig. 5). Specific polyclonal antibodies raised against protein fusions between the *Escherichia coli lacZ* gene and inframe DNA regions of the two ABC transporters were used in Western blot analysis to know the cell location of the two ATP-binding proteins. Both gene products were found in the soluble fraction of *S. antibioticus* with no direct association with the cell membrane (A. M. Rodríguez, unpublished results). Some other genes encoding ABC transporters have been described conferring macrolide resistance in other macrolide producers: *carA* in a carbomycin producer, *S. thermotolerans* (16), *srmB* in a spiramycin producer, *S. ambofaciens* (6), and *tlrC* in a tylosin producer, *S. fradiae* (15). An interesting aspect related to the ABC transporters is substrate specificity. In most of the ABC transporters described there is no evidence that the ATP-binding domains contribute directly to substrate specificity and it is assumed that substrate recognition resides on transmembrane segments (10). Among the different macrolides tested, *oleB* and *oleC* only confer resistance to oleandomycin and, furthermore, subcloning experiments demonstrated that the only presence of the gene encoding the ATP-binding protein is sufficient to confer resistance to oleandomycin when introduced either in *S. lividans* or in *S. albus*. To explain these results one should admit either that substrate specificity resides in the ATP-binding domains and not in the membrane protein or that there should be an integral membrane protein (conferring substrate specificity) in the two different hosts used for subcloning (*S. lividans* and *S. albus*). This latter hypothesis seems to be more improbable but a definitive prove should come from the construction of different chimeric proteins between several ABC transporters and from studies of binding of the antibiotic to the ATP-binding proteins.

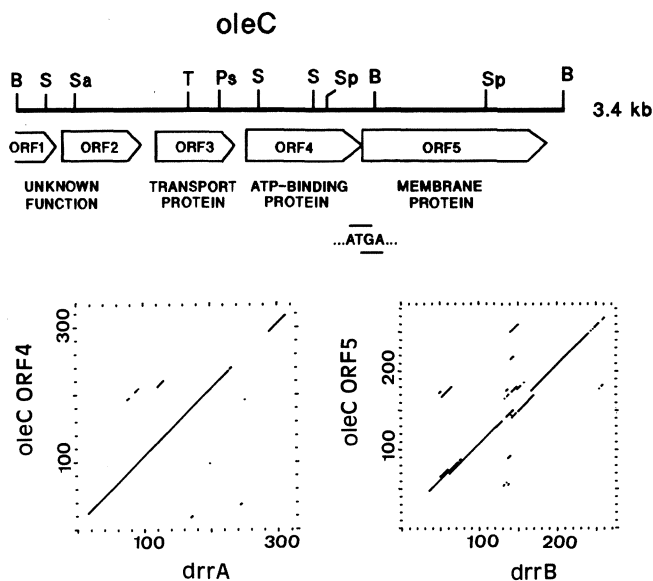


Fig. 4. Genetic organization of the *oleC* region. The different ORFs present in the sequenced DNA are indicated and the overlapping between the stop and starting codons of some genes. The lower plots represent DOTPLOT alignments between the ATP-binding proteins of *S. antibioticus* (*oleC* ORF4) and between the correspondent membrane proteins (*oleC* ORF5 and *drrB*).

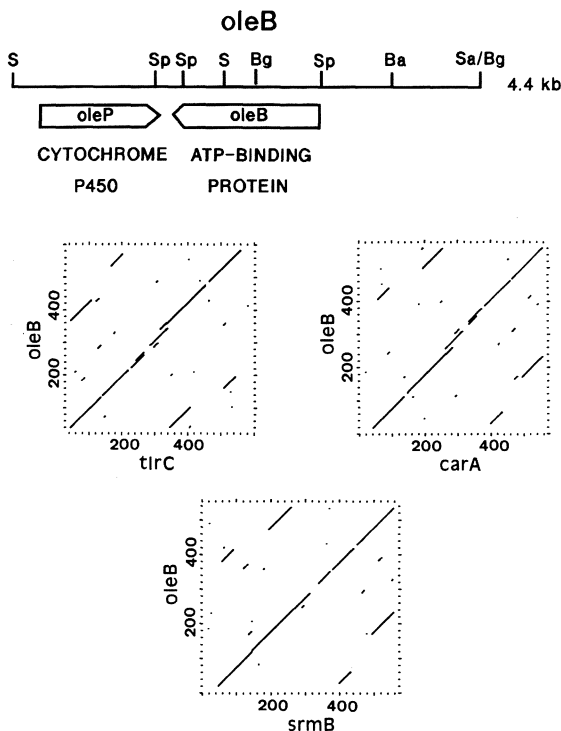


Fig. 5. Genetic organization of the *oleB* region. The DOTPLOT alignments show the similarity between the *oleB* product and the equivalent genes from the tylosin (*tirC*), carbomycin (*carA*) and spiramycin (*srmB*) producers.

Another characteristic of the mycelium of the oleandomycin producer is the existence of a permeability barrier that avoids the exogenous oleandomycin in its way back to the mycelium (5). This feature is also observed in the spiramycin, tylosin and carbomycin producers (4).

Linkage between oleandomycin resistance and biosynthetic genes

In most of the antibiotic biosynthetic pathways studied, genes encoding resistance are closely linked to the biosynthetic genes. A screening of a library of *S. antibioticus* chromosomal DNA in the bifunctional cosmid pKC505 (13) by in situ colony hybridization revealed the close proximity between two of the resistance genes, *oleA* and *oleC* (14), that were contained in the same cosmids. The third resistance gene, *oleB*, is only separated by about 8 kb from a large gene (10.5 kb) encoding one of the three multifunctional polypeptides of the oleandomycin polyketide synthase responsible for the biosynthesis of the oleandomycin lactone ring (19). In addition, genes involved in the biosynthesis of the oleandroside and desosamine moieties of oleandomycin molecule are located in other group of cosmids which share some DNA homology with the group of cosmids above mentioned (C. Olano, unpublished results) and therefore it is supposed that the complete oleandomycin pathway should comprise a large piece of chromosomal DNA, perhaps around 100 kb.

Concluding remarks

Ribosomal methylation is used by different macrolide producers as a self-resistance mechanism for survival during antibiotic production. In the oleandomycin producer, *S. antibioticus*, such a ribosomal-mediated resistance has not been found. On the basis of the existence of an intracellular glycosyltransferase capable of inactivating oleandomycin, a model is proposed here (Fig. 6) to explain how oleandomycin biosynthesis must proceed and the way the producer organism avoids its suicide. It is tempting to speculate that possibly the natural substrate of the glycosyltransferase could be an intermediate in the oleandomycin biosynthetic pathway and the glycosylation of this precursor would avoid the presence of intracellular active antibiotic during biosynthesis. Thus, the final intracellular product would be an inactive glycosylated oleandomycin that would be excreted through the cell membrane using the two membrane-linked ABC transporters in a process coupled to ATP hydrolysis. As a final step in the biosynthesis, the extracellular reactivating activity would release the glucose moiety from the glycosylated oleandomycin thus producing active antibiotic. Survival of the producer strain, which possesses oleandomycin-sensitive ribosomes, would be ensured by the impermeability of the mycelium to exogenous oleandomycin. Therefore, resistance to oleandomycin in *S. antibioticus* would be the consequence of a cooperative participation between intracellular glycosylation of a biosynthetic intermediate and an active efflux excretion mechanism.

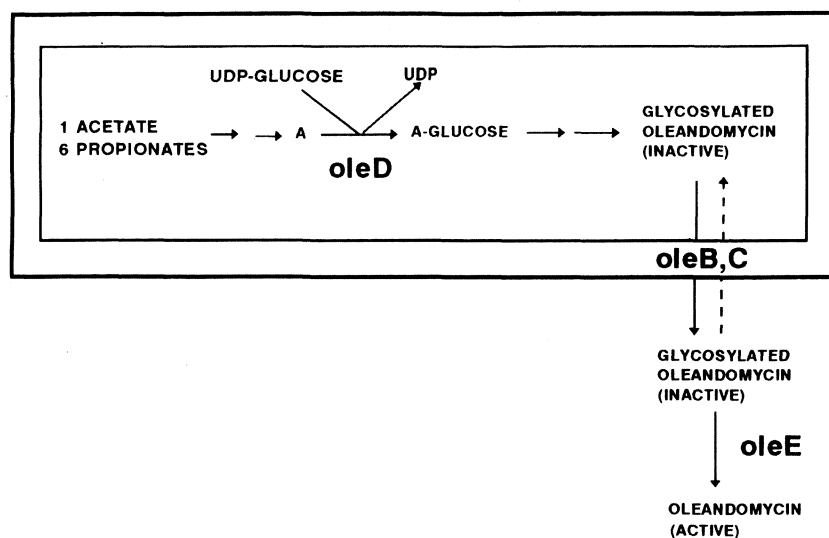


Fig. 6. Model proposed for the biosynthesis of glycosylated oleandomycin, its excretion and extracellular reactivation by *S. antibioticus*.

Acknowledgments

This research has been supported by grants of the CICYT (projects BI091–0758 and PB91–0336) and of the FICYT (Asturias, Spain) through predoctoral fellowships to C. O. and C. V. Work by A. M. R. was also supported by a fellowship of the FICYT (Asturias, Spain). L. M. Q. was supported by a postdoctoral fellowship of the Ministry of Education and Science (Spain). C. H. was supported by the S. N. I. and COFAA-IPN (México).

References

1. Birmingham, V. A., Cox, K. L., Larson, J. L., Fishman, S. E., Hersberger, C. L., Seno, E. T. (1986). Cloning and expression of a tylosin resistance gene from a tylosin-producing strain of *Streptomyces fradiae*. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 532–539.
2. Cundliffe, E. (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**, 207–233.
3. Epp, J. K., Burgett, S. G., Schöner, B. E. (1987). Cloning and nucleotide sequence of a carbomycin-resistance gene from *Streptomyces thermotolerans*. *Gene* **53**, 73–83.
4. Fierro, J. F., Hardisson, C., Salas, J. A. (1988). Involvement of cell impermeability in resistance to macrolides in some producer streptomycetes. *J. Antibiot.* **41**, 142–144.
5. Fierro, J. F., Hardisson, C., Salas, J. A. (1987). Resistance to oleandomycin in *Streptomyces antibioticus*, the producer organism. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1931–1939.
6. Geistlich, M., Losick, R., Turner, J. R., Rao, N. R. (1992). Characterization of a novel regulatory gene governing the expression of a polyketide synthase gene in *Streptomyces ambofaciens*. *Mol. Microbiol.* **6**, 2019–2029.
7. Guilfoile, P. G., Hutchinson, C. R. (1991). A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8553–8557.
8. Hernández, C., Olano, C., Méndez, C., Salas, J. A. (1993). Characterization of a *Streptomyces antibioticus* gene cluster encoding a glycosyltransferase involved in oleandomycin inactivation. *Gene* **134**, 139–140.
9. Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P. C., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W., Hermodson, M. A. (1986). A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**, 448–450.
10. Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67–113.
11. Jenkins, G., Cundliffe, E. (1991). Cloning and characterisation of two inducible resistance genes from *Streptomyces lividans*, responsible for resistance to lincomycin and macrolide antibiotics. *Gene* **108**, 55–62.
12. Olano, C., Rodríguez, A. M., Méndez, C., Salas, J. A. (1994). Characterization of *oleB*, a second ABC transporter involved in oleandomycin resistance in *Streptomyces antibioticus*. (in preparation).
13. Richardson, M. A., Kuhstoss, S., Solenberg, P., Schauss, N. A., Nagaraja, R. N. (1987). A new shuttle cosmid vector, pKC505, for streptomycetes: its use in the cloning of three different spiramycin-resistance genes from a *Streptomyces ambofaciens* library. *Gene* **61**, 231–241.
14. Rodríguez, A. M., Olano, C., Vilches, C., Méndez, C., Salas, J. A. (1993). *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin resistance determinants one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. *Mol. Microbiol.* **8**, 571–582.

15. Rosteck, P. R., Reynolds, P. A., Hersberger, C. L. (1991). Homology between proteins controlling *Streptomyces fradiae* resistance and ATP-binding transport. *Gene* **102**, 27–32.
16. Schöner, B., Geistlich, M., Rosteck, P., Rao, R. N., Seno, E., Reynolds, P., Cox, K., Burgett, S., Hersberger, C. L. (1992). Sequence similarity between macrolide-resistance determinants and ATP-binding transport proteins. *Gene* **115**, 93–96.
17. Skinner, R. H., Cundliffe, E. (1982). Dimethylation of adenine and the resistance of *Streptomyces erythreus* to erythromycin. *J. Gen. Microbiol.* **123**, 2411–2416.
18. Skinner, R. H., Cundliffe, E., Schmidt, F. J. (1983). Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. *J. Biol. Chem.* **258**, 12702–12706.
19. Swan, D. G., Rodríguez, A. M., Vilches, C., Méndez, C., Salas, J. A. (1993). Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. *Mol. Gen. Genet.* **242**, 358–362.
20. Thompson, C. J., Ward, J. M., Hopwood, D. A. (1982). Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. *J. Bacteriol.* **151**, 668–677.
21. Vilches, C., Méndez, C., Hardisson, C., Salas, J. A. (1990). Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus* influence of nutritional conditions and development of resistance. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1447–1454.
22. Vilches, C., Hernández, C., Méndez, C., Salas, J. A. (1992). Role of glycosylation and deglycosylation in the biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism, *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **174**, 161–165.
23. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gray, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **8**, 945–951.
24. Weber, J. M., Leung, J. O., Maine, G. T., Potenz, R. H. B., Paulus, T. J., Dewitt, J. P. (1990). Organization of a cluster of erythromycin genes in *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Bacteriol.* **172**, 2372–2383.
25. Zalacain, M., Cundliffe, E. (1989). Methylation of 23S rRNA caused by *tlrA* (*ermSF*), a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **171**, 4254–4260.
26. Zalacain, M., Cundliffe, E. (1990). Methylation of 23S ribosomal RNA due to *carB*, an antibiotic-resistance determinant from the carbomycin producer, *Streptomyces thermotolerans*. *Eur. J. Biochem.* **189**, 67–72.
27. Zalacain, M., Cundliffe, E. (1991). Cloning of *tlrD*, a fourth resistance gene, from the tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Gene* **97**, 137–142.

Agrupación de los genes de biosíntesis y resistencia a antibióticos β -lactámicos en actinomicetos productores de cefamicina C

Paloma Liras,* Juan J. R. Coque, Javier García-Calzada, Francisco J. Pérez Llarena, Rosa E. Cardoza

Área de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de León

Summary

Three genes related to β -lactam resistance have been found in the cluster of genes for cephamycin C biosynthesis in *Nocardia lactamdurans*. The *cmcT* gene encodes a hydrophobic protein located in the cytoplasmic membrane. The sequence of CMCT has a 21–31% identity in amino acids to proteins involved in antibiotic export from other antibiotic producing microorganisms. The *pbp* gene encodes a penicillin binding protein. *Nocardia lactamdurans* is rather sensitive to penicillins, but not to cephalosporins or cephamycin C. A third gene, *bla*, encodes a type A β -lactamase. Both the β -lactamase and the PBP protein, might form a system for the sensing and hydrolysis of penicillin intermediates which are released into the medium during the lysis of antibiotic producing cells.

Key words: Actinomycetes, gene clusters, antibiotic biosynthesis, β -lactams, cephamycin C.

Resumen

En el conjunto de genes de biosíntesis de cefamicina C se han localizado tres genes que pueden tener relación con mecanismos de resistencia en *Nocardia lactamdurans*. El gen *cmcT* codifica una proteína hidrofóbica localizada en la membrana citoplásmica. La secuencia de aminoácidos de CMCT tiene una identidad de entre 21 y 31% con proteínas implicadas en la exportación de antibióticos en otras cepas productoras. El gen *pbp* codifica una proteína de unión a penicilina, lo que concuerda con el hecho de que *Nocardia lactamdurans* es una cepa sensible a penicilinas, pero no a cefalosporinas. Un tercer gen, *bla*,

* *Correspondence to:* Paloma Liras. Área de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de León. 24071 León. Tel.: 987-291504. Fax: 987-291506.

codifica una β -lactamasa de tipo A. La β -lactamasa y la proteína PBP pueden constituir un sistema doble, sensor y de hidrólisis, de penicilinas que son intermediarios en la biosíntesis de cefamicina C y que pueden liberarse al medio de cultivo si se produce lisis de células que están produciendo cefamicina activamente.

Introducción

Es un fenómeno bien conocido que las cepas productoras de antibióticos, a fin de asegurar su supervivencia, son resistentes al antibiótico que producen. La resistencia puede ser temporal, produciéndose solamente en aquellas etapas del cultivo en las que se sintetiza el antibiótico, y generalmente los niveles de resistencia son proporcionales al nivel de producción de antibiótico de la cepa.

Existen diferentes mecanismos de resistencia en las cepas productoras (5): (i) La resistencia puede deberse a modificación del antibiótico por acetilación (como en el productor de puromicina, *Streptomyces alboniger*) (9), por fosforilación (en *Streptomyces griseus*, productor de estreptomina) (6) o por glicosilación (en *Streptomyces antibioticus*, productor de oleandomicina). Generalmente, en estos casos los productos modificados son intermediarios biosintéticos intracelulares que pierden su actividad antibiótica debido a la modificación; durante la última etapa biosintética, generalmente por hidrólisis, se forma el antibiótico activo, no modificado, que se excreta. En estos casos el gen de resistencia es un gen biosintético; este mecanismo exige que el antibiótico excretado no penetre de nuevo en las células del microorganismo productor o bien que existan mecanismos de bombeo que aseguren un nivel intracelular de antibiótico muy bajo (véase más adelante). (ii) En otros casos, los microorganismos productores de antibióticos poseen modificada la diana sobre la que actúa el antibiótico. Tal es el caso de la DNA girasa en *Streptomyces sphaeroides*, productor de novobiocina (11), o de la sintetasa de ácidos grasos en *Cephalosporium caerulens*, productor de cerulenina. (iii) Finalmente, un mecanismo muy extendido de resistencia, que frecuentemente va unido a algunos de los mecanismos antes citados, es el bombeo y exclusión del antibiótico de las células del microorganismo productor, lo que permite mantener un nivel intracelular de antibiótico muy bajo (10).

Desde que se descubrió que los genes de biosíntesis de antibióticos están agrupados, se han descrito múltiples casos en los que genes de resistencia se encuentran presentes en el conjunto ("cluster") de genes biosintéticos (Tabla 1). En ciertos casos se ha encontrado más de un gen de resistencia, como sucede en el "cluster" de genes de la tetraciclina o de la puromicina.

En todos los casos citados anteriormente la diana del antibiótico está presente en el citoplasma y el mecanismo de resistencia va dirigido a proteger la diana intracelular. Sin embargo, la situación es diferente en los antibióticos β -lactámicos, que interfieren, desde el exterior de la célula, con el entrecruzamiento del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Este tipo de pared sólo existe en los actinomicetos productores de cefamicinas; los hongos productores de penicilinas y cefalosporinas son naturalmente resistentes debido a su naturaleza eucariótica. Por ello se había teorizado "a priori" que no se encontrarían genes de resistencia asociados a los genes de biosíntesis de β -lactamas, ya que si en actinomicetos existieran genes capaces de codificar β -lactamasas, el antibiótico producido se hidrolizaría irreversiblemente.

TABLA 1
MECANISMOS DE RESISTENCIA EN CEPAS PRODUCTORAS DE ANTIBIÓTICOS

	Mecanismo	Microorganismo	Antibiótico producido
MODIFICACIÓN DEL ANTIBIÓTICO	3' APH, 3AAC	<i>S. fradiae</i>	Neomicina
	AAC (6')	<i>S. kanamyceticus</i>	Kanamicina
	SPH	<i>S. griseus</i>	Estreptomina
	Glicosilasas	<i>S. antibioticus</i>	Oleandomicina
	Acetiltransferasa	<i>S. hygroscopicus</i>	Bialafos
	Acetiltransferasa	<i>S. alboniger</i>	Puromicina
MODIFICACIÓN DE LA DIANA DEL ANTIBIÓTICO	DNA girasa	<i>S. sphaeroides</i>	Novobiocina
	RNA polimerasa	<i>N. mediterranei</i>	Rifamicina
	Metilación rRNA	<i>S. azureus</i>	Thioestreptona
		<i>S. fradiae</i>	MSL
	Sintetasa de ácidos grasos	<i>C. caeruleus</i>	Cerulenina
EXCLUSIÓN DEL ANTIBIÓTICO		<i>S. rimosus</i>	Tetraciclina
		<i>S. lividans</i>	Metilnomicina

Resistencia a antibióticos β -lactámicos en actinomicetos productores

En *Nocardia lactamdurans* existe una esterasa que actúa sobre compuestos β -lactámicos. Se trata de una cefalosporina C-acetil hidrolasa (CAH) extracelular, muy abundante en los cultivos en condiciones de producción de cefamicina C. Una enzima análoga había sido descrita en *Streptomyces clavuligerus* (2) y *Cephalosporium acremonium*. La CAH no actúa sobre el grupo carbamoilo en C-3 de las cefamicinas (véase Fig. 1a), pero es capaz de eliminar el acetilo presente en la misma posición en la cefalosporina C (y en otras cefalosporinas) originando desacetilcefalosporina C, un compuesto con menor actividad antibiótica. La esterasa de *Nocardia lactamdurans* es insensible a PMSF (a diferencia de las β -lactamasas); su K_m respecto a cefalosporina C es alta (7mM) y su papel como enzima responsable de resistencia no está plenamente demostrado (R. E. Cardoza, resultados no publicados).

En nuestro laboratorio se han analizado los "clusters" de genes de biosíntesis de cefamicina C de dos actinomicetos productores, *N. lactamdurans* y *S. clavuligerus* (3; F. J. Llarena, resultados no publicados) sin que el gen de la esterasa haya sido localizado en ninguno de ellos.

En el genoma de *N. lactamdurans* se han identificado 13 marcos de lectura (Fig. 1b) que codifican enzimas biosintéticas, un posible gen regulador (*cmcR*) y tres ORF (*pbp*, *bla* y *cmcT*), que de alguna forma pueden tener relación con la resistencia a antibióticos β -lactámicos.

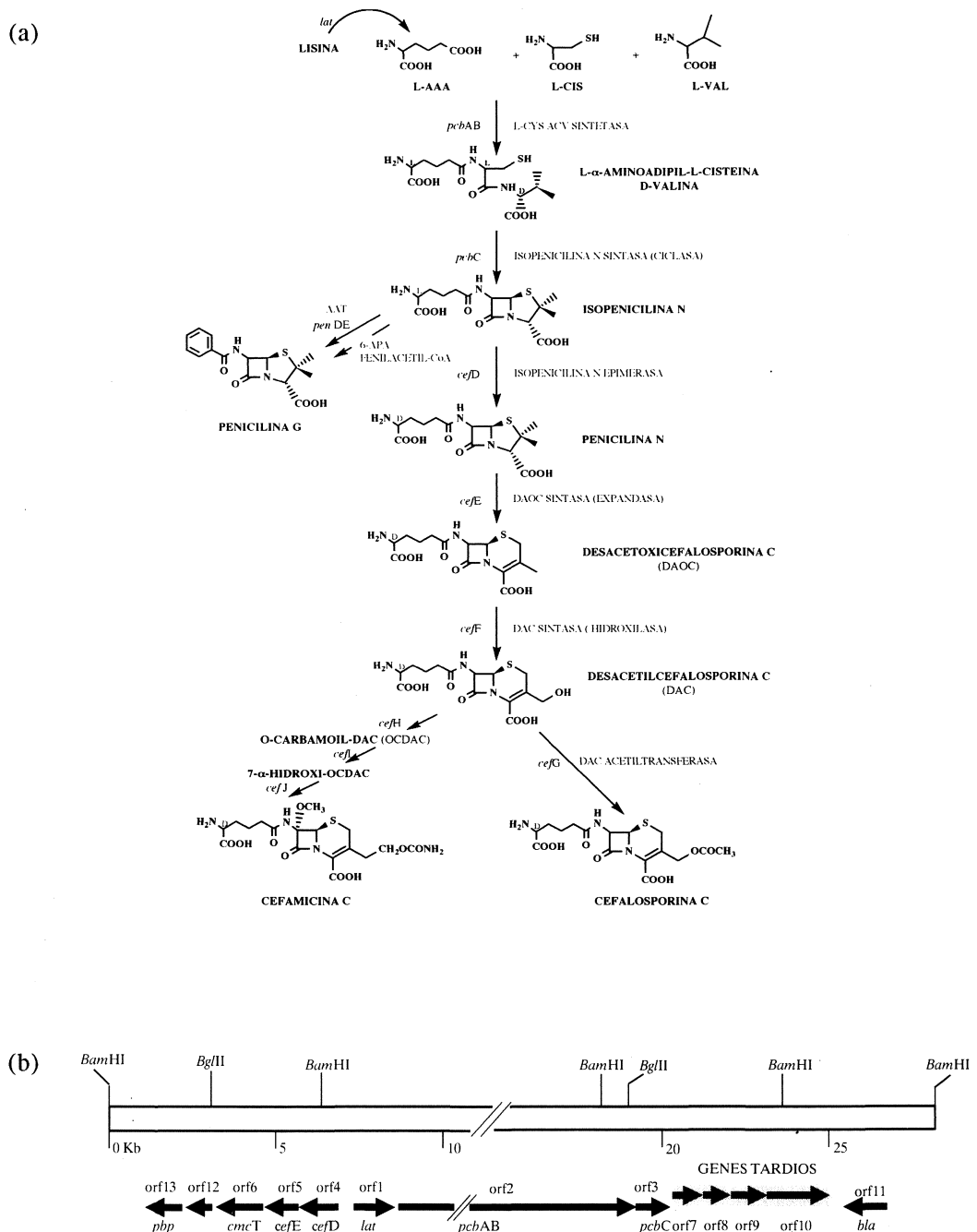


Fig. 1. (a) Vía biosintética de penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas. (b) Conjunto de genes de biosíntesis de cefamicina C de *Nocardia lactamdurans*. Las enzimas que codifican estos genes se muestran en la Fig. 1a. El gen *lat* codifica la lisina-6-aminotransferasa implicada en biosíntesis de α-aminoadípico. El resto de los genes codifican proteínas que pueden ser reguladoras o están implicadas en el transporte o en la resistencia a β-lactamas.

La proteína codificada por el gen *pbp* es 24,7% idéntica con la secuencia de aminoácidos de la D-alanil, D-alanina carboxipeptidasa de *Streptomyces* R61 (8). A diferencia de ésta, no es extracelular, por lo que carece del péptido guía característico de las proteínas que se excretan. El extremo carboxilo de esta proteína de unión a penicilina (PBP_{cef}) muestra secuencias capaces de formar α -hélices transmembranales. Por ello, se purificaron membranas de *N. lactamdurans* y de *Streptomyces lividans* [pUL702-PBP_a], que contienen el gen *pbp* en el plásmido multicopia pIJ702. Un ensayo de unión de ¹⁴C-penicilina a las proteínas de membrana mostró que *Nocardia lactamdurans* posee 8 proteínas que unen penicilina (PBPs), de las que la de Mr aparente 45000 (en SDS-PAGE), peso similar al deducido de la secuencia de aminoácidos del gen *pbp* (Mr 40500), se incrementa notablemente en el transformante *S. lividans* [pUL702-PBP_a]. Estudios de competición entre la cefalosporina C y ¹⁴C-penicilina por la proteína PBP_{cef} muestran que ésta no une cefalosporina (y presumiblemente tampoco el análogo cefamicina C), por lo que en el caso de *N. lactamdurans* este gen más que tener un papel estricto en la resistencia podría ser un sensor de la presencia de penicilinas en el medio ambiente extracelular.

El gen *cmcT* codifica una proteína de Mr deducido 49300 y un pI de 11,6. Este alto pI es consecuencia indirecta del alto contenido (51%) en aminoácidos hidrofóbicos de la proteína. En la secuencia de aminoácidos existen 11 segmentos hidrofóbicos transmembranales característicos, y la proteína posee un alto porcentaje de identidad con proteínas que confieren resistencia a metilenomicina (MmR, 31,7%), actinorrodina (producto de actII-ORF2, 31,7%), tetraciclina (producto de *otrB*, 24,5%) o puromicina (PUR-8, 21,6%). Todas estas proteínas parecen estar implicadas en el bombeo de dichos antibióticos al espacio periplásmico. En *N. lactamdurans* el papel de la proteína codificada por *cmcT* sería la exportación de la cefamicina C, más que la resistencia a la misma, ya que, como se indicó previamente, este antibiótico actúa sobre el entrecruzamiento del peptidoglicano en el espacio periplásmico.

N. lactamdurans BLA

VADRRRVHAWARARPAAPEPAPPTPSAAA [↓] PSVAPGPAATPPDPAVEQEFTRLQ [↑] TQYDARLGL	62
A RR A P A A A A A L ARLG	
YAVDTGSGESVAFRADERFAFAST [*] FKALAAA [*] VLDSTTPQQLDQVVRYSKDELLENSPITKD	124
YA TG G VA RADERFAF STFKALAAA [*] VL L V SP T D	
HVATGMTLRELCDAAVRFSD [~] NTAGNLLLKHVGGPQGLDAALTA [~] VGDEVTSADRWE [~] PELNSAV	186
H ATG T LCDAA R SD TAGNLL GGP L A L GD V D EPELN	
PGDVRDTSTPRALAHDLRQFVLGDALAEDDRALLTDWLR [~] RNTTGGTVIRAGVPADWVVGDKT	248
P D RDT TPRA A D R VLGDAL D RALLTDWL RNTTGG IRAGVP W V DKT	
GSGYYGGRNDIAVLWPPNRAPIVMAVMTSREEPRAKRADALLADAARVAVTALG	302
G G YG NDI [~] AVLWPP P V AVM R R L A V L	

Fig. 2. Secuencia de aminoácidos de la β -lactamasas (BLA) de *N. lactamdurans*. Los aminoácidos comunes con la β -lactamasas de *S. clavuligerus* se indican debajo. La flecha indica el procesamiento del péptido guía. Con una línea se indican las 4 secuencias conservadas en todas las β -lactamasas del tipo A.

Una β -lactamasa está codificada en el cluster de genes de biosíntesis de cefamicina C

La presencia de una β -lactamasa en *N. lactamdurans* era predecible debido a la necesidad de añadir PMSF, un inhibidor de serina proteasas, para llevar a cabo ensayos de enzimas de la vía biosintética en los que el producto final detectado es una penicilina, por ejemplo el ensayo de la isopenicilina N sintasa (4). El gen *bla* ha sido localizado en el extremo derecho del "cluster" (Fig. 1b); codifica una β -lactamasa de 302 aminoácidos y Mr 32054. En la posición 85 de la secuencia se encuentra el residuo serina presente en el centro activo de todas las β -lactamasas y pueden apreciarse las cuatro regiones conservadas típicas de estas enzimas (Fig. 2), así como la secuencia del péptido guía (29 aminoácidos) implicado en la secreción.

TABLA 2
SIMILITUD DE LA β -LACTAMASA DE *Nocardia lactamdurans* CON OTRAS β -LACTAMASAS DE TIPO A

Origen	Identidad (%)	Aminoácidos comparados
Secuencia consenso AMBLER	52,7	296
<i>Streptomyces badius</i>	52,1	292
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	51,8	278
<i>Streptomyces cacaoi blaU</i>	51,7	290
<i>Actinomadura R39</i>	51,2	285
<i>Streptomyces albus</i>	45,2	279
<i>Streptomyces fradiae</i>	44,4	302
<i>Streptomyces cellulosae</i>	42,6	272
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	41,9	284
<i>Streptomyces lavendulae</i>	41,7	300
<i>Streptomyces cacaoi ULg</i>	46,7	306
<i>Bacillus cereus</i> 5/B	51,5	259
<i>Serratia marcescens</i>	50,6	259
<i>Yersinia enterocolitica</i>	45,0	262
<i>Citrobacter diversus</i>	45,6	259
<i>Klebsiella oxytoca</i>	43,7	279
<i>Escherichia coli</i> R-TEM	43,4	228
<i>Lysobacter enzymogenes</i>	43,3	284
<i>Staphylococcus aureus</i>	35,0	263
<i>Enterobacter faecalis</i>	35,0	263
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39,8	259
<i>Rhodobacter capsulata</i>	34,8	273
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PSE-4	34,5	255

Cuando se crece *N. lactamdurans* en el medio de producción de cefamicina C (NYG suplementado con $MgCl_2$), la β -lactamasa se produce muy pronto durante la fermentación, alcanzando su valor máximo a las 36 horas de cultivo (3); la adición de penicilina G origina un aumento de actividad enzimática de hasta 7 veces. Esta enzima extracelular, parcialmente inducible, está localizada entre la membrana y la pared celular, detectándose muy poca actividad en el medio de cultivo. La secuencia de aminoácidos de la proteína es muy similar a la de β -lactamasas de otras especies de *Streptomyces*, (Tabla 2); siendo todas ellas de tipo A (7), es decir son activas frente a penicilinas, pero no frente a cefalosporinas o cefamicinas (Tabla 3).

TABLA 3
ESPECIFICIDAD DE LA β -LACTAMASA DE *Nocardia lactamdurans*

Substrato	Antibiótico residual a distintos tiempos de tratamiento	
	2 horas	4 horas
Penicilina G	15%	0%
Ampicilina	17%	5%
Penicilina N	90%	80%
Isopenicilina N	90%	80%
Cefalosporina C (CPC)	100%	60%*
Desacetil-CPC	100%	100%
Desacetoxi-CPC	100%	100%
Cefamicina C	100%	100%
Cefoxitina	100%	100%

* Insensible a PMSF.

La presencia de un gen *bla* en los "clusters" de genes biosintéticos de cefamicina C parece ser general. En *S. clavuligerus* ha sido demostrada por secuenciación del gen correspondiente y en los productores *S. cattleya*, *S. lipmanii* y *S. griseus* mediante hibridación de ácidos nucleicos (F. J. Llerena, resultados no publicados). Esto nos llevó a plantearnos si otros *Streptomyces* descritos como productores de β -lactamasas poseen genes silenciosos para biosíntesis de cefamicina. Sin embargo, la falta de hibridación del DNA en estas cepas con sondas de genes biosintéticos (*pcbC*) permite desechar este supuesto.

N. lactamdurans posee una alta resistencia a cefalosporina C (500 μ g/ml), cuyo origen molecular aún no hemos determinado, sin embargo es sensible a penicilinas (5–10 μ g/ml), especialmente los cultivos en fase muy temprana de crecimiento. Nuestra hipótesis es que *Nocardia lactamdurans* (y probablemente otros microorganismos productores de cefamicina C excretan la β -lactamasa como mecanismo de defensa frente a penicilinas que son intermedia-

rios biosintéticos y que pudieran liberarse por lisis de células que se encontraran en fase activa de producción. La presencia de la proteína PBP_{cef} puede dotar al microorganismo de un sensor capaz de activar la expresión de la β -lactamasa, que es inducible por penicilinas, en un mecanismo similar al descrito en *Bacillus subtilis*.

Existe la hipótesis, bastante aceptada, de que los genes de producción de β -lactamasas se originaron en procariontes (1). Si esto es así, los actinomicetos pudieron ser los primeros microorganismos en tener contacto con un antibiótico β -lactámico y los primeros en requerir resistencia a los mismos. Ghuysen (8) sugiere que las β -lactamasas derivaron de PBPs que modificaron su K_m por la penicilina y se especializaron en la hidrólisis de la misma. En el momento actual sólo puede especularse si la evolución de las PBP hacia β -lactamasas se produjo en microorganismos productores de β -lactamasas o si esta evolución fue independiente y los microorganismos productores incorporaron dichos genes a sus “clusters” biosintéticos.

Bibliografía

1. Aharonowitz, Y., Cohen, G., Martín, J. F. (1992). Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: Structure, organization, regulation and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 461–495.
2. Brannon, D. R., Fukuda, D. S., Mabe, J. A., Huber, F. M., Whitney, J. G. (1972). Detection of a cephalosporin C acetyl esterase in the carbamate cephalosporin antibiotic-producing culture, *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1**, 237–241.
3. Coque, J. J. R., Liras, P., Martín, J. F. (1993). Genes for a β -lactamase, a penicillin-binding protein and a transmembrane protein are clustered with the cephamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans*. *EMBO J.* **12**, 631–639.
4. Cortés, J., Martín, J. F., Castro, J. M., Láiz, L., Liras, P. (1987). Purification and characterization of a 2-oxoglutarate-linked ATP-independent deacetoxycephalosporin C synthase of *Streptomyces lactamdurans*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 3165–3174.
5. Cundliffe, E. (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 207–233.
6. Distler, J., Mansouri, K., Peipersberg, W. (1985). Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* II. Adjacent genomic location of biosynthetic genes and one of two streptomycin resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**, 151–154.
7. Forsman, M., Häggström, B., Lindgren, L., Jaurin, B. (1990). Molecular analysis of β -lactamasas from four species of *Streptomyces*: comparison of amino acid sequences with those of other β -lactamasas. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 589–598.
8. Ghuysen, J. M. (1991). Serine β -lactamasas and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 37–67.
9. Lacalle, R. A., Ruiz, D., Jiménez, A. (1991). Molecular analysis of the *dmpM* gene encoding an O-demethyl puromycin O-methyltransferase from *Streptomyces alboniger*. *Gene* **109**, 55–61.
10. Rodríguez, A. M., Olano, C., Vilches, C., Méndez, C., Salas, J. A. (1993). *Streptomyces antibioticus* contains at least 3 oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. *Mol. Microbiol.* **8**, 571–582.
11. Thiara, A. S., Cundliffe, E. (1993). Expression and analysis of two *gyrB* genes from the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **8**, 495–506.

Molecular fingerprinting of *Salmonella typhimurium* by IS200-typing as a tool for epidemiological and evolutionary studies

Glòria Soria,^{1,2} Jordi Barbé,² Isidre Gibert*²

¹ *Laboratori de Microbiologia. Hospital General de Catalunya. Sant Cugat del Vallès, Barcelona*

² *Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona*

Summary

The aim of this work was to develop and evaluate a molecular typing strategy for *Salmonella* based on hybridization of chromosomal DNA with two different probes derived from insertion sequence IS200. Probe IS200-TT was specifically constructed for this study as a trimer of a 112 pb *TaqI*-*TaqI* fragment of IS200. Among several restriction enzymes evaluated, two were selected: *EcoRI*, which cuts the insertion sequence in two pieces, each one complementary to one of the probes used, and *PstI*, a restriction enzyme with no recognition site into IS200. With several combinations of these restriction enzymes and probes, 43 *Salmonella typhimurium* strains were analyzed for copy number and location of IS200, as well as reproducibility and stability of the patterns. IS200 types have been shown to be stable, both in strains isolated from different patients implicated in the same salmonellosis outbreak and in strains isolated from the same patient at different times or from different specimens. The discriminatory power of the method has been 0.91 to 0.94. As a comparison, *S. typhimurium* strains were also ribotyped. Discriminatory power of the ribotypes oscillated between 0.44 and 0.55, depending on the enzyme used, and achieved a 0.78 value when the information obtained with two restriction enzymes was combined. Moreover, IS200 typing was able to differentiate among a group of *S. typhimurium* strains which were identical by ribotype and enzymatic electrophoretic mobility. These results enable us to conclude that, for the stability, reproducibility and discriminatory power of the patterns generated, IS200 probes can be a very useful tool in the molecular typing of *S. typhimurium*.

Key words: *Salmonella typhimurium*, IS200-typing, fingerprinting.

* *Correspondence to:* Isidre Gibert. Departament de Genètica i de Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona). Tel.: 93-5812050. Fax: 93-5812387. E-mail: IBMIØ@ccuab.uab.es

Resumen

El objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar y evaluar una estrategia de tipificación de *Salmonella* basada en la hibridación del DNA cromosómico con diversas sondas derivadas de la secuencia de inserción IS200. Para este trabajo, se ha construido la sonda IS200-TT formada por un trímero de 112 pb *TaqI*-*TaqI* de la IS200. De las diferentes enzimas probadas se han seleccionado dos: *EcoRI*, que corta la secuencia de inserción en dos trozos, cada uno de ellos complementarios a cada una de las sondas utilizadas, y *PstI*, enzima de restricción que no presenta ninguna diana en la IS200. Con diferentes combinaciones de estas enzimas y sondas se ha analizado el número de copias y patrones de IS200 en 43 cepas de *Salmonella typhimurium*. Asimismo, se ha determinado tanto la reproducibilidad como estabilidad de dichos patrones. Dichos patrones de IS200 son estables tanto en cepas aisladas de diferentes pacientes implicados en un mismo brote de salmonelosis como en cepas procedentes de un mismo paciente a lo largo del tiempo o de diferentes especímenes. El poder de discriminación del método ha sido de 0,91 a 0,94. Además, se han comparado los ribotipos de las mismas cepas. El poder de discriminación obtenido mediante la ribotipificación ha oscilado entre 0,44 y 0,55, en función de la enzima utilizada, y ha alcanzado el valor de 0,78 combinando ambas enzimas. Además, la tipificación con la IS200 es capaz de diferenciar cepas de *S. typhimurium* pertenecientes a un mismo grupo y que son idénticas por ribotipo y movilidad enzimática electroforética. Los resultados permiten concluir que por la estabilidad, reproducibilidad y poder de discriminación de los patrones obtenidos, las sondas de IS200 pueden ser herramientas muy útiles en la tipificación molecular de *S. typhimurium*.

Introduction

Salmonellosis is a serious public health hazard in many geographic areas, including developed countries, as well as a major economic problem for the food industry. Detailed strain identification is essential in outbreak investigations in order to determine the association between clinical cases and sources of infection as well as to describe the pattern of propagation. This information may be afterwards used in the prevention and control of the disease.

Salmonellae are currently characterized by their somatic and flagellar antigens according to the serological scheme of Kauffmann-White (12). Although over 2000 serovars have been identified, a few serovars such as Typhimurium, Enteritidis, Typhi or Virchow, are responsible for the majority of human infections. Subdivision of these serovars has traditionally relied on phenotypic characters, such as biotyping and bacteriophage typing (17). These characters depend in many cases on the variable expression of unidentified genetic loci and therefore do not represent a global and reliable image of the bacterial genome.

Modern typing methods are based on characterization of the genotype of the organism by analysis of plasmid and chromosomal DNA. Although plasmid profiles have often proved a useful epidemiological marker (17), this method is unsatisfactory for genotype analysis

because plasmids are unstable extrachromosomal replicons subject to lateral transfer. A method for generating discriminatory molecular fingerprints of the chromosome would greatly assist the genetic analysis of evolutionary and epidemiological relationships between strains of salmonellae.

Copy numbers and locations of insertion sequences can change. Thus, identity among strains in the number and position of these mobile elements provides definitive evidence of common genetic ancestry. Insertion sequences have been recently used as probes for fingerprinting in *Mycobacterium tuberculosis* (18), *Staphylococcus aureus* (19), and *Shigella* (16). IS200 is a 708 bp insertion element (6) distributed in different copy numbers among most natural isolates of *Salmonella* (5). Unlike many enterobacterial insertion elements, IS200 lacks terminal inverted repeats (10) and it rarely transposes (3). This stability favours its use as a probe for epidemiological purposes.

The aim of this work was to develop and evaluate a molecular typing strategy for *Salmonella* based on hybridization of chromosomal DNA with two different probes derived from insertion sequence IS200. *Salmonella typhimurium* strains were analyzed for copy number and location of IS200. The reproducibility and stability of the patterns obtained were studied, as well as the discriminatory power of the method. This method was also compared to ribotyping, a chromosomal typing method that has been applied to *Salmonella* (4, 13) and many other bacterial species.

Materials and methods

Bacterial strains

Strains of *Salmonella typhimurium* presumed to be epidemiologically unrelated were kindly provided by the Laboratori Municipal de Barcelona, Laboratori de Sanitat Animal de Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, Departamento de Microbiología de la Universidad de Zaragoza, and SARA culture collection (2). The SARA collection comprises strains representative of the diversity found within *S. typhimurium* and its isolates have known genealogical relationships as characterized by multilocus enzyme electrophoresis. Epidemiologically related strains either involved in salmonellosis outbreaks or isolated from the same patient over the time were obtained from the Hospital General de Catalunya. All strains were biochemically confirmed as *Salmonella* with MicroScan panels (Baxter) before entering the study.

DNA probes

Two IS200 probes were used. Probe IS200-EHE (5) is a 600 bp tail to tail dimer of the *EcoRI-HindIII* fragment of IS200, placed to the left of the unique *EcoRI* restriction site. Probe IS200-TT, specially constructed for this study as described in the Results section, is a trimer of a 112 bp *TaqI-TaqI* fragment of insertion sequence IS200, which lies to the right of the *EcoRI* site.

DNA techniques

Plasmid DNA was obtained by alkaline lysis (14) and purified in a CsCl-ethidium bromide gradient according to standard methods (14). IS200 probes were labeled with 11-dUTP-digoxigenin by random priming (Boehringer Mannheim).

For ribotyping, commercially available 16S and 23S rRNA from *Escherichia coli* (Boehringer Mannheim) was labeled with 11-dUTP-digoxigenin by reverse transcription with M-MuLV enzyme (Boehringer Mannheim), according to the technique described by Hall (8).

Genomic DNA was extracted by the method of Ausubel (1), and 1–2 µg quantities were digested to completion. DNA fragments were separated by overnight electrophoresis in 0.7% agarose gels and vacuum blotted (LKB-Vaccugene apparatus) onto Hybond N nylon membranes (Amersham). DNA was fixed to the membrane by UV exposure during 5 minutes on a UVP-TM35 transilluminator (320 nm). Hybridization was performed in the presence of formamide and excess DNA probe (final concentration of 25 ng/ml) by standard methods (14). After astringent washes, reactions were visualized colorimetrically using NBT-BCIP as substrate.

Data analysis

*Hind*III DNA fragments of lambda were used as migration references of known molecular weights. The mean molecular weight and standard deviation of each band was calculated from independent gel runs. The presence of common bands, that is bands found in all strains analyzed, was recorded.

A *Salmonella* IS200 type was defined as a unique pattern of DNA bands. The number of different types obtained and the frequency of each one were recorded among epidemiologically unrelated strains. The discriminatory power of the IS200 typing method was determined according to Hunter and Gaston index ID (9).

The band pattern of each isolate was visually scored for the presence or absence of each unique band. A rectangular matrix was constructed with data collected from all isolates, and the similarity index of Jaccard (SJ) among isolates was determined. The construction of a dendrogram from the similarity matrix was done by the unweighted pair group method of analysis. TAXAN (Swartz) and SYSTAT (Wilkinson) programs were used for data analysis.

Results

Construction of IS200-TT DNA probe

Probe IS200-TT is a trimer of a 112 bp *Taq*I-*Taq*I fragment of insertion sequence IS200. The fragment of interest was recovered from plasmid pIZ47 (5), autoligated to obtain multimers, and subsequently cloned into pRL538. A 336 bp insert was selected, recovered by restriction with *Eco*RI, and cloned into vector pBluescript SK+, to form plasmid pUA175, which was

thereafter used as source of probe. DNA sequencing of the IS200-TT probe showed its structure to be a trimer, with three copies of the 112 fragment ligated head to tail.

IS200-typing

Among several restriction enzymes evaluated, two were selected for this study: *EcoRI*, which cuts the insertion sequence IS200 in two pieces, each one complementary of one of the two probes used, and *PstI*, a restriction enzyme with no recognition site inside IS200. All *S. typhimurium* strains studied (43) were typeable by hybridization with IS200 probes, and the hybridization patterns obtained were reproducible, as seen in independent repetitions.

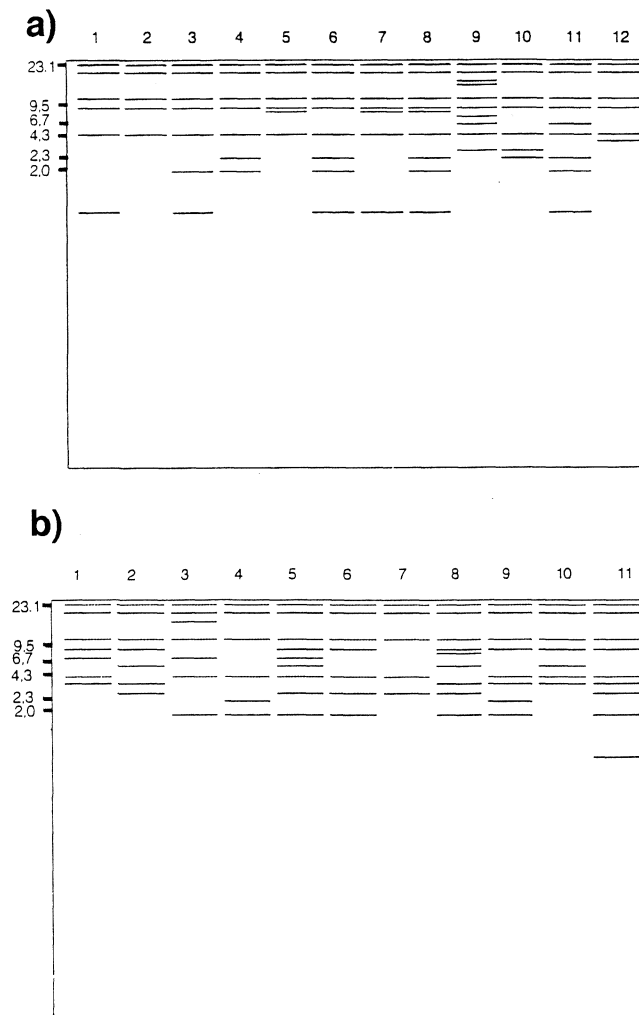


Fig. 1. Diagrammatic representation of band patterns obtained by hybridization with probe IS200-TT of *S. typhimurium* DNA digested with *EcoRI*. Molecular weight markers are indicated on the left. Panel a): lane 1, Tm I; lane 2, Tm II; lane 3, Tm III; lane 4, Tm IV; lane 5, Tm V; lane 6, Tm VI; lane 7, Tm VII; lane 8, Tm VIII; lane 9, Tm IX; lane 10, Tm X; lane 11, Tm XI; lane 12, Tm XII. Panel b): lane 1, Tm XIII; lane 2, Tm XIV; lane 3, Tm XV; lane 4, Tm XVI; lane 5, Tm XVII; lane 6, Tm XVIII; lane 7, Tm XIX; lane 8, Tm XX; lane 9, Tm XXI; lane 10, Tm XXII; lane 11, Tm XXIII.

When chromosomal DNA of *S. typhimurium* (43 strains) was digested with restriction enzyme *EcoRI* and hybridized with probe IS200-TT, 15 different bands were obtained (ranging from 0.5 kb to >23 kb). Three of these bands (23.1 kb, 19.1 kb, 10 kb) were present in all strains tested, and another two bands (7.9 kb and 4 kb) were present in 93 and 95% of strains, respectively. The other bands were variable, and according to them up to 23 different band patterns could be established, designated Tm I to Tm XXIII. A schematic graphic presentation of these patterns can be seen in Fig. 1. Tm II and Tm XIX were the patterns with less bands, only 5, whereas Tm IX was the pattern showing more bands, 10 in total. Tm II was the most frequent type (21%), followed by Tm I (12%). All other types had low frequencies of appearance, including 19 single types. The discriminatory index was 0.94.

Digesting with restriction enzyme *EcoRI* and hybridizing with probe IS200-EH, 21 strains were analyzed and 18 different DNA bands were found, with molecular weights ranging from 0.5 kb to 18 kb. Two bands (5.1 kb and 3.4 kb) were present in all strains tested while another two bands (6 kb and 4.2 kb) were present in 90 and 95% of strains respectively. A schematic graphic presentation of the different band patterns found, designated Tm 1 to Tm 12, can be found in Fig. 2. Tm 1, was the most frequent type (24%), followed by Tm 2 (19%), whereas all other types showed frequencies lower than 10%. The discriminatory index ID was calculated to be 0.91.

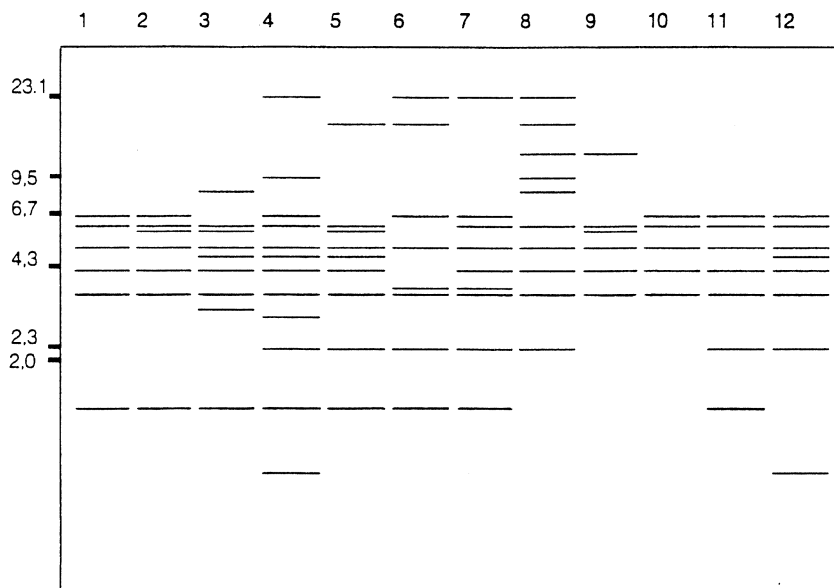


Fig. 2. Diagrammatic representation of band patterns obtained by hybridization with probe IS200-EHE of *S. typhimurium* DNA digested with *EcoRI*. Molecular weight markers are indicated on the left. Lane 1, Tm 1; lane 2, Tm 2; lane 3, Tm 3; lane 4, Tm 4; lane 5, Tm 5; lane 6, Tm 6; lane 7, Tm 7; lane 8, Tm 8; lane 9, Tm 9; lane 10, Tm 10; lane 11, Tm. 11; lane 12, Tm 12.

When chromosomal DNA was digested with restriction enzyme *Pst*I, hybridization patterns obtained with one probe or the other were identical, confirming that there is no *Pst*I restriction site into IS200. A total of 24 strains were digested with *Pst*I, and 14 hybridization bands were found with molecular weights ranging from 1.6 kb to >23 kb. Four bands (23.7 kb, 4.6 kb, 2.4 kb, and 1.8 kb) were present in all strains tested, and another two bands (7.1 kb, 3.3 kb) were present in 91 and 87.5% of strains, respectively. According to band patterns, 13 types named Tm A to Tm M were found (Fig. 3). Type Tm B had only 6 bands, whereas Tm C and Tm I showed 11 bands. Tm A was the most frequent type (22%), followed by Tm B (17%). All other types had only one isolate. The discriminatory power was 0.94.

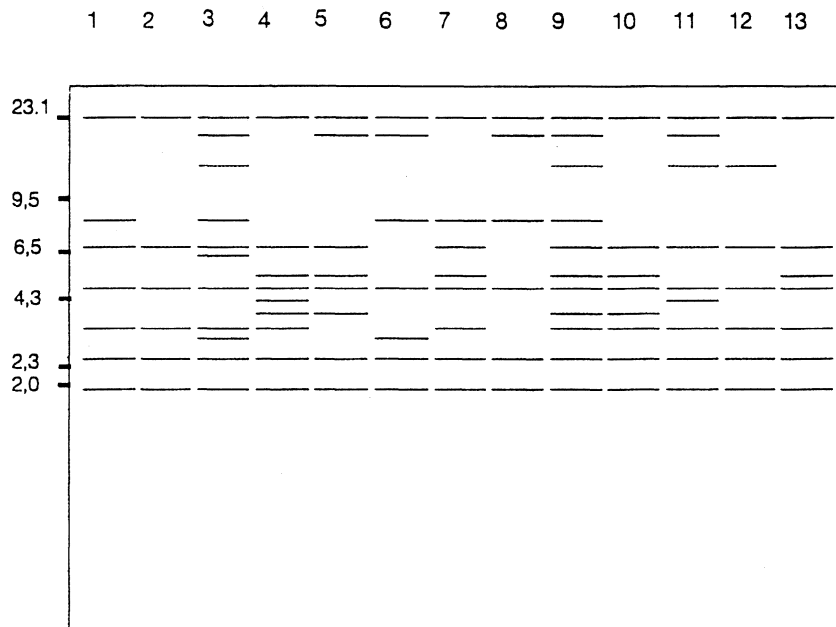


Fig. 3. Diagrammatic representation of band patterns obtained by hybridization with probe IS200-TT of *S. typhimurium* DNA digested with *Pst*I. Molecular weight markers are indicated on the left. Lane 1, Tm A; lane 2, Tm B; lane 3, Tm C; lane 4, Tm D; lane 5, Tm E; lane 6, Tm F; lane 7, Tm G; lane 8, Tm H; lane 9, Tm I; lane 10, Tm J; lane 11, Tm K; lane 12, Tm L; lane 13, Tm M.

Stability of IS200 types in epidemiologically related strains

The stability of IS200 patterns was followed in vivo, and no changes could be appreciated in patterns obtained from the same strains. Moreover, in order to study the stability in an epidemiological setting, a collection was established with the *Salmonella* strains isolated at the Hospital General de Catalunya which belong to one of the following groups: a) strains isolated

from the same patient over a long period of time; b) strains isolated from different specimens of the same patient; c) strains isolated from different patients during a salmonellosis outbreak. Nine groups of related strains were obtained belonging to serotypes Typhimurium, Enteritidis, Typhi, Montevideo and Virchow. In all nine cases, strains of the same group presented the same hybridization pattern (Table 1).

TABLE 1
STABILITY OF IS200 TYPES

Group	Serotype	Strain	Date	Specimen	Patient	IS200-TT	IS200-EHEIS	IS200-TT
						<i>EcoI</i>	<i>EcoI</i>	<i>PstI</i>
1	Montevideo	H27	6/8/91	Stool	S.I.	Mo I	Mo 1	-
		H29	6/8/91	Stool	S.I.'s father	Mo I	Mo 1	-
		H30	8/8/91	Stool	S.I.'s mother	Mo I	Mo 1	-
2	Enteritidis	H36	27/9/91	Stool	B.O.	En I	En 1	En A
		H37	27/9/91	Stool	B.O.'s father	En I	En 1	En A
3	Enteritidis	H43	23/3/91	Blood	H.R.	En I	En 1	En A
		H44	26/3/91	Blood	H.R.	En I	En 1	En A
4	Virchow	H46	17/4/91	Stool	S.M.	Vi III	Vi I	-
		H47	7/6/91	Stool	S.M.	Vi III	Vi I	-
5	Typhimurium	H54	10/2/92	Blood	H.U.	Tm IX	Tm 5	Tm C
		H55	11/2/92	Ascitis	H.U.	Tm IX	Tm 5	Tm C
		H56	27/2/92	Drainage	H.U.	Tm IX	Tm 5	Tm C
6	Typhi	H62	16/6/92	Blood	P.R.	Ty III	Ty 1	Ty A
		H63	18/6/92	Blood	P.R.	Ty III	Ty 1	Ty A
		H64	19/6/92	Stool	P.R.	Ty III	Ty 1	Ty A
		H65	25/6/92	Stool	P.R.	Ty III	Ty 1	Ty A
7	Enteritidis	H31	7/9/91	Stool	C.S.	En I	En 1	En A
		H58	25/11/91	Stool	C.S.	En I	En 1	En A
		H60	10/5/92	Stool	C.S.	En I	En 1	En A
8	Typhimurium	H76	22/10/92	Stool	P.P.	Tm II	Tm 1	Tm B
		H78	23/10/92	Stool	P.P.'s father	Tm II	Tm 1	Tm B
		H79	23/10/92	Stool	P.P.'s brother	Tm II	Tm 1	Tm B
9	Typhimurium	H77	26/11/92	Stool	S.P.	Tm I	Tm 2	Tm A
		H81	26/11/92	Stool	S.P.'s husband	Tm I	Tm 2	Tm A

Comparison of IS200 typing and ribotyping

As a comparison for IS200-typing, *S. typhimurium* strains were ribotyped. Preliminary studies with *EcoRI*, *HindIII*, *SmaI*, *XhoI*, *PstI* and *HaeIII* showed that the most informative and clear patterns were obtained by restriction with *EcoRI*, followed by *PstI*, so both enzymes were subsequently used. Ribotyping was performed on 27 strains digested with *EcoRI*. The ribotypes showed bands ranging from 1.4 kb to >23 kb distributed in a high molecular weight group (>6 kb) and a low molecular weight group (<3 kb); a third group of bands placed in between were fainter and its presence was depending on the amount of DNA loaded in the gel. Considering only the high intensity bands, 6 different ribotypes were identified, designed rT1 to rT6. The discriminatory power was determined to be 0.55. Ribotyping with *PstI*, only three ribotypes could be distinguished, rTI to rTIII. rTI was the type found in 72.4% of strains. Discriminatory power was 0.44. If the three ribotypes obtained with *PstI* were further divided according to their *EcoRI* ribotype, 10 ribotypes were obtained and the discriminatory power was 0.78.

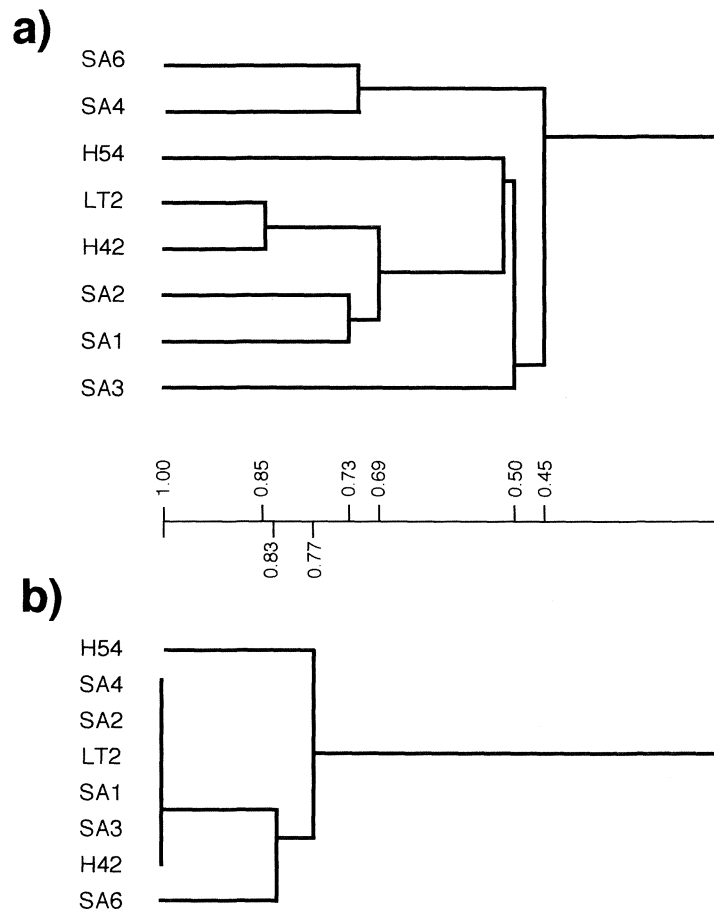


Fig. 4. Dendrograms showing similarity coefficients among *S. typhimurium* strains. a) dendrogram derived from IS200-typing; b) dendrogram derived from ribotyping.

In order to fully compare IS200 typing with ribotyping, eight strains that had been analyzed by all three IS200 typing strategies, as well as by ribotyping with both enzymes, were studied. The information obtained with IS200 typing was combined in a rectangular matrix, a similarity matrix was generated and the dendrogram was drawn (Fig. 4a). It can be seen that, at a similarity level of 0.65, four groups are formed: strains H54 and SA3 are in single groups, while the other groups contain two and four strains respectively. At a similarity level of 0.85, all strains are resolved into single groups. When the dendrogram generated by the ribotype information with both enzymes is observed (Fig. 4b), it is seen that at a level of 0.85 these eight strains fall into three groups, one of which contains six of them. In fact, these six strains are undistinguishable by ribotyping, with a similarity coefficient of 1.00.

Discussion

The results shown in this work indicate that there are five to six IS200 hybridization bands present in all *S. typhimurium* strains studied. This observation suggests the presence in the *S. typhimurium* genome of conserved chromosomal insertion points for IS200. These points are probably inherited from a common ancestry, whereas patterns with more bands may have generated from the ancestry by transposition of this insertion sequence to other chromosome sites.

It is worth noting the fact that the most frequent types were those with the least IS200 copies, suggesting a low frequency of transposition, which is in accordance with the low number of insertion mutations caused by IS200 (3).

It should be noted that the six IS200 insertion sites common to all strains studied are those found in the LT2 strain of our laboratory, as well as in others (11). However, strain SARA2 (2), which is also an LT2 derivative, presents 3 extra bands. This difference could be explained by the increased transposition frequency (ITF) observed in storage conditions (3). This high ITF has been also claimed to explain the high number of copies of IS5 found in strains belonging to the ECOR collection (7).

In the evaluation of IS200 typing as an epidemiological tool, the first question to be considered is typeability. All strains containing copies of IS200 are potentially typeable. Since most *Salmonella* serotypes of clinical and veterinary interest have copies of IS200 (5), this method should not be restricted to a particular serotype, but it could be of general application in this genus. Secondly, the patterns should be reproducible, as shown in this work with independent repetitions. In third place, the patterns obtained with any typing method should be stable enough to be useful in epidemiological studies. The rationale for IS200 typing is that this insertion element is present in different copy numbers and sites in the *Salmonella* chromosome, and thus is a reflection of the evolutionary relationships among strains of a group. However, this ability to transpose could be a disadvantage if the frequency of transposition was too high or too low. The results shown, although obtained on a reduced number of strains, are very promising because epidemiologically related strains showed in all cases the same IS200 pattern.

Finally, the discriminatory power was high (0.91–0.94) with all combinations of restriction enzyme and probe used. Since all seem to reflect equally well the distribution of insertion sites in the chromosome, the typing strategy can be chosen according to easiness of pattern interpretation. Ribotyping showed a much lower discriminatory power, even when two enzymes were used. Furthermore, IS200 typing was able to distinguish among six strains which were identical by ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis. This fact is in accordance with previous observations (15) showing that *Escherichia coli* strains identical by electrophoretic enzyme mobility, only shared 43% of IS insertion sites.

These results show that, for the stability, reproducibility and discriminatory power of the patterns generated, IS200 probes can be a useful tool both in the molecular typing and evolutionary studies of *Salmonella typhimurium*.

Acknowledgments

We would like to thank F. J. Castillo, M. Desimón, M. D. Farré, G. Prats, M. Saco and E. Torre for their generous gifts of several strains.

References

1. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., More, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
2. Beltrán, P., Plock, S. A., Smith, N. H., Whittam, T. S., Old, D. C., Selander, R. K. (1991). Reference collection of strains of the *Salmonella typhimurium* complex from natural populations. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 601–606.
3. Casadesús, J., Roth, J. R. (1989). Absence of insertions among spontaneous mutants of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **216**, 204–209.
4. Esteban, E., Snipes, K., Hird, D., Kasten, R., Kinde, H. (1993). Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 233–237.
5. Gibert, I., Barbé, J., Casadesús, J. (1990). Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.* **126**, 2555–2560.
6. Gibert, I., Carrol, K., Hillyard, D. R., Barbé, J., Casadesús, J. (1991). IS200 is not a member of the IS600 family of insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1343.
7. Green, L., Miller, R. D., Dykhuizen, D. E., Hartl, D. L. (1984). Distribution of DNA insertion element IS5 in natural isolates of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4500–4504.
8. Hall, L. M. C., Duke, B., Guiney, M., Williams, R. (1992). Typing of *Enterococcus* species by DNA restriction fragment analysis. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 915–919.
9. Hunter, P. R., Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2465–2466.
10. Lam, S., Roth, J. R. (1983). IS200: a *Salmonella*-specific insertion sequence. *Cell* **34**, 951–960.
11. Lam, S., Roth, J. R. (1983). Genetic mapping of IS200 copies in *Salmonella typhimurium* LT2. *Genetics* **105**, 801–811.
12. Le Minor, L. (1991). The genus *Salmonella*. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (eds.), *The Prokaryotes*, pp. 2760–2774. Springer-Verlag, Berlin.

13. Pang, T., Altwegg, M., Martinetti, G., Koh, C. L., Puthucheary, S. (1992). Genetic variation among Malaysian isolates of *Salmonella typhi* as detected by ribosomal RNA gene restriction patterns. *Microbiol. Immunol.* **36**, 539–543.
14. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
15. Sawyer, S. A., Dykhuizen, E., DuBose, R. F., Green, L., Mutangadura, T., Wolcyc, D. F., Hartl, D. L. (1987). Distribution and abundance of insertion sequences among natural isolates of *Escherichia coli*. *Genetics* **115**, 51–63.
16. Soldati, L., Piffaretti, J. C. (1991). Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. *Res. Microbiol.* **142**, 489–498.
17. Threlfall, E. J., Frost, J. A. (1990). The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 5–16.
18. Van Soolingen, D., Hermans, P., De Haas, P. E., Soll, D. R., van Embden, J. D. A. (1991). Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependant DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2578–2586.
19. Wei, M. Q., Udo, E. E., Grubb, W. B. (1992). Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with IS256. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**, 175–180.

Electrotransformation of *Yersinia ruckeri* by plasmid DNA

Juan M. Cutrín, Ramón F. Conchas, Juan L. Barja, Alicia E. Toranzo*

*Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología,
Universidad de Santiago de Compostela*

Summary

Yersinia ruckeri, a fish pathogenic bacterium in aquaculture, was used to evaluate the electroporation as a new transformation method for this species. DNA used for the electrotransformation were plasmids of molecular mass ranging from 2.3 kb to 33 kb, and diverse replicons. To optimize this method we used *Y. ruckeri* 11.29 strain (from serotype O2) and pSU2718 DNA. The best transformation efficiency (6.0×10^5 transformants/ μg DNA) was obtained with 12.5 kV/cm, 25 μF , 400 Ω and 2 hours of incubation after pulse. When these conditions were applied to other strains belonging to different serotypes and other plasmids, we obtained transformants in all strains assayed, but only when using low molecular weight plasmids. Plasmid vectors and resident plasmid were not modified in host strains after electrotransformation. In studies of conformation we confirmed that only circular DNA was able for transformation. The utilization of this technique for direct cloning in *Y. ruckeri* makes possible further studies on recombinant DNA.

Key words: *Yersinia ruckeri*, transformation, electroporation.

Resumen

Yersinia ruckeri, una bacteria patógena de peces y de gran importancia en acuicultura, fue utilizada para evaluar la electroporación como un método de transformación para esta especie. El DNA empleado para la electrotransformación procedió de plásmidos de diferente masa molecular (2,3–33 kb) y distintos

* *Correspondence to:* Alicia E. Toranzo. Depto. Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. 15706 Santiago de Compostela. Tel.: 981-563100 (#3255). Fax: 981-596904.

replicones. Con el fin de definir las condiciones óptimas para llevar a cabo el proceso, se utilizó la cepa 11.29 (serotipo 02) y el plásmido pSU2718. La mayor eficiencia transformativa ($6,0 \times 10^5$ transformantes/ μg DNA) se consiguió con 12,5 kV/cm, 400 Ω , 25 μF , y 2 horas de incubación después del pulso eléctrico. Estas condiciones se emplearon con cepas de los diferentes serotipos y con diferentes plásmidos, obteniéndose transformaciones en todas ellas cuando se utilizaron plásmidos de bajo peso molecular. Ni los plásmidos introducidos ni los residentes se modificaron en las cepas receptoras. Los estudios de conformación revelaron que sólo las moléculas de DNA circulares eran aptas para la transformación. La utilización de esta técnica para clonación directa en *Yersinia ruckeri* puede contribuir notablemente a posteriores estudios de DNA recombinante y análisis génico.

Introduction

In the genus *Yersinia* conjugation (14), transduction (26) and transformation (28) were methods widely used for transferring DNA. However, high transformation efficiency was not reported until the application of electroporation technique (37), named then electrotransformation (6). These techniques were only applied to clinical species like *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. However, there are not similar studies in the fish pathogenic bacterium *Yersinia ruckeri*. This species causes important economic losses mainly in continental aquaculture.

Electroporation has been used for transferring macromolecules (proteins and nucleic acids) into eukaryotic and prokaryotic cells. Although the precise mode of action is not known (11, 33), presumably the high voltage induces the formation of transient pores at lipidic-protein junctions, allowing introduction of exogenous macromolecules into the cells.

In this report we investigated the parameters influencing electrotransformation efficiency of *Y. ruckeri* strains with plasmid DNA. Since it has been proved that this species is a good immunogen and easy to culture, the introduction of genes, coding for capsidal polipeptides of viruses or bacterial virulence factors, makes that *Y. ruckeri* can be regarded as a very good candidate for production of recombinant bacterial and viral vaccines for fish diseases.

Materials and methods

Cells

Yersinia ruckeri strains used in this work are listed in Table 1. Serotypic system used was based in the new scheme reported by Romalde et al. (29). To prepare competent cells, the bacteria were grown in LB broth (10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g NaCl per liter) at 25°C to an A_{600} of 0.5–0.8. The cells were harvested by centrifugation (4000 x g, 15min, 4°C), washed once in cold glass-ultrafiltered water (Milli-Q, Millipore) and once in transformation buffer (272 mM Sucrose/15% glycerol). The pellet was resuspended in 1 ml of transformation buffer, distributed, frozen on dry ice, and stored at -70°C until required.

TABLE 1
Yersinia ruckeri STRAINS USED IN THIS STUDY

Strains	Serotype	Plasmid content (MD)	Sources ^(a)
PP31	01a	50, 15	J. L. Romalde
NCIMB 2194	01a	50, 15	NCIMB
1533	01b	50, 4	T. Hästein
11.29	02	–	D. P. Anderson
1638	02	–	T. Hästein
11.73	04	15	T. Cook

^(a) Donor addresses: J. L. Romalde, Dept. Microbiología, Fac. de Biología, Universidad de Santiago, Spain; T. Hästein, National Veterinary Institute, Oslo, Norway; D. P. Anderson, National Fish Health Res. Lab. Kearneysville, West Virginia, USA; T. Cook, Dept. Microbiology, University of Maryland, College Park, USA.

DNA

Plasmid DNA and the genotypic markers are listed in Table 2. Plasmids were extracted by alkaline lysis (Birnboim and Doly method, 4) and double banded in CsCl gradient (30). The plasmids were resuspended in Milli-Q water. The DNA concentration of these stocks was estimated by absorbance to 260 nm (assuming that one A_{260} unit is 50 $\mu\text{g/ml}$) and also by comparing the band intensity on an ethidium bromide-stained agarose gel with known concentration of 1 DNA.

TABLE 2
 PLASMIDS USED IN THE EXPERIMENTS OF TRANSFORMATION

Plasmid	Size (kb)	Genotype markers*
pSU2718	2.6	Cm^{R} (pACY184 derived)
pMET1.9	5	Amp^{R}
pMAMneo	8.3	Amp^{R}
pUM103	12	Amp^{R}
pVK102	22	$\text{Km}^{\text{R}}\text{Te}^{\text{R}}$
pMET103	30	$\text{Km}^{\text{R}}\text{Te}^{\text{R}}$
pRK201.1	33	Te^{R}

* Cm, chloramphenicol; Amp, ampicillin; Km, kanamycin; Te, tetracycline.

Transformation methodology

The concentrated cells were thawed at room temperature, and placed on ice. One μl of DNA sample (known concentration) and 40 μl of the competent cells (5×10^{10} cells/ml) were added to an Eppendorf tube. The suspension was mixed, placed on ice for 1 min, and removed to a cold electroporation cuvette. The cells were then subjected to a single electric pulse, using a Gene Pulser (Bio-rad Laboratories, Richmond, CA). After discharge, 1 ml of SOC medium (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM glucose) was immediately added, and this solution was incubated at 25°C with heavy shaking. Transformants were identified by plating on LB agar containing 20 mM glucose, and an antibiotic concentration that inhibits the rest of the cells (chloramphenicol, ampicillin, kanamycin, tetracycline depending of the plasmid used).

Characterization of transformation variables

To optimize the electrotransformation efficiency (number of transformants/ μg DNA) and frequency of transformation (number of transformants/survival cells), the influence of various parameters was investigated. For this purpose we used the *Y. ruckeri* strain 11.29 (serotype O2) and pSU2718 DNA (20).

To search the optimal phase of the growth curve, cells in different growth phase were harvested and electroporated using initially 12.5 kV/cm and 400 Ω of resistance. Growth was monitored by measuring A_{600} .

The effect of incubation time before pulse in electrotransformation efficiency was investigated incubating on ice the mixture pSU2718 DNA plus cells for times ranging from 1 to 60 min.

The time constant is a variable that indicates the moment in which the exponential decay pulse arise the 37% of the initial field strength. RC time constant (t) is determined by the capacitance (C) and the resistance (R). Fixed the capacitance in 25 μF , different resistances from 100 Ω to 1000 Ω were tested for searching the best time constant.

Field strengths of 0 to 25 kV/cm were assayed to optimize electrotransformation efficiency and survival rate. The control used for this experiment was the mixture pSU2718 DNA plus cells without the application of the electrical discharge.

Different amounts of pSU2718 DNA varying from 0.002 to 2 μg and cell concentrations ranging from 7.6×10^7 to 5.1×10^{10} cells/ml were tested for estimating the influence of both variables in electrotransformation efficiency. Bacterial cells without plasmid DNA added were used as control.

The effect of recuperation time on transformation efficiency after subjecting the mixture of cells and plasmid DNA to a single pulse was also evaluated. The cell/DNA suspension was incubated for various times from 0 to 5 hours at 25°C. Cell growth and transformation efficiency were calculated in parallel .

To determine the efficiency of plasmid DNA conformation, pSU2718 was linearized by digestion with *Hind* III and then religated with T4 DNA ligase. Equivalent amounts of uncut (supercoiled), cut (linearized) and ligated (relaxed circular) forms of pSU2718 DNA were used for electrotransformation of *Y. ruckeri* 11.29 strain.

Results

Optimization of electrotransformation variables

Influence of grown phase on *Yersinia ruckeri* transformation efficiency.- Cells in different growth phase were harvested and electroporated. When we used cells taken from early exponential phase (absorbances of 0.5 to 0.8) the transformation efficiency was between 10^5 and 10^6 transformants/ μg DNA (Fig. 1). However, if the cells were harvested in late exponential or stationary phase, the efficiency decreased until 10^4 and 10^3 transformants/ μg DNA.

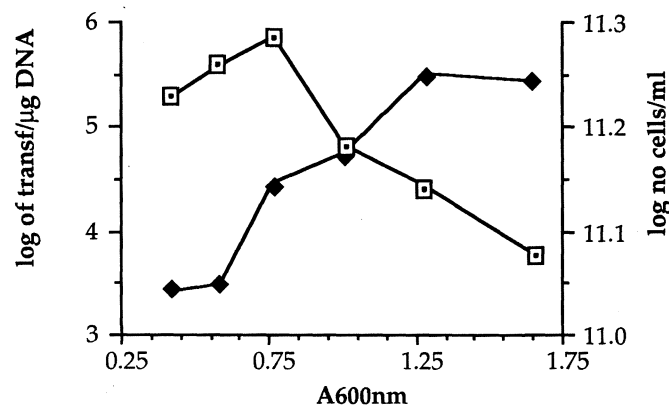


Fig. 1. Influence of growth phase on electrotransformation efficiency of *Yersinia ruckeri* strain 11.29 and pSU2718 plasmid DNA. \square log transformants/ μg DNA. \blacklozenge log of bacterial concentration.

Effect of increasing time constant and incubation time before pulse in transformation efficiency.- Transformation efficiency was increased from 100Ω ($t \approx 2.5$ milliseconds) to 400Ω ($t \approx 10$ ms). Resistances greater than 400Ω produced a decrease of transformant efficiencies. Mixtures of pSU2718 DNA and cells were incubated for several times to study the effect of this contact time. A decrease of the efficiency for about 1 log (maybe due to the minimal presence of DNases) was observed when the incubation time was increased from 1 to 60 min (data not shown).

Effect of voltage on transformation and survival of *Yersinia ruckeri* cells.- Field strengths of 0 to 25 kV/cm were assayed. The effect of voltage on transformation efficiency and survival is shown in Fig. 2. Increased electrical field-strengths resulted in greater yield of transformants. Over the range of 2.5 to 12.5 kV/cm, the transformation efficiency was found to be directly proportional to the initial electric field-strength. Greater field strengths produced a slowly decrease of the efficiency. The optimal voltage (12.5 kV/cm) produced the highest number of transformants but with a survival rate of 0.5%. The highest voltage (25 kV/cm) produced the lowest survival rate ($<0.1\%$). As expected, no transformants were obtained if DNA was not added to the electroporation mixture or if the cells were not subjected to an electrical discharge.

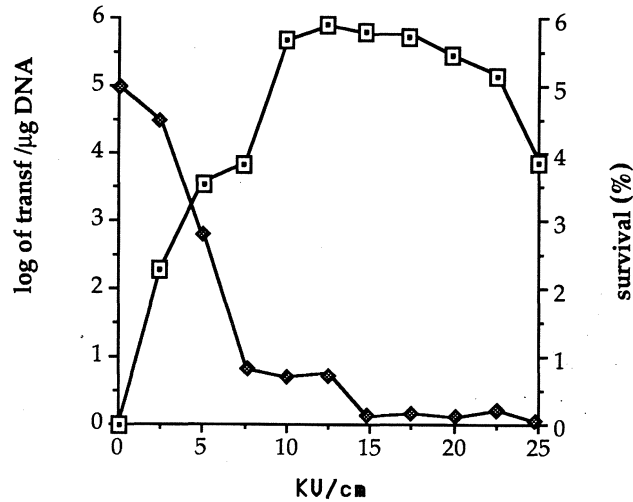


Fig. 2. Effect of voltage on electrotransformation efficiency and cell survival of *Y. ruckeri* strain 11.29 using the pSU2718 plasmid as vector. \square log of transformants/ μg DNA. \diamond Survival %.

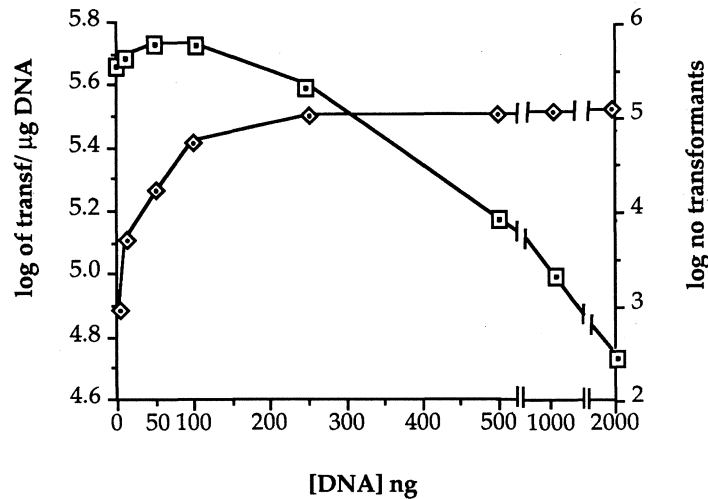


Fig. 3. Influence of DNA concentration on electrotransformation efficiency of *Yersinia ruckeri* strain 11.29 and pSU2718 plasmid. \square log of transformants/ μg DNA. \diamond log of no. transformants.

Effect of plasmid and cell concentration on electroporation efficiency.- Different amounts of pSU2718 DNA varying from 0.002 to 2 μg were tested. The transformation efficiency in the order of 5×10^5 transformants/ μg was independent of the concentration of plasmid DNA over the range of 2 to 250 ng. As is it shown in Fig. 3 with higher amounts of

plasmid DNA the transformation efficiency decreased and the number of transformants remained constant. However, frequency of transformation increased from 10^{-5} to 10^{-3} in parallel with the concentration of DNA. Then, we used 50–100 ng of DNA for the following experiments.

With cell concentration of 1.5×10^8 cells/ml or less, no transformants were obtained. With higher concentration, the transformation efficiency was found to be directly proportional to the number of cells/ml (data not shown). The highest number of transformants were obtained with 5.1×10^{10} cells/ml.

Effect of incubation time after pulse on transformation efficiency.- As it is illustrated in Fig. 4, cell concentration remained in stationary phase for 2 hours, whereas transformation efficiency increased significantly. After 2 hours of incubation, the number of surviving cells showed a slight increase. This fact made impossible to differentiate between an increase of the number of transformants and duplication of the already existent transformants. From these results we decided to incubate the mixture of cells and DNA after pulse for 2 hours before plating.

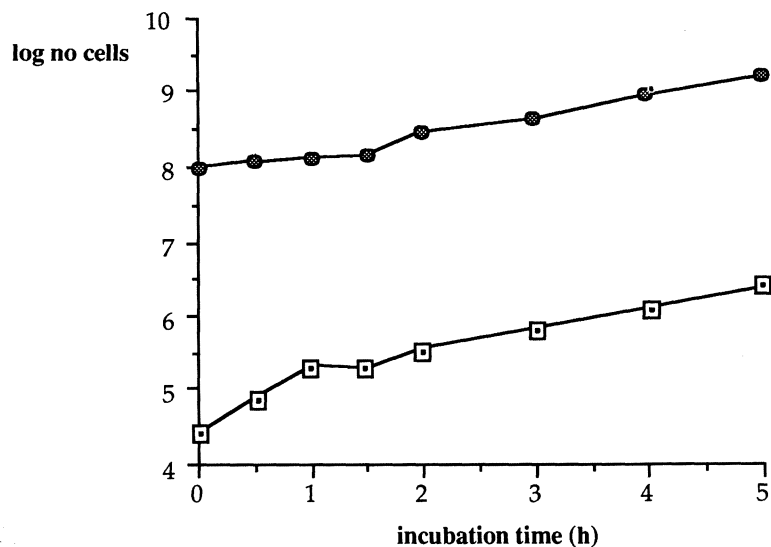


Fig. 4. Influence of incubation time after pulse on transformation efficiency and cell survival of *Yersinia ruckeri* strain 11.29 and pSU2718 plasmid vector. □ log of transformants/μg DNA. ● log of surviving cells.

Effect of plasmid conformation on *Yersinia ruckeri* transformation efficiency.- To determine the efficiency of plasmid DNA conformation, pSU2718 was linearized by digestion with *Hind* III and then religated with T4 DNA ligase. With the three conformations: uncut (supercoiled), cut (linearized) and ligated (relaxed circular) forms, transformation efficiencies were 2.2×10^5 , 1.0×10^2 and 6.5×10^5 transformants/μg DNA, respectively.

TABLE 3
ELECTROTRANSFORMATION OF *Yersinia ruckeri* STRAINS WITH SEVERAL PLASMIDS FROM *Escherichia coli*

Host		Plasmid DNA			
strains	Serotype	pSU2718	pMET1.9	pMAMneo	pUM103
PP31	01a	2.0 x 10 ⁴ (*)	8.2 x 10 ³	3.8 x 10 ³	6.2 x 10 ³
NCIMB 2194	01a	2.3 x 10 ³	1.6 x 10 ⁴	2.0 x 10 ³	6.3 x 10 ³
1533	01b	1.0 x 10 ³	1.3 x 10 ⁴	1.5 x 10 ³	2.0 x 10 ³
11.29	02	9.0 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁶	1.2 x 10 ³	1.1 x 10 ³
1638	02	5.8 x 10 ⁴	1.2 x 10 ⁵	1.4 x 10 ³	3.0 x 10 ⁵
11.73	04	1.4 x 10 ³	1.4 x 10 ⁴	2.1 x 10 ³	7.0 x 10 ³

(*) Number of transformants/ μ g plasmid DNA. Plasmids pVK102, pMET103 and pRK201.1 gave no transformants.

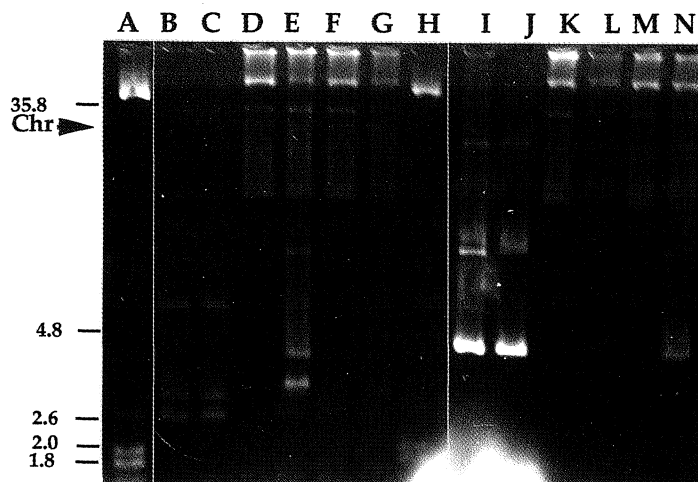


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of pSU2718 and pMET1.9 plasmids before and after to be introduced by electrotransformation in 01a and 02 serotype strains of *Yersinia ruckeri*. A: *E. coli* V517; B: pSU2718 plasmid; C: 11.9 strain transformed by pSU2718; D: PP31 strain; E: PP31 transformed by pSU2718; F: NCIMB 2194 strain; G: NCIMB 2194 transformed by pSU2718; H: pMET1.9 plasmid; I: 11.29 strain transformed by pMET1.9; J: PP31 strain; K: PP31 transformed by pMET1.9; L: NCIMB 2194 strain; M: NCIMB 2194 transformed by pMET1.9. Numbers indicate molecular size in megadaltons (MD).

Electrotransformation efficiency of Yersinia ruckeri strains

In Table 3 we summarized the results of transformation efficiency of *Y. ruckeri* strains with several plasmids. All serotypes tested were transformed. As it is shown in Fig. 5, serotype 02 was better transformed than the others serotypes which presented another plasmids in their genomes.

We obtained transformants with plasmids of several molecular mass ranging from 2.3 kb to 12 kb. Larger plasmids were not recovered from *Y. ruckeri* in selective media, after electroporation.

When we used for electrotransformation pSU2718 and pMET1.9 plasmids obtained from the strain 11.29 of *Y. ruckeri* (retrotransformation), and we compared the results with the same plasmids obtained from *Escherichia coli*, transformation efficiencies were not increased significantly (Table 4).

TABLE 4
ELECTROTRANSFORMATION EFFICIENCIES IN *Yersinia ruckeri* WITH HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS PLASMID DNA

Host strains	Serotype	pSU2718 from		pMET 1.9 from	
		<i>E. coli</i> MC1060	<i>Yersinia ruckeri</i> 11.29	<i>E. coli</i> JM109	<i>Yersinia ruckeri</i> 11.29
PP31	01a	2.0 x 10 ⁴ (*)	2.0 x 10 ³	8.2 x 10 ³	6.7 x 10 ³
NCIMB 2194	01a	2.3 x 10 ³	1.5 x 10 ³	1.6 x 10 ⁴	7.7 x 10 ³
1533	01b	1.0 x 10 ³	4.0 x 10 ²	1.3 x 10 ⁴	1.8 x 10 ³
11.29	02	9.0 x 10 ⁵	4.8 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁶	1.9 x 10 ⁵
1638	02	5.8 x 10 ⁴	3.9 x 10 ⁴	2.2 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁴
11.73	04	1.4 x 10 ³	7.0 x 10 ²	1.3 x 10 ⁴	7.0 x 10 ³

(*) Number of transformants/ μ g plasmid DNA.

In order to reduce the time of this methodology, the plasmid extraction (Birnboim and Doly method) without purification on CsCl gradient was also used for electrotransformation *Y. ruckeri* strains. Using either heterologous DNA (from *E. coli*) or homologous DNA (retrotransformation) the transformation efficiencies were similar to the results obtained with highly purified DNA (Table 5).

Stability of vectors and resident plasmids

To confirm that the plasmids introduced by electrotransformation were not altered in host strains, plasmid DNA was isolated by the alkaline lysis method and digested with a restriction nuclease (Fig. 6). The presence of pSU2718 and pMET1.9 was observed without detectable deletion.

Y. ruckeri strains of 01a serotype were used to check the stability of the resident plasmids in the presence of a foreign replicon introduced by electrotransformation. As it is shown in Fig. 6, the restriction pattern of the 50 MD and 15 MD plasmids from transformants and from native strains PP31 were identical.

TABLE 5
ELECTROTRANSFORMATION EFFICIENCIES IN *Yersinia ruckeri* WITH HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS DNA EXTRACTED BY BIRNBOIM AND DOLY METHOD

		Plasmids from <i>Escherichia coli</i>				
Host strains	Serotype	pSU2718	pMET1.9	pMAMneo	pUM103	pVK102
PP31	01a	2.0 x 10 ⁴ (*)	1.7 x 10 ³	1.6 x 10 ³	4.0 x 10 ²	–
NCIMB 2194	01a	5.0 x 10 ³	1.3 x 10 ³	9.0 x 10 ²	4.7 x 10 ²	–
1533	01b	1.0 x 10 ³	8.5 x 10 ²	2.5 x 10 ²	1.7 x 10 ²	–
11.29	02	7.8 x 10 ⁵	3.0 x 10 ⁵	5.0 x 10 ³	3.3 x 10 ²	–
1638	02	7.7 x 10 ⁴	2.2 x 10 ⁵	1.2 x 10 ⁵	5.7 x 10 ⁴	–
11.73	04	9.0 x 10 ³	2.4 x 10 ³	8.0 x 10 ²	3.8 x 10 ²	–

		Plasmids from <i>Yersinia ruckeri</i>			
Host strains	Serotype	pSU2718	pMET1.9	pMAMneo	pUM103
PP31	01a	2.3 x 10 ⁴	1.4 x 10 ³	1.8 x 10 ³	1.1 x 10 ³
NCIMB 2194	01a	3.8 x 10 ⁴	1.6 x 10 ³	1.9 x 10 ³	7.5 x 10 ²
1533	01b	4.0 x 10 ³	4.5 x 10 ²	1.2 x 10 ³	5.0 x 10 ²
11.29	02	4.2 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁵	4.1 x 10 ⁵	2.5 x 10 ⁴
1638	02	8.0 x 10 ³	1.1 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁵	8.8 x 10 ³
11.73	04	4.0 x 10 ³	1.8 x 10 ³	2.3 x 10 ³	4.0 x 10 ²

(*) Number of transformants/ μ g plasmid DNA. (–) no transformants.

Discussion

The electrotransformation methodology described here enables transformation of pathogenic *Yersinia ruckeri* strains with several plasmids.

This procedure, compared with classical methods (16, 17, 19), is efficient (about 10⁵ transformants/ μ g DNA), simple and fast, and enables the use of frozen cell stocks. Only one disadvantage can be mentioned, the possible secondary effects on the bacteria like stress, mutagenesis and function-structural changes (36).

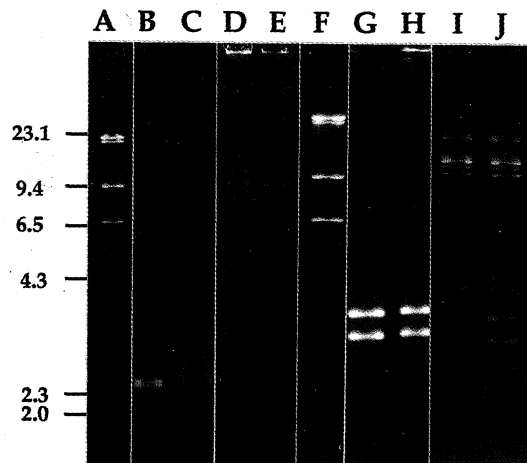


Fig. 6. Restriction patterns with *Hind* III of pSU2718 and pMET1.9 plasmid before and after to be introduced by electrotransformation in *Yersinia ruckeri* strains. A and F: 1 DNA; B: pSU2718 plasmid; C: 11.29 strain transformed by pSU2718; D: PP31 strain; E: PP31 transformed by pSU2718; G: pMET1.9 plasmid; H: 11.29 strain transformed by pMET1.9; I: PP31 strain; J: PP31 transformed by pMET1.9. The size of the standard fragments in kilobase pairs (kbp) of 1 DNA are indicated on the left.

These transformation studies have allowed us to optimize the electrical variables, cell and DNA variables. As it was reported in other genera (13, 22, 27, 31), in *Y. ruckeri* optimal efficiencies were observed with cells in early growth phase. However, in other studies the competent state was achieved in late exponential phase (1) or was not influenced (12).

In the present study, incubation time before pulse was not adequate maybe for a minimal presence of DNases (34). However, incubation after pulse was determinant for the maximization of the electrotransformation of *Y. ruckeri* strains. After discharge, bacterial suspension remained in “dormant” phase without duplication. A recuperation time was necessary for the expression of antibiotic resistance in the transformants (6).

Time constant did not display a great influence on transformation efficiency. From 2.5 ms to 10 ms were conditions frequently used (3, 8, 9, 10, 21, 22, 23, 25). On the contrary, voltage was the most important electric variable on electrotransformation of *Y. ruckeri*. Transformation efficiency was, in all species, dependent of the field strength. However, in the range assayed, the survival rate of the strains varied from high mortalities (1, 2, 6, 8, 13) to high survival levels (22). Survival to high voltage can be dependent to the bacterial membrane. In fact, it has been reported (36) that electroporation could cause damages in membrane, and sometimes the pores can exceed the critical range for cell viability.

High DNA concentrations can saturate the process of transformation by electroporation. In general, transformation efficiencies are optimal with low DNA concentrations. As it was described (7) it is possible that one molecule was sufficient to transform a host cell.

Transformation frequency is dependent also on DNA amount. With high concentrations we can obtain one transformant among a thousand of survival cells. Although in *Y. ruckeri* the range of transformation frequency was great, it was not so wide as those reported in *Escherichia coli* (8) which range from 10^{-1} to 10^{-6} .

The principal variable on electrotransformation efficiency of any bacteria is the cell concentration (6, 8, 13, 35, 36). Optimal results were obtained with the highest cell concentration.

Linear DNA conformation of pSU2718 was able to transform *Y. ruckeri*, but with low efficiency. It is possible that occurs an incomplete digestion or a free recirculation without DNA ligase. Ligation was also effective in other bacteria (6, 15, 27, 32).

Molecular weight will make electrotransformation impossible if it is too high (1, 21, 32). In *Y. ruckeri*, only plasmids lower than 12 kb were introduced by this technique. However, some species studied, like *Bacillus cereus* (2) and *Escherichia coli* (18), can be also transformed by electroporation with plasmids about 100 MD.

Although in our study the transformation efficiency of *Y. ruckeri* was similar using homologous or heterologous DNA, we can not rule out the existence in this species of a restriction/modification system for strange DNA. This system was already demonstrated in some genera (1, 2, 13, 22, 23, 32).

Interestingly DNA directly extracted by the Birnboim and Doly method was as efficient to achieve the electrotransformation of *Y. ruckeri* strains as using DNA purified by CsCl gradient. Therefore, the methodology here described became rapid and less complex.

The high efficiency obtained with religated DNA can allow the use of this technique in genetic engineering (5, 24). In addition since *Yersinia ruckeri* is a good immunogen for fish and easy to culture in conventional media, this species can be a useful candidate for production of recombinant bacterial and viral vaccines, as well as for its use in seroepidemiological studies.

Acknowledgments

We would like to thank L. Álvarez Fernández for the kind supply of plasmid. J. M. Cutrín thanks the Consellería de Educación, Xunta de Galicia, for its financial support.

References

1. Allen, S. P., Blaschek, H. P. (1990). Factors involved in the electroporation-induced transformation of *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol. Lett. **70**, 217–220.
2. Belliveau, B. H., Trevors, J. T. (1989). Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation. Appl. Environ. Microbiol. **55**, 1649–1652.
3. Binotto, J., MacLachlan, P. R., Sanderson, K. E. (1991). Electrotransformation in *Salmonella typhimurium* LT2. Can. J. Microbiol. **37**, 474–477.
4. Birnboim, A., Doly, J. (1979). A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**, 1513–1525.

5. Boettger, C. C. (1988). High-efficiency generation of plasmid complementary DNA libraries using electro-transformation. *Biotechniques* **6**, 878–880.
6. Conchas, R. F., Carniel, E. (1990). A highly efficient transformation system for *Yersinia* species via electroporation. *Gene* **87**, 133–137.
7. David, S., Simons, G., de Vos, W. M. (1989). Plasmid transformation by electroporation of *Leuconostoc paramesenteroides* and its use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1483–1489.
8. Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127–6146.
9. Farinha, M. A., Kropinski, A. M. (1990). High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cells suspensions. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**, 221–226.
10. Gilchrist, A., Smit, J. (1991) Transformation of freshwater and marine caulobacters by electroporation. *J. Bacteriol.* **173**, 921–925.
11. Glaser, R. W., Leikin, S. L., Chernomordik, L. V., Pastushenko, V. F., Sokirko, A. I. (1989). Electrical breakdown of membranes. *Studia Biophys.* **13**, 157–160.
12. Glenn, A. W., Roberto, F. F., Ward, T. E. (1992). Transformation of *Acidiphilium* by electroporation and conjugation. *Can. J. Microbiol.* **38**, 387–393.
13. Haynes, J. A., Britz, M. L. (1990). The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency by electroporation. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 255–263.
14. Heesemann, J., Laufs, R. (1983). Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J. Bacteriol.* **155**, 761–767.
15. Jacobs, M., Wnendt, S., Stahl, U. (1990). High-efficiency electro-transformation of *Escherichia coli* with DNA from ligation mixtures. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1653.
16. Kondo, J. K., McKay, L. L. (1984). Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 252–259.
17. Lee-Weckner, L-J., Chassy, B. R. (1984). Production and regeneration of *Lactobacillus casei* protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 994–1000.
18. Leonard, E. D., Sedivy, J. M. (1990). A new vector for cloning large eukaryotic DNA segments in *Escherichia coli*. *Biol. Technology* **8**, 841–844.
19. Mandel, M., Higa, A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159–162.
20. Martínez, E., Bartolomé, B., de la Cruz, F. (1988). pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and lacZa reporter gene of pUC9/9 and pUC18/19 plasmid. *Gene* **68**, 159–162.
21. Metzler, M. C., Zhang, Y-P., Chen, T-A. (1992). Transformation of the Gram-positive bacterium *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* by electroporation with plasmids from de IncP incompatibility group. *J. Bacteriol.* **174**, 4500–4503.
22. Miller, J. F., Dower, W. J., Tompkins, L. S. (1988). High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 856–860.
23. Mitchell, M. A., Skowronek, K., Kauc, L., Goodgal, S. H. (1991). Electroporation of *Haemophilus influenzae* is effective for transformation of plasmid but not chromosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3625–3628.
24. Nagel, R., Elliot, A., Masel, A., Birch, R. G., Manners, J. M. (1990). Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**, 325–328.
25. Pemberton, J. M., Penfold, R. J. (1992). High-frequency electroporation and maintenance of pUC- and pBR-based cloning vectors in *Pseudomonas stutzeri*. *Current Microbiol.* **25**, 25–29.
26. Portnoy, D. A., Blank, H. F., Kinsbury, D. T., Falkow, S. (1983). Genetic analysis of essential plasmid determinants of pathogenicity in *Yersinia pestis*. *J. Infect. Dis.* **148**, 297–304.

27. Powell, I. A., Achen, M. G., Hillier, A. J., Davidson, B. E. (1988). A simple and rapid method for genetic transformation of lactic streptococci by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 655–660.
28. Rodríguez-Solorzano, L., Rodríguez, J. C., Ortiz, J. M., Mellado, A. (1984). Efficient transformation of a *Yersinia enterocolitica* strain (serotype O:3) by pBR322 DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**, 329–331.
29. Romalde, J. L., Magariños, B., Barja, J. L., Toranzo, A. E. (1993). Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* proposal for a new intraspecies classification. *System. Appl. Microbiol.* **16**, 411–419.
30. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
31. Simon, D., Ferretti, J. J. (1991). Electrotransformation of *Streptococcus pyogenes* with plasmid and linear DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **82**, 219–224.
32. Smith, C. J., Parker, A., Rogers, M. B. (1990). Plasmid transformation of *Bacteroides* spp. by electroporation. *Plasmid* **24**, 100–109.
33. Sugar, I. P., Forster, W., Newmann, E. (1987). Model of cell electrofusion: membrane electroporation, pore coalescence and percolation. *Biophys. Chem.* **26**, 321–335.
34. Taketo, A. (1988). DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim. Biophys. Acta* **949**, 318–324.
35. Trevors, J. T. (1991). Electrotransformation of bacteria. *Meth. Mol. Cell. Biol.* **2**, 247–253.
36. Trevors, J. T., Chassy, B. M., Dower, W. J., Blaschek, H. P. (1991). Electrotransformation of bacteria by plasmid DNA. *In: Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A., Sowers, A. E. (eds.), Handbook of electroporation and electrofusion*, pp. 265–289. Academic Press, New York.
37. Zimmermann, U. (1982). Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta* **694**, 227–277.

Distribución y caracterización fenotípica de *Yersinia* en muestras de origen humano y ambiental

F. Javier Castillo,*¹ Victoria Larraz,² M. Asunción Lafarga,²
Mercedes Navarro,² Rafael Gómez-Lus¹

¹Depto. de Microbiología y Medicina Preventiva, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza

²Instituto Municipal de Salud Pública, Zaragoza

Summary

The distribution of species and phenotypes of *Yersinia* isolated from environmental samples over an eight year period are compared to that of stool cultures obtained from patients of the same geographical location (Zaragoza, Spain). The number of samples and the percentage contamination were as follows: wastewater 362, 67.4%, freshwater 523, 13.4%, raw food 607, 24.5% and cooked food 1134, 7.9%. *Yersinia enterocolitica* was isolated significantly more frequently than other species in wastewater, while *Yersinia intermedia* was the most significant species found in freshwater. Significant differences between the percentage isolates of identified species in raw and cooked foods were not found. Fifteen different serogroups were identified from faeces, thirteen of which were also isolated from environmental samples. Three serogroups of *Y. enterocolitica* associated with human disease were isolated from the patients faeces as follows: O:3, 145 cases; O:8, 3 cases and O:5,27, 1 case. A low proportion were isolated from food: O:3, 3 strains; O:8, 2 strains and O:5,27, 5 strains. Only one isolate from serogroup O:3 was obtained from freshwater.

Key words: *Yersinia*, epidemiology, human sources, environmental sources.

Resumen

Se compara la distribución de especies y fenotipos de *Yersinia* aislados de muestras medio-ambientales durante un período de ocho años con la registrada en los coprocultivos obtenidos de pacientes de la misma área geográfica (Zaragoza, España). El número de muestras y el porcentaje de contaminación fue

* Correspondence to: F. Javier Castillo. Depto. de Microbiología y Medicina Preventiva. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza. Domingo Miral, s/n. 50009 Zaragoza. Tel.: 976-357916.

el siguiente: aguas residuales 362 (67,4%), aguas superficiales 523 (13,4%), alimentos crudos 607 (24,5%) y alimentos cocinados 1134 (7,9%). *Y. enterocolitica* fue significativamente más frecuente en aguas residuales, mientras que *Y. intermedia* lo fue en aguas superficiales. No encontramos diferencias significativas entre los porcentajes de aislamiento de las especies identificadas en alimentos crudos y cocinados. En heces se identificaron 15 serogrupos distintos de los que 13 se aislaron también en muestras ambientales. Los tres serogrupos de *Y. enterocolitica* asociados a patología humana identificados en las heces de pacientes: O:3 (145 casos), O:8 (3 casos) y O:5,27 (1 caso), se recuperaron en baja proporción a partir de alimentos: O:3 (3 cepas), O:8 (2 cepas), O:5,27 (5 cepas). Tan sólo obtuvimos un aislamiento del serogrupo O:3 en aguas superficiales.

Introducción

La presencia de microorganismos del género *Yersinia* en el intestino del hombre y numerosas especies animales configura a la vía feco-oral como el mecanismo de transmisión más frecuente, por lo que parece interesante explorar la presencia de estos microorganismos en los vehículos de transmisión más importantes, es decir, el agua y los alimentos. Por otra parte, es bien conocida la existencia de notables diferencias geográficas tanto en la incidencia como en el espectro de fenotipos asociados a la producción de patología humana (17). El propósito de este estudio fue investigar la presencia y distribución de *Yersinia* spp. en muestras de origen ambiental que podrían constituir vehículos de infección para el hombre y relacionar las características fenotípicas de estos aislamientos con los obtenidos de pacientes en la misma área geográfica.

Materiales y métodos

Se investigó la presencia de *Yersinia* spp. en los coprocultivos de pacientes asistidos en el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza durante el período comprendido entre enero de 1979 y marzo de 1993. Las heces fueron sembradas en agar MacConkey y agar salmonella-shigella (SS); a partir de 1983 se incluyó también agar cefsulodina-irgasan-novobiocina (CIN). Adicionalmente, y durante un período de 18 meses, se utilizó la técnica de enriquecimiento en frío haciendo una emulsión de heces en agua de peptona tamponada (AP) que se incubó a 4°C durante 28 días, practicando resiembras con periodicidad semanal en SS y CIN.

Entre enero de 1985 y marzo de 1993 se procesaron 362 muestras de aguas residuales de los colectores urbanos de Zaragoza, 523 muestras de aguas superficiales del Canal Imperial de Aragón, que es la principal fuente de abastecimiento de la potabilizadora de la ciudad, y 1741 muestras de alimentos procedentes del centro de distribución a los establecimientos de la ciudad, de comercios minoristas y de establecimientos dedicados a la restauración colectiva. Estas muestras se sembraron en AP utilizando un inóculo de 5 ml de agua o 25 g de alimento

homogeneizado en un triturador tipo "Stomacher". Tras 2, 14 y 28 días de incubación a 4°C, 0,5 ml del enriquecimiento fueron mezclados con 4,5 ml de KOH al 0,5% durante 1 minuto (2) y se efectuó resiembra en CIN.

La identificación de especie y biotipo se efectuó por los métodos habituales (4, 12). El tipado serológico se efectuó en el Centro Internacional de Referencia de la OMS (I. Pasteur, París) y en el IMSP utilizando los antisueros monoespecíficos amablemente proporcionados por el Prof. H. H. Mollaret.

Resultados y discusión

Para establecer la incidencia de las principales bacterias enteropatógenas tomamos un período de 4 años (1989–1992) en el que procesamos 14777 muestras de heces procedentes de 8.077 pacientes. En el 15,4% de los enfermos se identificaron los siguientes microorganismos: *Salmonella* (9,12%), *Campylobacter* (4,63%), *Aeromonas-Plesiomonas* (0,74%), *Shigella* (0,48%) y *Yersinia enterocolitica* biotipo 4, serogrupo O:3 (0,44%). Al comparar estos resultados con los reflejados en el Boletín Microbiológico Semanal para el bienio 1988–89 (1) encontramos una notable similitud en la frecuencia relativa de dichos microorganismos, figurando en ambas series *Yersinia* con el porcentaje más bajo.

Las infecciones intestinales producidas por *Y. enterocolitica* son más frecuentes en población infantil (19, 20, 24, 27). Al distribuir los casos estudiados en función de la edad encontramos que las cepas del fenotipo 4/O:3 son más frecuentes en niños (82,7%), mientras que las cepas de otros fenotipos se aíslan en proporción similar en niños (54,7%) y adultos (45,2%). En 26 pacientes infectados por *Yersinia* spp. identificamos otros microorganismos enteropatógenos en la misma muestra: en 12 casos se asoció *Salmonella enterica* (serovars: typhimurium, enteritidis, virchow y ohio), en 12 *Campylobacter jejuni* y en 2 *Giardia lamblia*. La proporción de infecciones asociadas respecto al total fue similar en las cepas del serogrupo O:3 (13%) y en las de otros serogrupos (16,6%).

TABLA 1
ESPECIES Y BIOTIPOS DE *Yersinia* IDENTIFICADOS EN PACIENTES

Especie/Biotipo	Aislamiento directo N° cepas (%)	Enriquecimiento* N° cepas (%)	Total
<i>Y. enterocolitica</i> biotipo 4	137 (94,5)	8 (5,5)	145
<i>Y. enterocolitica</i> biotipo 1	10 (29,4)	24 (70,6)	34
<i>Y. enterocolitica</i> biotipo 3		1	1
<i>Y. frederiksenii</i>	5	2	7

* 18 meses.

La distribución en especies y biotipos de los 187 casos identificados se muestra en la Tabla 1. Al analizar los resultados obtenidos mediante los dos métodos utilizados, y coincidiendo con la experiencia de otros autores (14, 31), comprobamos que el incremento en la recuperación de *Yersinia* obtenido por el enriquecimiento en frío se produce esencialmente a costa del aislamiento de fenotipos no asociados a la producción de patología humana. Todas las cepas de *Y. enterocolitica* biotipo 4 pertenecían al serogrupo O:3 (Tabla 2), este fenotipo asociado a patogenicidad humana fue el más frecuente (77,5%) y es el predominante en España (8, 14, 24, 27). De entre los 15 serogrupos identificados en heces destacamos la presencia de otros dos serogrupos relacionados con la producción de patología humana: O:8 (3 casos) y O:5,27 (1 caso). En la Tabla 2 comparamos la distribución porcentual de los serogrupos prevalentes identificados en muestras de origen humano en estudios realizados en nuestro país (8, 14). Las variaciones en la prevalencia relativa de los serogrupos se justifican en parte por las diferencias existentes en la metodología utilizada, de modo que a un mayor uso del enriquecimiento corresponde una mayor presencia de serogrupos no asociados a la producción de patología humana. A pesar de estas discrepancias, se observa que el serogrupo O:3 es el más frecuente en las tres series y que entre los serogrupos “ambientales” prevalecen O:5, O:6 y O:7,8.

TABLA 2
SEROGRUPOS IDENTIFICADOS EN PACIENTES. COMPARACIÓN CON OTROS ESTUDIOS

Serogrupos	Zaragoza N° casos	Zaragoza Porcentaje	Calvo et al. (8) Porcentaje	Gurgui et al. (14) Porcentaje
O:3	145	77,5	79,5	31,6
O:14	8	4,3		1,4
O:7,8	7	3,7	2,4	4,3
O:5	6	3,2	4,0	11,5
O:6	3	1,6	2,4	7,9
O:8	3	1,6		
O:30				6,5
N° cepas		187	371	139

Seis cepas fueron no tipificables y se aisló una cepa de los serogrupos: O:5,27; O:16; O:36; O:43; O:25,35; O:50,51; O:18,49,51; O:41,42,43; O:39,41,42,43.

Se estudiaron 362 muestras de aguas residuales y 523 de aguas superficiales identificando 566 y 180 cepas de *Yersinia*, respectivamente. El número de muestras de alimentos crudos y cocinados fue de 607 y 1134, y se aislaron 233 y 91 cepas, respectivamente. Es destacable el elevado porcentaje de contaminación registrado en aguas residuales (67,4%) y en alimentos crudos (24,5%). Los mecanismos naturales que operan en la autodepuración de las aguas

contribuyen a reducir la carga microbiana y justifican la presencia de un índice de contaminación significativamente menor en las aguas superficiales (13,4%). El efecto del calor se traduce en una sustancial y significativa reducción de la contaminación registrada para los alimentos cocinados (7,9%). Los elevados porcentajes de contaminación, comparables a los obtenidos por otros autores (3, 10, 11, 14, 26) son indicativos de la amplia distribución de *Yersinia* en el medio ambiente, lo que evidentemente posibilita su transmisión al hombre.

Al analizar la distribución porcentual de las especies de *Yersinia* identificadas en los distintos tipos de muestras estudiadas (Tabla 3), observamos que *Y. enterocolitica* fue la especie más frecuente en todas ellas. Las denominadas "especies relacionadas" se aíslan fundamentalmente del medio exterior y su recuperación de heces suele ser reflejo de un simple tránsito intestinal. Al comparar las especies identificadas en el medio acuático encontramos que *Y. enterocolitica* fue significativamente más frecuente en aguas residuales, mientras que *Y. intermedia* se aisló con una frecuencia significativamente mayor en aguas superficiales. La alta presencia de esta especie en aguas superficiales es indicativa de su origen acuático (7, 26, 33). La distribución de especies en alimentos crudos y cocinados fue muy similar, sin diferencias significativas. Al comparar la distribución de las especies identificadas en muestras ambientales con la obtenida en los pacientes, llama la atención la ausencia de *Y. intermedia* en heces, cuando realmente está presente, tanto en aguas superficiales como en alimentos. Su presencia escasa en aguas residuales y en el intestino podría reflejar su limitada capacidad para mantenerse en medios con fuerte competencia bacteriana. La heterogeneidad de los integrantes del género *Yersinia* debida a diferencias notables en su fisiología se reflejan en su distribución en la naturaleza.

TABLA 3
DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE *Yersinia* EN MUESTRAS DE DISTINTO ORIGEN

Especies	Aguas residuales	Aguas superficiales	Alimentos crudos	Alimentos cocinados	Heces de pacientes
<i>Y. enterocolitica</i>	78,3	49,4	73,0	75,8	96,2
<i>Y. frederiksenii</i>	13,9	11,7	11,1	6,6	3,7
<i>Y. kristensenii</i>	1,1	1,1	3,0	4,4	
<i>Y. intermedia</i>	1,9	37,8	12,0	13,2	
<i>Yersinia</i> sp.	4,8		0,8		
Nº cepas	566	180	233	91	187

TABLA 4
DISTRIBUCIÓN DE BIOTIPOS DE *Y. enterocolitica* EN MUESTRAS DE DISTINTO ORIGEN

Biotipos	Aguas residuales	Aguas superficiales	Alimentos crudos	Alimentos cocinados	Heces de pacientes
Biotipo 1	83,1	50,6	70,5	79,7	18,9
Biotipo 2	10,6	41,6	23,5	13,0	
Biotipo 3	5,6	3,4	4,7	5,8	0,5
Biotipo 4	0,7	4,5	1,2	1,4	80,5
Nº cepas	443	89	170	69	180

Como puede observarse en la Tabla 4, existen marcadas diferencias en la distribución de los biotipos de *Y. enterocolitica* identificados en heces respecto a la hallada en muestras medio-ambientales. Frente a un claro predominio del biotipo 4 en el hombre (80,5%), en las otras muestras constituye el biotipo menos frecuente. El concepto de fenotipos “adaptados” al hombre (9, 21, 22), cuya presencia en el medio exterior sería limitada o transitoria por su escasa capacidad para competir y mantenerse, tiene un claro reflejo en los resultados obtenidos. En este sentido, la menor presencia porcentual del biotipo 4 entre las muestras ambientales se produce precisamente en aguas residuales que, al proceder de colectores urbanos que recogen efluentes de origen humano, debería tener una composición más parecida a la hallada en heces. Los fenómenos de competencia parecen críticos para marcar las diferencias observadas. Sin olvidar el destacado papel que desempeñan otros reservorios demostrados, como el cerdo (6, 15, 19, 23, 25, 29), la circulación interhumana de estas cepas no debe menospreciarse. De modo similar a lo señalado al comparar las especies recuperadas, se observan notables diferencias en la distribución de biotipos en aguas residuales y superficiales, con mayor presencia del biotipo 1 en las primeras y valores similares para los biotipos 1 y 2 en aguas superficiales. Los biotipos identificados en alimentos crudos y cocinados presentan una distribución similar.

Los diferentes serogrupos identificados en muestras ambientales, así como la relación de los aislados en pacientes y en dos o más tipos de muestras ambientales, se reflejan en la Tabla 5. El serogrupo O:5 figura entre los más frecuentemente identificados en las diferentes muestras. El serogrupo O:6,30,31 fue el más frecuente en aguas superficiales, recuperándose también entre los predominantes en alimentos crudos y cocinados. Tan sólo dos serogrupos (O:5 y O:25,35) se identificaron en todas las muestras (Tablas 2 y 5). Cuatro serogrupos (O:3, O:14, O:16 y O:50,51), entre los que figura el patógeno por excelencia en nuestro medio, se aislaron a partir del hombre, los alimentos y uno de los tipos de muestras acuáticas. Los otros dos serogrupos asociados a patología humana (O:8 y O:5,27) se recuperaron del reservorio humano y de los alimentos. El papel de la vía alimentaria como transmisora de cepas potencialmente patógenas queda de manifiesto por estos resultados.

TABLA 5
SEROGRUPOS DE *Yersinia* IDENTIFICADOS EN MUESTRAS AMBIENTALES

Alimentos crudos	Alimentos cocinados	Aguas residuales	Aguas superficiales
<u>O:5 (51)*</u>	<u>O:5 (15)</u>	O:10,34 (9)	O:6,30,31 (12)
O:7,8,13,19 (29)	O:6,30,31 (13)	<u>O:5 (7)</u>	O:4,32 (9)
O:6,30,31 (17)	O:7,8,13 (10)	O:7,9,13,19 (6)	O:52,53 (9)
O:7,8,13 (8)	O:4,32,33 (8)	O:6,47 (4)	O:4,14,16,29 (8)
O:16,29 (5)	O:10 (4)	<u>O:14 (3)</u>	O:7,8,13,19 (7)
O:4,32,33 (5)	<u>O:5,27 (3)</u>	<u>O:6 (2)</u>	O:12,25,26 (6)
<u>O:25,35 (5)</u>	<u>O:25,35 (3)</u>	<u>O:25,35 (2)</u>	<u>O:5 (5)</u>
O:10,34 (3)	O:11,23,24 (3)	O:12	O:38,52,53 (5)
<u>O:3 (2)</u>	O:41,42,43 (3)	<u>O:16</u>	O:7,8,9,23 (5)
<u>O:5,27 (2)</u>	O:17 (2)	O:47	O:10,14 (4)
<u>O:6</u>	O:12,25,26 (2)	O:6,30	O:16,34 (4)
<u>O:8</u>	O:52,53,54	O:13,2	<u>O:3</u>
<u>O:14</u>	<u>O:3</u>	O:16,34	O:17
O:15	<u>O:8</u>	O:7,13,19	O:40
<u>O:16</u>	<u>O:14</u>	O:39,41,42,43	O:8,9
O:17	<u>O:16</u>	O:46,52,53,54	<u>O:25,35</u>
O:27	O:31		O:34,30
O:32	O:40		O:48,52
O:4,32	O:43		<u>O:50,51</u>
O:7,13	O:4,32		O:5,7,13
O:34,38	O:7,8		O:5,11,23
<u>O:50,51</u>	<u>O:50,51</u>		
O:3,8,52			

* El número de cepas figura entre paréntesis. Los serogrupos aislados de pacientes y de dos o más muestras ambientales figuran subrayados.

En los alimentos crudos obtuvimos el mismo porcentaje de contaminación en los productos cárnicos y en los productos de la pesca (24,5%). El porcentaje de contaminación global de los alimentos cocinados (7,9%) fue significativamente inferior al hallado en los alimentos crudos. También es destacable la ausencia de *Yersinia* en el pollo cocinado, dado que presentó el mayor índice de contaminación de los alimentos crudos analizados (43,4%), en concordancia con los resultados de Toquin (30). Por la conocida presencia en el cerdo de fenotipos patógenos para el hombre, son destacables los porcentajes de contaminación registrados entre los alimentos cocinados, en carne de cerdo (10%), embutidos (20,1%), salchichas (14,6%) y hamburguesas (11,4%). Entre los cárnicos crudos destacan: embutidos (29,3%), salchichas (26,4%), hamburguesas (14,6%) y carne picada (13,2%). Aunque sólo el 2,5% de los lácteos pasteurizados

presentaron contaminación por *Yersinia*, una de las cepas aisladas de leche se identificó como *Y. enterocolitica* 4/O:3. Este hallazgo discrepa de los resultados obtenidos por otros autores (18), pero confirma los hallazgos de Hughes (16) y Tacket et al. (28). La contaminación postpasteurización, más que la capacidad de *Yersinia* para sobrevivir al proceso de higienización de la leche, justificaría la contaminación (13). Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores (10, 11, 14, 18, 32) encontramos que el porcentaje de contaminación detectado fue similar, con valores que oscilan entre el 21,1% y el 33,5%. En los cuatro estudios reflejados en la Fig. 1 se aisló *Y. enterocolitica* con más frecuencia que las otras especies, siendo también en todos ellos prevalente el biotipo 1 dentro de esta especie. La mayor presencia del biotipo 4 en el estudio de Gurgui et al. (14) debe ser relacionada con la inclusión de lenguas de cerdo en la muestra analizada. Nosotros aislamos dos cepas de *Y. enterocolitica* 4/O:3 en muestras de carne picada cruda, que suele incluir carne de cerdo en su composición. En tres de los estudios comparados se constató una presencia destacada del serogrupo O:5, que se ha relacionado con producción de patología humana (5) y figura entre los hallados con más frecuencia tanto en el hombre, como en alimentos y muestras medio-ambientales (8, 10, 11, 14, 18, 26). Precisamente su abundante distribución en el medio podría justificar su recuperación de las heces con más frecuencia que otros serogrupos.

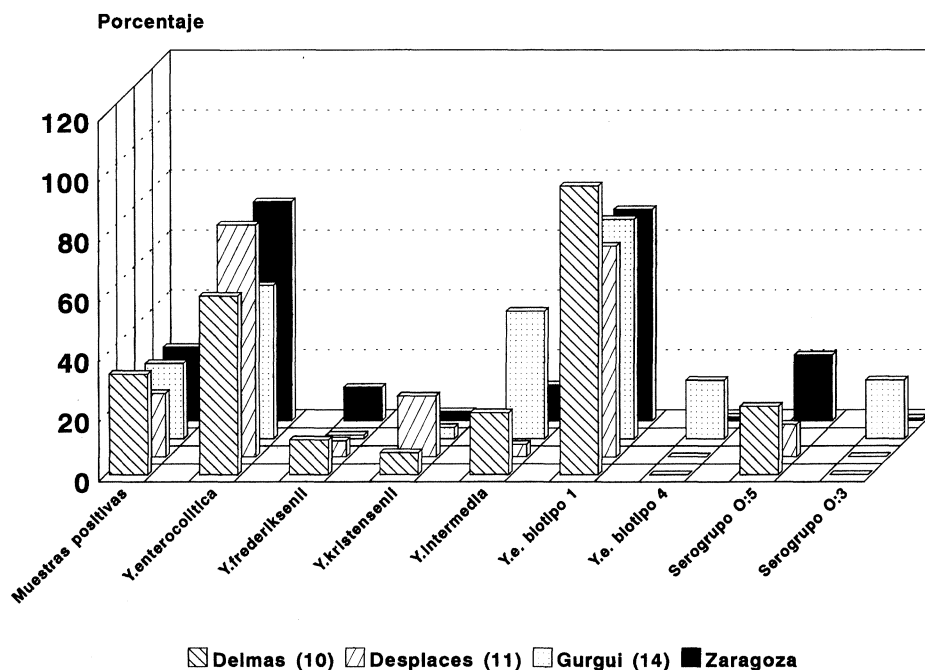


Fig. 1. Comparación de resultados obtenidos en alimentos crudos.

Bibliografía

1. Anónimo. (1990). Vigilancia de gastroenteritis notificadas al Sistema de Información Microbiológica. 1988–1990 (Semana 32). Boletín Microbiológico Semanal. Ministerio de Sanidad y Consumo. España **29–30**, 177–178.
2. Aulisio, C. C. G., Mehlman, I. S., Sanders, A. C. (1980). Alkali method for rapid recovery of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* from foods. Appl. Environ. Microbiol. **39**, 135–140.
3. Bercovier, H., Brault, J., Barre, W., Mollaret, H. H. (1978). Biochemical, serological and phagetyping characteristics of 459 *Yersinia* strains isolated from a terrestrial ecosystem. Curr. Microbiol. **1**, 353–357.
4. Bercovier, H., Brenner, D. J., Ursing, J., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Alonso, J. M., Carter, G. P., Mollaret, H. H. (1980). Characterization of *Yersinia enterocolitica* sensu stricto. Curr. Microbiol. **4**, 201–206.
5. Bissett, M. L., Powers, C., Abbott, S. L., Janda, J. M. (1990). Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency, and serogroup distribution. J. Clin. Microbiol. **28**, 910–912.
6. Blumberg, H. M., Kiehlbauch, J. A., Wachsmuth, I. K. (1991). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* O:3 infections: use of chromosomal DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes. J. Clin. Microbiol. **29**, 2368–2374.
7. Calvo, C., Brault, J. (1983). Contribución al estudio epidemiológico de *Yersinia enterocolitica*. Ann. Microbiol. **134 A**, 183–188.
8. Calvo, C., Ramos-Cormenzana, A., Guiyoule, A., Mollaret, H. H. (1985). Incidencia de *Yersinia enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* y *Y. intermedia* en España. Enf. Infec. y Microbiol. Clin. **2**, 105–109.
9. Cornelis, G., Laroche, Y., Ballingand, G., Sory, M. P., Wauters, G. (1987). *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. Rev. Infect. Dis. **9**, 64–87.
10. Delmas, C. L., Vidon, D. J. M. (1985). Isolation of *Yersinia enterocolitica* and species from foods in France. Appl. Environ. Microbiol. **50**, 767–771.
11. Desplaces, N. (1985). Fréquence d'isolement de *Yersinia* sp. dans certains aliments. Sci. Aliment. **5**, 110–112.
12. Farmer III, J. J., Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., Riddle, C., Wathen-Grady, H. G., Elias, C., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., O'Hara, C. M., Morris, G. K., Smith, P. B., Brenner, D. J. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. **21**, 46–76.
13. Greenwood, M. H., Hooper, W. L. (1985). *Yersinia* spp. in foods and related environments. Food Microbiol. **2**, 263–269.
14. Gurgui, M., Mirelis, B., Coll, P., Prats, G. (1988). Epidemiology of *Yersiniae* in Barcelona (Spain). Microbiol. SEM **4**, 107–116.
15. Gurgui, M., Mirelis, B., Coll, P., Prats, G. (1987). *Yersinia enterocolitica* infections and pork. Lancet. **ii**, 334.
16. Hughes, D. (1979). Isolation of *Yersinia enterocolitica* from milk and a dairy farm in Australia. J. Appl. Bacteriol. **46**, 125–130.
17. Hurvell, B. (1981). Zoonotic *Yersinia enterocolitica* infection: host range, clinical manifestations, and transmission between animals and man. In: Bottone, E. J. (ed.), *Yersinia enterocolitica*, pp. 145–159. CRC Press, Boca Raton, FL.
18. Ibrahim, A., Mac Rae, I. C. (1991). Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from red meat and milk. J. Food Sci. **56**, 1524–1526.

19. Lee, L. A., Gerber, A. R., Lonsway, D. R., Smith, J. D., Carter, G. P., Puhr, N. D., Parrish, C. M., Sikes, R. K., Finton, R. J., Tauxe, R. V. (1990). *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N. Engl. J. Med.* **322**, 984–987.
20. Metchock, B., Lonsway, D. R., Carter, G. P., Lee, L. A., McGowan, Jr., J. E. (1991). *Yersinia enterocolitica*: a frequent seasonal stool isolate from children at an urban hospital in the southeast United States. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2868–2869.
21. Mollaret, H. H. (1976). Contribution a l'étude épidémiologique des infections à *Yersinia enterocolitica*. *Méd. Mal. Infect.* **6**, 442–448.
22. Mollaret, H. H., Alonso, J. M., Bercovier, H. (1982). Aspects biologiques, diagnostiques et écologiques des yersinioses. *Méd. Mal. Infect.* **12**, 664–667.
23. Nesbakken, T., Kapperud, G., Dommarsnes, K., Skurnik, M., Hornes, E. (1991). Comparative study of a DNA hybridization method and two isolation procedures for detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in naturally contaminated pork products. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 389–394.
24. Pérez Trallero, E., Cilla Eguiluz, G., López Lopategui, M. C., Urbietta Egaña, M. (1986). Gastroenteritis por *Yersinia enterocolitica* en Guipúzcoa. Estudio de 103 casos. *Enf. Infecc. y Microbiol. Clin.* **4**, 262–266.
25. Pérez Trallero, E., Idígoras, P., Solaun, M. L., Zigorraga, C. (1992). Comparación de cepas de *Yersinia enterocolitica* porcinas y humanas aisladas en Guipúzcoa. *Enf. Infecc. y Microbiol. Clin.* **10**, 186–189.
26. Shayegani, M., DeForge, I., McGlynn, D. M., Root, T. (1981). Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *J. Clin. Microbiol.* **14**, 304–312.
27. Soriano, F., Ponte, M. C., Rivas, M. C., Oliva, M., Gaspar, M. C. (1981). Infección humana por *Yersinia enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* en España. Análisis de 80 casos recientes. *Rev. Clin. Esp.* **161**, 215–222.
28. Tacket, C. O., Narain, J. P., Sattin, R., Lofgren, J. P., Konigsberg, C., Rendtorff, R. C., Rausa, A., Davis, B. R., Cohen, M. L. (1984). A multistate outbreak of infection caused by *Yersinia enterocolitica* transmitted by pasteurized milk. *J. Am. Med. Assoc.* **251**, 483–486.
29. Tauxe, R. V., Vandepitte, J., Wauters, G., Martin, S. M., Goossens, V., de Mol, P., vøan Noyen, R., Thiers, G. (1987). *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* **i**, 1129–1132.
30. Toquin, M. T. (1985). Orige des *Yersinia* isolées à partir d'escalopes de volailles. *Sci. Aliments.* **5**, 85–91.
31. Van Noyen, R., Vandepitte, J., Wauters, G. (1980). Non value of cold enrichment of stools for isolation of *Yersinia enterocolitica* serotypes 3 and 9 from patients. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 127–131.
32. Walker, S. J., Gilmour, A. (1986). The incidence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like organisms in raw and pasteurized milk in northern Ireland. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 133–135.
33. Wauters, G. (1981). The pathogenic significance of the different *Yersinia* group in man. *In*: Roberts, T. A., Hobbs, G. (eds.), Psychotropic microorganisms in spoilage and pathogenicity. Academic Press, London.

Bioensuciamiento de tubos en cambiadores de calor¹

Felipe Montero,* José Luis Pintado

Laboratorio de Tecnología de Materiales, IBERDROLA, S.A., Madrid

Summary

We compared the biofouling behavior of different materials (admiralty brass, stainless steel, and titanium) commonly used to construct heat exchangers in thermoelectric plants. The incidence of film formation on the loss of heat during transference was assessed, and analyzed in terms of plant efficiency and corrosion, both general and localized development. Our results showed that the resistance of titanium and stainless steel to corrosion was similar, and much better than that of admiralty brass. Biofouling, however, was higher in the first two materials.

Key words: Biofouling, titanium, calorific transfer.

Resumen

Se ha efectuado un estudio comparativo de la respuesta al bioensuciamiento de diversos materiales (latón almirantazgo, acero inoxidable y titanio) empleados comúnmente en la construcción de cambiadores de calor de centrales termoeléctricas. Se ha estudiado el efecto que la formación de biopelícula ejerce sobre la pérdida de transferencia calorífica y, por tanto, sobre el rendimiento de la planta y la corrosión, tanto generalizada como puntual. Nuestros resultados muestran que la resistencia a la corrosión del titanio y del acero inoxidable es muy similar en ambos, y muy superior a la del latón almirantazgo. En cuanto al bioensuciamiento, se invierten las características, es decir, es mayor en los dos primeros casos.

* *Correspondence to:* Felipe Montero. Laboratorio de Tecnología de Materiales. IBERDROLA, S.A. Paseo Virgen del Puerto, 57. 28005 Madrid. Tel.: 91–3662500. Fax: 91–3641230.

¹“Bioensuciamiento” es la traducción que proponen los autores del término inglés *biofouling*.

Introducción

El bioensuciamiento que se produce en los cambiadores de calor, debido a la colonización de la superficie de los tubos por microorganismos, causa grandes problemas, tanto por la disminución de la transferencia calorífica como por los fenómenos de corrosión que suelen ir unidos a este proceso.

Hasta hace pocos años no se había tenido en cuenta la acción biológica en la corrosión de las superficies metálicas sumergidas, achacándose las que se producían a mecanismos puramente electroquímicos o físicos. Sin embargo, hoy en día se conoce bastante bien la gran influencia que los microorganismos (bacterias, hongos, microalgas, etc.) tienen en la formación de estas películas y sus efectos (2, 3).

Como ejemplo de la importancia de este fenómeno, sobre todo en grandes cambiadores de calor de centrales térmicas y nucleares, podemos decir que se ha comprobado que el rendimiento de estos aparatos llega a disminuir hasta un 20% o 30%, lo cual repercute en el rendimiento general de la planta.

Paralelamente, además del bioensuciamiento antes mencionado, se producen en muchos casos corrosiones inducidas biológicamente que obligan a suspender la producción energética mientras se reparan y que suponen pérdidas materiales y económicas verdaderamente importantes.

Objetivos

El Laboratorio de Tecnología de Materiales de IBERDROLA, S.A., está llevando a cabo un estudio comparativo del comportamiento de diversos materiales, latón almirantazgo, acero inoxidable y titanio, en lo que se refiere al bioensuciamiento y sus consecuencias en el rendimiento de condensadores de centrales termoeléctricas de gran potencia, así como los posibles tipos de corrosiones que se pueden producir. Este estudio está financiado por OCIDE dentro del Programa de Investigación Electrotécnica (PIE). El estudio comenzó el año 1992 y se encuentra en curso en este momento, por lo que esta comunicación es un adelanto de lo que se ha realizado hasta la fecha y de los resultados obtenidos.

De todos es bien conocido que el comportamiento de los microorganismos es muy diferente según cual sea el medio en que se realicen los ensayos. Por esta razón se decidió llevar a cabo todo el estudio en medios naturales, es decir en las propias centrales termoeléctricas y usando las mismas aguas con los tratamientos químicos que realmente se efectúan en ellas.

Los objetivos de este proyecto son fundamentalmente:

(a) Estudio de la cantidad y espesor de las biopelículas que se forman en los tubos durante un período de tiempo largo, superior a un año, con el fin de ver el efecto estacional, factor muy importante en el desarrollo biológico. Este estudio se ha efectuado en tubos con circulación de agua y en tubos taponados para ver la influencia del estancamiento sobre la formación de las películas.

(b) Estudio biológico y químico de la naturaleza de estas biopelículas y su posible relación con la composición del agua, la temperatura y otros parámetros.

(c) Estudio de la disminución del coeficiente de transferencia calorífica en función del tiempo de exposición de los tubos al bioensuciamiento.

(d) Estudio del efecto electroquímico que el bioensuciamiento produce en las superficies metálicas de los tubos, como corrosiones de cualquier tipo y, muy especialmente, las puntuales que son las que entrañan más peligro en estas instalaciones.

Queremos puntualizar que el estudio que se está realizando tendrá total validez para las dos centrales elegidas con aguas procedentes de los ríos Tajo y Júcar, con sistemas de circulación de un solo paso la primera y en circuito de recirculación abierto la segunda. Los resultados obtenidos no se pueden generalizar totalmente a otras centrales, ya que con otros tipos de aguas y sistemas el comportamiento de los materiales será probablemente distinto, debido a las particulares condiciones químicas y biológicas del agua en cada caso.

En este estudio sólo se reflejan los resultados obtenidos para los objetivos a), b) y d), que han sido los inicialmente analizados. El objetivo c), que estudia la influencia de la biopelícula sobre la transferencia calorífica, se encuentra todavía en período de ejecución.

Materiales y métodos

Para el estudio de los tubos taponados se preparó un recipiente de PVC de 500 x 600 x 400 mm, con una serie de soportes en su interior para acomodar las probetas que iban a ser extraídas periódicamente (Fig. 1).

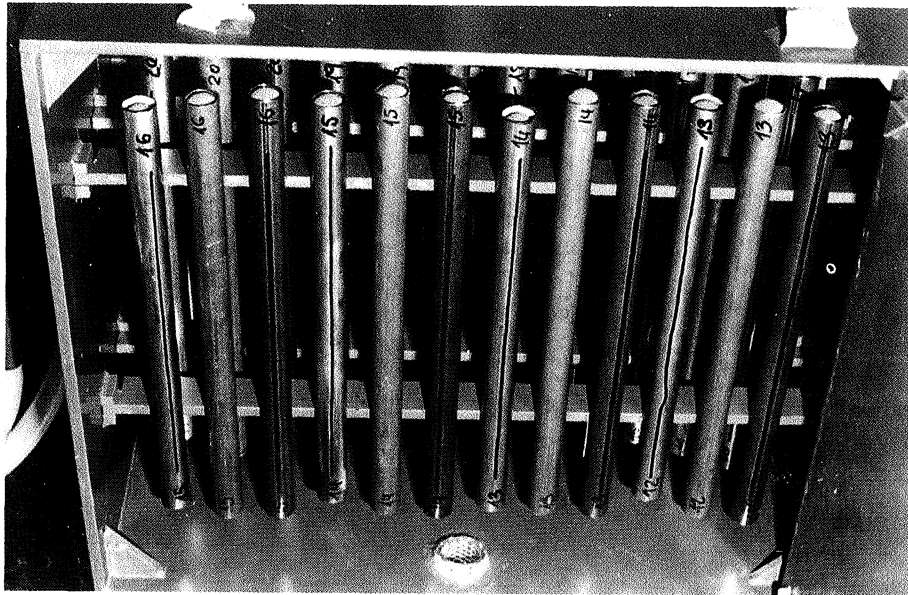


Fig. 1. Disposición general de las probetas taponadas que muestra las bolas de Taprogge en la entrada de las mismas.

Todas las probetas ensayadas eran de 400 mm de longitud, que es la mínima necesaria para realizar los ensayos por corrientes inducidas antes de instalarlas y después de cada extracción. Estas probetas se limpiaron, desengrasaron, marcaron sus extremos y la generatriz superior y a continuación se pesaron y calibraron. También se llevaron a cabo los correspondientes análisis químicos de los materiales empleados en estos tubos.

El extremo de cada tubo más próximo a la entrada del agua se taponó con bolas de Taprogge, como muestra la Fig. 1. Los tramos de tubo con circulación interior de agua se colocaron en tres líneas paralelas a la entrada de la caja anterior, uniéndose entre sí mediante manguitos de PVC (Fig. 2).

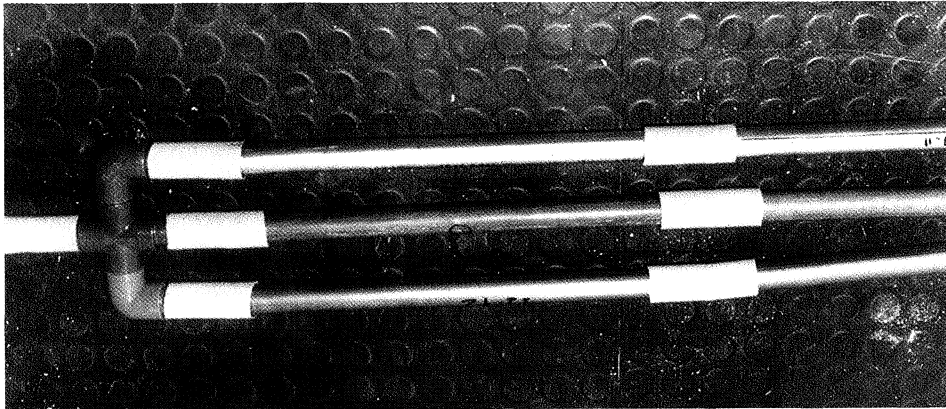


Fig. 2. Tubos con circulación de agua.

El caudal se reguló mediante un depósito situado a la entrada de los tubos en el que se mantenía una altura de agua constante, con un caudal aproximado de 25 litros/minuto para las tres líneas, que supone una velocidad de flujo por el interior de los tubos de aproximadamente 0,003 m/seg. Se eligió esta velocidad tan pequeña a fin de mantener los materiales en un flujo laminar lento, que permitiera con mayor facilidad la formación del bioensuciamiento y, por lo tanto, acelerar las posibles corrosiones que lleva consigo.

Se pensó en mantener los bancos en funcionamiento durante un año para poder estudiar la influencia de las estaciones en el desarrollo biológico, es decir, en el bioensuciamiento, efectuando extracciones cada 30 o 40 días. Simultáneamente a la retirada de los tubos, se tomaron muestras del agua circulante para realizar en ella los correspondientes análisis químicos y bacteriológicos. La Fig. 3 es una vista general de la instalación. El banco de ensayos para determinar el coeficiente de transferencia calorífica está formado por un recipiente cerrado, de acero inoxidable, atravesado longitudinalmente por tres tubos de 2 m de longitud, de los mismos materiales empleados en el banco anterior, formando así un pequeño condensador.

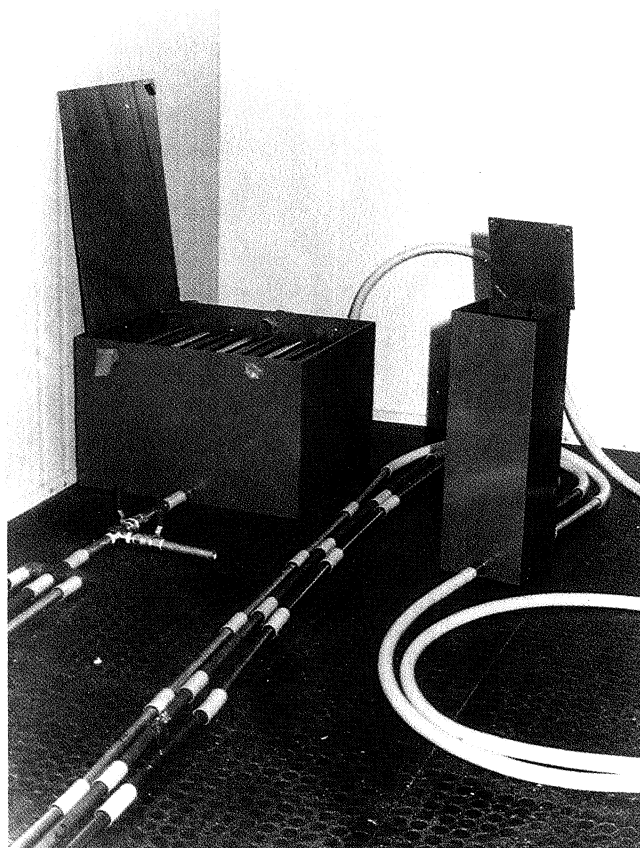


Fig. 3. Vista general de la instalación.

El agua que circula por el interior de los tubos se abastece de la misma línea que el banco anterior, habiéndose instalado a la entrada de cada tubo un caudalímetro electromagnético de alta precisión (0,5%) para la medida del caudal que circula por cada uno de ellos. Tanto a la entrada como a la salida de cada tubo se instalaron tres sondas de alta precisión (Pt-100 clase A) para el registro de las temperaturas, situadas a distinta profundidad respecto al eje del tubo.

Este pequeño condensador fue dotado de un sistema de caldeo eléctrico con el fin de producir el vapor necesario y posteriormente condensarlo en los tubos situados en la zona media del calderín, fuera del contacto con el agua. Asimismo, el calderín fue dotado de los correspondientes elementos de seguridad y control para conocer en todo momento las condiciones de operación y fijar las más convenientes.

Tanto los caudalímetros como todas las sondas de temperatura fueron conectadas a un sistema de captación de datos, unido a un ordenador, capaz de registrar y procesar los datos en los tiempos fijados y en la cantidad de medidas requeridas.

Para comprobar como se inicia el bioensuciamiento, se colocaron probetas de 1 cm^2 de los tres materiales estudiados con tiempos progresivos de inmersión de 1 a 24 horas. Estas probetas fueron posteriormente fijadas y deshidratadas mediante punto crítico para ser metalizadas con oro y efectuar su observación por microscopia electrónica de barrido (SEM).

Resultados

En este estudio, cuando hablamos de biopelículas o bioensuciamiento, incluimos en estas expresiones la suma de microorganismos depositados con las sales minerales inorgánicas que quedan atrapadas entre ellos y que forman en conjunto una película sobre la pared de los tubos. Anteponeamos siempre la palabra "bio" porque la componente biológica es dominante, frente a la mineral, tanto en el origen como en formación de la película (4).

Queremos resaltar que los resultados que se dan a continuación se refieren exclusivamente al agua de refrigeración del río Tajo, ya que los correspondientes al río Júcar están en proceso de análisis y no son suficientes para poder sacar conclusiones.

Tubos con circulación de agua

Con los datos obtenidos en las distintas extracciones se ha hecho una serie de representaciones gráficas para mejor comparación y seguimiento del bioensuciamiento. Como ejemplo, en la Fig. 4 se han representado en abscisas el tiempo transcurrido, en días, y en

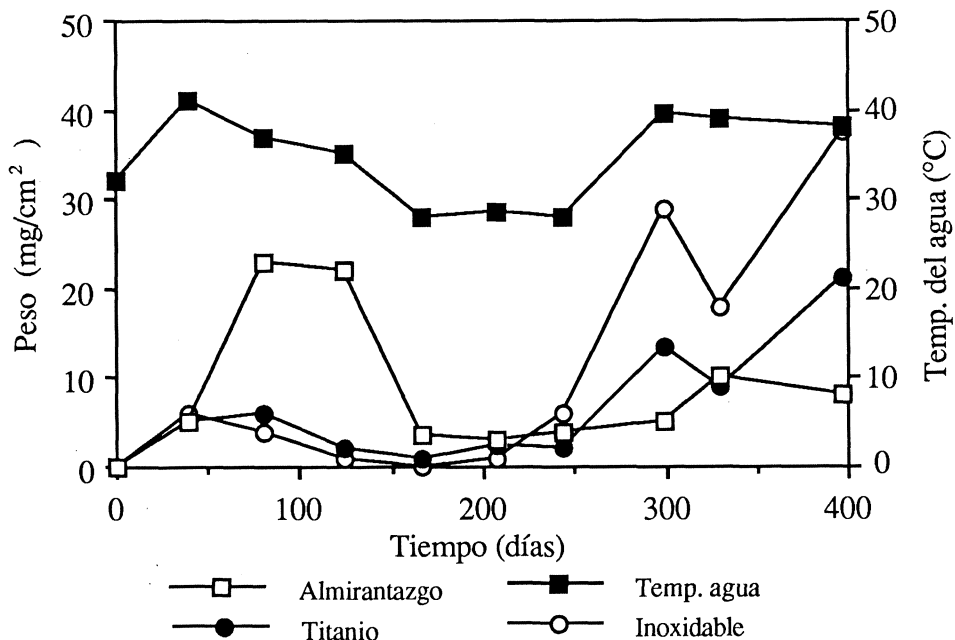


Fig. 4. Peso de la capa de bioensuciamiento seca en tubos con circulación de agua.

ordenadas el peso de biopelícula seca depositada. La temperatura del agua en °C también está representada en ordenadas. En esta gráfica se ve claramente la influencia de la temperatura del agua circulante en el desarrollo de los microorganismos y, por tanto, del bioensuciamiento (5).

El comportamiento del titanio y del acero inoxidable ha sido similar, con una deposición media de materia desecada inferior a 5 mg/cm². En comparación, el latón almirantazgo parece que ha tenido un valor mayor, pero, hay que tener en cuenta el fuerte ataque que ha sufrido la cara interior de éste, por lo que en este dato están incluidos parte de los productos de corrosión formados (fundamentalmente sulfuros) que al tener un peso específico mayor influyen notablemente en este dato.

En la Fig. 5 se ha representado el espesor de la biopelícula formada en función del tiempo, considerando que es uniforme en toda la longitud y sección del tubo. En la figura se aprecia como el mayor espesor corresponde al acero inoxidable y en menor cantidad al titanio y al Almirantazgo. Las fluctuaciones de estos valores están motivadas por la componente biológica.

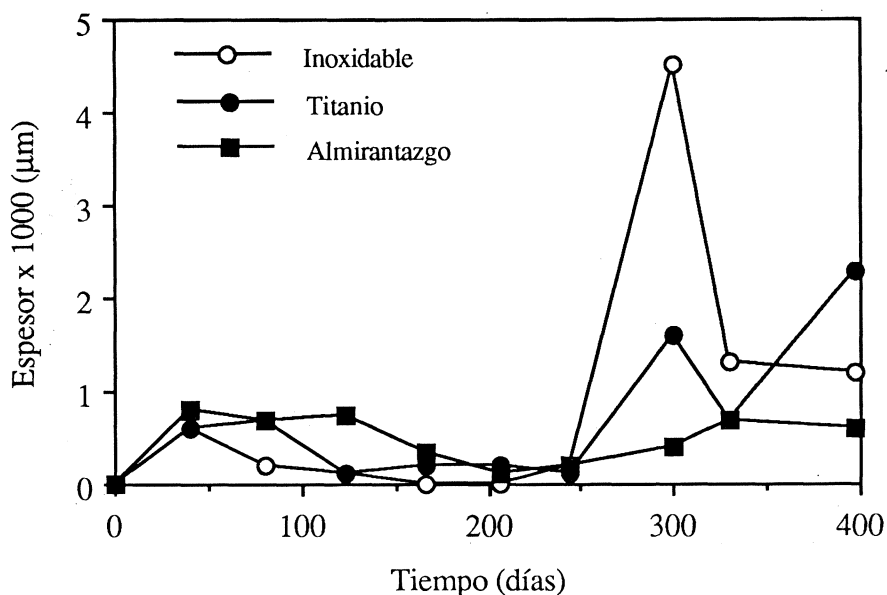


Fig. 5. Espesor de la capa de bioensuciamiento depositado en tubos con circulación de agua.

Tubos taponados

En la Tabla 1 se indican los valores del peso de espesor y del espesor de película seca, en función del tiempo transcurrido, tanto para tubos con circulación como taponados. En los tubos taponados el peso de película seca por unidad de superficie es mucho menor que en los tubos con circulación, ya que el bioensuciamiento sólo se produce, aproximadamente, en los 100 mm del extremo opuesto al taponamiento. Lo que sí se aprecia es la diferencia en la cantidad de deposición, mucho mayor en el tubo de latón almirantazgo que en los de titanio y de acero inoxidable, que siguen siendo muy parecidas en ambos. Debajo de la bola de Taprogge en el latón aparece una zona corroída.

TABLA 1
BIOENSUCIAMIENTO DE TUBOS EN CAMBIADORES DE CALOR

Días	Tubos con circulación		Tubos taponados	
	Acero inoxidable	Titanio	Latón almirantazgo inoxidable	Titanio almirantazgo
	Peso biopelícula (mg/cm ²)			
40	5,08	4,39	5,04	0,065
81	3,67	5,27	16,66	0,094
124	0,77	1,32	21,96	0,051
166	0,13	0,73	3,14	0,089
207	0,55	1,71	2,49	0,093
244	4,71	1,64	3,52	0,183
299	29,41	12,92	3,78	0,262
330	19,15	9,21	10,05	0,096
397	36,14	20,67	8,37	0,237
	Espesor biopelícula (µm)			
40	541,27	530,27	797,49	27,36
81	130,27	667,67	672,51	53,36
124	48,65	41,11	702,22	24,87
166	19,53	165,38	266,63	40,89
207	24,87	211,47	89,35	23,09
244	229,39	41,11	213,15	21,31
299	4493,83	1592,93	340,14	44,45
330	1287,70	711,41	799,37	21,31
397	1226,13	2383,33	574,67	44,45
	Materia orgánica (%)			
40	31,63	31,05	33,05	47,53
81	11,00	35,69	25,79	41,19
124	13,75	10,99	11,04	53,10
166	35,09	63,15	22,28	41,83
207	41,31	55,37	11,24	41,66
244	42,09	74,17	10,41	38,42
299	29,45	30,51	24,28	42,14
330	22,36	24,12	24,22	41,85
397	19,00	25,86	20,23	37,78

El espesor de la biopelícula es también mayor en el latón almirantazgo, seguido del titanio y del acero inoxidable, respectivamente. Aunque los tres materiales han estado expuestos en este caso a la acción del agua en su cara externa, las deposiciones o corrosiones sufridas en ella no han tenido incidencia en los datos anteriores.

Pérdida de peso

En los tubos con circulación también se han controlado sus variaciones en peso entre el comienzo del ensayo y cada una de las extracciones periódicas. Los tubos de acero inoxidable y los de titanio no han tenido variaciones de peso apreciables, mientras que en los de latón esta pérdida ha ido aumentando progresivamente hasta alcanzar en trece meses un 0,16% respecto al peso del tubo, que, referido a superficie atacada equivale a 1,8 mg/cm², que es un valor muy elevado.

En los tubos taponados, este mismo ensayo se ha visto muy influenciado por el ataque de la superficie exterior del tubo, donde el agua ha tenido una circulación muy lenta que ha permitido la formación de una notable biopelícula y, consecuentemente, una fuerte corrosión generalizada, principalmente en la generatriz superior del tubo. Indicaremos que en el latón almirantazgo tuvo lugar un 1,02% de pérdida de peso total y de 5,9 mg/cm² por unidad de superficie. Los tubos de acero inoxidable y los de titanio no sufrieron variaciones de peso apreciables (6).

Análisis de los productos depositados

Para poder conocer la composición de los productos que forman las biopelículas depositadas, se ha procedido a su análisis químico y microbiológico. El primero por calcinación a baja temperatura ($525 \pm 25^\circ\text{C}$), para determinar la fracción orgánica de las muestras (Tabla 1), y posterior calcinación a 1000°C , para conocer la fracción mineral volátil y el residuo.

Como comentario resumido de estos resultados, podemos indicar que en los tubos de titanio con circulación, la proporción de materia orgánica depositada es mayor que en los de acero inoxidable y los de latón. Respecto a los tubos taponados, el titanio y el acero inoxidable tienen la misma proporción de materia orgánica, mayor que la depositada en los tubos de latón. La materia mineral volátil (carbonatos y sulfuros, principalmente) es similar en los tres tipos de materiales. Sin embargo, el peso medio en los tubos taponados es doble que en aquéllos con circulación de agua.

Los análisis microbiológicos pusieron de manifiesto las siguientes concentraciones medias (en Unidades Formadoras de Colonias, UFC):

Bacterias aerobias totales = 7×10^4 UFC/ml.

Bacterias reductoras sulfatos = 12 UFC/100 ml.

Bacterias reductoras sulfitos = 160 UFC/100 ml.

Los exámenes con microscopio óptico de contraste de fases, así como con microscopía electrónica de barrido, pusieron de manifiesto que el bioensuciamiento comenzaba con una colonización de algas planctónicas de los géneros *Scenedesmus*, *Navicula*, *Cyclotella*,

Golenkinia, *Pediastrum* y *Anacystis*, principalmente (1). Las bacterias eran minoría. A medida que crecía la biopelícula tenía lugar la aparición de microorganismos filamentosos ramificados, no identificados, y de formas cocáceas con una fuerte secreción de polisacáridos y englobamiento de material mineral. En algunas muestras se encontró también zooplancton (copépodos, cladóceros, etc.).

Conclusiones

A la vista de todos los datos anteriores, podemos resumir que el comportamiento del titanio ha sido excelente en cuanto a la corrosión; no así en cuanto al bioensuciamiento, lo que significa que es fundamental un sistema de limpieza eficaz del interior de los tubos de operación.

El acero inoxidable ha tenido similar comportamiento que el titanio en los dos aspectos, aunque el bioensuciamiento presenta una proporción menor de materia orgánica.

El peor comportamiento lo ha tenido el latón almirantazgo, especialmente en cuanto a la corrosión.

Bibliografía

1. Bourrelly, P. (1981). Les Algues d'eau douce. Societé Nouvelle des Editions Boubée. Tomos I, II y III.
2. Characklis, W. G., Marshall, K. C. (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, New York.
3. Morton, L. H. G., Chamberlain, A. H. L. (1988). Biofilms. Biodeterioration Society. Proceedings of the Spring Meeting of the Biodeterioration Society.
4. Rossmoore, H. W. (1991) Biodeterioration and Biodegradation 8. Proceedings of the 8th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, pp. 53–62. Elsevier Applied Science. London.
5. Walters, A. H., Elphick, J. J. (1968). Biodeterioration of Materials. Elsevier, London.
6. Walters, A. H., Hueck-van der Plas, E. H. (1972). Biodetereoration of Materials 2. John Wiley & Sons, New York.

Nuevas aplicaciones de las técnicas submicroscópicas en el estudio del biodeterioro producido por talos liquénicos

Carmen Ascaso,^{*1} Jacek Wierzechos²

¹*Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid*

²*Instituto de Agrofísica, Academia Polaca de Ciencias, Lublin, Polonia*

Summary

The advances that have been made on the effect of lichens on rock substrate have been numerous. The first techniques used in order to know the type of biodeterioration produced by lichen thalli, were observations by light microscopy. The microchemical techniques that followed this, such as X-Ray Diffraction and Infrared Spectroscopy, provided knowledge of the mineral composition of the substrate which is in contact with the lichen thalli. This zone is known as interface. More recently, the Scanning Electron Microscope has allowed observations of the relationship between the hyphae of the lower part of the thallus and the topography of the superficial part of the rock. In the current work, new applications of Scanning Electron Microscopy are presented. The backscattered electron image permits observation of the penetration of living thalli elements in the rock. With this technique, it is possible to follow the fissures underneath the lichen thalli and see at a cellular level the biological elements. This technique is an important step in understanding the biodeterioration produced by lichens. It allows clarification of such aspects as the ability of embedded minerals detached from the rock among the hyphae and also the possibility of investigating organic and inorganic compounds mixed with hyphae and algae. This technique, moreover, is promising for use in future investigations of biodeterioration where the cellular morphology of the different organisms are interesting, taking into account treatments with biocides.

Key words: *Aspicilia intermutans*, *Lecidea auriculata*, scanning electron microscopy, back-scattered electrons.

* *Correspondence to:* Carmen Ascaso. Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. Serrano, 115 bis. 28006 Madrid. Tel.: 91-5625020. Fax: 91-5640800.

Resumen

Las aproximaciones que se han hecho al estudio del efecto de los líquenes sobre el sustrato rocoso han sido muy numerosas. Las primeras técnicas utilizadas para conocer qué tipo de biodeterioro producen los talos liquénicos fueron las observaciones con microscopio óptico. Las técnicas microquímicas que siguieron a éstas (tales como Difracción de Rayos X y Espectroscopia de Infrarrojos) posibilitaron el conocimiento de la composición mineral de la parte del sustrato que está en contacto con el liquen y que se denomina interfase. Más recientemente, la microscopia electrónica de barrido condujo a observaciones sobre la relación existente entre las hifas de la parte inferior del talo y la topografía de la parte superficial de la roca. Este trabajo presenta las nuevas aplicaciones de microscopia electrónica de barrido que están permitiendo observar el modo en que los elementos vivos del talo penetran en el sustrato rocoso. Con esta técnica se puede hacer un seguimiento de las fisuras bajo el talo liquénico y observar los elementos de naturaleza biológica presentes en las células. Esta técnica es de gran utilidad para el estudio del biodeterioro producido por líquenes porque permite clarificar aspectos tales como la capacidad de englobar entre las hifas minerales arrancados de la roca e investigar compuestos orgánicos o inorgánicos que, mezclados entre hifas o algas, están incluidos en fisuras a varios milímetros de la superficie. Además, esta técnica, puede ser útil cuando sea necesario conocer la morfología celular de los organismos causantes del biodeterioro para considerar la eficacia de tratamientos con biocidas.

Introducción

El estudio de la interfase talo liquénico–sustrato rocoso ha sido abordado desde hace varias décadas con la utilización de muy diversas técnicas. A partir de 1968, se empezaron a utilizar técnicas de raspado para aplicar las técnicas usuales de investigación en mineralogía de arcillas al material obtenido de la interfase liquen-roca. Las primeras investigaciones en este sentido fueron las de Dormaar (6) y las de Ascaso et al. (1). Dichas técnicas mostraron que existían minerales en la zona de contacto liquen–roca que no estaban presentes en la roca subyacente no alterada. En 1977, Hallbauer y Jahns (8) observaron directamente esta zona mediante la aplicación de microscopia electrónica de barrido (SEM), cuyo poder de resolución permitía mejores observaciones que las llevadas a cabo en investigaciones anteriores realizadas con microscopio óptico. La técnica SEM se combinó por vez primera con microanálisis por dispersión de energía de rayos X (EDX), con lo cual se obtuvo buena resolución asociada con capacidad microanalítica. Sin embargo, debido al poco desarrollo de las técnicas en ese momento, el EDX fue utilizado únicamente para discernir entre parte vegetal e inorgánica. Entre los años 1980 y 1982 vieron la luz varios trabajos que combinaban técnicas de microscopia óptica y de raspado (2, 7, 9, 10, 12). Con dichos trabajos se iba comprendiendo cada vez más la mineralogía de la zona de interfase, ya que al material de raspado se aplicaban técnicas de difracción de rayos X, espectroscopia de infrarrojos y microscopia electrónica de transmisión (TEM). A la vez, aumentó el interés en la aplicación de técnicas no destructivas para la investigación de la relación talo–sustrato. El desarrollo cronológico de la aplicación de

técnicas tanto microanalíticas como microscópicas ha quedado revisado en el trabajo de Ascaso y Wierzchos (4). En los últimos años, un nuevo objetivo en este tipo de investigaciones ha consistido en poner a punto técnicas con resolución suficiente para permitir conocer no solamente la mineralogía sino también la ultraestructura de los simbioses liquénicos que están en proximidad a los minerales investigados. En 1991 se investigó por microscopía electrónica de transmisión, mediante cortes ultrafinos, la relación estructural que existe entre las células algales y fúngicas de un talo liquénico y los minerales adyacentes, observando además el aspecto ultraestructural del alga y del hongo (3).

Sería muy deseable que el estudio de la interfase, fundamentalmente cuando se trata de líquenes crustáceos, pudiera ser abordado por técnicas de TEM con EDX. Sin embargo, la TEM presenta algunas dificultades en su utilización para este tipo de investigaciones. Una de ellas es la necesidad de obtener cortes ultrafinos del material de la interfase y otra es la limitación del área de contacto liquen-roca que puede ser colocada en el portamuestras del TEM.

En el presente trabajo, la aplicación de la técnica SEM con electrones retrodispersados (BSE) y EDX posibilita el conocimiento de nuevos aspectos de la simbiosis liquénica y de su relación con el sustrato, permitiendo conocer la localización de productos intra y extratalinos, estudiar su naturaleza química e investigar la ultraestructura de los simbioses del talo y de los elementos biológicos que se sitúan en las fisuras de la roca existentes bajo el mismo.

Materiales y métodos

Las especies liquénicas *Aspicilia intermutans* (Nyl.) Arn. y *Lecidea auriculata* Th. Fr. fueron recolectadas sobre roca granítica en Bustarviejo de la Sierra (Madrid). Los talos liquénicos sobre sus correspondientes rocas fueron procesadas según el protocolo de preparación convencional de muestras biológicas para microscopía electrónica de transmisión utilizando como medio de inclusión la resina LR White. Una vez polimerizadas las muestras, se llevó a cabo un corte transversal a la zona de contacto liquen-roca con una sierra de diamante. La superficie resultante fue finamente pulida. Las muestras fueron cubiertas con carbón y observadas en un microscopio de barrido Zeiss DSM 960 provisto de detector de electrones retrodispersados y de detector de rayos X para microanálisis.

Resultados y discusión

La Fig. 1 muestra la imagen que presenta un corte transversal de *Lecidea auriculata* sobre granito. En la parte superior pueden observarse fragmentos de material biológico del talo y un trozo de mineral de la roca que ha quedado separado del sustrato y englobado entre algas e hifas del talo. A una distancia de 200 a 300 μm de la superficie puede verse una gran fisura llena de material biológico procedente del talo. Anteriormente, se había hecho este tipo de observaciones con microscopio óptico pero las fisuras de poco espesor no eran detectadas. En

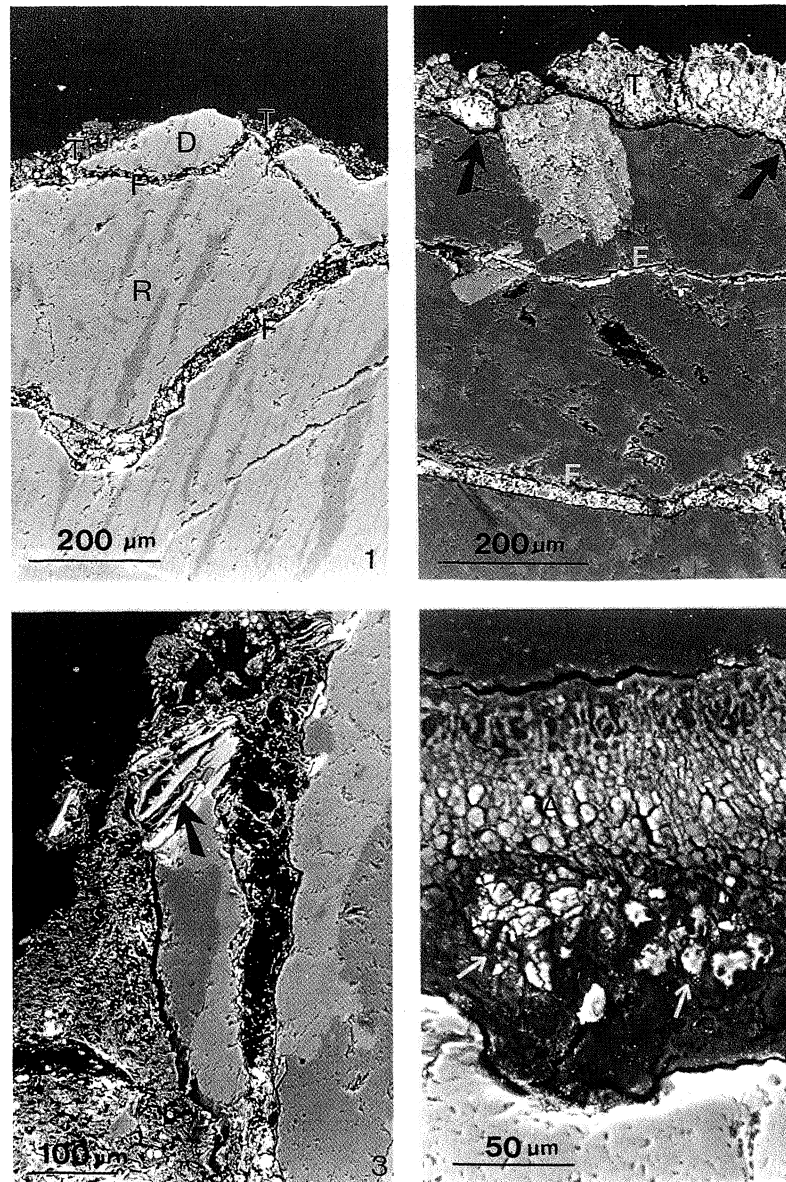


Fig. 1. Vista general de la interacción entre el talo de *Lecidea auriculata* y un sustrato granítico. D: parte de la roca que ha quedado englobada entre los componentes del talo; F: fisura; R: roca; T: talo.

Fig. 2. Vista general de la interacción entre el talo de *Aspicilia intermutans* y un sustrato granítico. El talo que está bien delimitado presenta algunas intrusiones en la superficie de la roca (flechas). F: fisuras; T: talo.

Fig. 3. Parte del talo de *L. auriculata* englobando minerales. La flecha señala la zona de micas cuyas láminas están siendo separadas por las hifas del talo.

Fig. 4. Talo de *Aspicilia* mostrando los fotobiontes y con presencia de depósitos de material en la zona medular (flechas). A: algas (fotobiontes).

la Fig. 2 se ve una imagen similar a la anterior correspondiente a la observación de la zona de interfase de *Aspicilia intermutans*. El talo está asentado sobre la superficie y debajo existen varias fisuras que se sitúan en paralelo a la superficie de la roca. La imagen muestra intrusiones de la parte inferior del talo en la roca (flechas).

Otro aspecto interesante que es preciso apuntar, con respecto a la relación talo–sustrato en la misma superficie de la roca, es la capacidad que tienen las hifas del talo para englobar minerales de la roca. La Fig. 3 muestra un trozo de feldespatos desgajado de la roca (según se aprecia por los contornos que presenta) con material micáceo en su extremo que está siendo exfoliado. Se puede apreciar que son las hifas del talo las que están penetrando por las líneas de exfoliación (flechas). Esta observación, junto con otras realizadas en zonas próximas, permite afirmar que la idea de contaminación cruzada, según la cual los minerales situados bajo los talos líquénicos pueden proceder de otros lugares, debe ser revisada. No se descarta que algunos de los minerales que se encuentran bajo el talo puedan haber llegado a esa zona por el agua o el viento, pero sí es claro que las hifas del talo engloban minerales de la parte rocosa que está inmediatamente debajo de ellas.

En la Fig. 4 se presenta un corte transversal del talo. En la parte inferior y en color más claro aparece la roca. En la parte media superior se distinguen estructuras redondeadas que son los fotobiontes y pueden verse con mucha claridad depósitos irregulares (flechas) en la zona de la médula. La aplicación de EDX para el análisis de los depósitos irregulares permite conocer que se trata de acúmulos de oxalato cálcico. La presencia de oxalato cálcico está bien documentada en líquenes. Ascaso et al. (2) encontraron oxalato cálcico monohidrato al aplicar difracción de rayos X al material obtenido por raspado del talo de *Caloplaca calopisma* asentado en una roca calcárea. Oxalatos de cobre fueron encontrados en la médula de *Acarospora regulosa* en rocas conteniendo minerales ricos en cobre (5, 11).

Con frecuencia, aparecen junto a los oxalatos minerales microdivididos (4) que son fácilmente identificables gracias a la resolución de la técnica y en los que la aplicación de microanálisis EDX puede ser de gran interés para determinar su grado de alteración.

En la Fig. 5 puede observarse un corte transversal del talo con parte de la roca en su zona derecha, en una imagen semejante a la de la Fig. 4. Aquí se aprecia con mayor precisión el aspecto de alga y hongo. No se ven, sin embargo, depósitos irregulares intratalinos similares a los descritos en la figura anterior. Para una mejor definición en esta imagen de los elementos biológicos, se ha sacrificado la posibilidad de observación de los compuestos inorgánicos. Las imágenes de la ultraestructura de los simbioses de la Fig. 5 se aproximan a las que podrían hacerse por TEM. La Fig. 6 muestra una ampliación de una de las células algales observadas. En la célula algal de la Fig. 6 puede apreciarse el cloroplasto central, con paquetes de tilacoides (flechas), granos de almidón con aspecto oscuro, de 0,5 μm de longitud y, centralmente, una zona clara de perfil ovalado que es el pirenoide. Esta imagen tiene menor resolución que las de fotobiontes, una vez obtenidos cortes ultrafinos del talo y observados por TEM. Sin embargo, estas imágenes son un logro importante ya que permiten observar parte de la ultraestructura del componente algal sin necesidad de obtener cortes ultrafinos. Además, hay que tener en cuenta que la técnica permite observar varios centímetros cuadrados de la interfase y centrarse, si se desea, en la observación citológica de los simbioses. Esta observación citológica puede ser de gran interés en todos los estudios de aplicación de biocidas.

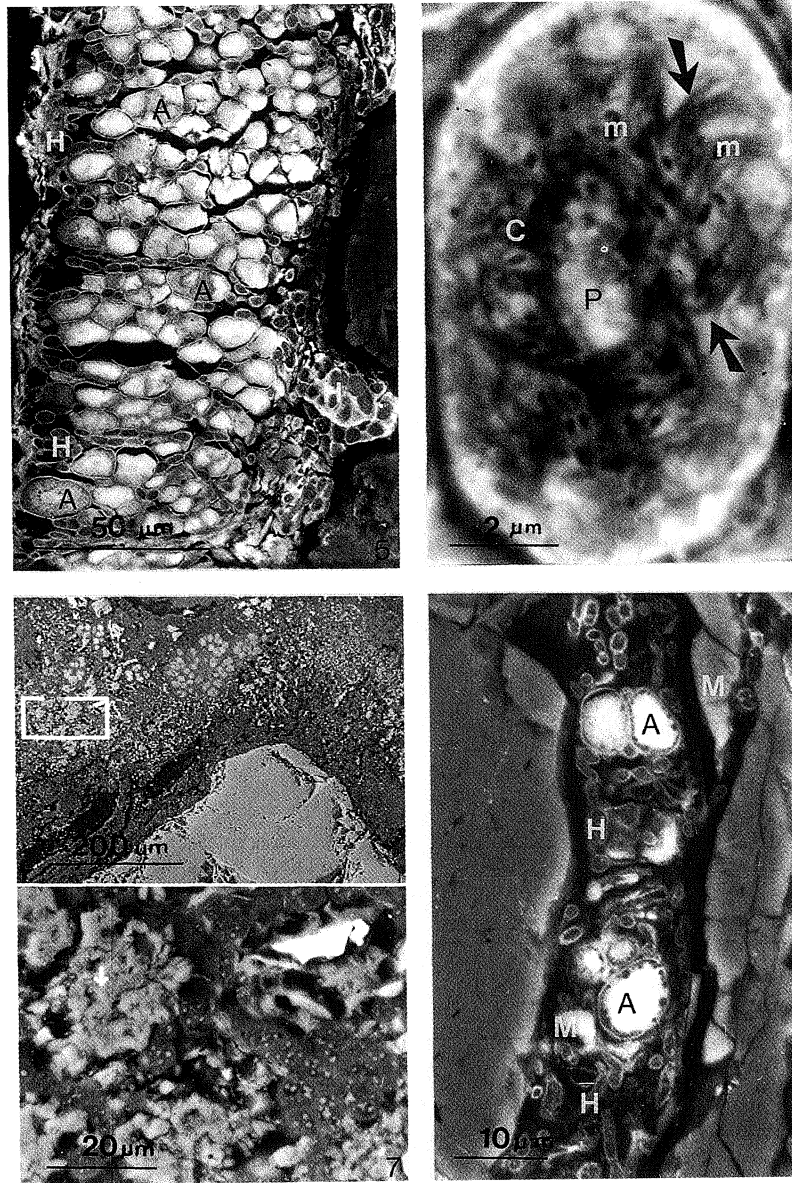


Fig. 5. Talo de *Aspicilia* en el que se resalta el aspecto anatómico. Se puede ver la disposición de los hongos en las diferentes capas del talo. A: alga; H: hongo.

Fig. 6. Detalle de un fotobionte del talo de *Aspicilia*, mostrando la resolución de la técnica SEM+BSE. C: cloroplasto; m: almidón; P: pirenoide. La flecha señala los paquetes de tilacoides.

Fig. 7. Fisura dentro de la roca granítica. La parte comprendida en el recuadro blanco de la parte superior se muestra en detalle en la microfotografía inferior. La zona de la flecha blanca presenta una acumulación de oxalato cálcico.

Fig. 8. Detalle del interior de una fisura donde se observan algas, hongos y partículas minerales. A: alga; H: hongo; M: minerales.

Una vez examinada la parte superficial de la roca donde está asentado el talo, se pueden ir observando las fisuras que se encuentran debajo del mismo. En las fisuras (Fig. 7) se mezclan minerales microdivididos que tienen su origen en las paredes de la fisura, compuestos neoformados (recuadro blanco en microfotografía superior) y material biológico. En la microfotografía inferior de la Fig. 7 se muestran con detalle los compuestos neoformados. La observación de elementos biológicos que aparecen entremezclados con minerales y compuestos reviste grandes dificultades. La técnica SEM+BSE permite superar algunas y ver las células algales y fúngicas de las fisuras tal como muestra la Fig. 8. La obtención de buenas microfotografías de los elementos de las fisuras ha sido uno de los objetivos más importantes del presente trabajo. Se ha tratado de conseguir una buena observación de las algas y hongos que están en las fisuras y también de otros organismos vivos que los acompañan, tales como bacterias y cianobacterias.

Imágenes como las mostradas en la figura citada sirven para comprender la profundidad hasta la que pueden aparecer organismos vivos en la roca y tratar de determinar el estado fisiológico de los organismos tras la aplicación de tratamientos contra el biodeterioro de los sustratos.

Agradecimientos

Agradecemos a Víctor Jiménez Rico su ayuda en la determinación de las especies. Agradecemos a Fernando Pinto y a María Teresa Carnota la asistencia técnica. Este trabajo ha sido financiado con el proyecto de investigación número PB92-0071 de la DGICYT.

Bibliografía

1. Ascaso, C., Galván, J., Ortega, C. (1976). The pedogenic action of *Parmelia conspersa*, *Rhizocarpon geographicum* and *Umbilicaria pustulata*. *Lichenologist* **8**, 151–171.
2. Ascaso, C., Galván, J., Rodríguez-Pascual, C. (1982). The weathering of calcareous rocks by lichens. *Pedobiol.* **24**, 219–229.
3. Ascaso, C., Ollacarizqueta, M. A. (1991). Structural relationship between lichen and carved stonework of Silos Monastery, Burgos, Spain. *Intern. Biodeterior.* **27**, 337–349.
4. Ascaso, C., Wierzchos, J. (1994). Study of the biodeterioration zone between the lichen thallus and the substrate. *Cryptogamic Botany*.
5. Chisholm, J. E., Jones, G. C., Purvis, O. W. (1987). Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens. *Mineralogical Magazine* **51**, 715–718.
6. Dormaar, J. F. (1968). Infrared absorption spectra of mineral matter in saxicolous lichens and associated mosses. *Can. J. Earth Sci.* **5**, 223–230.
7. Galván, J., Rodríguez-Pascual, C., Ascaso, C. (1981). The pedogenic action of lichens in metamorphic rocks. *Pedobiology* **21**, 60–73.
8. Hallbauer, D. K., Jahns, H. M. (1977). Attack of lichens on quartzitic rock surfaces. *Lichenologist* **9**, 119–122.

9. Jones, D., Wilson, M. J., Tait, J. M. (1980). Weathering of a basalt by *Pertusaria corallina*. *Lichenologist* **12**, 277–289.
10. Jones, D., Wilson, M. J., McHardy, W. J. (1981). Lichen weathering of rock-forming minerals: application of scanning electron microscopy and microprobe analysis. *J. Microscopy* **124**, 95–104.
11. Purvis, O. W. (1984). The occurrence of copper oxalate in lichens growing on copper sulphide-bearing rocks in Scandinavia. *Lichenologist* **16**, 197–204.

Mecanismos de corrosión microbiana sobre los materiales pétreos

Gonzalo Gómez-Alarcón,* M. Ángeles de la Torre

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

Summary

Present studies related to stone weathering demonstrate that the biological activity of bacteria, algae, fungi and lichens play an important role in the biodegradative processes implied in stone building decay. In natural environments is not possible to separate the damage provoked by microorganisms from damage caused by physical and chemical agents. In vitro assays carried out with microbes isolated from weathered stones are required in order to understand the biological mechanisms involved in stone deterioration. We have demonstrated, by means of different techniques as commented in the text, that filamentous fungi contribute greatly to stone biodeterioration by using different mechanisms: (a) mechanical (hiphae growth and penetration in stony substrate); and (b) biochemical (organic acid excretion, cation release, chelation and deposition of organic salts, precipitation of neoformation salts and metals oxidation).

Key words: Biodeterioration, rock-decay, stone alteration mechanisms, fungi.

Resumen

Los estudios que se están llevando a cabo en la actualidad, en relación a los procesos de deterioro pétreo demuestran que bacterias, algas, hongos y líquenes, principalmente, juegan un papel muy importante en la degradación de monumentos y edificios históricos. En condiciones naturales no es posible llegar a discernir el daño provocado por las poblaciones microbianas del daño debido a diversos agentes físico-químicos. Se apunta la necesidad de realizar ensayos

* *Correspondence to:* Gonzalo Gómez-Alarcón. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Velázquez, 144. 28006 Madrid. Tel.: 91-5611800/91-5644562. Fax: 91-5627518.

in vitro con los propios microorganismos aislados del material alterado, con objeto de analizar en detalle el grado de intervención biológica en el deterioro pétreo.

En el presente trabajo se demuestra que los hongos filamentosos contribuyen enormemente a los procesos de alteración pétreo principalmente a través de dos mecanismos: (a) mecánicos (derivados del crecimiento y expansión del micelio en superficie y en profundidad); y (b) bioquímicos (excreción de ácidos orgánicos, solubilización y quelación de cationes, precipitación de sales, depósitos de sales orgánicas de neoformación y oxidación de cationes).

Introducción

Los materiales pétreos y los monumentos construidos en piedra se hallan sometidos a un lento pero inevitable proceso de alteración. Muchos edificios históricos construidos en los últimos siglos, en especial aquéllos que se encuentran localizados en zonas urbanas e industriales, están sufriendo un desgaste mucho mayor debido a la acción corrosiva de los contaminantes presentes en la atmósfera (5). Un elevado número de compuestos orgánicos presentes en costras y pátinas de superficies alteradas han sido caracterizados (25, 26). En su mayoría son productos de combustión o productos de desecho de actividades industriales, que en algunos casos podrían ser aprovechables como fuente de carbono para el metabolismo microbiano (31). Sin embargo, en la actualidad se dispone de poca información acerca del efecto corrosivo ejercido por la mayoría de estos compuestos sobre la piedra.

Otro factor importante de alteración lo constituye los organismos que habitan en la superficie de los materiales rocosos. Bacterias, algas, hongos, etc., proceden en su mayoría del suelo circundante que en condiciones favorables son transportados por el viento, insectos, etc., hasta la superficie de los monumentos. Sin embargo, no todos los organismos encuentran posibilidades para proliferar y pocos están capacitados para ejercer un efecto biocorrosivo.

La alteración producida por los microorganismos sobre los materiales pétreos no puede ser cuantificada ni desligada de la acción ejercida por los agentes físicos y químicos. Por eso, no se puede presentar una correlación entre microorganismos y alteración de la piedra. Sin embargo, para explicar estos hechos, los ensayos de laboratorio son de gran ayuda, pues si bien las condiciones en que se desenvuelven las poblaciones microbianas en aquel medio son distintas al ambiente natural, puede afirmarse que las condiciones de laboratorio pueden acelerar pero no cambiar los procesos que aparecen en la naturaleza (30).

En el presente trabajo se exponen algunos de los resultados obtenidos en ensayos in vitro practicados con hongos filamentosos, aislados de monumentos pétreos alterados y se analizan los distintos mecanismos que utilizan estos organismos para llevar a cabo un efecto biodeteriorativo sobre la piedra.

Alteración mecánica

Los organismos miceliares, como es el caso de los hongos y líquenes, pueden producir alteración mecánica sobre los materiales pétreos que colonizan. Mediante microscopía elec-

trónica de barrido puede observarse como, una vez que los organismos se han instalado sobre el sustrato, se inicia el crecimiento y expansión del micelio. Las hifas penetran a través de microfisuras y grietas y se expanden por la superficie del mineral dando lugar en unos casos a formaciones compactas y continuas llamadas “biofilms”. En otros casos, el crecimiento se desarrolla en áreas localizadas de la superficie de la roca. Estos fenómenos han sido observados en nuestro laboratorio. La expansión-contracción de los elementos celulares contribuye al disgregamiento mineral, ya que en el medio natural y en períodos de sequía, el micelio se retrae arrastrando con él partículas minerales de la superficie del sustrato.

Cuando los colonizadores son organismos endolíticos la alteración que provocan no es sólo superficial, ya que los elementos celulares penetran hacia el interior favoreciendo además la retención de agua que puede causar un daño notable como consecuencia de los ciclos naturales de congelación y descongelación.

Alteración química

Secreción de ácidos orgánicos

La producción de ácidos orgánicos durante el metabolismo microbiano, así como su influencia en la alteración de los materiales pétreos, han sido ampliamente estudiados en los últimos años (12, 18, 23, 27, 28), habiéndose llegado a la conclusión que los metabolitos acídicos son los principales responsables del biodeterioro. Diversos organismos aislados de piedras alteradas han sido examinados en el laboratorio por su capacidad para excretar ácidos carboxílicos con capacidad biodeteriorativa. Además, muchos de estos metabolitos han sido encontrados in situ sobre los mismos materiales rocosos en que fueron aislados aquellos organismos (7, 23).

Para explicar los procesos de alteración que se presentan en los hábitats naturales, desarrollamos en el laboratorio condiciones de cultivo lo más parecidas posible a las que se presentan en la naturaleza. El material utilizado fue el siguiente:

- Hongos filamentosos aislados en número elevado y con amplia distribución sobre monumentos alterados.
- Cantidades limitadas de fuente de carbono y nitrógeno.
- Sustratos pétreos no alterados que proporcionarían los elementos minerales necesarios para el metabolismo.

Por cromatografía líquida de alta eficacia determinamos los ácidos orgánicos excretados por los hongos, comprobando que la cantidad y variedad de los mismos se veía afectada por la composición del medio, el tiempo de incubación y la procedencia de las distintas cepas fúngicas ensayadas (Tabla 1).

Los organismos autótrofos, como cianobacterias y algas, suelen ser los primeros colonizadores de los materiales pétreos y sirven, cuando mueren, de soporte nutritivo a los heterótrofos, tales como bacterias y hongos. En experiencias de laboratorio hemos podido demostrar los acontecimientos previstos en el medio natural. *Penicillium corylophilum* es capaz

TABLA 1
 ÁCIDOS ORGÁNICOS DETERMINADOS EN CULTIVOS REALIZADOS SOBRE
 PROBETAS DE PIEDRA INTACTA, UTILIZANDO CEPAS FÚNGICAS AISLADAS DE
 CADA UNO DE LOS MATERIALES TESTADOS

	glucónico	cítrico	fumárico	succínico	málico
ARENISCA					
<i>Penicillium frequentans</i>	+	+	-	+	-
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	+	+	+	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	-	-	+	+
GRANITO					
<i>Penicillium frequentans</i>	+	+	-	-	+
CALIZA					
<i>Penicillium frequentans</i>	+	+	-	-	-

de utilizar los componentes celulares de una alga seleccionada como única fuente de carbono y producir hasta 0,240 g/l de ácido oxálico (resultados no publicados). En presencia de una fuente de carbono adicional y biomasa algal fueron activados el metabolismo fúngico y la secreción de ácidos orgánicos (M. Muñoz 1992; Tesina, Universidad de Alcalá de Henares).

Quelación de cationes

La formación de quelatos entre los iones metálicos y los ácidos orgánicos originados en el metabolismo microbiano, es un proceso importante en el biodeterioro de los materiales pétreos (14). Además, para algunos autores (23) la actividad de quelar cationes es considerada de mayor efecto mineralítico que la propia producción de ácidos carboxílicos. En cualquier caso, la unión establecida mediante un proceso de quelación proporciona mayor estabilidad a la molécula y permite el biotransporte de los cationes minerales que pueden depositarse en la superficie y, junto con residuos orgánicos, material celular, etc., dar lugar a la formación de pátinas y costras de alteración.

Los ácidos oxálico y cítrico han sido implicados en la alteración de diferentes silicatos (12). Manley y Evans (20) comprobaron que el oxálico y cítrico formaban complejos con Al^{3+} extraído de feldespatos. De la Torre (1992; Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid) observó en caldos metabólicos de cultivos fúngicos, y con pH superior a 4, que todo el Fe disuelto se encontraba en forma oxidada. Ya que el Fe^{3+} es muy insoluble, excepto a pH muy ácido, y dada la elevada proporción de ácidos glucónico y cítrico detectados en el medio, es razonable pensar que dichos ácidos formaban complejos con el Fe^{3+} y también con el Al^{3+} .

Se ha indicado que otros compuestos, como algunos fenoles, forman también quelatos con algunos cationes minerales (4). Mohamed (1992; Tesina, Universidad Autónoma de Madrid) en ensayos in vitro comprobó que hongos acidogénicos y no acidogénicos producían

ácidos fenólicos (vanílico, ferúlico, 4-hidroxibenzoico, etc.) que podrían formar complejos con los iones metálicos solubilizados participando así en los procesos mineralíticos.

Otros metabolitos parecen participar también en la formación de quelatos. Williams y Rudolf (32) comprobaron que ciertos antibióticos podrían formar quelatos con iones trivalentes. Esto podría explicar los resultados obtenidos trabajando con *Cladosporium cladosporoides*, hongo no acidogénico, en cuyos caldos metabólicos se detectaron Fe^{3+} y Al^{3+} en solución (de la Torre, 1992, antes citada).

Adams et al. (1) aislaron en zonas áridas de Estados Unidos y otros países, bacterias y hongos que en condiciones de laboratorio producían compuestos de quelación conocidos como sideróforos (catecoles e hidroxamatos), capaces de solubilizar óxidos e hidróxidos de hierro insolubles, que aparecen unidos a las rocas. Esto demostraría que los microorganismos en la naturaleza disponen de mecanismos apropiados para solubilizar iones metálicos que les son necesarios para su metabolismo.

Formación de sales orgánicas

Los organismos acidogénicos, hongos y líquenes principalmente, provocan la formación de sales orgánicas que se depositan en la superficie de los materiales pétreos colonizados. Dichas sales se forman entre los aniones acídicos procedentes del metabolismo microbiano y los iones metálicos solubilizados.

Son escasos los trabajos que hacen referencia a la presencia de precipitados orgánicos en la superficie de los sustratos pétreos alterados. Alessandrini et al. (3) identificaron oxalato cálcico en costras de arenisca, caliza y granito de monumentos pétreos pero no especificaron su origen. Sin embargo, Caner y Boke (6) indicaron el posible origen biológico en la formación de oxalatos detectados sobre algunos monumentos construidos en mármol.

En experiencias de laboratorio, inoculando *Penicillium frequentans* y *Cladosporium cladosporoides* sobre probetas intactas de arenisca, caliza y granito, identificamos en la superficie de estos materiales con la ayuda de varias técnicas (microscopio de barrido con analizador de cationes y difracción de rayos X), oxalato cálcico mono y dihidrato, oxalato magnésico y oxalato férrico (29). Sobre muestras de arenisca y caliza, *P. frequentans* y *Trichoderma pseudokoningii* provocaron la formación de grandes acúmulos de citrato cálcico (de la Torre, 1992; antes citada).

Oxidación de cationes

Los cationes minerales son constituyentes importantes de los materiales rocosos. El hierro, por ejemplo, representa el 5% de la masa terrestre y forma parte de casi todos los tipos de rocas. En la naturaleza se presenta en dos estados de oxidación: Fe^{2+} y Fe^{3+} . El Fe^{3+} precipita como óxido o hidróxido a pH neutro (por eso los niveles de Fe^{3+} son muy bajos en el medio ambiente) aunque puede ser quelado por ácidos y otros compuestos, haciéndolo más asequible para los microorganismos (10). Este elemento, por otra parte, es esencial para los organismos como elemento traza, tomando parte en reacciones de transferencia de electrones y actuando como cofactor de enzimas (22).

El Mn constituye entre el 0,4 y el 1,6% de casi todos los tipos de rocas. En los hábitats naturales se encuentra como Mn^{2+} , Mn^{3+} y Mn^{4+} , siendo la forma tetravalente la más estable, si bien en dicho estado no es utilizable por los microorganismos. El manganeso es un elemento traza imprescindible para los microorganismos y participa en diferentes sistemas enzimáticos (19).

En los procesos de alteración de los materiales pétreos, los cationes minerales aparecen en las costras y pátinas en forma de óxidos e hidróxidos junto con microorganismos, sulfatos, carbonatos, compuestos químicos procedentes de la contaminación atmosférica, etc. (16). Debido a la actividad biológica algunos cationes son solubilizados y transportados a través de grietas y fisuras hasta la superficie o a zonas próximas a la misma en donde sufren procesos de óxido-reducción, tanto química como enzimática.

Jens (1984; Thesis, University of Oldenburg, Germany) y Grote (1986; Thesis, University of Oldenburg, Germany) han demostrado que algunos hongos y cianobacterias aislados de costras alteradas aceleran los procesos de oxidación de Fe y Mn y los óxidos metálicos aparecen con frecuencia adheridos a las células microbianas.

En experiencias de laboratorio de la Torre y Gómez-Alarcón (Microbial Ecol., en prensa) estudiaron la capacidad de oxidación de Fe^{2+} y Mn^{2+} por varias cepas fúngicas acidogénicas y no acidogénicas cultivadas en presencia de sustratos rocosos y en diferentes medios de cultivo. Se comprobó que la oxidación de Mn^{2+} por hongos acidogénicos era mayor en medios conteniendo elevada concentración de glucosa, nitrato y manganeso. El Mn^{4+} precipitaba como óxido e hidróxido adheridos al micelio. Por su parte, en la oxidación del Fe^{2+} , el Fe^{3+} formado permanecía en solución a través de procesos de quelación, aunque también fueron detectados depósitos de Fe^{3+} alrededor de micelio fúngico. Por último, fue comprobado que la oxidación del Fe^{2+} y Mn^{2+} era biológicamente inducida por hongos filamentosos a través de enzimas extracelulares e hidrosolubles, con máximo de actividad específica durante la fase exponencial de crecimiento.

Formación de depresiones o cavidades

La formación de oquedades y depresiones en la superficie de los materiales pétreos es un hecho común que puede ser apreciado en muchos monumentos expuestos a la acción del medio ambiente. Estas alteraciones por lo común son originadas por causas físicas y/o químicas. Sin embargo, pueden tener también un origen biológico. Krumbein y Jens (13); Krumbein et al. (17) y del Monte y Ferrari (21) han observado sobre monumentos de mármol y sobre calizas de zonas desérticas la formación de depresiones originadas por la presencia de líquenes endolíticos y hongos. Con todo, creemos que estos estudios son incipientes y merecerán la atención de los geomicrobiólogos en el futuro.

En experiencias practicadas en nuestro laboratorio hemos reproducido las bioalteraciones antes indicadas. Observamos que la colonización de muestras de caliza de cantera por el hongo *P. frequentans* provocaba la desintegración de algunas zonas del sustrato con la consiguiente formación de cavidades o "pitting" como también suelen ser conocidas (de la Torre et al., 1993, Appl. Microbiol. Biot., en prensa).

Films microbianos

Muchos microorganismos que colonizan los materiales rocosos, forman en los hábitats naturales films microbianos o biofilms. Cuando los organismos colonizadores permanecen bastante tiempo y los productos de excreción aumentan, se establecen gradientes de concentración en los metabolitos y productos de desecho de forma que en las capas más profundas aparecen mayores concentraciones de dichos compuestos (11).

Las comunidades microbianas durante su crecimiento modifican la composición mineralógica de las rocas originales afectando la estabilidad, permeabilidad y color de la piedra (15).

En experiencias de laboratorio utilizando varias cepas fúngicas, hemos estudiado la formación de biopelículas o costras sobre la superficie de piedras de cantera. Aplicando técnicas de microscopía óptica y electrónica de barrido acoplada con analizador de cationes, hemos podido comprobar que las costras formadas estaban constituidas por material biológico, partículas minerales arrancadas y englobadas a veces por el micelio y acúmulos salinos depositados en la superficie. Se observaron, además, cambios de coloración en la superficie de los materiales rocosos debidos a la presencia de sales orgánicas de neoformación y a la oxidación de iones metálicos depositados.

Otros autores han analizado la participación de los microorganismos en la formación de costras y pátinas. Eckhardt (8) comprobó que algunas costras recogidas de monumentos alterados estaban constituidas por partículas minerales, micelio fúngico y bacterias. Más recientemente, Agarossi et al. (2) y Krumbein (16) observaron la contribución de los organismos fúngicos en la formación de costras de alteración en muchos monumentos.

Alteración de componentes minerales

Existe abundante bibliografía acerca de las alteraciones producidas sobre los materiales pétreos y que son atribuidas a los microorganismos. Sin embargo, en el ambiente natural las modificaciones observadas son consecuencia de la acción combinada de diversos agentes físicos, químicos y biológicos. Por eso se hace necesario practicar experiencias de laboratorio con organismos de ensayo para extraer conclusiones válidas sobre el efecto de cada agente biológico. Una primera aproximación la constituye el estudio de la capacidad de los ácidos orgánicos excretados en el metabolismo microbiano para solubilizar cationes minerales que son componentes de las estructuras minerales. Robert y Razzaghe-Karimi (24) observaron que los ácidos oxálico y cítrico originaban la alteración de las micas a través de la solubilización de cationes. Eckhardt (9) demostró que los ácidos antes citados disolvían K, Ca, Mg, Fe y Al de muestras de biotita. Manley y Evans (20) comprobaron que el oxálico y cítrico solubilizaban iones metálicos de algunas clases de feldespatos. De la Torre et al. (29) comprobaron que los ácidos oxálico, cítrico y glucónico solubilizan cationes de los materiales rocosos, siendo su capacidad extractiva variable y conforme a la naturaleza y composición del sustrato atacado. La pérdida de cationes de algunos minerales supone la desorganización de su estructura cristalina y por consiguiente la pérdida de estabilidad del material rocoso.

Nosotros comprobamos que los caldos metabólicos pertenecientes a cepas fúngicas inoculadas en presencia de probetas de piedra, contenían cationes disueltos como consecuencia del metabolismo microbiano (Tabla 2). La cantidad de cationes solubilizados variaba de acuerdo al carácter acidogénico o no de la cepa utilizada, condiciones de cultivo, etc.

Sobre la superficie de las muestras de piedra sometidas a la acción de algunos hongos, es posible descubrir las alteraciones producidas después de haber permanecido en contacto un largo período de tiempo.

Por técnicas de difracción de rayos X y espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier, comprobamos el efecto degradativo provocado por hongos acidogénicos sobre muestras de piedra. Sobre arenisca y granito se observó un ataque selectivo de silicatos y feldespatos, mientras que sobre caliza se pudo constatar una notable alteración de la calcita y dolomita. Sobre la superficie del material pétreo se detectaron abundantes depósitos de neoformación: oxalato cálcico, oxalato férrico, oxalato magnésico y citrato cálcico. Los hongos no acidogénicos produjeron una alteración mucho menor y no se detectaron depósitos salinos sobre las pátinas formadas (29).

TABLA 2

CATIONES DETERMINADOS EN CULTIVOS REALIZADOS SOBRE PROBETAS DE PIEDRA, UTILIZANDO VARIAS CEPAS FÚNGICAS

	Cationes en solución							
	Fe	Mn	Zn	Mg	Al	Ca	Na	K
ARENISCA								
<i>Penicillium frequentans</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	+	+	-	-	+	-	+	+
GRANITO								
<i>Penicillium frequentans</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
CALIZA								
<i>Penicillium frequentans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Conclusiones

Los organismos autótrofos (cianobacterias y algas) adaptados a vivir en un ambiente natural, y los heterótrofos (bacterias, hongos, líquenes, etc.) en presencia de sustancias orgánicas apropiadas, pueden adherirse y proliferar en la superficie de los materiales rocosos.

La contribución de los microorganismos a la corrosión de la piedra no puede ser cuantificada en la naturaleza debido a la participación simultánea de los agentes físicos y químicos. Las experiencias in vitro simulando condiciones naturales y utilizando organismos procedentes de materiales alterados junto con piedras no atacadas, nos proporcionan la información adecuada para interpretar las alteraciones observadas sobre los materiales en el medio ambiente.

Las posibilidades de estudio en este campo de la ciencia no parecen agotadas en el presente. Cuando la gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos que se emiten a la atmósfera en las zonas urbanas e industriales alcanzan la superficie de los monumentos, aceleran y pueden agravar los procesos de deterioro. Conviene reparar en que las nuevas condiciones pueden provocar cambios genéticos en la microflora que aparece sobre la piedra y producir nuevas cepas con alguna interesante peculiaridad metabólica, lo cual abre nuevas posibilidades de conocimiento e investigación.

Bibliografía

1. Adams, J. B., Palmer, F., Staley, J. T. (1992). Rock weathering in deserts: mobilization and concentration of ferric iron by microorganisms. *Geomicrobiology J.* **10**, 99–114.
2. Agarossi, G., Ferrari, R., del Monte, M. (1985). Microbial biodeterioration in the hypogea: the subterranean neopythagorean basilica of Porta Maggiore in Rome. *In: Felix, G. (ed.), Vth International Congress on deterioration and conservation of Stone, Vol. 2*, pp. 597–605.
3. Alessandrini, G., Bonecchi, R., Peruzzi, R., Toniolo, L. (1989). Caratteristiche composizionali e morfologiche di pellicole ad ossalato: studio comparato su substrati lapidei di diversa natura. *In: Proceedings International Symposium. The Oxalate Films: Origin and significance in the Conservation of Works of Art*, pp. 137–150. Centro C.N.R. Gino Bozza, Milán.
4. Berthelin, J. (1983). Microbial weathering process. *In: Krumbein, W. E. (ed.), Microbial Geochemistry*, pp. 223–262. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
5. Bock, E., Sand, W. (1993). The microbiology of masonry biodeterioration. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 503–514.
6. Caner, E. N., Boke, H. (1989). Occurrence of calcium oxalates on marble monuments in Anatolia. *In: Proceedings International Symposium. The Oxalate Films: Origin and significance in the Conservation of Works of Art*, pp. 299–307. Centro C.N.R. Gino Bozza, Milán.
7. Dannecker, W., Selke, K. (1989). Simultanbestimmung organischer und anorganischer anionen aus verwitterten natursteinoberflächen mittels gradienten-ionen-chromatographie. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **335**, 966–970.
8. Eckhardt, F. E. W. (1978). Microorganisms and weathering of a sandstone monument. *In: Krumbein, W. E. (ed.), Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology, Vol. 2. The Terrestrial Environment*, pp. 675–686. Ann. Arbor Science Publ. Inc., Michigan.
9. Eckhardt, F. E. W. (1985). Solubilization, transport and deposition of mineral cations by microorganisms-efficient rock weathering agents. *In: Drever, J. I. (ed.), The Chemistry of Weathering* **11**, 161–174. Riedel Pub. Co. Dordrecht.
10. Ehrlich, H. L. (1990). *Geomicrobiology*. Marcel Dekker Inc. N.Y.
11. Gilbet, P., Evans, D. J., Brown, M. R. W. (1993). Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ. *J. Appl. Bacteriol. Supplement* **74**, 67s–78s.
12. Henderson, M. E. K., Duff, R. B. (1963). The release of metallic and silicate ions from minerals rocks and soils by fungal activity. *J. Soil. Sci.* **14**, 236–246.

13. Krumbein, W. E., Jens, K. (1981). Biogenic rock varnishes of the Negev Desert (Israel) and ecological study of iron and manganese transformation by cyanobacteria and fungi. *Oecologia* **50**, 25–38.
14. Krumbein, W. E., Petersen, K. (1987). Biogene Krusten-Schaden-Schutz-Sanierung. Banteuschutz Bausanierung Sonderheft, pp. 61–64.
15. Krumbein, W. E. (1988). Microbial interactions with mineral materials. *In*: Houghton, D. R., Smith, R. N., Heggins, H. O. W. (eds.). *Biodeterioration* **7**, 78–100. Elsevier, London.
16. Krumbein, W. E. (1988). Biology of stone and minerals in buildings-biodeterioration, biotransfer, bioprotection. *In*: Proceedings 6th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, pp. 1–12. Nicholas Copernicus University, Torun.
17. Krumbein, N. E., Petersen, K., Schellnhuber, H. J. (1989). On the geomicrobiology of yellow, orange, red, brown and black films and crusts developing on several different types of stone and objects of art. *In*: Proceedings International Symposium. The Oxalate Films: Origin and significance in the conservation of Works of Art, pp. 337–347. Centro C.N.R. Gino Bozza, Milán.
18. Kuroczkin, J., Bode, K., Petersen, K., Krumbein, W. E. (1988). Some physiological characteristics of fungi isolated from sandstone. *In*: Proceedings 6th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, pp. 21–25. Nicholas Copernicus University, Torun.
19. Mahler, H. R., Cordes, E. H. (1966). *Biological Chemistry*. Harper and Row, New York.
20. Manley, E. P., Evans, L. J. (1986). Dissolution of feldspars by low-molecular-weight aliphatic and aromatic acids. *Soil Sci.* **141**, 106–112.
21. Monte, M. del, Ferrari, A. (1989). Patine da biointerazione alla luce delle superficie mormoree. *In*: Proceedings International Symposium. The oxalate films: Origin and significance in the conservation of works of art, pp. 171–182. Centro C.N.R. Gino Bozza, Milán.
22. Neilands, J. B. (1974). Iron and its role in microbial physiology. *In*: Neilands, J. B. (ed.), *Microbial Iron Metabolism*, pp. 3–34. Academic Press, New York.
23. Palmer Jr., R. J., Siebert, J., Hirsch, P. (1991). Biomass and organic acids in sandstone of a weathering building: production by bacterial and fungal isolates. *Microbial Ecol.* **21**, 253–266.
24. Robert, M., Razzaghe-Karimi, M. H. (1975). Mise en evidence de deux types d'évolution minéralogique des micas trioctaédriques en présence d'acides organiques hydrosolubles. *C. R. Acad. Sci. Paris* **280**, 2175–2178.
25. Sáiz-Jiménez, C., García-Rowe, J., García, M. A., Ortega, J. J., Roekerns, E., Van Grieken, R. (1990). Endolithic cyanobacteria in Maastrich limestone. *Sci. Total Environ.* **94**, 209–220.
26. Sáiz-Jiménez, C., Hermosín, B., Ortega-Calvo, J. J., Gómez-Alarcón, G. (1991). Applications of analytical pyrolysis to the study of stony cultural properties. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **20**, 239–251.
27. Torre de la, M. A., Gómez-Alarcón, G., Melgarejo, P., Lorenzo, J. (1991). Fungal colonization of the Salamanca cathedral sandstones. Some patterns of degradation. *In*: Baer, N. S., Sabbioni, C., Sors, A. I. (eds.), pp. 511–514. *Science, Technology and European Cultural Heritage*. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford.
28. Torre, M. A. de la, Gómez-Alarcón, G., Melgarejo, P., Sáiz-Jiménez, C. (1991). Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain. *Sci. Total Environ.* **107**, 159–168.
29. Torre, M. A. de la, Gómez-Alarcón, G., Vizcaíno, C., García, M. T. (1993). Biochemical mechanisms of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. *Biogeochemistry* **19**, 129–147.
30. Urzì, C., Lisi, S., Criseo, G., Pernice, A. (1991). Adhesion to and degradation of marble by a *Micrococcus* strain isolated from it. *Geomicrobiology J.* **9**, 81–90.
31. Warscheid, T., Oelting, M., Krumbein, W. E. (1991). Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. *Int. Biodeterior.* **28**, 37–48.
32. Williams, M. E., Rudolph, E. D. (1974). The role of lichens and associated fungi in the chemical weathering of rock. *Mycologia* **66**, 648–660.

Biocorrosion produced by *Thiobacillus*-like microorganisms

Ana I. López, Irma Marín, Ricardo Amils*

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid

Summary

Biocorrosion can be produced by many different microorganisms through diverse mechanisms. The biocorrosion produced by acidophilic microorganisms of the genus *Thiobacillus* is based on the production of sulfuric acid and ferric ion from pyrites or related mineral structures, as a result of the chemolithotrophic metabolism of these microorganisms. The products of this aerobic respiration are also powerful oxidant elements, which can produce chemical oxidations of other metallic structures. The Tinto River, a very unusual extremophilic habitat (pH around 2, and high concentration of ferric ion), product of the growth of strict chemolithotrophic microorganisms, is discussed as a model case.

Key words: Biocorrosion, *Thiobacillus*, acidophiles, chemolithotrophy.

Resumen

La biocorrosión puede ser debida al desarrollo de distintos tipos de microorganismos y a través de diferentes mecanismos. La biocorrosión producida por las bacterias acidófilas del género *Thiobacillus* está basada en la producción de ácido sulfúrico y ion férrico a partir de piritas y otras estructuras minerales, como resultado del metabolismo quimiolitótrofo de estos microorganismos. Los productos de esta respiración aeróbica son a su vez oxidantes energéticos que pueden causar la oxidación de otras estructuras metálicas. El río Tinto, un hábitat inusual extremo (pH alrededor de 2 y alta concentración de ion férrico) producto del crecimiento de microorganismos quimiolitótrofos estrictos, se presenta como modelo de generación de productos con capacidad de biocorrosión acídica.

* *Correspondence to:* Ricardo Amils. Centro de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Cantoblanco (Madrid). Tel.: 91-3978078. Fax: 91-3978344/91-3974799.

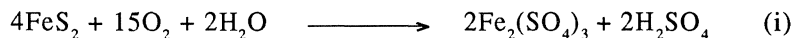
Introduction

The discovery of the important role of microorganisms in the solubilization and deposition of minerals in the environment has been one of the most significant findings in biotechnology in recent years due to its possible applications in many different fields (18, 23, 24). The best characterized chemolithotrophic microorganisms can produce oxidation or reduction of diverse sulphur and iron compounds, depending on the substrate and the ecological conditions of the habitats in which they develop. Some of them, like *Thiobacillus* species, are aerobic acidophilic bacteria, which can grow on different reduced sulphur and/or iron compounds (9). Others, like the *Gallionella* group of bacteria, are capable of oxidizing sulphur at extremely high temperatures and at an acidic pH (4, 11). On the contrary, some anaerobic bacteria, like the members of the *Desulfovibrio* genus, are able to reduce sulfate at neutral pH (7). An important role is played by the ferric ion reducing bacteria which are also anaerobic and perform at neutral pH (7).

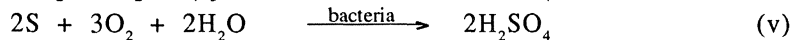
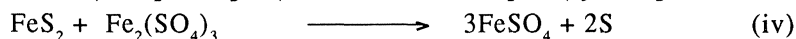
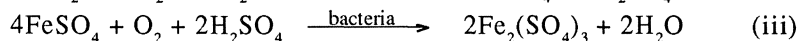
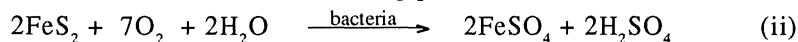
The best characterized processes are those related with the solubilization of cations from low-grade ores and the desulphurization of coal to prevent acidic rain (3, 23, 24). Also, these microorganisms are involved in processes of transport and/or sequester of metals which are of fine interest in the detoxification of contaminated waters (6, 17, 22, 26). Finally, these microorganisms can produce corrosion of metal structures with all its economical and environmental implications (13, 24). In this review we will concentrate mainly in the aerobic corrosion mediated by *Thiobacillus* like microorganisms. The Tinto River will be analyzed as an acidic chemolithotrophic habitat from which basic knowledge on the ecology, physiology, taxonomy and biotechnological applications of this important group of microorganisms can be obtained.

Chemical aspects of microbial leaching

Metals in insoluble minerals and industrial structures can be solubilized either directly through the normal metabolic activities of microorganisms or indirectly by chemical oxidation brought about by the products of metabolic activity. The overall result of bacterial action upon pyrite is shown in the following reaction:



which is the result of the following partial reactions:



These reactions occur chemically, but they are catalysed by different bacteria by a factor of 10^6 (13). Equation (iv) describes oxidation of the pyrite by oxidized iron without participation of bacteria, to produce elemental sulphur, which can be subsequently oxidized by specialized

bacteria. The described oxidation reactions mediated by bacteria correspond to what is known as direct bioleaching.

The sulphuric acid produced lowers the pH and promotes optimal conditions for the growth of the acidophilic microorganisms. The oxidized iron produced in equation (iii) can also, in acidic conditions, oxidize other metal sulphides to soluble metal sulphates. The latter is a chemical oxidation mediated by the products of the direct bioleaching reactions, and it is known as indirect bioleaching. It is difficult to distinguish between direct and indirect mechanisms. In real mineral bioleaching operations the situation is even more complicated, because chemical and microbial mediated leaching, both direct and indirect, are operating simultaneously. Similar situations must be considered in the biocorrosion processes mediated by these types of microorganisms.

The chemical and biochemical reactions involved in the solubilization of different metallic materials, natural or artificial, depend on the different components present on their structures and the conditions controlling microbial growth: temperature, pH, presence of oxygen, etc.

The *Thiobacillus* genus

Thiobacillus ferrooxidans was the first strict chemolithotrophic acidophilic microorganism isolated from acidic mining waters (5). This Gram-negative bacteria is a motile rod, 0.5 x 1.0–2.0 μm , capable of growing on reduced iron from which it can obtain energy and reducing power, needed for the assimilation of CO_2 at acidic pH. According to the Bergey's Manual it can grow between pH 1.4 and 6.0 (14), although its practical optimal value lies between 1.5 and 3. The reference strains are mesophilic, with optimal growth temperature around 30°C. Iron is not the only inorganic energy source for *T. ferrooxidans*. It can also use reduced forms of inorganic sulphur and mineral metal sulfides as energy sources.

Many strains of *T. ferrooxidans* have been isolated, with different capacities to oxidize substrates, variations in DNA base composition, and with different resistance to metal ions and acidic conditions (10, 21). Other related microorganisms, *Thiobacillus acidophilus* and *Thiobacillus organoparus*, have been described as having similar morphology and growth properties as *T. ferrooxidans*, although until now its role in metal leaching is uncertain. *Thiobacillus thiooxidans* has been described as a chemolithotrophic which differs from *T. ferrooxidans* in its inability to oxidize ferrous iron, although it oxidizes reduced sulphur with high efficiency. It is the most acidophilic of the different members of the genus *Thiobacillus*, producing acidophilic conditions that allow its growth at pH 0.65 (7, 9, 15). *Thiobacillus cuprinus* has been described as a mixotrophic microorganism capable of growing heterotrophically using different minerals with high copper content (12).

Other chemolithotrophic microorganisms related with metal solubilization

Leptospirillum ferrooxidans is capable of oxidizing ferrous iron but can not grow on reduced sulphur compounds. It is usually found in consortia with *T. thiooxidans*, degrading pyrite

with high efficiency. The morphology of these bacteria is very different from the rest of the thiobacilli. They exhibit a vibrioid form, forming spirals of joined cells (2, 19).

Also, a range of moderate thermophiles have been isolated in different mining sites (8, 20). Their optimal growth temperature lies between 45° and 50°C and they exhibit different substrate specificity. Their taxonomic ascription has not been achieved. In our laboratory we are currently employing pulse field gel electrophoresis to generate macrorestriction patterns of intact DNA in order to facilitate the taxonomic ascription of new chemolithotrophic microorganisms isolated from different sources (1, 8).

All the thermophilic acidophiles capable of chemolithotrophic growth described up to date belong to the Sulfolobales order of archaeobacteria (Archaea). They have been isolated from sulphur springs and from different mines (4, 8, 11). The cells have an irregular spherical shape, with optimal growth temperatures between 65 and 80°C. All are capable of oxidizing reduced sulphur compounds, but only some of them are able to oxidize ferrous iron. Many isolates of *Sulfolobus* grow autotrophically and heterotrophically.

Mixed cultures

The importance of mixed cultures of different microorganisms in relation to metal oxidation is now well established. The mixed cultures of *L. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* have been mentioned as effective pyrite oxidative consortia. In general, mixed cultures have the ability to adjust to the different conditions found in the complex oxidation processes of metallic structures. In these habitats, other microorganisms in addition to the chemolithotrophic ones are found, as different fungi and yeast, which grow on the traces of organic matter leaked by the chemolithotrophics. Their role in the overall process is uncertain. They can contribute to the scavenging of organic compounds that inhibit the iron-oxidizing bacteria, as nitrogen fixers supplying nitrogen to the system, or simply by excreting organic compounds which might sequester the leached metals. It is interesting to consider the existence of different microorganisms with different optimal pH which can be found in metallic oxidative processes, suggesting a sequential domination of different organisms with a gradual reduction of pH. Iron oxidation can be produced by *Gallionella* at neutral pH, can be achieved with bacteria of the genus *Metallogenium* at pH 4–5 and by acidophilic thiobacilli at even lower pH. The need for such displacement processes depends on the conditions in which the oxidative processes take place (13).

Corrosion of metallic structures promoted by microorganisms

Oil and water pipelines together with other buried metallic structures are subjected to corrosion mediated by microbial action. Similar problems develop in aluminum fuel tanks and other aluminum alloy structures. Different mechanisms are involved in biocorrosion, most of them associated with the production of corrosive products as acids and sulphide (13). Growth of organisms on industrial structures usually involves the production of sheets and polysaccharide

structures responsible for slime formation. These structures may trap microorganisms directly responsible for specific corrosion problems (25).

Also corrosion can result from microbial growth on damp or wet surfaces, resulting in the absorption of oxygen from beneath the growing cells and the establishment of electrochemical cells. The anaerobic zone resulting from the depletion of oxygen is anodic with respect to the exposed metal around the microbial growth, promoting what is known as anodic dissolution (13, 25).

The best characterized mechanisms of biocorrosion are those corresponding to the development of anaerobic sulphate-reducing bacteria implicated in the deterioration of buried and water immersed iron or steel structures. These bacteria use sulphate as an electron acceptor for anaerobic respiration, producing sulphide. The growth of different *Desulfovibrio* spp. produces different compounds or depletes the system from others which affect anodic and cathodic electrochemical reactions. The anodic reactions are affected by the production of sulphide, different metabolites and the consumption of phosphate or nitrogen compounds which facilitate the action of aggressive anions as Cl^- . The cathodic reactions are mainly affected by the production of sulphide and organic acids. These mechanisms can operate simultaneously (25).

The corrosion produced in metallic structures by the acidophilic aerobic bacteria is based fundamentally on the production of acid, the change of the redox potential of the components of the structures and on the generation of products or the elimination of components that can change the electrochemical reactions above mentioned.

Corrosion by acid production

The ubiquitous thiobacilli produce sulphuric acid which corrodes any metallic structure. The corrosion produced by this type of microorganisms depends on the local conditions where the industrial structures are maintained. Particularly important will be the presence of reduced sulphur compounds. Thiobacilli can also attack concrete structures. These structures are particularly fragile when exposed to these bacteria in aerobic conditions at low pH. This is one of the reasons why concrete structures are not appropriate for the confident of dangerous materials (13).

Corrosion produced by iron-oxidizing bacteria

As described above, there is a complete range of microorganisms capable of oxidizing iron at different pH conditions. Drainage waters from coal and pyritic mines are characterized by their extreme acid pH and high concentration of ferric ion, which are the products of the chemolithotrophic growth of *Thiobacillus* spp. and related microorganisms. Industrial structures, especially those utilized in mines, are exposed to acidic waters, ferric ions and chemolithotrophic microorganisms which individually or in a coordinated manner are responsible for their high level of deterioration.

The Tinto River as a model case

We would like to finish by presenting our field work on the Tinto River, which is an interesting acidophilic habitat promoted mainly by the growth of acidophilic thiobacilli on the complex sulphides of Tinto River (8, 16). We think that an improvement on our knowledge of natural extremophilic habitats like the Tinto River may help to understand the problems produced by this important group of microorganisms and also to benefit from their adequate use.

Our group is currently performing a study of the microbial ecology of the Tinto River (16). This river has its origin at Sierra Aracena, in southwestern Spain. It flows through the copper mining region of Río Tinto, where it acquires its characteristic low pH and high content of metallic cations, which are maintained all along its course until it reaches the Atlantic Ocean in Huelva, 80 km from its origin.

Physical and chemical parameters of the river

The extremely low pH values, between 2 and 2.5, are obtained when the river reaches the mining region, and are maintained along its entire length (Fig. 1). The pH profile remains constant all year, regardless of the temperature and the volume of the water flow. Also a high content of metallic cations is found along the river. Iron is the most abundant metal found in solution in the river waters. Iron is mainly present in the oxidized ferric ion form (Fig. 2). The high level of ferric ion originates the characteristic red color of its waters, to which the river owes its name. Other metallic cations present in the river are copper and zinc, although their relative concentrations are at least one order of magnitude lower than the ferric ion. The concentration of sulphate, the main form of soluble sulphur, is very high in the different sections of the river.

The main physico-chemical parameters measured along the river correspond to the conductivity and the redox potential (Fig. 3). Both characteristics agree with the properties of the different components found in the river. The measured redox potential and the pH, which

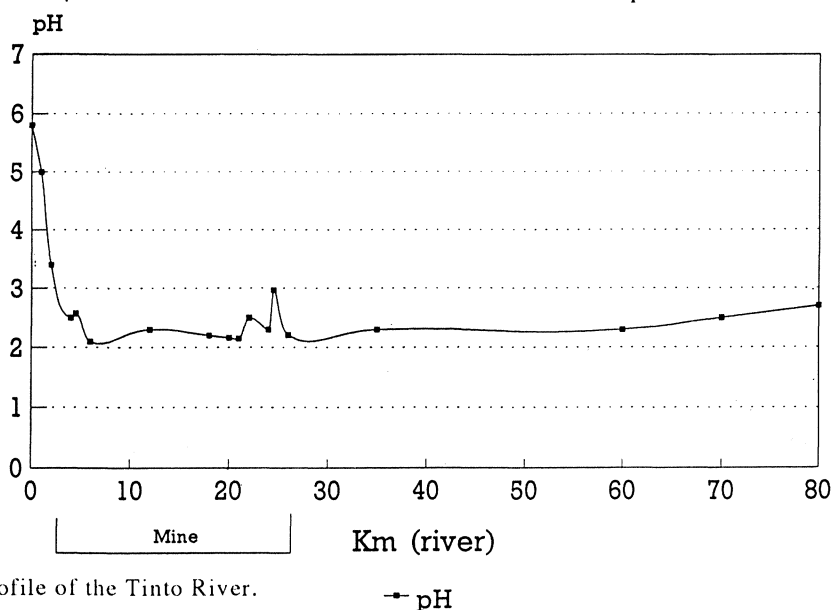


Fig. 1. pH profile of the Tinto River.

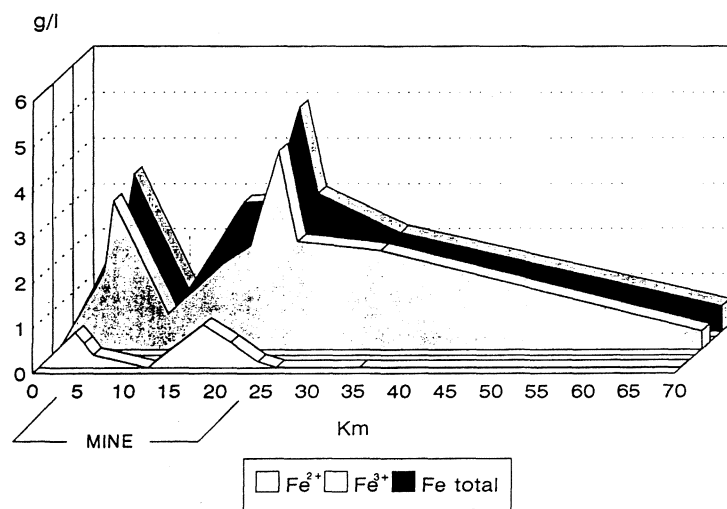


Fig. 2. Ferrous and ferric ions content in the Tinto River. The plotted values are the mean of three different seasonal determinations.

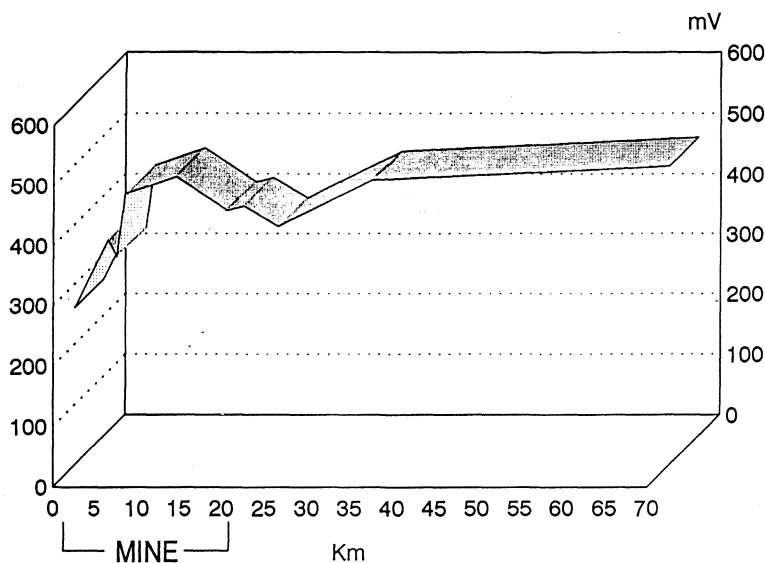


Fig. 3. Redox potential at different stations along the river. The plotted values are the mean of three different seasonal determinations.

are basically constant along the entire course of the river, allow us to conclude that the iron is mainly in soluble form as ferric ion.

Microbial determinations along the river

No higher eukaryotes are present once the river crosses the mining region, although a great abundance of algae and fungi can be found along its length. The entire river contains a great variety of filamentous fungi and yeast (16).

We have concentrated on the characterization of bacteria, with special emphasis on those exhibiting bioleaching properties. Regarding heterotrophic bacteria, there is a great abundance of Gram-positive bacilli, which due to the conditions of the habitat where they develop must correspond to acidophilic bacteria. The chemolithotrophic bacteria are abundant and constant along the acidic part of the river. In Fig. 4 the distribution of the chemolithotrophic bacteria is shown. It should be noted that the level of chemolithotrophic microorganisms capable of oxidizing ferrous ion and sulfur are constant all along the river. Different species corresponding to *Thiobacillus ferrooxidans* (15) type and *Leptospirillum ferrooxidans* (19) have been identified in the river waters. Also, new strict chemolithotrophic microorganisms which do not correspond to any described species have been isolated and are currently being characterized. Some of them correspond to thermotolerant bacteria with optimal growth temperature around 50°C. Thermophilic archaea with optimal growth temperature of 70°C have been isolated from the mining region, which gives an idea of the conditions in which some of the bioleaching processes are occurring.

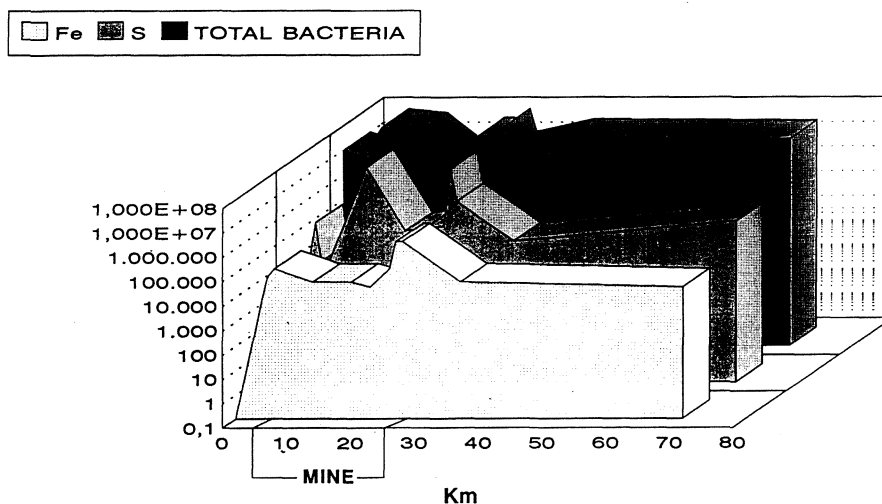


Fig. 4. Chemolithotrophic and heterotrophic prokaryotes determined in different positions of the river. The values are plotted in a log scale.

The Tinto River as an acidic chemolithotrophic model system

So far we have characterized different physical, chemical and biological parameters of the Tinto River, without any interconnection among them besides their container. We would like to advance a working model of how this complex geomicrobiological system might operate, with the understanding that there are many variables that must be measured before a refined model is obtained.

The extreme conditions acquired by the river seem to be mainly due to chemolithotrophic microbial activity and not to abiotic chemical oxidation processes. The acidic waters entering the river do not correspond to actual active mining activities. Most of the actual acidic waters come from flooded abandoned mines and from natural underground waters.

It cannot be forgotten that Tinto River has been in operation as a copper mine since Roman times, and probably before. Obviously we cannot exclude the possibility that the

extreme conditions of the river are the product of the mining works in operation for more than 2,000 years, but there are other considerations that we would like to introduce into the model.

In the Tinto River there are several characteristics that we would like to underline: a) after the river abandons the mining region the proton concentration, the redox potential, the ferric ion and the sulfate concentration are maintained in high values, although the different tributaries, with non acidic waters, increase the water content of the river by a dilution factor of two orders of magnitude; b) the concentration of chemolithotrophics is constant all along the river, suggesting that substrates to obtain energy must be available.

We would like to consider the possibility that ferric ion and sulfate together with high concentration of protons is due to a continuous biooxidation process, which is maintained by the chemical reduction of ferric ion in acidic conditions promoting chemical oxidations of the different mineral components present in the river. Of course, the possibility that anaerobic bacteria capable of reducing the high concentration of ferric ion might play a role, should also be considered but at the moment we favor chemical reduction as the means to maintain the level of ferrous ion necessary for the growth of chemolithotrophic bacteria. This coupling between the chemical and the biological systems would be responsible for maintaining the conditions of the river. As mentioned before, this model is a preliminary one, and further discussion and experiments are needed. The next step is to add to the river characteristics, already mentioned, the figures of the chemical and biological characterization of the sediments. Another important variable corresponds to the heterotrophic biomass which is probably fed by the photosynthesis performed by the acidophilic algae. Most of this biomass retains a high concentration of metals which should be considered in the mass balance of the system.

We would like to conclude by stressing that, contrary to expectations, the Tinto River is an extreme habitat shared by many diverse microorganisms. We do not know, and it may be impossible to do so, whether this extreme acidophilic habitat is simply a product of mankind's misbehaviour or due to naturally occurring phenomena. Of course the aim of this communication is not to defend industrial contamination as a possible source of extreme habitats, but we think that in our search for the limits of life models like the Tinto River are of interest in the study of new life conditions. After all, the new models of the origin of life are considering chemolithotrophy as a good candidate for primordial metabolic energy (27). We may have before us an interesting model to better understand life in extreme acidic conditions.

References

1. Amils, R., Abad, J. P. (1991). Genética de extremófilos mediante electroforesis en campo pulsado. *In: Ruiz-Berraquero (ed.), Microbiología 1990*, pp. 148–157. Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla.
2. Balashova, V. V., Vedenina, I. Y., Markosyan, G. E., Zavarzin, G. A. (1974). The autotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Microbiologiya* **43**, 581–585.
3. Bos, P., Boogerd, F. C., Kuenen, J. G. (1992). Microbial desulfurization of coal. *In: Mitchell, R. (ed.), Environmental Microbiology*, pp. 375–403. Wiley-Liss, New York.

4. Brock, T. D. (1985). *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Springer-Verlag, New York.
5. Colmer, A. R., Hinkle, M. E. (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage. *Science* **106**, 253–256.
6. Eccles, M., Hunt, S. (1986). *Immobilization of Ions by Bio-Sorption*. Society of Chemical Industry/Ellis Hordwood Ltd., London.
7. Ehrlich, H. L. (1990). *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, New York.
8. Gómez, E., López, A. I., Marín, I., Amils, R. (1993). Isolation and characterization of novel microorganisms from Río Tinto. *In*: Torma, A. E., Apel, M. L., Brierley, C. L. (eds.), *Biohydrometallurgical Technologies*, Vol II, pp. 470–486. The Minerals, Metals and Material Society, Warrendale.
9. Harrison, A. P. (1984). The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**, 265–292.
10. Huber, H. (1987). *Isolierung charakterisierung und taxonomische Einordnung neuer mesophiler, metallmobilisierender Bakterien*. Doctoral Thesis, University of Regensburg.
11. Huber, H. (1993). Hyperthermophiles: geochemical and industrial applications. *In*: Torma, A. E., Apel, M. L., Brierley, C. L. (eds.), *Biohydrometallurgical Technologies*, Vol II, p. 495–506. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale.
12. Huber, G., Huber, H., Stetter, K. O. (1986). Isolation and characterisation of new metal-mobilizing bacteria. *Biotech. Bioeng. Symp.* **16**, 239–251.
13. Hughes, M. N., Poole, R. K. (1989). *Metals and Microorganisms*. Chapman and Hall, London.
14. Kelly, P. D., Harrison, A. P. (1989). Genus *Thiobacillus*. *In*: Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., Holt, J. G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, pp. 1842–1858. Williams and Wilkins, Baltimore.
15. Kuenen, J. G., Pronk, J. T., Hazen, W., Meulenberg, R., Boss, P. (1993). A review of bioenergetics and enzymology of sulfur compound oxidation by acidophilic thiobacilli. *In*: Torma, A. E., Apel, M. L., Brierley, C. L. (eds.), *Biohydrometallurgical Technologies*, Vol II, pp. 487–494. The Minerals, Metals and Material Society, Warrendale.
16. López, A. I., Marín, I., Amils, R. (1994). *Geomicrobiology*, in press.
17. Nichols, A. B. (1991). Bioremediation: potential and pitfalls. *Water Environ. Technol.* **4**, 52–56.
18. Nicolaidis, A. A. (1987). Microbial mineral processing: The opportunities for genetic manipulation. *J. Chem. Technol. Biotech.* **38**, 167–185.
19. Norris, P. (1983). Iron and mineral oxidation with *Leptospirillum*-like bacteria. *In*: Rossi, G., Torma, A. E. (eds.), *Recent Progress in Biohydrometallurgy*, pp. 83–96. Associazione Mineraria Sarda, Iglesias.
20. Norris, P. R. (1989). Mineral-oxidizing bacteria: metal-organism interactions. *In*: Poole, R. K., Gadd, G. M. (eds.), *Metal-microbe Interactions*, pp. 99–117. IRL Press, Oxford.
21. Pichuanes, S., Garrido, J., Leighton, V., Rodríguez, M. (1986). Studies on native strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. II. Comparative fine structure. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**, 284–291.
22. Ritcey, G. M. (1989). *Tailings Management. Problems and Solutions in the Mining Industry*. Elsevier, London.
23. Torma, A. E., Apel, M. L., Brierley, C. L. (eds.) (1993). *Biohydrometallurgical Technologies*, Vols. I and II. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale.
24. Tuovinen, O. H., Fry, I. (1993). Bioleaching and mineral biotechnology. *Current Opinion in Biotech.* **4**, 344–355.
25. Videla, H. A., Salvarezza, R. C. (1984). *Introducción a la corrosión microbiológica*. Librería Agropecuaria, Buenos Aires.
26. Volesky, B. (ed.) (1990). *Biosorption of Heavy Metals*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
27. Wächterhäuser, G. (1990). The case for the chemoautotrophic origins of life in an iron-sulfur world. *Origins of Life* **20**, 173.

Microbial degradation of poly- β -hydroxyalkanoates

Jordi Mas-Castellà,^{*1} Rafael Lafuente,¹ Jordi Urmeneta,¹ Steve Goodwin,²
Ricard Guerrero¹

¹ *Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona*

² *Department of Microbiology, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, USA*

Summary

The search for new materials that are not hazardous to the environment has become a major issue in our society, engaged as it is in the attainment of sustainable development. Poly- β -hydroxyalkanoates (PHA), produced exclusively by prokaryotes, can be used as thermoplastics and are fully biodegradable and innocuous to the environment. Biodegradability testing has quantified the capacity of microorganisms to degrade such new chemical compounds, particularly polyhydroxyalkanoates. Standardized tests may also discover new microorganisms and environmental conditions that accelerate biodegradation. We evaluate various techniques used to assess the biodegradability of PHA, and which may also be applied to test other kinds of polymers.

Key words: Poly- β -hydroxyalkanoates, microbial degradation, depolymerase activity, plastic biodegradation, sulfate-reducing bacteria.

Resumen

La búsqueda de nuevos materiales que sean inocuos para el medio ambiente se ha hecho cada vez más necesaria en nuestra sociedad, orientada a conseguir un desarrollo constante. Los poli- β -hidroxialcanoatos (PHA) son polímeros producidos exclusivamente por procariotas. Pueden ser utilizados como termoplásticos y, después de su empleo, resultan totalmente biodegradables e inocuos para el ambiente. Se han puesto a punto diversos métodos que valoran la tasa de degradación microbiana de estos nuevos materiales. Estos métodos permiten también aislar microorganismos que tengan tasas de degradación elevadas o bien optimizar las condiciones ambientales en las que se produce la degradación. En este artículo se discuten algunos de los principales métodos utilizados para estudiar la degradación microbiana de polímeros en general, y de PHA en particular.

* *Correspondence to:* Jordi Mas-Castellà. Departament de Microbiologia. Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Tel.: 93-4021484. Fax: 93-4110592. E-mail: guerrero@porthos.bio.ub.es.

Introduction

The use of biodegradable plastics has been proposed as a solution to the problem of plastic waste. Although plastics account for as much as 20% by weight of solid urban waste, the fate of these materials in the environment is poorly understood. Durability, which was considered to be a positive attribute for plastics, is now perceived as negative, and interest in the use of biodegradable plastics has increased. The development of methods to test the biodegradability of polymeric materials is of great interest (19). Several methods have been developed to become standard tests for biodegradation. This creates many challenges to develop both plastics which are susceptible to biodegradation and controlled microbial communities which degrade plastics (Fig. 1).

Microorganisms are capable of accumulating distinctive polymers as future sources of carbon, nitrogen, and phosphorus, in the form of intracellular inclusions (2, 10, 23). This strategy increases their survival in a constantly changing environment. The carbon polymers are often poly- β -hydroxyalkanoates, polyesters of high molecular weight, which are produced exclusively by prokaryotes. These polymers are of potential use for new biodegradable products with plastic properties, such as bottles, bags, containers and packing materials.

In this article, we evaluate different methods of testing polymer biodegradation, specifically of poly- β -hydroxyalkanoates. Some of these methods permit the isolation of microorganisms with high biodegradation rates. Besides, an optimization of the techniques to evaluate these processes is essential. We report some of the methods developed, since much additional work is required to improve the assessment of biodegradability.

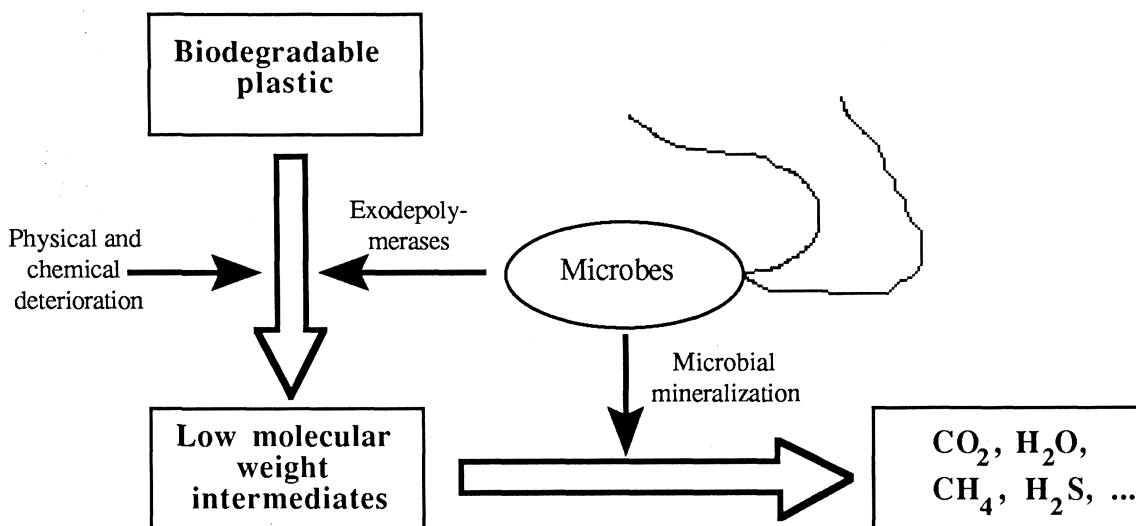


Fig. 1. Biodegradation of plastics: general scheme.

Brief review of biodegradation test methods

A summary of some of the methods with a brief description of their characteristics and references is enclosed in Table 1. To evaluate the biodegradability of polymers, the habitat must first be considered. Test procedures should try to simulate it as closely as possible. Two criteria are required to demonstrate biodegradation: growth of organisms, and polymer degradation. All organisms require a source of carbon, a source of nitrogen, and certain inorganic ions, as well as water. The polymer typically serves as the only carbon source for anabolic reactions. Most common polymers lack nitrogen, which the organisms need for the synthesis of proteins and other nitrogenous compounds (see chemical formulas of some polymers in Fig. 2). Organisms are able to use inorganic nitrogen and/or organic nitrogen. Inorganic ions are also required as enzyme cofactors and as components of proteins, nucleic acids, etc. The major ionic requirements are SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Fe^{2+} or Fe^{3+} , K^+ and Mg^{2+} . Trace amounts of Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , and some other ions may be additionally required. Some organisms require small amounts of vitamins and other growth factors, such as biotin, thiamin, riboflavin, nicotinic acid, folic acid, purines and pyrimidines, and others. Although these requirements are only necessary for the fastidious organisms, they can impede evaluation of biodegradation.

Non-biodegradable polymer	Biodegradable polymer
Polyethylene $\left[\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{C}- \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} \right]_n$	Poly- β -hydroxy-alkanoates $\left[\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ -\text{O}-\text{C}-\text{C}-\text{C}- \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} \right]_n$ $\text{R} = (\text{CH}_2)_x - \text{CH}_3$ $x = 0 - 8$
Polypropylene $\left[\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{C}- \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$	Polycaprolactone $\left[\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{O}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}- \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array} \right]_n$
	Starch / Cellulose $\left[\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array} \right]_n$

Fig. 2. Molecular structures of the main types of polymer classified according to their biodegradability.

The first step in the development of a testing procedure for a biodegradation study is to formulate a medium which be suitable for most tests. Most of the media developed over the years have been formulated for fungal biodegradation.

TABLE 1
BIODEGRADATION METHODS REVISED¹

Method (Reference) ¹	Description	Advantages	Disadvantages	Relative cost
ASTM test (3, 4, 12, 18)	It is a simple evaluation for microbial growth	Operationally feasible and relatively easy	Bacteria must be culturable Limited by media, temperature, etc. Subjective in interpretation	Inexpensive
Turbidometric measurement (18)	Absorbance measurements to detect polymer degradation	Useful for measuring the activity of enzyme and cell preparations	Only for non-filamentous organisms	Inexpensive
Respiration of test organisms (5, 16, 22, 26)	Detection based on the CO ₂ balance of the biochemical oxygen demand test (BOD)	Sensitive	No useful for mixed culture studies Requires technological expertise	Expensive; usually, requiring radio-labelled compounds
Monitoring weight loss (13, 17, 20)	Controlling the polymer weight it is easy to detect degradation	More simplistic and good reproducibility. Widely used	Limited by the growth time Low specificity and sensitivity	Inexpensive
Burial test (11, 19)	Measure weight changes by using environmental conditions	Simulate the environmental conditions	There is a lack of controls Long term testing requires large amounts of soil	Inexpensive
Clear zone technique (21)	Detect enzymatic activity by formation of clear zones on agar	Qualitative and sensitive to isolate organisms containing exodepolymerases	Bacteria must be culturable Limited by media	Inexpensive
Microscopic analysis (6, 8, 13)	Physical properties of the polymer are analyzed	Operationally feasible and relatively simple	Inconclusive in terms of biodegradation. Low specificity	Inexpensive
Acid production (this work)	Changes in the pH determined polymer degradation	Easily detection based in colour changes	Little work done to date to assess sensitivity	Inexpensive
Anaerobic sediment incubation (Urmeneta et al., in prep.)	Bottles with sediment are incubated under natural conditions	Simulate the environmental conditions	Limited by the number of bottles that is possible to incubate simultaneously	Inexpensive
Determination of adenosine triphosphate (14b)	Based in the firefly luciferase system to measure ATP levels	Useful with mixed cultures Highly sensitive	Sophisticated instrumentation required Technically complex	Expensive

¹ The numbers between parenthesis indicate the references of the method.

Fungal degradation

The American Society for Testing and Materials (ASTM) test for fungal degradation (3) prescribes the use of a mixture of spore suspensions of *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Chaetomium* sp., *Trichoderma* sp., and *Pullularia* sp.

The ASTM test for the resistance of polymers to bacteria (4) prescribes the use of *Pseudomonas aeruginosa*. Ennis and Kramer (12) used *Protaminobacter*, *Achromobacter*, *Brevibacterium* and *Bacillus* species. Others adopted a typical soil enrichment technique to isolate the species growing on a biodegradable polymer.

The earliest studies of biodegradability constituted the evaluation of polymers as a support for microbial growth. The methods most widely used in the USA are those described by the ASTM (3, 4), which involve the inoculation of polymeric material with fungal spore suspensions or bacterial cultures. The growth on the polymer was reported as follows: 0 = no growth, 1 = traces of growth (less than 10% covered), 2 = light growth (10–30% covered), 3 = medium growth (30–60% covered), and 4 = heavy growth. This test offers a simple evaluation for microbial growth, since it is subjectively interpreted. These tests, however, do not prove that the polymer was used for growth.

Many authors have criticized the results of tests of this kind. Significant variations were found in results from different laboratories, while there was correlation in other cases. Plastics containing additives such as plasticizers and antioxidants, may support growth due to the utilization of the additives rather than the polymer. Fungal growth is not necessarily related to biodegradation. Benedict et al. (6) attempted to correlate the ASTM procedure with a more quantitative technique involving the monitoring of the molecular weights by gel permeation chromatography (GPC). They found that fungal growth did not correlate well with the GPC results.

Turbidometry

Mallette (18) reported a turbidometric measurement of non-filamentous organisms in solution. This technique monitored growth of the microorganism, which correlated well with weight loss experiments. A quantitative assay of microbial degradation may also be performed by using a suspension of polymer. The procedure is similar to the turbidometric experiments mentioned below. The suspension of polymer is diluted in buffer to an absorbance of approximately 0.2 at 580 nm. The suspension of organisms or enzyme preparation is added and the mixture is incubated. The turbidity is recorded at intervals. A linear decrease in turbidity is normally seen with time. This assay is particularly useful to measure the activity of enzyme preparations, and Mallette used it to measure depolymerase activities.

Manometric assay of respiration

A widely used technique (5, 7, 22, 26) is the determination of the respiration of organisms. This typically involves the monitoring of the release of CO₂. Such studies require the careful use of controls to determine the contribution of endogenous metabolism to the changes in the test variables. Some knowledge of the metabolism of the test organism is

necessary to use this technique accurately, and it is generally not suitable for mixed culture studies. The technique is quite sensitive, but requires a level of effort and technological expertise that limits its utility as a routine method. For example, it is necessary to distinguish polymer degradation from other sources of carbon. This can be accomplished by monitoring the increase of $^{14}\text{CO}_2$ from a polymer. A similar test involves the monitoring of metabolic reactant, an example of which is commonly referred to as the biochemical oxygen demand test (BOD) (16).

Tests monitoring polymer weight loss

The most widely used test of polymer changes is weight loss. These tests also provide information on the rate of biodegradation in the sample. These techniques are simple and can be applied to various testing procedures. Generally, the procedure is as follows: the polymer is prepared in suitable form, sterilized, weighed, and exposed to the microorganism. This exposure may be performed on mineral agar plates by overlaying the polymer with agar medium and inoculating the mineral agar. The organisms may alternatively be added to the molten agar before overlaying the polymer (17).

Another technique involves immersing a weighed quantity of polymer in a suspension of growing cells or in an enzyme solution. The container is incubated at an appropriate temperature and the polymer is retrieved. The retrieval procedure may proceed as follows: the polymer surface is sterilized again, washed to remove any microbial film (which might contribute to the weight), dried, and the polymer is reweighed. The activity of the organism must be normalized and many tests must be run with proper controls to obtain reproducibility. These tests, although presumably offering good reproducibility in terms of growth-time profiles, are severely limited by: (a) necessarily small distribution of types of microorganisms, (b) elimination of any possible positive symbiotic effects between microorganisms, (c) short duration of test compared to burial test and (d) build-up of toxic or growth-inhibiting reaction products, due to the static nature of the test.

The burial test is another method which monitors weight loss (19). Its obvious advantage is the simulation of the environmental conditions of interest, and the fact that the polymer can be prepared in a predetermined form. A major disadvantage is the lack of laboratory controls. The mechanism of polymer degradation cannot be discerned. A compost mixture simulating various soils can be used for testing in laboratories, but long-term testing requires large amounts of soil to maintain adequate food for microbial growth. Soil samples can be seeded with additional specific organisms in attempts to enhance degradation. The persistence of these added organisms and their role in the degradation process are subject to question, since controls are not performed.

Methods have been developed so that exo- and endo-depolymerases can be used to study biodegradation. One which involves the use of both types of enzymes is described below. This method monitors the degradation of a polymer, coated on the inside of a flask or on a support inside the flask, by changes in molecular weight and molecular weight distribution. The support typically has a relatively large surface area, e.g. sand, glass beads, polymer particles themselves. After the appropriate incubation, water is removed from the sample by lyophilization. The dried residue film is extracted with the appropriate solvent for GPC, filtered, and chromatographed. Controls should be run to verify that cell components are not extracted.

The GPC method can be used to determine the biodegradation of fractions of various molecular weights which seem to degrade slower or at different rates. Fractions which are appropriately resolved can be replated or cast again to determine their ability to support growth.

Most tests monitor weight loss, change in molecular weight and distribution and change in appearance (13). Other tests include loss of tensile strength, loss of elasticity, end group analysis, release of breakdown products, change in viscosity, and release of dyes from the polymer. The type of information required dictates the test to be performed, although their specificity and sensitivity are low, and most do not measure ultimate biodegradation or mineralization.

Clear zone assay

A common technique is the clear zone assay (21), which is typically used to isolate organisms containing exo-depolymerases. This technique is qualitative and the size of the zone is regulated by: (a) the concentration of the agar, (b) the concentration of the polymer, (c) the particle size of the polymer used, and (d) the molecular weight of the enzymes involved. Most insoluble polymers are sterilized, ground to fine powders and suspended in the molten agar. Alternatively, the polymers which melt in the same temperature range as agar can be blended homogeneously and allowed to cool, resulting in the desired turbid suspension. An increase in biomass or the formation of clear zones around colonies on agar are endpoints for this assay.

Microscopic analysis of physical properties

Polymer film can be cast from solution onto enriched agar and inoculated (6). The physical appearance of the film is then analyzed by microscopy and its physical properties examined. The samples to be scanned by electron microscopy are prepared by boring circles in the film with a cork bore and floating them off the surface with water (9, 13). Microscopy may be used to observe physical changes in materials but it is inconclusive in terms of biodegradation.

Biodegradation of poly- β -hydroxyalkanoates

Our review of techniques used to study biodegradation led us to note that certain specific types of polymers were not mentioned. A good review of biodegradable polymers is given by Preiss (25) and Byrom (8). The polymers which we were principally interested in studying were poly- β -hydroxyalkanoates (PHA). ICI (Imperial Chemical Industries) has produced poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and other copolymers of this type for many years. Biopol[®], for instance, is a copolymer of poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). They have reported (15, 27) on the biodegradability of PHB. In summary, they determined the overall biodegradability of PHB under anaerobic conditions. The rate of biodegradation of PHB depends on the surface area and the concentration of active organisms. These authors determined weight loss by measuring the respiration of ¹⁴CO₂ in labeled PHB. They included studies of morphology by

optical and electron microscopy, molecular weights by GPC, change in crystallinity, and effects of humidity. They also measured changes in these properties of PHB film in various soils by similar methods. Their conclusions were that PHB degraded slowly in these soils due to surface erosion by extracellular enzymes secreted by colonizing fungi. Little bacterial involvement was observed and the most significant factors controlling the rate of fungal attack were surface area and water availability. The method of monitoring $^{14}\text{CO}_2$ was not considered quantitative.

Materials and methods

Media

Various media were used with distinct poly- β -hydroxyalkanoates (PHA) as carbon source. The composition of the media were as follows:

Phosphate buffered basal medium (PBBM): NaCl, 0.9 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; NH_4Cl , 1 g; Pfennig's trace mineral solution (SL 9), 10 ml; resazurin solution (2 mg/l), 1 ml; distilled water, 1 l.

Pseudomonas medium (1): K_2HPO_4 , 1.15 g; KH_2PO_4 , 0.625 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g; NH_4NO_3 , 1 g; Pfennig's trace mineral solution (SL 9), 10 ml; Zeikus' vitamin solution, 1 ml; distilled water, 1 l.

Pfennig's trace mineral solution (SL 9): distilled water, 500 ml; nitrilotriacetic acid, 12.8 g; adjusted to pH 6 with HCl 25%, 7.7 N; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 g; ZnCl_2 , 70 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 mg; H_3BO_3 , 6 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 190 mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 36 mg and adjusted to pH 6 with NaOH.

Zeikus' vitamin solution (28): biotin, 2 mg; folic acid, 2 mg; pyridoxine, 10 mg; thiamin, 5 mg; riboflavin, 5 mg; nicotinic acid, 5 mg; pantothenic acid, 5 mg; cyanocobalamin, 0.1 mg; p-aminobenzoic acid, 5 mg; lipoic acid, 5 mg; distilled water, 1 l.

Acid production

Microbial mat samples were cultured in anaerobic PBBM containing PHA as sole carbon source. After autoclaving, 0.05 ml of phosphate solution (2.2 M), 0.2 ml of Na_2S (2.5%), 0.1 ml of the vitamins solution, and 0.2 g of poly- β -hydroxybutyrate-poly- β -hydroxyvalerate copolymer (PHB-HV, 13.5% HV) was added. Finally, 1 ml of the microbial mat culture was added and the anaerobic tubes were incubated for several days at 23°C.

These cultures were used to study the extracellular enzymes involved in PHA degradation. In addition, water from Oyster pond (Woods Hole, Massachusetts, USA), where a microbial mat community is well developed, was used to detect the possible enzymatic activity to degrade PHA.

Xanthomonas maltophilia was grown in a minimal medium specific for *Pseudomonas*. A small amount (0.01% w/v) of yeast extract was added to the medium as growth factor. Poly- β -hydroxyoctanoate (PHO) was used as carbon source (0.3 mg/ml). A medium without PHO was used to compare differences between growths.

10 ml of each culture was centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes. 100 μl , 200 μl and 300 μl of each supernatant were checked for enzymatic PHA biodegradation.

Aerobic PHA biodegradation was measured by placing samples on each of the twelve wells of a ceramic plate. 0.005 g of PHA was diluted in 100 ml of chloroform and 1 ml of this dilution was placed in each well. The chloroform was evaporated, leaving a thin film over the well. No supernatant was added to the last well, which was used as control.

Tricine buffer was used in two concentrations: 1 mM and 5 mM, and was mixed with 1 ml of Cresol-red indicator solution. The indicator was diluted with ethanol (1% w/v), and the final concentration in the buffer was 60 µl of indicator in 100 ml of buffer. The pH range of this indicator is 7.1 yellow–8.8 red. Two types of experiment were performed:

(a) Without pH control.

(b) With pH control of the supernatant and buffer. pH was adjusted to 8.8 by addition of NaOH. Adjusting the pH guaranteed that no metabolites or previous biodegradation in the medium changed the pH of the well immediately.

The color changes obtained in each ceramic plate reveal enzymatic PHA biodegradation. In the degradation process the medium is acidified by the appearance of monomers as a consequence of the action of depolymerase, which causes the color change. Experiments were performed without adjusting the pH of supernatant or buffer.

Depolymerase activity determined spectrophotometrically

Xanthomonas and *Aspergillus* were grown using *Pseudomonas* minimal medium. Three different carbon sources were used: *Xanthomonas* with PHO, *Aspergillus* with octanoate and glucose, and *Aspergillus* with PHO and glucose. *Xanthomonas* and *Aspergillus* supernatants were tested by this method described below. 1 ml of each culture was centrifuged using Eppendorf microcentrifuges (13,000 rpm for 10 minutes) and the supernatant tested for depolymerase activity.

1 ml of a PHO dilution (3 mg/ml water) was mixed with 9 ml of buffer (glycine–NaOH, pH 9). 2 ml of buffer with PHO and 200 µl of each supernatant were placed in cuvettes. 200 µl of minimal medium, instead of supernatant, was used as control. The cuvettes were placed in a spectrophotometer set at 660 nm. Temperature was set at 45°C. The samples remained in the spectrophotometer for several hours and absorbance values were recorded.

Anaerobic sediment incubation

Anaerobic lake sediment was collected in Lake Cisó (Banyoles, Girona, NE Spain) (14a, 24). A Samples of 30 ml of the sediment were placed in 100 ml glass bottles. Determined quantities of PHA (PHB:HV at 93:7 molar percentage) were placed in the incubation bottles which were then filled to capacity with anoxic lake water. 1 mM of molybdate was used to inhibit the activity of the SRB (sulfate-reducing bacteria) in some bottles. They were incubated in the dark at 15°C in a water bath. After 42 days of incubation, the polymer content remaining in the sediment was measured.

The determination of the remaining polymer was described elsewhere (Mas-Castellà, J., 1991, Ph. D. thesis, University of Barcelona). To extract the polymer from the sediment, water was decanted off and the sediment was frozen and lyophilized. A Soxhlet apparatus was used to extract the polymer with chloroform as a solvent at 80°C, recirculating for 4 h. At the end of extraction, the chloroform was then evaporated in a nitrogen flux. The dried residues were

digested with 1 ml of concentrated sulfuric acid at 100°C for 1 h. This digestion generates crotonic acid, which was quantified by high pressure liquid chromatography (HPLC) using a fast acid column (BioRad HPAH 125–0100) reading at 210 nm in a Hewlett Packard detector series II-1040-M. Sulfuric acid 1 mM was used as mobile phase at a flow rate of 1 ml min⁻¹.

Results

Acid production

Results from the experiments testing acid production in the wells with polymer and culture supernatant depended on whether or not pH was controlled.

(a) Without pH control. All the wells with *Aspergillus* supernatant showed a similar color range, while the controls remained pink. This clearly indicated that the supernatant had a lower pH than the buffer. There were metabolites in the supernatant that acidified the medium. The color change was greater with *Aspergillus* than with *Xanthomonas* supernatant. A gradient of color was observed that correlated to the increasing supernatant volumes: 100 μ l, 200 μ l and 300 μ l. Maximal color change occurred after 48 h. The wells with 300 μ l were bright yellow and were the fastest at changing color. However, no differences between *Xanthomonas* cultures grown with PHO and without PHO were observed. Color changes in both cases were similar. *Aspergillus* culture with PHO and glucose as carbon source showed dramatic color changes in minutes. In general, modifications of the shape of the PHA film were observed.

(b) With pH control. Experiments controlling the pH (8.8 for the buffer with indicator and for the supernatants) showed slight color changes. With the 1 mM buffer, changes were faster, which indicated enzymatic activity. Maximal change was observed after 60 h. However, in this case, there were no differences between *Xanthomonas* cultures with PHO and without PHO.

The experiments performed with samples from microbial mats (surface water and microbial mat culture supernatant) showed slow color changes. So, no enzymatic activity was detected in these samples.

Depolymerase activity measured spectrophotometrically

This method was used to quantify enzymatic activity in culture supernatants (Fig. 3). The initial increase in absorbance is due to flocculation of the suspended PHO upon the addition of cations that are contained in the supernatants. The increase in absorbance may also be due in part to the initial interaction between depolymerases in the supernatant and the polymer. In fact, the absorbance increase in controls with added medium was always lower than the absorbance increase in the samples that received supernatants containing the putative enzyme. After the increase in absorbance due to flocculation, enzymatic degradation of the polymer leads to a decrease in absorbance. This is not due simply to settling, because controls do not exhibit the decrease in absorbance (data not shown).

The results indicate that the maximum enzymatic activity occurred in supernatants from cultures of *Aspergillus* grown on octanoate and glucose or grown on PHO and glucose (Fig. 4). Supernatants from cultures of *Xanthomonas* grown on PHO demonstrated significantly less depolymerase activity than the fungal cultures.

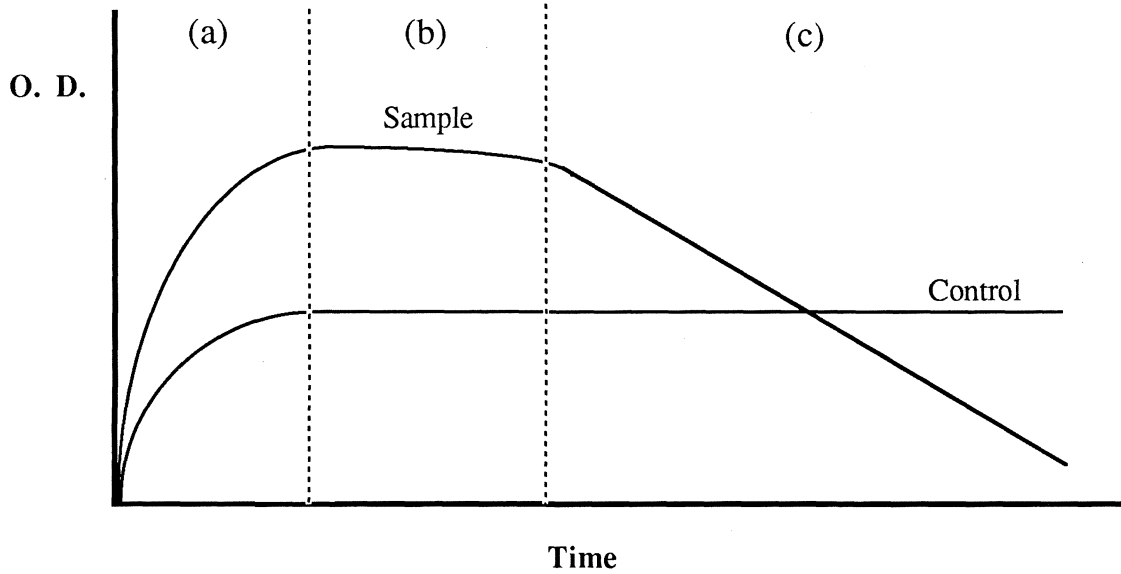


Fig. 3. Hypothetical activity of an enzymatic degradation: (a) the enzyme links the polymer, which increases the absorbance, (b) the enzyme remains linked, (c) as a consequence of the biodegradation there is an absorbance decrease. This absorbance decrease is not observed with the control curve.

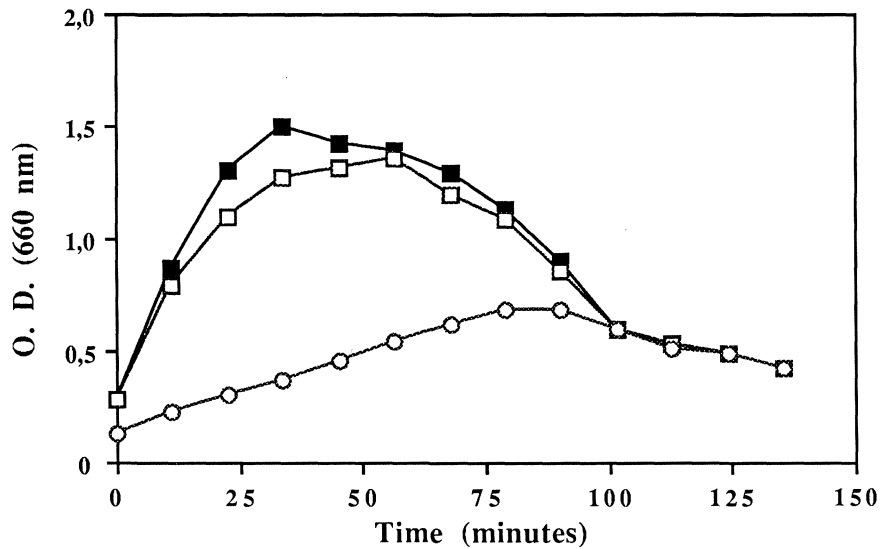


Fig. 4. Spectrophotometric determination of the biodegradation of polymers. Curves obtained with *Aspergillus* sp. growing with octanoate and glucose (■), *Aspergillus* sp. with PHO and glucose (□) and *Xanthomonas maltophilia* with PHO (○).

Anaerobic sediment incubation

PHA biodegradation rates depended on the quantity of polymer added to the sediment. The maximum biodegradation rate obtained was $15.52 \mu\text{g PHA h}^{-1}$ per $\text{mg PHA added per cm}^3$ of sediment. Potential natural rates of PHA biodegradation in anaerobic lake sediments can be measured with this method.

When SRB were inhibited by molybdate, the samples showed little degradation of PHA in comparison with control (Fig. 5). The slopes of the graphic represent μg of PHA degraded per hour per mg of PHA added per cm^3 of sediment. In the bottles containing lake water without sediment, low PHA degradation was observed. The results showed that SRB are the main responsible for PHA biodegradation in the sediment of Lake Cisó.

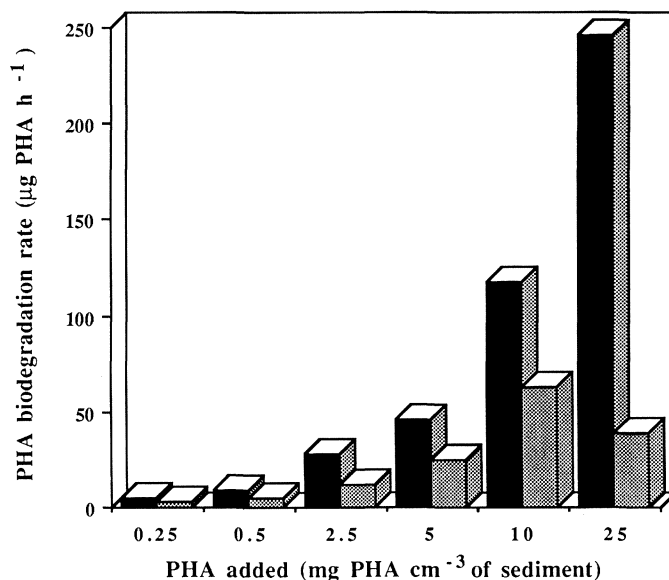


Fig. 5. Different PHA degradation rates correlated to the quantity of PHA, obtained with the anaerobic sediment incubation: controls (black bars) and molybdate-inhibited SRB (grey bars).

Conclusions and recommendations

Biodegradability of new plastic materials needs to be determined by definitive tests in environmentally representative conditions using standardized methods and evaluating the following aspects (in aerobic and anaerobic conditions): (i) weight loss, (ii) microbial growth, (iii) concentration of degraded products released, (iv) molecular weight averages, (v) molecular weight distribution, (vi) tensile properties, (vii) physical appearance of the surface, (viii) viscosity, (ix) crystallinity and (x) thermal properties. The aim of these methods is to obtain

the most information from the smallest amount of material and yet be simple enough for routine use. Therefore, the method has to be designed to account for all these factors.

Perhaps, an interesting method to develop in the future is the control of the ATP concentration of the test system. This method uses the firefly luciferase system to measure ATP levels in a sample. Since ATP is rapidly metabolized and is lost when cells die, the level of ATP is an extremely sensitive measure of the mass of organisms, regardless of species. It may be used with mixed cultures, although more sophisticated instruments may be required.

These methods should be evaluated by monitoring biodegradation of PHB and PHB–HV by various bacteria and fungi, as suggested by the ASTM. Microorganisms are diverse, so the results from a few bacteria may not be conclusive. Biodegradation studies should compare results in both mixed and axenic cultures.

Biodegradation testing under simulated environmental conditions should be a high priority. Laboratory microcosms may be able to simulate these environmental conditions. However, the future use of biodegradable plastics will depend on a balance of economic factors and society needs and values.

Acknowledgments

This work was supported by Project EV 4V719 of the 4th Environmental R&D Programme of the EC and the CICYT Spanish grant MAR91-0874, both to R. Guerrero. Work from R. Lafuente at the University of Massachusetts-Amherst was supported by National Science Foundation Grant MCB 9202419 to S. Goodwin. J. Urmeneta had a scholarship from the CIRIT of the Autonomous Government of Catalonia. We thank L. Margulis for aid during the work, and M. Piqueras and Robin Rycroft during preparation of the article.

References

1. American Type Culture Collection (ATCC) (1988). Catalogue of Bacteria and Bacteriophages. Rockville, Maryland.
2. Anderson, A. J., Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**, 450–472.
3. ASTM. (1976a). Standard Recommended Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi, G21-70. Annual Book of ASTM Standards, pp. 781–785. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
4. ASTM. (1976b). Tentative Recommended Practice for Determining Resistance of Plastics to Bacteria, G22-67T. Annual Book of ASTM Standards, pp. 786–789. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
5. Barak, P., Coquet, Y., Halbach, T. R., Molina, J. A. E. (1991). Biodegradability of polyhydroxybutyrate(co-hydroxyvalerate) and starch incorporated polyethylene plastic films in soils. *J. Environ. Quality* **20**, 173–179.
6. Benedict, C. V., Cameron, J. A., Huang, S. J. (1983). Polycaprolactone degradation by mixed and pure cultures of bacteria and a yeast. *J. Appl. Polym. Sci.* **28**, 335–342.
7. Budwill, K., Fedorak, P. M., Page, W. J. (1992). Methanogenic degradation of poly(3-hydroxyalkanoates). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1398–1401.

8. Byrom, D. (1993). The synthesis and biodegradation of polyhydroxyalkanoates from bacteria. *Int. Biodet. Biodegr.* **31**, 199–208.
9. Cook, W. J., Cameron, J. A., Bell, J. P., Huang, S. J. (1981). Scanning electron microscopic visualization of biodegradation of polycaprolactones by fungi. *J. Polym. Sci.: Polym. Letters Edition* **19**, 159–165.
10. Dawes, E. A., Senior, P. J. (1973). Energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **10**, 135–266.
11. DeCosta, J. B. (1968). Soil burial resistance of vinyl chloride plastics. *Indust. Eng. Chem. Product Res. Dev.* **7**, 238–240.
12. Ennis, D. M., Kramer, A. (1975). A rapid micro technique for testing biodegradability of nylons and related polyamides. *J. Food Sci.* **40**, 181–185.
13. Gilmore, D. F., Antoun, S., Lenz, R. W., Goodwin, S., Austin, R., Fuller, R. C. (1992). The fate of 'biodegradable' plastics in municipal leaf compost. *J. Industrial Microbiol.* **10**, 199–206.
- 14a. Guerrero, R., Montesinos, E., Pedrós-Alió, C., Esteve, I., Mas, J., van Gernerden, H., Hofman, P. A. G., Bakker, J. F. (1985). Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.* **30**, 919–931.
- 14b. Holm-Hansen, O. (1973). The use of ATP determinations in ecological studies. *Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm)* **17**, 215–222.
15. Holmes, P. A., Richardson, K. R., Hill, I. R., Drew, E. A. (1983). Biodegradability of poly(3-hydroxybutyrate) films in soil. ICI Technical Publication, Billingham, UK.
16. Krupp, L. R., Jewell, W. J. (1992). Biodegradability of modified plastic films in controlled biological environments. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 193–198.
17. Malik, K. A., Claus, D. (1978). A method for the demonstration of extracellular hydrolysis of poly- β -hydroxybutyrate. *J. Appl. Bacteriol.* **45**, 143–146.
18. Mallette, M. F. (1969). Evaluation of growth by physical and chemical means. *In: Norris, J. R., Ribbons, D. W. (eds.), Methods in Microbiology*, vol. 1, pp. 521–566. Academic Press, New York.
19. Mergaert, J., Anderson, C., Wouters, A., Swings, J., Kersters, K. (1992). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**, 317–322.
20. Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A., Swings, J. (1993). Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3233–3238.
21. Palmisano, A. C., Pettigrew, C. A. (1992). Biodegradability of plastics. *BioScience* **42**, 680–685.
22. Pankhurst, E. S., Davies, M. J. (1968). Investigations into the effects of microorganisms on PVC pressure-sensitive adhesive tape and its constituents. *In: Waters, A. H., Elphick, J. J. (eds.), Biodeterioration of Materials*, pp. 302–316. Elsevier, Amsterdam.
23. Pedrós-Alió, C., Mas-Castellà, J., Mas, J., Guerrero, R. (1990). Polyhydroxyalkanoate accumulation in planktonic and anaerobic environments. *In: Dawes, E. A. (ed.), Novel Biodegradable Microbial Polymers*, pp. 263–274. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
24. Pedrós-Alió, C., Guerrero, R. (1993). Microbial ecology in Lake Cisó. *Adv. Microb. Ecol.* **13**, 155–209.
25. Preiss, J. (1989). Chemistry and metabolism of intracellular reserves. *In: Poindexter, J. S., Leadbetter, E. R. (eds.), Bacteria in Nature*, vol. 3, pp. 189–258. Plenum Press, New York.
26. Sharpe, A. N., Woodrow, M. N. (1972). A rapid test for biodegradability of *Pseudomonas* organisms. *In: Waters, A. H., Hueck-van der Plas, E. H. (eds.), Biodeterioration of Materials*, pp. 233–237 Applied Science Pub., London.
27. Windeatt, A. J., Street, J. R. (1983). Assessment of the ultimate fate of poly-3-hydroxybutyrate under anaerobic conditions. ICI Technical Publication, Billingham, UK.
28. Wolin, E. A., Wolin, M. J., Wolfe, R. S. (1963). Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* **238**, 2882–2886.

Transporte a grandes distancias de contaminantes atmosféricos y sus efectos sobre los ecosistemas

Ramon Guardans,* Benjamín S. Gimeno

Instituto de Medio Ambiente, CIEMAT, Madrid

Summary

It was known, as far back as the nineteenth century, that rain water from industrial areas was more acid than that from rural areas. The potential risks for life in general were discussed, but no further attention was paid to the issue. At the end of the twentieth century, the ecosystems of Europe, Canada and the United States have been severely damaged by pollutants borne by atmospheric winds to places distant from their origin. The main effects of these atmospheric pollutants are due to sulfur and nitrogen oxide dilution and to photochemical reactions. International organizations have been formed and agreements pronounced and ratified by many countries for a universal study on the pollution process, on the transport of pollutants—mostly sulfur, nitrogen and ozone—and on how to collaborate in order to reduce emissions in the respective countries of origin for the worldwide profit.

Key words: Atmospheric pollutants, ecosystem, ozone, critical load, virus–ozone interactions.

Resumen

Ya en el siglo pasado se apreció la mayor acidificación de las aguas pluviales de las zonas industriales, en relación con las de las lluvias de las zonas rurales. Aunque se llegó a hablar de los posibles riesgos para la vida en general, después no se le prestó mayor atención. En los años recientes de nuestro siglo, los ecosistemas de Europa, Canadá y Estados Unidos se han visto gravemente afectados por contaminantes transportados por la atmósfera a través de grandes distancias. Los efectos contaminantes se deben, principalmente, a la dilución de óxidos de azufre y de nitrógeno y a reacciones fotoquímicas. Para el estudio conjunto de los procesos de contaminación y del transporte de contaminantes —principalmente,

* *Correspondence to:* Ramon Guardans. Inst. de Medio Ambiente, CIEMAT. Av. Complutense, 22. 28040 Madrid. Tel.: 91-3466196. Fax: 91-3466005. E-mail: guardans@vm.ciemat.es

azufre, nitrógeno y ozono—, para su evaluación y para estudiar la forma de colaborar, con objeto de disminuir sus emisiones en los respectivos países de origen, se han constituido distintas organizaciones internacionales y se han dictado diversos convenios, que han sido ratificados por muchos países.

Introducción

Los problemas locales derivados de la presencia de contaminantes en la atmósfera fueron identificados y estudiados por primera vez en la década de 1950, años en los que se desarrollaron los primeros modelos de transporte y de difusión. Estos modelos se dedicaron a la predicción de la difusión de las emisiones de materiales radiactivos a causa de accidentes, o de incidentes. Sin embargo, la opinión general hasta mediados de la década de 1970 era que se trataba, fundamentalmente, de un problema de dilución y, por sorprendente que pueda parecer hoy, se partía de la base de que en último término los contaminantes “desaparecían”. Esta forma de pensar dio lugar a la estrategia de las chimeneas altas, ya que éstas disminuían significativamente las concentraciones en los alrededores del lugar emisor.

Los trabajos de biólogos y meteorólogos, y algunos experimentos nucleares en la alta atmósfera, fueron suficientes para demostrar claramente que los contaminantes, y en general los compuestos químicos diluidos en ella, eran transportados a grandes distancias, y que la capacidad de dilución de la atmósfera es limitada: la contaminación no desaparece.

La conversión de residuos locales en flujos exosomáticos es la única solución termodinámica viable para mantener activos procesos improbables, aislados, en focos de producción. La eliminación de los residuos es parte del proceso de producción.

En las plantas, la primera vía para el transporte de solutos a grandes distancias, es el simplasto, (del griego *sym-*, con, y *plastós*, formado; formado juntamente). Es un protoplasto plurinucleado, constituido por la unión de varias células uninucleadas, o por la división sucesiva del núcleo de una misma célula. Está separado del apoplasto, o ámbito extracelular, por los plasmalemas, y de las vacuolas intracelulares por el notoplasto. Forma el floema (grupos de elementos conductores de las plantas, constituidos por tubos cribosos y fibras liberianas), cuya actividad principal es el transporte, a sumideros heterotróficos en otros lugares de la planta, del fotosintato.

El flujo en el seno del simplasto es mucho mayor que el normal en la membrana de las plantas. Además, la carga y descarga del simplasto requiere áreas laterales muy grandes comparadas con el área transversal de las células movilizadoras.

La distribución espacial y temporal en la atmósfera de las distintas proporciones de productos químicos es la combinación de procesos metabólicos y geofísicos. La generación de energía y otras formas industriales y domésticas de combustión se combinan con el metabolismo exosomático que se aprovecha de la energía del sol y usa trucos muy curiosos para acumular potencia y alterar notablemente la disposición de las cosas, tanto en el aire, como en el suelo y en el agua.

Finalmente, la imprenta y las comunicaciones digitales han configurado la actual percepción colectiva de la contaminación transfronteriza, así como han determinado la estructura formal de los instrumentos colectivos de diagnóstico y pronóstico.

Transporte a grandes distancias de contaminantes atmosféricos

A finales de la década de 1960, quedó claramente establecida la relación entre las emisiones de óxidos de azufre y de nitrógeno en centrales térmicas y otras instalaciones industriales con la acidificación de las aguas dulces en los países nórdicos (34). En la década de 1970 se estableció también la relación entre estos contaminantes y los daños observados en los bosques de Europa central (38). También en Canadá y Estados Unidos se dispuso en pocos años de una extensa documentación experimental y de campo sobre los efectos de distintos contaminantes sobre los ecosistemas.

Los efectos contaminantes de la atmósfera se deben, principalmente, (i) a la dilución de óxidos de azufre y nitrógeno (deposiciones ácidas) y (ii) a las reacciones fotoquímicas que producen concentraciones intermitentes de contaminantes primarios y secundarios. En muchos casos, la fuente contaminante transfronteriza está muy lejos. Todo ello ha llevado a organizar actuaciones internacionales conjuntas para disminuir las emisiones industriales y, por consiguiente, sus efectos nocivos. Otro objetivo es conseguirlo con los costes mínimos por parte de las industrias.

Convenio de Ginebra sobre transporte a gran distancia y transfronterizo de contaminación atmosférica (UN/ECE/LRTAP).

El "Economic Council for Europe" (ECE) es un órgano subsidiario de Naciones Unidas que incluye más de 35 países; entre ellos, todo el continente europeo, Canadá y Estados Unidos. Este grupo de países emite a la atmósfera unos 70 millones de toneladas de azufre y 45 millones de toneladas de óxidos de nitrógeno, lo que representa más del 40% de las emisiones antropogénicas mundiales.

En el seno de UN/ECE se firmó en 1979 un convenio sobre transporte de contaminantes atmosféricos a gran distancia (Long Range Transport of Air Pollutants, LRTAP). Este convenio formaliza el compromiso de los firmantes a desarrollar y aplicar estrategias para la disminución de las emisiones.

El Convenio de Ginebra ha adoptado protocolos sobre SO_2 , NO_x y compuestos orgánicos volátiles, que han sido firmados y ratificados por la mayor parte de los países. Las actividades de la Convención tienen carácter científico, tecnológico y político.

Con UN/ECE/LRTAP la comunidad internacional puede evaluar el efecto de la contaminación atmosférica sobre los ecosistemas y las posibles soluciones a largo plazo. El Convenio, firmado por más de 30 países del hemisferio norte, supone el compromiso de los participantes a desarrollar estrategias viables de disminución de las emisiones y controlar los efectos.

Desde el punto de vista científico se plantea la dificultad de condensar la información disponible, experimental y teórica, en un conjunto pequeño de informaciones concretas que permitan tomar decisiones operativas, y de forma que la base científica y el proceso de condensación sean razonables para los expertos.

En 1990 el protocolo del azufre había sido ratificado por 21 países europeos, Estados Unidos y Canadá. El protocolo supone un compromiso para reducir en un 30% (para 1993) los niveles de emisión de 1980. En 1988 se adoptó otro protocolo relacionado con los óxidos de

nitrógeno, con el compromiso de no aumentar los niveles de emisión de 1980–1985. Fue ratificado por 25 países europeos, Canadá y Estados Unidos.

En la redacción de estos protocolos, así como en el conjunto de actividades relacionadas con la UN/ECE/LTRAP, se ha establecido una serie de métodos, de diagnóstico y de pronóstico, relacionados con la evaluación de los efectos de la contaminación atmosférica sobre la biosfera y la simulación de escenarios alternativos de reducción de emisiones.

El Convenio de Ginebra se rige por un Cuerpo Ejecutivo decisorio, que se reúne una vez al año, y una serie de cuerpos subsidiarios, que tienen asignadas tareas específicas y preparan los informes de trabajo para el Cuerpo Ejecutivo

El Grupo de Trabajo de Efectos (WGE) es un grupo subsidiario del Cuerpo Ejecutivo, y tiene por misión obtener la información que éste necesita de los efectos de los distintos climas de contaminación sobre los distintos ecosistemas. La información obtenida por el WGE se transmite al Grupo de Trabajo de Estrategias y al Cuerpo Ejecutivo, que elaboran los instrumentos jurídicos, económicos y políticos que configuran el ámbito internacional establecido para la vigilancia y prevención de la contaminación atmosférica continental.

El WGE trabaja basándose en las informaciones recibidas por los países miembros. Éstos, por el texto de la Convención, se comprometen a aportar las informaciones de que dispongan. El WGE, por otra parte, también coordina y estimula el trabajo de una serie de programas de investigación internacionales (International Cooperative Programmes, ICP's) destinados a completar y mejorar las informaciones disponibles.

Modelos de efectos de la contaminación utilizados en UN/ECE/LRTAP

Para establecer modelos cuantitativos de los efectos de la deposición de contaminantes atmosféricos sobre ecosistemas, se utilizan varios modelos que a continuación se resumen en tres tipos: (i) Escala continental de transporte y difusión de contaminantes. Permite evaluar las concentraciones atmosféricas presentes en distintas zonas. (ii) Deposición de estos contaminantes sobre los ecosistemas. (iii) Descripción de los efectos de la presencia de estos contaminantes sobre los ecosistemas.

Partiendo de datos de emisión suministrados por organismos internacionales, como OCDE y modelos meteorológicos de circulación atmosférica, se hacen pronósticos sobre las concentraciones esperadas de las distintas especies químicas en los diversos puntos del continente. Los modelos de deposición se consideran detalladamente en UN/ECE/LRTAP, aunque no entraremos en su descripción aquí. Los modelos de efectos de la contaminación atmosférica sobre los ecosistemas se han desarrollado desde las escalas subcelulares, donde ocurren los procesos enzimáticos, con minúsculos remolinos y gradientes. Las enzimas, distanciadas por estructuras exosomáticas, se organizan en “colonias”, que duran meses o años, y a las que identificamos como organismos, especies e individuos. Las poblaciones oscilan en el espacio y en el tiempo, y los efectos de la química atmosférica sobre la textura fina de estas oscilaciones se pueden aplicar a la previsión y a la prevención de los efectos causados por la contaminación.

Los modelos cuantitativos de efectos representan problemas conceptuales desde los puntos de vista científico y teórico. Pero hasta ahora, en el trabajo de campo, ha sido difícil la

aplicación de modelos ecológicos detallados a gran escala, debido a la gran dificultad de encontrar información sobre grandes extensiones geográficas con la suficiente resolución espacial. En consecuencia, a gran escala, ejercicios como los llevados a cabo por los ICP en el Convenio de Ginebra y otros esfuerzos comparables, están sentando las bases para una evaluación cuantitativa y de alta resolución espacio-temporal de la fisiología del continente y del planeta.

Simultáneamente, las bacterias, los procesos intracelulares de construcción y almacenamiento, las vías de destoxicación de los espacios celulares e intracelulares, y otros campos, donde la investigación ha sido activa en las últimas décadas, aportan informaciones importantes sobre la forma en que la química de la atmósfera modula el clima metabólico.

En el marco del UN/ECE/LRTAP/WGE, después de varios años de colaboración internacional, se han establecido una serie de modelos cuantitativos de los efectos de la contaminación atmosférica. De uno de los documentos recientes extraemos unos párrafos a modo de ilustración.

Sverdrup et al. (36) y De Vries (6) han descrito métodos para calcular las cargas críticas. Las reglas recomendadas para la cartografía de las cargas críticas de acidez para Europa han sido descritas en el Mapping Vademecum (18) y los primeros resultados cartográficos de este ejercicio pueden encontrarse en Hettelingh et al. (17). El Mapping Vademecum describe un conjunto de cuestiones prácticas relacionadas con los procedimientos estadísticos y métodos de cálculo, que deben ser respetados por los participantes nacionales para conseguir, a escala continental, mapas coherentes de las cargas críticas de acidez.

Los métodos de cálculo de la carga crítica de nitrógeno se basan en los conceptos descritos en las actas de Lokeberg (14).

A continuación, se expone un resumen de los métodos utilizados para calcular las cargas críticas de acidez, azufre y nitrógeno. Después se comparan con los valores de deposición calculados y se evalúan los correspondientes excesos.

Las ecuaciones se expresan en equivalentes ácidos (eq) hectárea⁻¹ año⁻¹. La carga crítica de acidez real, CL(A), se calcula según:

$$CL(A) = ANC_w - ANC_{I(crit)} \quad (i)$$

donde $ANC_w = ANC$ producida por meteorización y $ANC_{I(crit)} = ANC$ consumida por la máxima lixiviación de alcalinidad aceptable en las cargas críticas para azufre y nitrógeno acidificantes. Para el protocolo del azufre en el curso de negociación se ha definido una carga crítica de azufre, CL(S), que se calcula a partir de la carga crítica de acidez, atribuyendo una parte de la deposición ácida tolerable a la deposición de azufre:

$$CL(S) = S_f \cdot CL(A) \quad (ii)$$

donde S_f es la llamada "fracción de azufre", definida por:

$$S_f = \frac{F(S_{dep}, S_{dep} + N_{dep} - N_u - N_i)}{F(S_{dep}, S_{dep} + N_{dep} - N_u - N_i)} \quad \text{cuando } N_{dep} > N_u + N_i \quad (iii)$$

$$S_f = 1 \quad \text{en los demás casos}$$

donde S_{dep} es la deposición de azufre actual, N_{dep} la de nitrógeno actual, N_u la absorción de nitrógeno y N_i la inmovilización de nitrógeno.

La carga crítica de nitrógeno, $CL(N)$, se calcula suponiendo que la deposición de nitrógeno acarrea acidificación si no es absorbido o inmovilizado por el ecosistema. Obsérvese que esta fórmula no tiene en cuenta la desnitrificación:

$$CL(N) = N_u + N_i + (1 - S_p) \cdot CL(A) \quad (iv)$$

Al calcular las cargas críticas y los excesos para un ecosistema, además de los efectos acidificantes, hay que tener en cuenta los que intervienen en el equilibrio de nutrientes y la potencial eutrofización. Se considera el nitrógeno en un balance de masas estacionario. Teniendo en cuenta las principales fuentes y sumideros y sin considerar la fijación biológica de N_2 , el equilibrio de masas utilizado en los cálculos se expresa:

$$N_{dep} = N_u + N_i + N_l + N_{de} \quad (v)$$

donde N_l es el lixiviado de nitrógeno, y N_{de} la desnitrificación. En esta formulación, los términos cuyos valores determinan el de la carga crítica son la absorción de nitrógeno, la inmovilización y el lixiviado:

$$CL_{nut}(N) = N_{u(crit)} + N_{i(crit)} + N_{l(crit)} + N_{de} \quad (vi)$$

donde $CL_{nut}(N)$ es la carga crítica de nitrógeno nutriente. Para calcular la carga crítica, los términos de la expresión (6) han de ser estimados particularmente; existen distintos métodos para la evaluación de cada término.

La estimación de la absorción de nitrógeno se basa en el concepto de nutriente limitante, que implica que N_u depende de la meteorización de cationes básicos y de la deposición de éstos. La absorción de nitrógeno a largo plazo se define como la absorción que puede quedar equilibrada por un sumidero a largo plazo de cationes básicos.

Esta cantidad se designa como absorción crítica, $N_{u(crit)}$. Los cálculos no se basan en la tasa de absorción actual, puesto que el crecimiento actual puede estar potenciado por aportes artificiales, e intermitentes, de nutrientes movilizados por deposiciones ácidas. La absorción crítica se calcula utilizando los balances de masas para los nutrientes Mg, K, Ca y P, separadamente. La producción de distintos elementos, debido a la meteorización de los perfiles de suelo, puede calcularse a partir de modelos de meteorización de suelos tales como PROFILE, de la obtención de muestras y del análisis de suelos. Puede ser estimada también a partir del tipo de suelo, teniendo en cuenta el tipo de roca madre subyacente, así como su temperatura y humedad.

Tomando la deposición y la meteorización como fuentes de estos nutrientes, y la absorción y el lixiviado como sumideros, el balance de masas para el elemento X ($X = Ca, Mg, K$ ó P) tenemos:

$$X_{u(crit)} = X_{dep} + X_w - Q \cdot [X]_{crit} \quad (vii)$$

donde $X_{u(crit)}$ es el umbral crítico de absorción del elemento X; X_{dep} es la deposición atmosférica del elemento X; X_w es la producción del elemento X por meteorización; Q es el flujo de agua en la base de la zona de raíces ($m^3 ha^{-1}$); $[X]_{crit}$ es la concentración limitante para la absorción del nutriente X.

La concentración limitante es el nivel en el que los árboles no pueden obtener el nutriente presente en la solución. En los cálculos se considera que la concentración limitante para Ca y Mg es $0,0005 \text{ eq m}^{-3}$, y 0 para K y P.

El umbral crítico de absorción de nitrógeno puede calcularse a partir del umbral crítico de absorción de cationes básicos, valiéndose de la relación entre la concentración de cada catión y el nitrógeno en la biomasa:

$$N_{u(\text{crit})} = \left\{ \frac{Ca_{u(\text{crit})}}{X_{Ca:N}} \frac{Mg_{u(\text{crit})}}{X_{Mg:N}} \frac{K_{u(\text{crit})}}{X_{K:N}} \frac{P_{u(\text{crit})}}{X_{P:N}} \right\} \quad (\text{viii})$$

donde $N_{u(\text{crit})}$ es el umbral crítico de absorción de nitrógeno y $X_{X:N}$ es la fracción del nutriente X frente al nitrógeno, durante la absorción (eq/eq).

Los modelos que se han utilizado hasta el momento en UN/ECE/LRTAP para calcular las cargas críticas se han centrado en las propiedades cuantitativas de la química del suelo. Entre otras razones, porque la mediación de estas características en cuencas hidrográficas permite establecer un diagnóstico sobre unos umbrales que se relacionan con modelos biológicos de tipificación de efectos o daños.

Para la descripción de niveles y de los procesos en organismos se han propuesto modelos biológicos de procesos de destoxificación a escala celular y subcelular.

En España se ha prestado atención a los efectos producidos por fuentes puntuales diversas, y se participa, desde hace años, en EMEP, donde el Instituto Carlos III aporta los datos de las 5 estaciones. ICONA ha contribuido al IPC-Forests con una red de 437 puntos, en los que se han tomado muestras de 10.544 árboles del conjunto del territorio (34). También se han llevado a cabo trabajos muy interesantes en la Península en relación con IPC-Materials, que se describen en Morcillo y Feliu (28). Recientemente, la actividad investigadora se ha ampliado y se han iniciado trabajos para evaluar los efectos del ozono troposférico sobre la vegetación natural y sobre los cultivos mediterráneos.

Los efectos del ozono sobre la vegetación terrestre pueden manifestarse a diferentes niveles, desde el molecular al de organismo, y, de una manera indirecta, al de ecosistema. Estos efectos dependen de la concentración del contaminante, de la duración de la exposición, del tiempo que media entre las exposiciones, y de los diversos factores ambientales y biológicos que influyen en la respuesta.

Entre los primeros efectos mensurables del ozono sobre la fisiología vegetal se encuentran la alteración de la permeabilidad de la membrana, la disminución de la fijación del dióxido de carbono y la alteración de la respuesta estomática. Estos efectos se pueden explicar por procesos tales como la activación o inactivación de determinadas enzimas, modificaciones metabólicas y alteraciones en el transporte de los productos de asimilación. Los cambios químicos y fisiológicos se pueden traducir en la aparición de daños visibles, senescencia prematura, aumento de la caída de la hoja y reducción del crecimiento y de la productividad económica de la planta.

Tinger (37) construyó un modelo conceptual de la respuesta de la planta frente al ozono. En este modelo se describía una secuencia de cuatro etapas: fase gaseosa y líquida, perturbación, homeostasis y daño.

Fase gaseosa. La entrada de ozono en la hoja es el resultado del gradiente químico entre su concentración en el ambiente y en el interior de la hoja. El flujo es proporcional a la conductividad estomática, e inverso a las resistencias que se presentan a medida que el ozono se difunde a través de la capa límite, de los estomas, de los espacios intercelulares y de la fase líquida.

Fase líquida. En esta fase se produce el transporte de ozono desde los puntos de deposición extracelulares a los lugares de perturbación intracelulares. A lo largo de esta ruta el ozono puede difundirse a través del agua, las membranas y el citoplasma. Como el medio es más viscoso que el aire, la difusión es mucho más lenta. La menor solubilidad del ozono respecto a otros contaminantes (como por ejemplo, el dióxido de azufre) disminuiría su transporte a lo largo de la interfase gas-líquido. Sin embargo, la tendencia del ozono a formar derivados facilitaría su difusión en fase líquida. La molécula de ozono es muy reactiva y tiene un elevado potencial redox. En solución acuosa, puede reaccionar con ácidos grasos insaturados y con compuestos que contengan grupos sulfidrilos y anillos. La reacción del ozono con los dobles enlaces de las olefinas en solución acuosa produce un aldehído o una cetona y un compuesto de Criegee que a su vez se descompone después de formar un aldehído o una cetona adicional y peróxido de hidrógeno.

En presencia de agua, los productos de la descomposición del ozono producen hidroxilos, hidroperoxilos, anión superóxido y otros radicales libres. Éstos pueden ser unos oxidantes más potentes que el propio ozono. Sin embargo, las plantas poseen sistemas de defensa contra las formas tóxicas del oxígeno. Estos sistemas aparecieron paralelamente al enriquecimiento en oxígeno de la atmósfera terrestre, hace más de dos mil millones de años. Los vegetales son productores de oxígeno en la fotosíntesis. Al tener lugar ésta, algunas moléculas de agua se descomponen en protones, electrones y oxígeno molecular. Este último es la principal fuente de agentes oxidantes en las células vegetales.

La primera especie molecular derivada directamente del oxígeno es el ion superóxido (O_2^-). Este ion es un radical libre, es decir, una molécula altamente reactiva capaz de romper ciertos enlaces químicos en las moléculas orgánicas. Los iones superóxido son el producto directo de la reducción del oxígeno en los cloroplastos, consecuencia del transporte de electrones, que tienen lugar en las membranas cuando los cloroplastos reciben luz. Estos iones pueden dar origen a otras moléculas oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que, es una sustancia tóxica, dado que inactiva ciertas enzimas del ciclo de Calvin, ciclo que interviene en la fijación del carbono del aire. Además, reacciona con los iones superóxido, produciendo los radicales hidroxilo (OH^-).

A los oxidantes derivados del oxígeno, se añade una cuarta especie química: el oxígeno singlete, 1O_2 , formado en los centros de captura de luz. Cuando la energía luminosa que llega a la clorofila es demasiado elevada, la energía de excitación puede transferirse directamente al oxígeno, originándose el oxígeno singlete.

Estos iones superóxido se producen, además, durante la respiración celular en las mitocondrias, al reducir el oxígeno en agua, reacción que está acoplada a la producción de energía.

Las cadenas transportadoras de electrones que intervienen en la fotosíntesis funcionan permanentemente en los cloroplastos. En la célula se producen constantemente iones superóxido, peróxido de hidrógeno y, secundariamente, radicales hidroxilo. Estos últimos son muy reactivos.

Las células vegetales poseen sistemas enzimáticos y no enzimáticos para impedir que se acumulen los iones superóxido y el peróxido de hidrógeno. Una primera familia de enzimas de detoxificación incluye las superóxido dismutasas (metaloproteínas), que convierten los iones superóxido en oxígeno y en agua oxigenada.

La segunda familia está relacionada con la eliminación de peróxido de hidrógeno. El ascorbato convierte el agua oxigenada en agua. En esta reacción cede dos átomos de hidrógeno y, a la vez, él mismo es oxidado. Las plantas contienen grandes concentraciones de ascorbato. Sin embargo, para que el sistema pueda funcionar a largo plazo, el ascorbato debe reciclarse a partir de ascorbato oxidado. Este reciclado puede producirse en presencia de glutatión (antioxidante). La oxidación del ascorbato está catalizada por la ascorbato peroxidasa. La regeneración del glutatión se produce gracias a la glutatión reductasa. Foyer y Halliwell demostraron que los antioxidantes están unidos por un ciclo de enzimas que garantizan su reciclaje y su disponibilidad. Es el ciclo ascorbato–glutatión, que funciona en los cloroplastos y en el citosol y permite la eliminación de agua oxigenada en todos los tejidos. El ascorbato es un buen donador de electrones y puede transferirlos directamente a los iones superóxido y a los radicales hidroxilo para convertirlos en agua. El agua oxigenada es eliminada también mediante la catalasa, que la convierte en agua. Esta enzima se localiza en los peroxisomas.

Perturbación. Los contaminantes atmosféricos, entre ellos, el ozono, inducen al cierre de los estomas. La consiguiente deficiencia en dióxido de carbono podría llevar a la acumulación de reductores fotoquímicos. Esta acumulación induciría la formación de especies químicas tan dañinas como el anión superóxido de hidrógeno.

Las membranas celulares parecen ser uno de los lugares clave de la perturbación inducida por el ozono. La incapacidad de la célula para disipar el exceso de reductores fotoquímicos, que permiten la formación de radicales libres, explicaría que los daños inducidos por el ozono se aprecien primero en los cloroplastos.

La exposición al ozono produce la salida de potasio de la célula, cuando lo normal es la entrada de éste emparejada con la salida de sodio. Este aumento de la permeabilidad de la membrana es reversible, si cesa la exposición al ozono; pero si ésta continúa, se produce un daño irreparable de los lugares de transporte. Parece que no se produce un deterioro general de la membrana, sino que el ozono inactiva selectivamente determinados lugares, que controlan la osmorregulación. Cualquier agente que afecte a la integridad de la membrana puede disociar espacialmente los componentes del transporte de electrones, y afectar los procesos de fotosíntesis y respiración.

Homeostasis. Después de sufrir una perturbación, los sistemas vivos tienden a restablecer el estado metabólico normal. Hay dos medios de recuperación: reparación y/o compensación de la perturbación y sus consecuencias. Los procesos de reparación restablecen los lugares de perturbación, eliminando así la disfunción fisiológica. En los procesos de compensación, la perturbación y sus consecuencias fisiológicas permanecen, y la célula responde con procesos que contrarrestan los efectos fisiológicos adversos de la perturbación. Dado que la recuperación puede ser total o parcial, el daño variará en intensidad.

El principal sistema de defensa de las plantas vasculares frente al ozono es la activación de las actividades enzimáticas relacionadas con la eliminación de radicales libres y de otras especies tóxicas que éstos originan. Si las plantas no están sometidas a concentraciones muy elevadas de ozono, o a exposiciones prolongadas a concentraciones tóxicas de este contaminante, la activación de estas enzimas será suficiente para impedir la aparición de alteraciones graves de los procesos celulares. Al sobrepasar determinados umbrales de exposición al ozono, diferentes según la especie, la variedad y las condiciones ambientales a que está sometida la planta, los mecanismos de defensa serán insuficientes para contrarrestar las alteraciones inducidas por la acumulación de radicales libres, por lo que aparecerán señales de daño.

Uno de los primeros síntomas del efecto del ozono en plantas de hoja ancha es la aparición de áreas brillantes u oleosas en la superficie foliar. Esto es consecuencia del aumento de la permeabilidad de la membrana, a causa de lo cual el contenido de las células se escapa al espacio intercelular. Si el tejido no está irreversiblemente dañado, este efecto es temporal; el tejido recupera su permeabilidad selectiva y no se desarrolla necrosis observable visualmente.

Daño. La suma del metabolismo alterado en muchas células afecta las actividades de los tejidos y órganos. Esto tiene consecuencias que se expresan como patologías foliares, alteración en el reparto de los productos de asimilación, y disminución del crecimiento y de la reproducción.

Distintos estudios realizados en el litoral levantino, encuadrados en el proyecto CC/MECAPIP (25, 26), han caracterizado la evolución de las concentraciones de ozono registradas entre los meses de abril a septiembre. Dichas concentraciones superan ampliamente las consideradas perjudiciales para la vegetación por la Comunidad Europea (Directiva CEE 92/72), o los niveles críticos de ozono determinados por la ONU y la Comisión Económica para Europa en los últimos comités de expertos reunidos en Egham, en 1991, y en Berna, en 1994.

Por otro lado, existe una amplia documentación bibliográfica que demuestra la gran sensibilidad de los cultivos mediterráneos al ozono (35).

Los estudios experimentales realizados conjuntamente por CIEMAT, Instituto Carlos III y MIGJORN, S. A., entre los años 1988 y 1992, han demostrado el efecto negativo del ozono sobre la apariencia externa (31), fisiología y productividad de plantas de judía y sandía (13, 8). Se ha observado que el ozono induce el cierre de estomas en esas plantas, y que disminuye la fotosíntesis neta en el caso de la sandía (2, 11). Bermejo et al. (2), tras la exposición de plantas de judía de una variedad sensible al ozono a concentraciones ambientales de este contaminante, observaron una disminución de la concentración de clorofilas.

Resultados más recientes indican que la resistencia al ozono aparece asociada al cierre de los estomas y al aumento de los niveles de peroxidasas (1), así como la reducción de la concentración de clorofilas, de la apertura estomática y de la fotosíntesis neta.

Las observaciones de campo del efecto del ozono en distintos cultivos, así como en masas forestales de pino carrasco, realizadas conjuntamente en 1992 por investigadores del CIEMAT, el Servicio de Protección de los Vegetales de Valencia, el Instituti Benaki griego, la Universidad de Newcastle británica y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, han demostrado que los daños del ozono se extienden por todo el levante peninsular (12). Sin embargo, los efectos indirectos de los contaminantes atmosféricos pueden ser más nocivos que los directos. Un ejemplo importante de estos efectos indirectos es la posible interacción del ozono con los organismos patógenos.

Parece que el ozono inhibe el desarrollo de los parásitos obligados, mientras que no se puede establecer conclusión alguna respecto a los parásitos facultativos. La respuesta obtenida depende de la dosis de ozono, del parásito, del hospedador e incluso del tejido afectado.

Heagle (15) observó que las interacciones entre el ozono y el hongo *Helminthosporium mayidis* dependen de la fase en que se encuentre el desarrollo de la enfermedad, de la concentración de ozono, de la dosis de contaminante, de la variedad del cultivo y del parásito, y de otros factores ambientales. El tiempo que media entre la inoculación del hongo y la exposición al ozono es crucial para determinar la respuesta de la planta, obteniéndose mayor protección frente al ozono si se deja transcurrir al menos un día desde la inoculación.

Parece que los hongos que atacan tejidos, como *Botrytis cinerea* y *Heterobasidion annosum*, son beneficiados cuando se desarrollan sobre tejidos dañados por el ozono (40). Según Manning (23), el ozono favorece la colonización de *Pullularia pullulans* en acículas de *Pinus strobus* que muestran síntomas visibles de daño por ozono. Miller et al. (27) observan que las acículas de *Pinus ponderosa* y *Pinus jeffreyi*, cuando están expuestas a ozono, presentan mayor infección de hongos que las plantas control.

La revisión bibliográfica realizada por Heagle (16) indica que el ozono puede reducir las lesiones foliares producidas por algunas bacterias, si bien detecta una gran variabilidad en las respuestas obtenidas. Esta variabilidad parece relacionada con el rango de concentraciones de ozono empleado y con el tiempo transcurrido entre la inoculación y la exposición al ozono, además de con la especie de bacteria y con el tipo de cultivo empleados. Esto es especialmente cierto en los experimentos realizados por Laurence y Wood (22) utilizando soja y *Pseudomonas glycinea*, que sugieren que la inducción de la inhibición del desarrollo bacteriano está ligada a exposiciones a ozono previas a la inoculación. Los mismos autores obtuvieron resultados parecidos con *Xanthomonas fragariae* en *Fragaria virginiana*.

Las concentraciones ambientales de ozono (55 ppb) pueden inducir la destrucción de las bacterias fijadoras de nitrógeno en alfalfa (37), trébol (10) y soja (3).

Los contaminantes atmosféricos pueden inducir alteraciones indirectas en las relaciones planta-insecto, las cuales afectan la capacidad para nutrirse de las plantas hospedadoras, a causa de los cambios en la fotosíntesis, en el transporte y en la acumulación de los productos de asimilación. Además, los cambios en la morfología de la planta y en los metabolitos secundarios pueden también afectar las relaciones planta-insecto (24).

La mayor parte de los estudios se han centrado en las relaciones planta-áfidos. Coleman y Jones (5) observaron que las exposiciones a concentraciones elevadas de ozono (200 ppb) no afectó el desarrollo de *Chaitophorus populicola* sobre *Populus deltoides*. Sin embargo, Warrington (39) observó un aumento de la tasa de crecimiento relativo del áfido *Rhopalosiphum padi* desarrollado en la cebada.

Brown et al. (4) observaron que tanto la exposición continua como episódica a ozono provoca el aumento del crecimiento de *Aphis fabae* sobre plantas de haba. Además, demostraron que este efecto se debe a cambios en la planta, ya que la misma exposición a ozono utilizando una dieta artificial no inducía respuesta alguna en la biología de los áfidos.

La tercera fase larvaria de *Lymantria dispar*, un lepidóptero, prefirió alimentarse con las hojas fumigadas con ozono a atacar las hojas procedentes de plantas control (20). Así mismo,

los adultos de *Epilachna varivestris*, también prefirieron alimentarse con las hojas fumigadas con ozono (9). Se obtuvieron resultados similares en condiciones de campo.

En observaciones de campo realizadas en California, en una zona afectada por oxidantes fotoquímicos, se apreció que los árboles que presentaban mayor intensidad de daño visible en las acículas, inducido por ozono, presentaban también mayor densidad de poblaciones de escarabajos de la madera.

Los contaminantes atmosféricos —y el ozono no es una excepción— pueden provocar la erosión superficial o dañar las epidermis, por lo que pueden contribuir a facilitar la infección por virus (19).

La bibliografía no muestra un patrón claro respecto a las relaciones virus-ozono. La variabilidad observada parece estar asociada con las concentraciones de ozono utilizadas, con la especie vegetal y con el tipo de virus. Casi todos los estudios encuadrados en este epígrafe, especialmente los realizados antes de 1980, suelen utilizar concentraciones anormalmente elevadas.

Los siguientes sistemas víricos han demostrado proteger la planta del ozono troposférico (19): infección sistémica de BCMV sobre la judía, lesiones localizadas de AMV, TRSV, TomRSV y TMV sobre las hojas cotiledonarias de judía, y TEV y TMV sobre hojas de tabaco, en el campo.

La exposición de plantas de tabaco a ozono reduce la sensibilidad de las mismas al virus del mosaico (TMV), así como de la soja al virus anillado del tabaco (TRSV). Sin embargo, la infección previa con TSV aumentó la sensibilidad de esas plantas al ozono (32).

Las observaciones de campo realizadas por Reinert et al. (33) indican que el tabaco tipo Burley afectado por TVMV o TEV es más sensible al ozono. Un estudio posterior demostró que la presencia conjunta de virus y ozono reduce todavía más la biomasa foliar de las plantas de tabaco. La sensibilidad frente a ambas agresiones parece coincidir con la sensibilidad de la variedad del virus. Los dos tipos de virus estudiados (TVMV y TEV) proporcionan diferentes respuestas. El análisis de los resultados muestra que TEV parece proteger de la acción negativa del ozono.

Las interacciones virus-ozono podrían explicarse por el hecho, observado por Langerbartels et al. (21), de que el ozono induce en la planta un aumento de los niveles de poliaminas y de los compuestos fenólicos, además de activar las enzimas degradadoras de membranas celulares. Las concentraciones de ozono utilizadas por esos autores fueron anormalmente elevadas (300–600 ppb), pero podrían explicar la protección de las plantas frente a las virosis cuando son expuestas a elevadas concentraciones de ozono.

Conclusión

En este artículo consideramos en primer lugar los procesos de destoxificación en términos fisiológicos y evolutivos. Los procesos y mecanismos de destoxificación están estrechamente vinculados con los aspectos patológicos descritos en la respuesta de los ecosistemas a la química de la atmósfera. En particular, se mencionan los modelos utilizados en el convenio UN/ECE/LRTAP para evaluar a escala continental los efectos de las concentraciones de óxidos de azufre y de nitrógeno, y de los contaminantes secundarios, resultantes de las reacciones fotoquímicas, como es el caso del ozono.

La interpretación fisiológica celular de los efectos de los contaminantes sobre las plantas y los ecosistemas está en fase inicial, y sólo se han mencionado algunos de los trabajos más recientes, en los que se estudia la relación patógeno-hospedador en los procesos de deterioro observados a causa de la presencia de concentraciones elevadas de contaminantes.

Bibliografía

1. Alonso, R., Bermejo, V., Elvira, S., Castillo, F. (1993). Plant peroxidases. Biochemistry and physiology. Proceedings of the III International Symposium, pp. 393–396.
2. Bermejo, V., Barnes, J., Elvira, S., Alonso, R., Gimeno, B. S., Davidson, A. (1994). Ozone induced physiological effects on some crops in eastern Spain. *In: Jager, H. J., Unsworth, M. H., De Temmerman, L., Maty, P. (eds.), Effects of Air Pollution on Agricultural Crops in Europe*, pp. 483–486. CEC Air Pollution Research Report 46.
3. Blum, U., Tingey, D. T. (1977). A study of potential ways in which ozone could reduce root growth and nodulation of soybean. *Atmos. Environ.* **11**, 737–739.
4. Brown, V. C., McNeill, Ashmore, M. H. (1992). The effects of ozone fumigation on the performance of the black aphid, *Alphis fabae* Scop., feeding on broads, *Vicia faba*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **38**, 71–78.
5. Coleman, J. S., Jones, G. C. (1988). Acute ozone stress on eastern cottonwood and the pest potential of the aphid *Chatiophorus populicola* Thoms (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* **17**, 207–252.
6. De Vries, W. (1991). Methodologies for the assessment and mapping of critical loads and impacts of abatement strategies on forest soils, Rep. 58, Winand Staring Center, Wageningen, the Netherlands.
7. De Vries, W., Posch, M., Reinds, G. J., Kämäri, J. (1992). Critical loads and their exceedance on forest soils in Europe, Rep. 58, Winand Staring Center, Wageningen, the Netherlands.
8. Endress, A. G., Post, S. L. (1985). Altered feeding preference of Mexican bean *Epilchna varivestis* for ozonated soybean foliage. *Environ. Pollut. Ser. A.* **39**, 9–16.
9. Elvira, S., Alonso, R., Quejido, A., Gimeno, B. S., Bermejo, V. (1992). Efectos del ozono sobre *Phaseolus vulgaris* L. var Lit en el Delta del Ebro (Tarragona). *In: Contaminación. Efectos fisiológicos y mecanimos de actuación de contaminantes*, pp. 343–356.
10. Ensing, J., Hofstra, G. (1982). Impact of air pollutant ozone on acetylene reduction and shoot growth of red clover. *Can. J. Plant Pathol.* **4**, 237–242.
11. Fernández-Bayón, J. M., Barnes, J. D., Ollerenshaw, J. H., Davison, A. W. (1993). Physiological effects of ozone on cultivars of watermelon (*Citrullus lanatus*) and muskmelon (*Cucumis melon*) widely grown in Spain. *Environ. Pollut.* **81**, 199–206.
12. Gimeno, B. S., Salleras, J. M., Porcuna, J. L., Reinert, R. A., Velisariou, D., Davidson, A. (1994). Assessment of ozone induced visible injury on different commercial crops along the Spanish eastern Mediterranean coast. A survey. *In: Jager, H. J., Unsworth, M., De Temmerman, Maty, P. (eds.), Effects of Air Pollution on Agricultural Crops in Europe*, pp. 511–514. CEC Air Pollution Research Report 46.
13. Gimeno, B. S., Bermejo, V., Salleras, J. M., Tarruel, A., Reinert, R. A. (1994). Ozone effects on the yield of watermelon and two bean cultivars grown at the Ebro delta. *In: Jager, H. J., Unsworth, M., De Temmerman, Maty, P. (eds.), Effects of Air Pollution on Agricultural Crops in Europe*, pp. 515–518. CEC Air Pollution Research Report 46.
14. Grennfelt, P., Thörnelöf, E. (1992). Critical loads for nitrogen, a workshop report. Nord **41**. Copenhagen.
15. Heagle, A. S. (1977). Effect ozone on parasitism of corn by *Helminthosporium mayidis*. *Phytopathology* **67**, 616–618.
16. Heagle, A. S. (1982). Interactions between air and parasitic plant diseases. *In: Unsworth, M. H., Ormrod, D. P. (eds.), Effects of Gaseous Air Pollution in Agriculture and Horticulture*, pp. 333–348. Butterworth Scientific, London.

17. Hettelingh, J.-P., de Vries, W., Schöpp, W., Downing, R. J., Smet, P. A. M. (1991). Methods and data. *In*: Hettelingh et al. (eds.), Mapping Critical Loads for Europe, chapter 3. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven, the Netherlands.
18. Hettelingh, J.-P., de Vries, W. (1992). Mapping Vademecum. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven, the Netherlands.
19. Huttunen, S. (1984). Interactions of disease and other stress factors with atmospheric pollution. *In*: Treshow, M., (ed.), Air Pollution and Plant Life, pp. 321–356. John Wiley & Sons, New York.
20. Jeffords, M. R., Endress, G. (1984). Possible role of ozone in the defoliation by the gipsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ. Entomol.* **13**, 1249–1252.
21. Langerbartels, C., Heller, W., Kernrer, K., Leonardi, S., Rosemann, D., Schaudner, M., Trost, M., Sandermann, Jr. (1990). Ozone-induced defense reactions in plants. *In*: Payer, H. D., Pfirrmann, T., Mathy, P. (eds.), CEC Air Pollution Research Report 26, pp. 358–368.
22. Laurence, J. A., Wood, F. A. (1978). Effects of ozone on infection of soybean by *Pseudomonas glycinea*. *Phytopathology* **68**, 4141–4145.
23. Manning, W. J. (1975). Interactions between air pollutants and fungal, bacterial and virus plant pathogens. *Environmental Pollution* **9**, 87–90.
24. Manning, W. J., Keane, K. D. (1988). Effects of air pollutants on interactions between plants, insects and pathogens. *In*: Heck, W. W., Taylor, O. C., Tingey, D. T. (eds.), Assessment of crop loss from air pollutants, pp. 365–386. Elsevier Applied Science, London.
25. Millán, M. M., Artiñano, B., Alonso, L., Navazo, M., Castro, M. (1991). The effect of meso-scale flows on regional and long-range atmospheric transport in the Mediterranean area. *Atmospheric Environment* **25 A**, 949–963.
26. Millán, M. M., Artiñano, B., Alonso, L., Castro, M., Fernández-Patier, R., Goberna, J. (1992). Mesometeorological cycles of air pollution in the Iberian Peninsula. CEC Air Pollution Research Report 44. pp. 219.
27. Miller, P. R. et al. (1977). Photochemical oxidant pollution effects on a mixed conifer forest ecosystem. A progres report. US Environmental Protection Agency, EPA-600/3-77-104.
28. Morcillo, M., Feliu, S. (eds.) (1993). Mapas de España de corrosividad atmosférica. CYTED, Madrid.
29. Odén, S. (1968). The acidification of air precipitation and its consequences in the natural environment. Ecology Committee Bulletin 1. Swedish National Science Research Council. Stockholm.
30. Olson, J.M. (1978). Precambrian evolution of photosynthetic and respiratory organisms. *Evolutionary Biology* **11**, 1–35.
31. Reinert, R. A., Gimeno, B. S., Salleras, J. M., Bermejo, V., Ochoa, M. J., Tarruel, A. (1992). Ozone effects on watermelon plants at the Ebro Delta (Spain): Symptomatology. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **38**, 41–49.
32. Reinert, R. A., Gooding, G. V., Jr. (1978). Effect of ozone and tobacco streak virus alone and in combination on *Nicotiana tabacum*. *Phytopathology* **68**, 15–17.
33. Reinert, R. A., Rufty, R. C., Eason, G. (1988). Interactions of Tobacco Vein Mottling Virus and ozone on biomass changes in Burley tobacco. *Environ. Pollut.* **53**, 209–218.
34. Servicio de protección contra agentes nocivos ICONA/MAPA (1992). Inventario CE-ECE de daños forestales. *Ecología* **6**, 135–149.
35. State of California. Air Resources Board (1987). Effect of ozone on vegetation and possible alternative air quality standards. Staff Report. March. 12 pp.
36. Sverdrup, H. U., de Vries, W., Henriksen, A. (1990). Mapping critical loads: A guidance manual to criteria, calculation, data collection and mapping. Nordic Council of Ministers, Miljørapport 14, Copenhagen.
37. Tingey, D. T. (1977). Ozone induced alterations in plant growth and metabolism. *In*: Dimitriades, B. (ed.), Proceedings of international conference on photochemical oxidant pollution and its control, vol II, pp. 601–609. US Environmental Protection Agency, EPA-600/3-77-001b.
38. Ulrich, B., Mayer, R., Khanna, P. K. (1979). Untersuchungsverfahren und ihre Auswirkungen in Waldökosystemen im Solling. *Schr. Forstl. Fak. Göttingen, Frankfurt/main Bd 58*.
39. Warrington, S. (1989). Ozone enhances the growth rate of cereal aphids. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **26**, 65–68.

Degradación de derivados del petróleo por *Acinetobacter calcoaceticus* MM5

M. Mercedes Marín, M. Luisa Ortiz, Fernando Laborda*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Alcalá de Henares

Summary

This paper describes the isolation of microorganisms from polluted heating oil. The growth of one of them has been studied (*Acinetobacter calcoaceticus* MM5) in several linear and branched hydrocarbons as well as the effect of its growth on commercial diesel oil. *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 is not capable of using glucose as its only source of carbon, and it needs the presence of nitrogen and phosphorus sources to degrade any petroleum by-product.

Key words: Petroleum microbiology, fuel oil biodegradation, *Acinetobacter calcoaceticus*, bioremediation.

Resumen

Se describe el aislamiento de microorganismos a partir de un gasóleo de calefacción contaminado. Se estudia el crecimiento de uno de ellos (*Acinetobacter calcoaceticus* MM5) en diversos hidrocarburos lineales y ramificados y el efecto de su crecimiento en gasóleo comercial. *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 no es capaz de utilizar glucosa como única fuente de carbono y para degradar los derivados petrolíferos necesita la presencia de fuentes de nitrógeno y fósforo.

Introducción

Los primeros estudios sobre microbiología del petróleo datan de finales del siglo pasado y principios del actual, y hacen especial referencia a la capacidad de ciertos microorganismos, como *Pseudomonas* y *Mycobacterium*, para metabolizar hidrocarburos y algunos derivados petrolíferos, como gasolina, queroseno, aceites de parafina, ceras, etc. (19)

* *Correspondence to:* Fernando Laborda. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá de Henares. Ctra. de Barcelona, km 33. 28871 Alcalá de Henares (Madrid). Tel.-fax: 91-8854621.

El requisito fundamental para mantener la proliferación microbiana en los derivados del petróleo es la presencia de agua, que puede llegar a los depósitos a través de filtraciones, por condensaciones dentro de los tanques debidas a los cambios de temperatura, por agua de lluvia o ser debida al metabolismo de microorganismos (1, 16).

El desarrollo de los microorganismos se realiza en la interfase hidrocarburo-agua, por lo que la superficie de contacto entre ambas fases es un factor importante en el crecimiento microbiano. El agua y los hidrocarburos pueden formar emulsiones que aumentan la superficie de contacto entre ambas fases, lo cual facilita el crecimiento microbiano. Muchos de los microorganismos degradadores de hidrocarburos producen tensoactivos que favorecen la estabilidad de las emulsiones (3).

Los efectos causados por el crecimiento de microorganismos pueden ser de dos tipos: a) debidos a la presencia física de los microorganismos (como obturación de tamices, filtros y conducciones), y b) causados por la actividad metabólica de los microorganismos (como alteraciones en la composición, viscosidad, pH, y otras características fisicoquímicas de los derivados, producción de tensoactivos que ocasionan cambios en la tensión superficial, y acumulación de gases que pueden originar explosiones) (10, 12).

Pero los microorganismos, al crecer sobre derivados petrolíferos, no sólo tienen efectos perjudiciales, sino que también presentan aspectos positivos. Por ejemplo, la biodegradación microbiana constituye uno de los mecanismos más importantes de eliminación de los hidrocarburos que contaminan el agua (tanto dulce como salada) y el suelo, y pueden desempeñar un papel muy importante en la depuración de residuos de refinerías (6, 9).

Los microorganismos encontrados en los diversos derivados petrolíferos pueden ser de dos tipos, utilizadores (degradadores) de hidrocarburos y no utilizadores de hidrocarburos. Los degradadores obtienen su energía a partir de los hidrocarburos, y en este proceso forman metabolitos tales como ácidos grasos, ésteres, alcoholes, etc., que permiten el crecimiento de otros organismos incapaces de crecer directamente sobre los hidrocarburos (12).

Los hidrocarburos del petróleo más fácilmente degradados son los n-alcenos, y dentro de éstos los de rango C10–C18. Siguen los isoalcenos, las olefinas, los derivados aromáticos y, por último, los cicloalcenos (2, 3).

Teniendo en cuenta que la mayor parte de los trabajos realizados hasta la fecha sobre el deterioro de productos petrolíferos se centran en el papel de los hongos filamentosos y de las bacterias sulfatorreductoras (15), en el presente trabajo nos planteamos el aislamiento de bacterias aerobias de un derivado petrolífero de uso habitual. Se escogió el gasóleo comercial de calefacción, procedente de un tanque de almacenamiento, y se estudió el efecto que uno de los microorganismos aislados produce al crecer sobre derivados petrolíferos.

Materiales y métodos

La muestra objeto de estudio es gasóleo de calefacción (gasóleo C), en el que se observa claramente la separación en dos fases diferenciadas. En ellas, la superior corresponde al gasóleo y la inferior a la fase acuosa; en ésta última podemos apreciar una evidente turbidez, opacidad y un sedimento oscuro; entre ambas fases se aprecia una película interfacial de aspecto pulverulento.

Métodos microbiológicos

Aislamiento de microorganismos aerobios. Se filtraron muestras de 0,5 y 1 ml, tanto de la fase gasólea como de la fase acuosa, a través de filtros Millipore que se colocaron sobre placas con Agar Nutritivo (Difco), MYPG (extracto de malta 3 g, extracto de levadura 3 g, peptona 5 g, glucosa 10 g) y MYG (extracto de malta 5 g, extracto de levadura 2,5 g, glucosa 10 g). Las placas se incubaron durante 7 días a 28°C.

Identificación de los microorganismos. Las bacterias aisladas se caracterizaron según criterios morfológicos y bioquímicos. Para la determinación de las pruebas bioquímicas se utilizaron sistemas de identificación rápida (API 20E, API 20NE, API 50CH) y se siguieron los criterios de la última edición del Manual de Bergey (13) y de Balows et al. (4).

Crecimiento en hidrocarburos. Las bacterias aisladas se cultivaron en un medio base salino (7), al que se añadió gasóleo C como única fuente de carbono. Se seleccionaron las colonias correspondientes a *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. Posteriormente se determinó la capacidad de crecimiento de esta bacteria al utilizar como única fuente de carbono petróleo crudo, gasóleo C, keroseno de aviación (Jet 1), y diversos hidrocarburos lineales, como tetradecano (C14), pentadecano (C15), hexadecano (C16), heptadecano (C17) y octadecano (C18). Los hidrocarburos se añadieron en una concentración del 1% v/v, y como inóculo se utilizó 1 ml de una suspensión de microorganismos con una absorbancia a 620 nm (A_{620}) de 0,3. Como controles positivos se determinó la capacidad de crecimiento en glucosa, citrato sódico, acetato sódico y etanol, y como control negativo el medio salino sin adición de fuente de carbono.

El crecimiento se determinó por variación de la A_{620} , recuento de microorganismos, peso seco y variación de pH después de cinco días de incubación. Se determinó también la variación de calor desprendido al incubar el microorganismo con los diferentes derivados, frente a controles sin inocular, mediante un Thermometric TAM 2277 (Thermal Activity Monitor), con un programa de ordenador Digitam.

Degradación de gasóleo

La modificación de las características del gasóleo por la acción de *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 se ha determinado en gasóleo de calefacción (gasóleo C), que se añade como única fuente de carbono al medio salino en una concentración de 0,5% v/v. Como inóculo se utilizó 1 ml de una suspensión de microorganismos de $A_{620} = 0,3$. El gasóleo residual fue extraído con hexano (14). Las muestras se tomaron a diferentes tiempos de incubación.

Espectroscopia infrarroja. Los espectros de IR se realizaron en un espectrómetro infrarrojo Perkin Elmer 883, acoplado a un sistema Perkin Elmer Infrared Data Station, en cubeta de CaF_2 con ventana de 0,1 mm.

Cromatografía de gases: Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Serie II, con detector de ionización de llama FID y columna Ultra 1 de 25 m y 0,2 mm de diámetro, utilizando como gas portador helio, con una temperatura inicial de 80°C y final de 280°C. El volumen de muestra inyectado fue de 1 μl .

Resultados y discusión

Aislamiento de microorganismos

A partir de colonias bacterianas de diferente aspecto morfológico, se aislaron un total de 20 microorganismos. Tras un estudio microscópico y bioquímico, fueron determinados taxonómicamente (Tabla 1). Los microorganismos se aislaron de la fase acuosa presente en el gasóleo alterado. En la fase oleosa únicamente se detectó la presencia de hongos filamentosos, en concreto, *Hormoconis resiniae* (5).

TABLA 1
CEPAS BACTERIANAS AISLADAS A PARTIR DE UN GASÓLEO ALTERADO

Cepas	Identificación
MM 1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MM 2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MM 3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MM 4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (*)
MM 5	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
MM 6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MM 7	<i>Pseudomonas putida</i> (*)
MM 8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MM 9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MM 10	Sin identificar
MM 11	<i>Staphylococcus xylosus</i>
MM 12	<i>Micrococcus</i> sp.
MM 13	<i>Staphylococcus xylosus</i>
MM 14	<i>Staphylococcus aureus</i>
MM 15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MM 16	<i>Bacillus subtilis</i>
MM 17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MM 18	Sin identificar
MM 19	<i>Micrococcus</i> sp.
MM 20	<i>Staphylococcus xylosus</i>

(*) Cepas de identificación dudosa.

Se han aislado tanto bacterias Gram-negativas como Gram-positivas. Entre las Gram-negativas destaca la presencia de diversas cepas de *Pseudomonas* y una de *Acinetobacter*, y entre las Gram-positivas diversas cepas de *Staphylococcus*, una de *Micrococcus* y una de *Bacillus* (Tabla 1). Todos estos géneros se han relacionado con el crecimiento en diversos derivados

petrolíferos. No obstante, puede resultar difícil enumerar los géneros más frecuentes implicados en la degradación de estos productos, ya que la mayor parte de los trabajos estudian microorganismos aislados del medio ambiente que luego se hacen crecer sobre hidrocarburos. Los estudios sobre microorganismos que se aíslan directamente de los productos petrolíferos son escasos (2, 3, 11, 15).

Crecimiento en hidrocarburos

De todas las bacterias aisladas, *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 es la única que crece utilizando gasóleo como única fuente de carbono. Este microorganismo presenta también un buen crecimiento en los diversos hidrocarburos empleados, con la excepción del keroseno, en el que el crecimiento es menor. De igual manera, el crecimiento es bueno en presencia de acetato y citrato, destacando el crecimiento obtenido cuando utiliza etanol como fuente de carbono (Tabla 2). Se observa que el crecimiento del microorganismo produce una acidificación del medio, a excepción del crecimiento en citrato o en acetato, en los que los valores de pH aumentan (Tabla 2).

TABLA 2

CRECIMIENTO DE *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 EN DIVERSOS DERIVADOS PETROLÍFEROS Y EN OTROS PRODUCTOS CARBONADOS DESPUÉS DE CINCO DÍAS DE INCUBACIÓN

	A_{620}	U.F.C./ml	Peso seco mg/ml	pH
Crudo	0,828	$4,3 \times 10^8$	0,517	5,40
Gasóleo	1,276	$3,0 \times 10^7$	0,742	5,18
Queroseno	0,047	$6,3 \times 10^7$	0,182	6,80
Tetradecano	0,919	$5,2 \times 10^8$	0,724	4,45
Pentadecano	1,031	$8,0 \times 10^7$	0,695	4,88
Hexadecano	1,081	$1,1 \times 10^8$	0,692	4,76
Heptadecano	1,089	$1,4 \times 10^8$	0,679	4,82
Octadecano	1,230	$1,7 \times 10^7$	0,708	4,73
Citrato	1,082	$2,9 \times 10^7$	1,434	9,72
Acetato	0,845	$5,5 \times 10^7$	1,763	9,62
Etanol	1,412	$5,1 \times 10^7$	8,840	4,01
Control	0,018	$1,06 \times 10^6$	0,081	7,03

Los valores de crecimiento medidos por los diversos métodos utilizados no siempre están relacionados, debido a diversas razones. Una de ellas es que las células bacterianas individuales pueden permanecer unidas, con lo que el recuento de U.F.C. (Unidades Formadoras de Colonias) puede verse alterado y no corresponder al incremento de peso seco obtenido.

Del estudio de la variación de la absorbancia, recuento de microorganismos y peso seco se comprobó que *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 no es capaz de utilizar glucosa como fuente de carbono. Este dato se confirmó midiendo, mediante el TAM, la variación de calor desprendido durante el crecimiento. En presencia de glucosa como única fuente de carbono no se observó desprendimiento de calor, a diferencia de lo que ocurre con el gasóleo C y el petróleo crudo (Fig. 1).

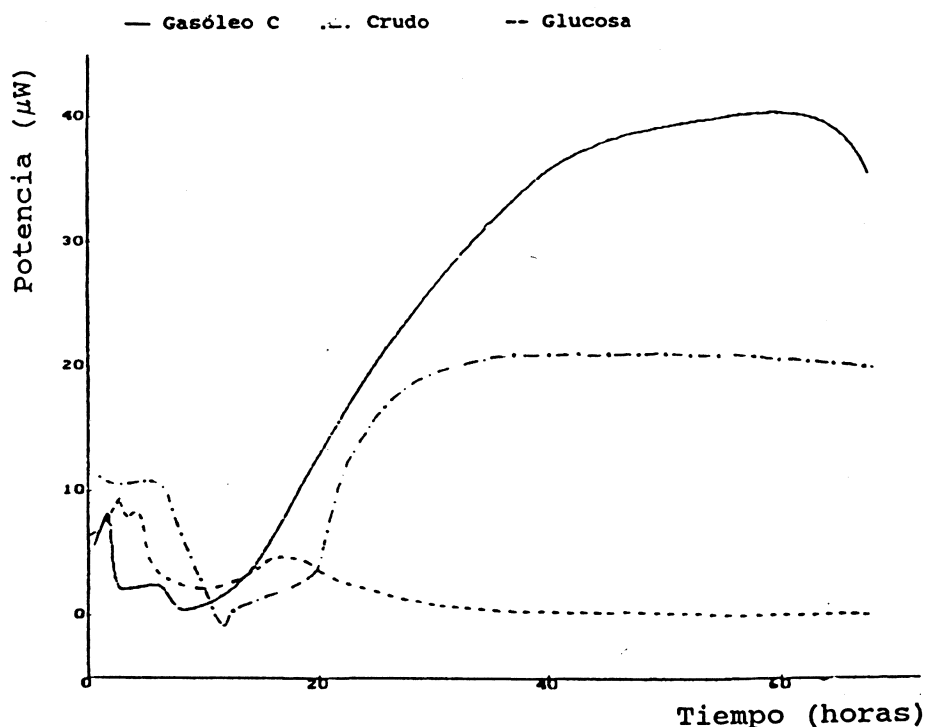


Fig. 1. Variación de la cantidad de calor desprendido cuando *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 crece en presencia de gasóleo C, petróleo crudo y glucosa.

Al crecer el microorganismo en los derivados petrolíferos, se observa la formación de una capa de combustible emulsionado, que queda flotando sobre la capa acuosa en la que se desarrolla el microorganismo. Al centrifugar, en la interfase se observa una estructura blanquecina y consistente, en la que se encuentran gotas de combustible rodeadas de microorganismos. Muchos microorganismos utilizadores de hidrocarburos producen tensoactivos, que facilitan la degradación de estos productos y que pueden tener usos industriales (17, 20).

Degradación de gasóleo

Espectroscopia infrarroja. Es uno de los métodos recomendados para la determinación de la degradación del petróleo (3). Cuando *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 se hace crecer sobre gasóleo C, y durante el período estudiado, no se ha observado la desaparición de ninguna banda característica (Fig. 2). Sin embargo, a partir de los cinco días de incubación se observó

la aparición de una banda a 1.707 cm^{-1} , que no se detectó en el control ni en muestras anteriores, y que se mantuvo hasta el final del período estudiado (Fig. 2). Esta banda podría corresponder a compuestos carbonílicos solubilizados en el gasóleo procedentes del metabolismo de los hidrocarburos, como indican Singer y Finnerty (18).

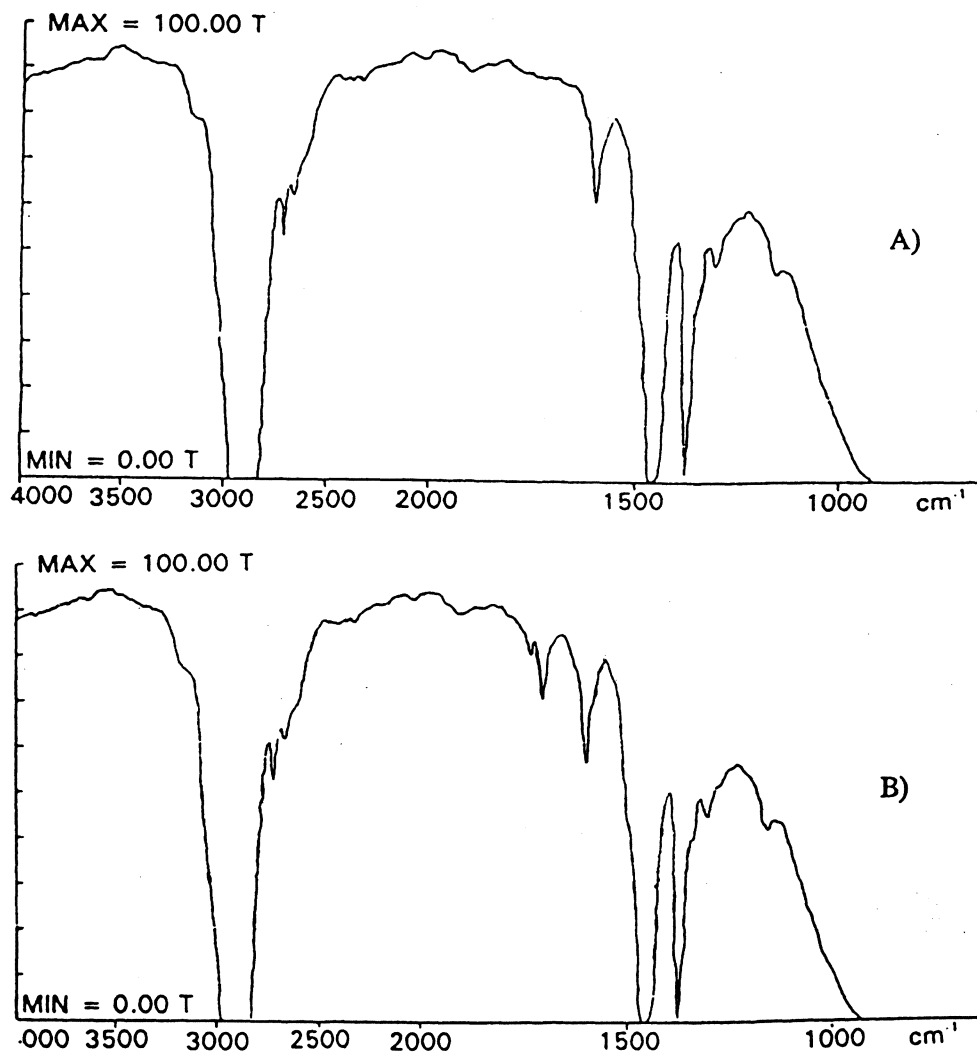


Fig. 2. Espectros IR de muestras de gasóleo C: A) control, B) tras cinco días de crecimiento de *Acinetobacter calcoaceticus* MM5.

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es también un método recomendado para la determinación de la degradación de los hidrocarburos (3). En los cromatogramas realizados a diferentes tiempos de incubación de *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 en gasóleo C, se observa que la degrada-

ción de los hidrocarburos aumenta progresivamente con el tiempo de incubación, siendo máxima a los 20 días (Fig. 3). La fracción más degradada son las n-parafinas, siendo metabolizados todos los alcanos (Fig. 3). Estos resultados confirmarían lo establecido por Fedorak y Westlake (8) y Kokub et al. (14) para petróleo crudo, en el que observan que la fracción de mayor biodegradabilidad corresponde a los hidrocarburos lineales.

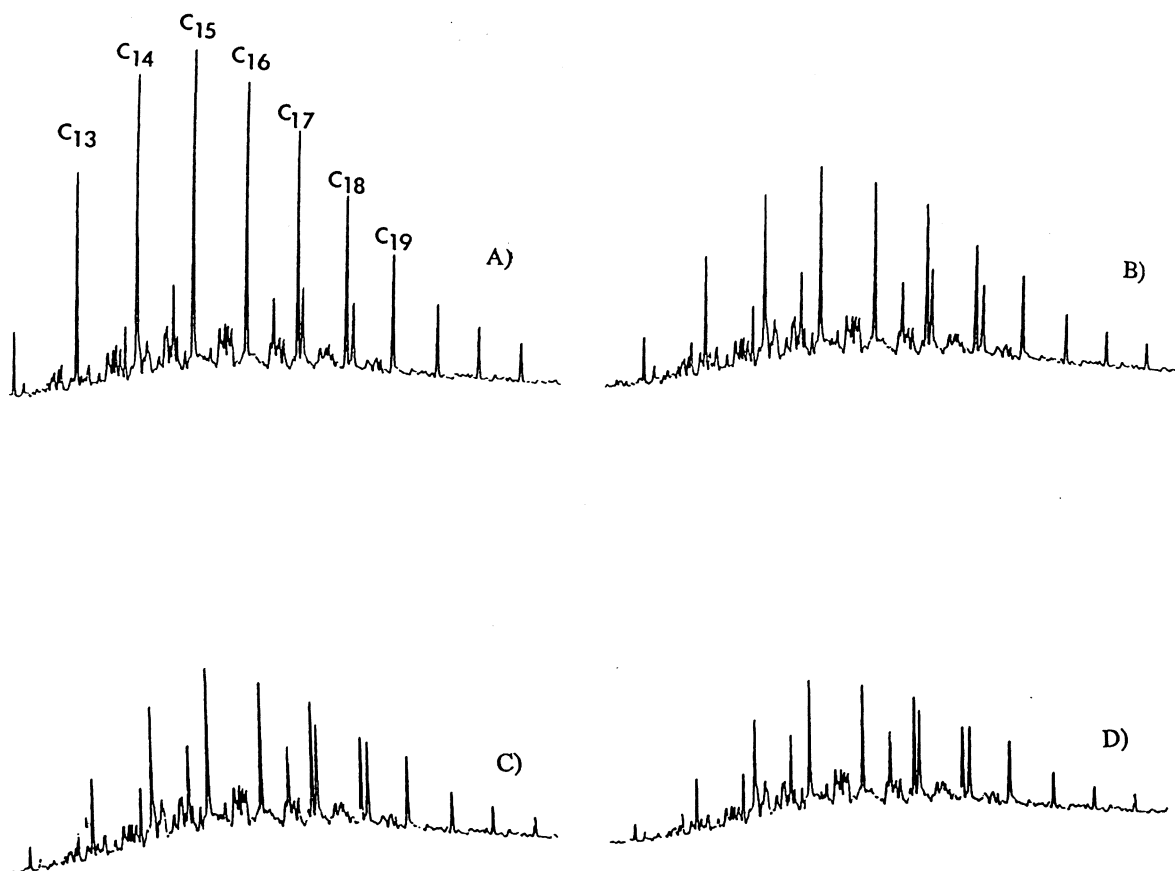


Fig. 3. Cromatografía gaseosa (CG) de muestras de gasóleo C: A) CG de un gasóleo control, B) CG después del crecimiento de *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 durante cinco días, C) CG después de 12 días de incubación, D) después de 20 días de incubación.

En el estudio de los requerimientos de fuentes de nitrógeno y fósforo se comprobó que es necesaria la presencia de ambas para que *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 pueda crecer y degradar los hidrocarburos; la ausencia de una de ellas impide la degradación de los hidrocarburos (Fig. 4). Estos resultados están en concordancia con lo establecido por Fedorak y Westlake (8) para mezclas de microorganismos crecidos en petróleo crudo, y por Reinfeld et al. (17) para *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, crecido también sobre crudo. Las bajas concentraciones disponibles de nitrógeno y fósforo en el agua de mar son uno de los factores limitantes del crecimiento y degradación microbiana de los hidrocarburos en dicho hábitat (3).

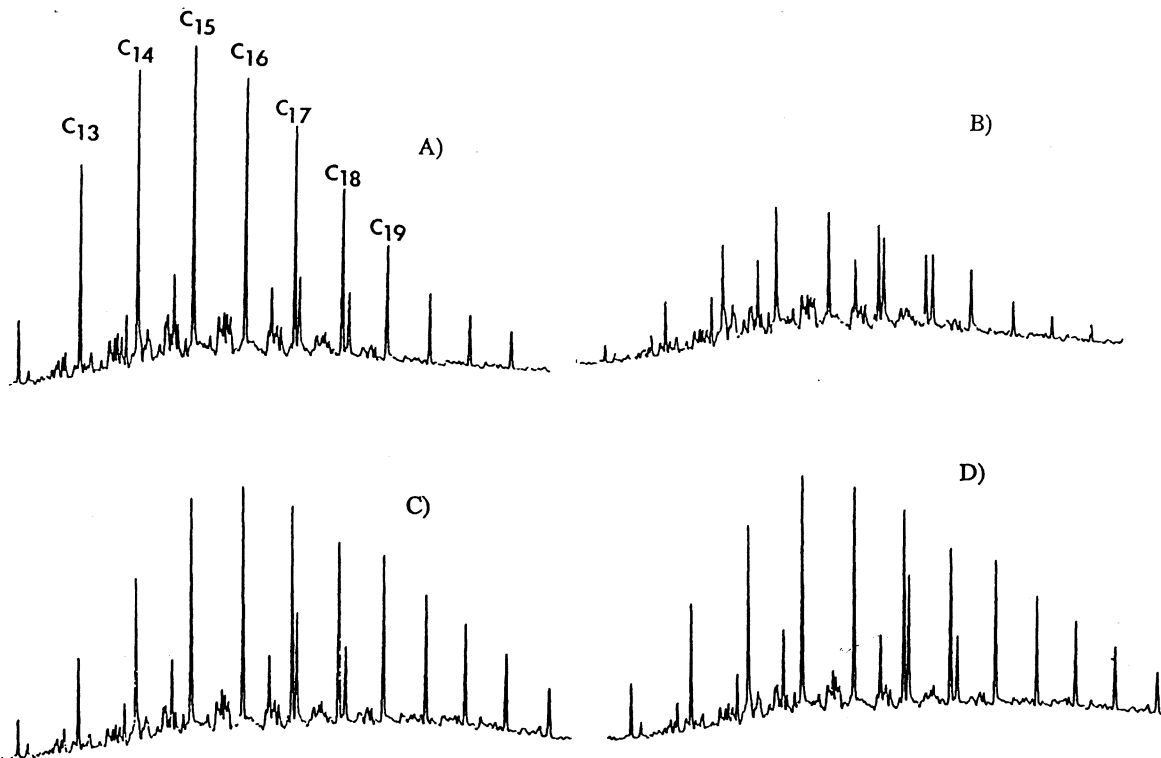


Fig. 4. Influencia de la presencia de fuentes de fósforo y nitrógeno en la degradación de gasóleo C por *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: A) cromatografía gaseosa (CG) de un gasóleo control; B) CG de un gasóleo incubado con *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 en medio completo; C) igual que B, pero sin fuente de fósforo; D) igual que B, pero sin fuente de nitrógeno.

La capacidad de *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 de degradar diferentes hidrocarburos podría tener aplicación en diversos procesos de biorremediación, cuyos estudios tienen cada día mayor importancia (3).

Bibliografía

1. Allsopp, D., Seal, K. J. (1986). Biodeterioration of refined and processed materials. *In: Introduction to Biodeterioration*, pp. 29–39. Arnold, E., London.
2. Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180–209.
3. Atlas, R. M., Bartha, R. (1992). Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *In: Marshall, K. C. (ed.), Adv. Microb. Ecol.* 12, 287–338.
4. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (1992). *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer Verlag, Berlin.
5. Barnnet, H. L., Hunter, B. B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company, Minnesota.
6. Bossert, I., Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. *In: Atlas, R. M. (ed.), Petroleum Microbiology*, pp. 435–473. Macmillan, New York.

7. Bushnell, L. D., Haas, H. F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.* **41**, 653–673.
8. Fedorak, P. M., Westlake, D. W. S. (1981). Microbial degradation of aromatics and saturated in Prudhoe Bay crude oil as determined by glass capillary gas chromatography. *Can. J. Microbiol.* **27**, 432–443.
9. Floodgate, G. (1984). The fate of petroleum in marine ecosystems. *In: Atlas, R. M. (ed.), Petroleum Microbiology*, pp. 355–397. Macmillan, New York.
10. Genner, C., Hill, E. C. (1981). Fuels and oils. *In: Rose, A. H. (ed.), Microbial Biodeterioration*. pp. 260–306. Academic Press, New York.
11. Herbert, B. N., Hill, E. C., Oates, P. D., Powell, D., Shennan, J. L., Whittle, R. (1987). A method for testing light distilled fuels. *In: Hopton, A., Hill, E. C. (eds.), Industrial Microbiological Testing*, pp. 215–219. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
12. Hill, E. C. (1984). Biodeterioration of petroleum products, *In: Atlas, R. M. (ed.), Petroleum Microbiology*, pp. 579–617. Macmillan, New York.
13. Holt, J. G. (ed.) (1984–1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
14. Kokub, D., Shafeeq, M., Khalid, Z. M., Hussain, A., Malik, K. A. (1990). Comparative studies on emulsification and biodeterioration of indigenous crude oils by enriched bacterial culture. *Biorecovery* **2**, 55–68.
15. Leahy, J. G., Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**, 305–315.
16. Pitcher, D. G. (1989). Industrial case histories of microbial fuel contamination. Cause, effect and treatment. *Internat. Biodeterio.* **25**, 207–218.
17. Reinfeld, A., Rosenberg, E., Gutnick, D. (1972). Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea waters by mixed and cultures. *Appl. Microbiol.* **24**, 363–386.
18. Singer, M. E., Finnerty, W. R. (1984). Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. *In: Atlas, R. M. (ed.), Petroleum Microbiology*, pp. 1–59. Macmillan, New York.
19. Söhngen, N. L. (1913). Benzin, Petroleum, Paraffinöl, und Paraffin als Kohlenstoffnahrung Energie Quelle für Mikroben. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionen, Krankheiten und Hygiene. Abteilung II* **37**, 595–609.
20. Zajic, J. E., Mahomedy, A. J. (1984). Biosurfactants: intermediates in the biosynthesis of amphipatic molecules in microbes. *In: Atlas, R. M. (ed.), Petroleum Microbiology*, pp. 221–297. Macmillan, New York.

Diseño de medios de enumeración de bacterias patógenas alóctonas de aguas naturales

Juan J. Borrego

Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga

Summary

Allochthonous microorganisms of aquatic ecosystems are not well adapted to survive, grow and reproduce in these environments, because of the lack of nutrients and the negative influence of environmental biotic and abiotic factors exerted on them. These factors produce a stress or sublethal injury on the allochthonous bacteria, which causes their inability to grow on the selective media routinely used for their detection and enumeration. Therefore, the methods used for the analysis of the sanitary water quality must allow the recovery of the physiological injured cells. In the present study, we have evaluated the efficiency of a new recovery medium of *Staphylococcus aureus* from water samples in comparison with other selective media previously formulated. The efficiency studies consider a series of parameters, such as accuracy, selectivity, specificity, reliability and precision.

Key words: Recovery media, *Staphylococcus aureus*, water samples, bacterial counting, pathogenic bacteria.

Resumen

Los microorganismos alóctonos de ambientes acuáticos no están bien adaptados para sobrevivir, crecer o multiplicarse en estos ecosistemas, debido fundamentalmente a la limitación de nutrientes y a su exposición a los factores bióticos y abióticos de estos ambientes. Algunos de estos factores actúan individual o sinérgicamente produciendo estrés o daños subletales que conllevan la incapacidad de las bacterias patógenas de crecer en los medios selectivos rutinariamente utilizados para su detección y enumeración. Por lo tanto, los métodos utilizados para determinar la calidad sanitaria de una agua deberían permitir la recuperación de las células

fisiológicamente dañadas. En el presente estudio, se evalúa la eficiencia de un nuevo medio para la enumeración de *Staphylococcus aureus* a partir de aguas naturales en comparación con la de otros medios selectivos previamente formulados. Los estudios de eficiencia consideran una serie de parámetros que incluyen la exactitud, especificidad, fiabilidad y precisión.

Introducción

Las bacterias patógenas alóctonas de ambientes acuáticos no están bien adaptadas para sobrevivir, crecer o multiplicarse en estos ambientes, debido fundamentalmente al factor limitante de nutrientes y a la exposición de los microorganismos a los factores bióticos y abióticos de estos ecosistemas (2, 28). Algunos de estos factores producen estrés o daños subletales que impiden el crecimiento de los microorganismos en los medios selectivos rutinariamente usados para su detección (23), aunque mantengan intactas sus características de virulencia y patogeneidad (33).

Diferentes estudios demuestran que muchos microorganismos patógenos presentan tiempos de supervivencia mayores que los microorganismos indicadores, al mismo tiempo que sufren menores efectos del estrés medioambiental (11, 24). Por estas razones, se han detectado microorganismos patógenos en brotes de enfermedades transmitidas por vía hídrica incluso cuando no se detectaban, o lo eran en bajas concentraciones, los microorganismos indicadores (6, 32). No obstante, la detección de tales patógenos es mucho menos eficiente cuando una proporción de la población celular está fisiológicamente dañada y la dosis infectiva es baja. El aumento de incidencia de enfermedades transmitidas por vía hídrica en los últimos años, fundamentalmente gastroenteritis de etiología desconocida, puede ser debida, o bien a la presencia de agentes patógenos todavía no caracterizados, o a una inadecuada metodología empleada en la detección y aislamiento de patógenos estresados por el medio ambiente (18).

Los efectos del daño o estrés medioambiental sobre las bacterias patógenas alóctonas se pueden centrar en los siguientes puntos:

Daños celulares

- Disminución del tamaño y actividad (37).
- Cambios en el volumen y forma (1).
- Daños en las membranas celulares (23).
- Daños en las adhesinas superficiales (39) y en las fimbrias (19).
- Pérdida de lípidos, carbohidratos, PHB, DNA y proteínas (13).
- Alteración en los constituyentes carbohidratados de la superficie celular (34).

Alteración de la fisiología celular

- Reducción en el ATP intracelular, respiración aeróbica, transporte y utilización de glucosa, y acumulación de lactato, acetato y etanol (23).
- Reducción en la producción de toxinas por los microorganismos enterotoxigénicos (40).
- Incapacidad de crecer en medios de cultivos (5, 31).

Efectos sobre la virulencia

- Pérdida de las células estresadas de la capacidad de adherirse a leucocitos (39).
- Pérdida de la invasibilidad sobre cultivos celulares (20).
- Pérdida de plásmidos que codifican factores de virulencia (27).

Materiales y métodos

Métodos utilizados para la enumeración de microorganismos alóctonos de medios acuáticos

Un método usado para detectar los microorganismos de una muestra de agua debe permitir el crecimiento tanto de los microorganismos fisiológicamente normales como de aquéllos que estén dañados. Sin embargo, hasta hace pocos años, muchos de los métodos aceptados para el aislamiento y enumeración de microorganismos patógenos alóctonos de las aguas no consideraban el estado “dañado” de los microorganismos y, por lo tanto, no los detectaban.

Actualmente, se sabe que estos microorganismos dañados pueden “autorrepararse” y hacerse funcionalmente normales en condiciones favorables (29). Cuando se sobrepasa la capacidad adaptativa de una célula, por la exposición prolongada a un estrés, se provoca daño o lesión celular. Este daño puede ser subletal, permitiendo la recuperación de la célula, tras un proceso de reparación, o puede causar la muerte celular.

El daño que se produce a la bacteria puede estudiarse, o bien ultraestructural, o bien funcionalmente; aunque, en la práctica, este daño se manifiesta como una incapacidad de la célula bacteriana para formar colonias en un medio definido o selectivo, aunque retenga la capacidad de crecer formando colonias en medios ricos.

Los agentes selectivos de los medios de cultivos, tales como los agentes surfactantes, sales, inhibidores, antibióticos, ácidos y colorantes, pueden ser tóxicos o inhibidores del proceso de reparación, provocando la no recuperación o muerte de los microorganismos dañados. Esto sugiere que cuando se usan estos medios selectivos para la recuperación de un microorganismo dado a partir de muestras de agua, hay que permitir que los microorganismos dañados o estresados se autorreparen en un medio óptimo previamente a su cultivo en medios selectivos (9, 12).

Por lo tanto, es deseable permitir a las células estresadas que puedan repararse de los daños ambientales antes de su aislamiento o enumeración por los métodos convencionales en los que se implica una acción selectiva.

Los métodos generales de reparación de células estresadas por los factores medioambientales son los siguientes:

Recuento en placa

- Incubación en TSB a 25°C durante 1 h (41), previa enumeración selectiva.
- Ray (28) propuso la siembra en placas de TSA o PCA, incubación a 25–35°C, 1–2 h, seguida de una doble capa con el medio selectivo.
- Adición de peroxidasas al medio selectivo (22).
- Adición al medio de cultivo de extracto de levadura, acetato sódico y glicerol (38).

Filtración por membrana

- El filtro se incubaba en almohadilla con un caldo no selectivo durante 2 h a 35°C (10).
- Doble capa de agar (30), cultivo en una capa basal de medio no selectivo (PCA, TSA o BHIA), durante 2 h, y cubrimiento posterior con una capa de medio selectivo.

Diseño de nuevos medios para la enumeración de microorganismos patógenos a partir de muestras de aguas naturales

En este capítulo revisaremos los estudios realizados para el diseño y, posteriormente, evaluación de un medio de cultivo selectivo de *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de aguas naturales.

1. Importancia de la detección de estafilococos, y en particular de S. aureus, a partir de muestras de aguas

- *Staphylococcus aureus* es un microorganismo patógeno que causa una gran variedad de procesos patológicos en el hombre, incluyendo infecciones cutáneas, otitis, conjuntivitis, infecciones de heridas, etc. (14).

- Es una especie altamente toxigena (8).

- Puede llegar a las aguas a través de los bañistas, por lo que no posee una relación directa y significativa con los indicadores de la polución fecal (3).

- Está bien adaptado a sobrevivir fuera del hospedador humano, siendo bastante resistente a los factores depuradores de los medios acuáticos (luz solar, alta concentración de NaCl, carencia de nutrientes, halógenos, etc.) (4).

- Los escasos estudios epidemiológicos realizados en nuestro país, demuestran una alta incidencia de las infecciones potencialmente causadas por *S. aureus* en los bañistas, y una relación significativa con su densidad en las aguas (3).

2. Problemas relacionados con la detección de S. aureus en muestras de aguas

- Los medios y métodos existentes en la bibliografía están adaptados a la detección de *S. aureus* de muestras de alimentos o muestras clínicas.

- Los métodos propuestos para la detección de estafilococos (en particular *S. aureus*) de muestras de aguas, no han sido suficientemente evaluados, presentando poca diferenciación y selectividad.

3. Estudios preliminares

En primer lugar, en nuestro Departamento realizamos un estudio de crecimiento cualitativo de diferentes especies del género *Staphylococcus* y otros microorganismos que pueden ser confundidos con ellos en los medios de cultivo rutinariamente empleados en muestras de alimentos y clínica (Tabla 1). De los 15 medios selectivos, sólo 8 (Baird-Parker, Chapman-Stone, Giolitti-Cantoni, KRANEP, Manitol salino, m-*Staphylococcus* con azida, *Staphylococcus* 110 con azida y Vogel-Johnson) permitían un buen crecimiento de las cepas de estafilococos y mostraban una inhibición variable de otras especies que generalmente producen falsos-positivos.

Estos medios fueron comparados para la recuperación de estafilococos a partir de muestras de agua, y del grado de detección de *S. aureus* (Tabla 2). Todos los medios ensayados mostraban una buena recuperación media de colonias típicas de estafilococos, tanto de muestras de agua dulce como de aguas marinas, destacando el agar KRANEP y el agar m-*Staphylococcus* con azida para las muestras dulceacuícolas, y los medios Baird-Parker y Giolitti-Cantoni para las marinas. Sin embargo, el porcentaje medio de confirmación de *S. aureus* fue relativamente bajo, no alcanzándose en ningún caso el 55% de verificación. El análisis no paramétrico del coeficiente de Kendall, indicaba que los cuatro medios más apropiados para la recuperación selectiva de *S. aureus* de aguas eran: KRANEP, m-*Staphylococcus*-azida, Baird-Parker y Giolitti-Cantoni.

TABLA 1
CRECIMIENTO CUALITATIVO DE DIFERENTES MICROORGANISMOS EN MEDIOS SELECTIVOS DE ESTAFILOCOCOS

MEDIOS	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Alcohol feniletílico	++	++	++	++	++	++	++	++	+
Baird-Parker	++/+	++/+	-	-	++	+	+	-	-
Baird-Parker mod.*	+/-	-	-	-	++	-	-	-	-
Medio enriquecimiento	+	+/-	-	-	++	-	-	-	-
Chapman-Stone	++	++	-	-	+	+	-	+	+
Columbia-CNA	-	-	+	-	-	++	++	-	++
Crisley-TPEY	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+
Giolitti-Cantoni	+/-	+/-	-	-	+	-	-	-	-
KRANEP	++	++	-	-	-	-	+	+	+
Manitol salino	++	++	-	-	+	+	+	+	-
Manitol salino-lipovit.	++	++	-	-	+	++	+	++	-
m-Staphyl.-azida	++	++	-	+	++	+	+	+	+
Staphyl. 110 azida	++	++	-	-	++	+	+	++	+
Staphyl.-Polimixina	-	-	-	-	++	+	++	-	++
Vogel-Johnson	+/-	+/-	-	-	+	-	-	+	+

A. *S. aureus*: CECT 86, UMF-1, UMC-2, UMA-1; B. *S. epidermidis*: CECT 231, UMC-10, UMA-12; C. *P. aeruginosa*: CECT 110; D. *E. coli*: CECT 102; E. *P. mirabilis*: CECT 107; F. *M. luteus*: CECT 51; G. *E. faecalis*: CECT 214; H. *B. megaterium*: CECT 44; I. *C. albicans*: CECT 1001.

* Modificación de Devriese (7)

++: Crecimiento a las 24-48 horas; +: Crecimiento a las 72-96 horas; +/-: No todas las cepas crecían; -: No crecimiento.

No obstante, el bajo porcentaje de confirmación de *S. aureus* obtenido, así como la poca selectividad de los medios ensayados (Tabla 1), nos decidieron a estudiar el diseño de un nuevo medio que fuese más específico para *S. aureus*, y que permitiera una mayor recuperación de estos microorganismos de las muestras de aguas naturales.

4. Diseño del agar BFR-0

4.1. Estudio de la susceptibilidad a agentes selectivos

Los medios de cultivo selectivos contienen una serie de sustancias que pueden agruparse, según su función, en dos categorías, sustancias nutritivas (constituyen la fuente de C, N y sales minerales de los microorganismos) y sustancias específicas, que generalmente se denominan sustancias inhibitoras (impiden el crecimiento de algunos organismos competidores, favoreciendo así el crecimiento del microorganismo en cuestión).

Las sustancias inhibitoras y sus concentraciones empleadas en la formulación del medio de enumeración de *S. aureus* (BFR) fueron las siguientes: acriflavina (0,001; 0,007 y 0,02 g/l); azida de sodio (0,01; 0,05 y 0,25 g/l); cloruro de litio (2,5; 5 y 10 g/l); cloruro sódico (50;

TABLA 2
RECUPERACIÓN COMPARATIVA DE ESTAFILOCOCOS DE MUESTRAS DE AGUAS NATURALES USANDO DIFERENTES MEDIOS SELECTIVOS

Medios	Recuentos de colonias típicas (x 1000)/100 ml		Porcentaje medio Eficiencia* de confirmación	
	Agua dulce (n=15)	Agua de mar (n=45)	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Baird-Parker	284	27,1	11,3	(3,0)
Chapman-Stone	45	4,0	27,5	(5,5)
Giolitti-Cantoni	246	19,1	17,3	(4,0)
KRANEP	1010	16,9	54,4	(1,0)
Manitol-Salino	67	1,4	8,9	(8,0)
m-Staphylococcus-azida	994	11,3	21,9	(2,0)
Staphylococcus 110 azida	230	3,4	11,0	(7,0)
Vogel-Johnson	320	7,3	16,5	(5,5)

* En paréntesis se expresa el orden del rango aplicando el coeficiente de concordancia de Kendall.

75 y 100 g/l); sulfato de polimixina B (0,003; 0,01 y 0,075 g/l); sulfametacina (0,025; 0,055 y 0,085 g/l); tiocianato potásico (12; 25 y 38 g/l); telurito potásico (0,05; 0,2 y 0,72 g/l); Tween 80 (5; 10 y 15 ml/l); polimixina B + sulfametacina (0,02 + 0,025; 0,02 + 0,055 y 0,02 + 0,085 g/l); y glicina + telurito potásico (12 + 0,05; 12 + 0,02 y 12 + 0,75 g/l). Los efectos de las distintas concentraciones de sustancias inhibitoras sobre el crecimiento microbiano fueron determinados tanto por variación de la D.O. a 620 nm, como por recuento de células viables en PCA. Los agentes inhibidores más efectivos fueron el telurito potásico y el tiocianato potásico para inhibir a *Proteus mirabilis*, la polimixina B y la acriflavina para *Bacillus megaterium*, la acriflavina y el telurito para *Enterococcus faecalis*, y el NaCl, azida sódica y la polimixina B para *Micrococcus luteus*. Estos agentes poseían un efecto mínimo sobre *S. aureus*, pero el telurito potásico y la polimixina B inhibían a *S. epidermidis*.

Paralelamente, se realizaron experiencias con sustancias estimuladoras del crecimiento de células de *S. aureus* y de especies de estafilococos coagulasa-negativas, siendo la glicina y el piruvato sódico los que producían una mejor recuperación de las células de estafilococos estresadas por el medio acuático natural.

Con estos resultados se formuló un medio basal, denominado BFR, cuya composición es la siguiente: Triptona (Difco), 10 g/l; extracto de levadura (Difco), 3 g/l; extracto de carne (Difco), 1,5 g/l; D-manitol (Difco), 20 g/l; glicina (Merck), 12 g/l; piruvato sódico (Merck), 10 g/l; tiocianato potásico (Sigma), 25 g/l; rojo fenol (Difco), 0,025 g/l; y agar (Difco), 15 g/l. Como agentes selectivos se emplearon: cloruro sódico (100, 75 y 50 g/l); polimixina B (0 y 30 mg/l); telurito potásico (0, 0,2 y 0,75 g/l); azida de sodio (0 y 49 mg/l); eritromicina sódica (0, 0,2 y 0,4 mg/l) y tiocianato potásico (0 y 25 g/l), con lo que se obtuvieron 22 modificaciones

del medio basal. Todas las modificaciones se ensayaron para determinar el grado de crecimiento cualitativo de los diferentes microorganismos, seleccionándose el medio BFR-0 (conteniendo como agentes selectivos el cloruro sódico, 100 g/l y la azida de sodio, 49 mg/l), para posteriores ensayos.

TABLA 3

RECUPERACIÓN COMPARATIVA DE CULTIVOS PUROS DE *Staphylococcus aureus* Y *S. epidermidis* POR DIFERENTES MEDIOS SELECTIVOS A PARTIR DE AGUA DE MAR FILTRADA

Cepas	Porcentaje de recuperación en los medios selectivos					Recuperación media
	Baird-Parker	Girol.-Cant.	KRANEP	BFR-0	BFR-1	
<i>S. aureus</i> CECT 86	94,5*	53,9	79,1	98,0	101,6	85,4
<i>S. aureus</i> UMF-1	79,5	53,7	81,1	84,9	81,3	76,1
<i>S. aureus</i> UMC-1	2,9	2,1	79,9	89,6	98,0	54,5
<i>S. epidermidis</i> CECT 231	32,7	18,0	78,2	70,3	73,9	54,6
<i>S. epidermidis</i> UMC-10	93,0	2,9	83,6	72,9	101,4	70,7
<i>S. epidermidis</i> UMA-10	61,0	5,3	74,4	84,1	70,4	59,0
Promedio	62,8	26,1	80,8	79,7	87,8	67,4

* El porcentaje de recuperación se calculó considerando el título en PCA/ml como 100%

CECT: Colección Española de Cultivos Tipos; UMF: Cepas aisladas de alimentos; UMC: Cepas aisladas de muestras clínicas; UMA: Cepas aisladas de aguas.

4.2. Evaluación de la eficiencia del medio BFR-0.

Para que un medio selectivo se pueda considerar eficiente y óptimo debe reunir las características de exactitud, especificidad, selectividad, precisión y comparación.

(a) *Exactitud*. Más del 75% de las células expuestas a condiciones estresantes del medio ambiente deben ser recuperadas en el medio evaluado. La exactitud del medio BFR-0 se determinó comparando las recuperaciones de cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* a partir de suspensiones en agua de mar filtrada en PCA y en BFR-0. Las suspensiones se conservaron a 4°C y se muestrearon a intervalos de 0, 12 y 24 h. El porcentaje relativo de recuperación de todas las cepas de *Staphylococcus* de las suspensiones de agua de mar filtrada fue del 79,7% (Tabla 3), superior al límite del 75% requerido para la exactitud de un medio de enumeración (21). Las recuperaciones relativas variaron de cepa en cepa en el mismo intervalo de tiempo, obteniéndose una recuperación media del 82,7% para *S. aureus*, y del 75,8% para *S. epidermidis* (Tabla 3).

TABLA 4
VERIFICACIÓN COMO *Staphylococcus aureus* DE LAS COLONIAS AISLADAS POR DIFERENTES MEDIOS A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUAS NATURALES

Medios	Número de colonias examinadas							
	Río		Estuario		Mar		Total	
	Típicas	No típ.	Típicas	No típ.	Típicas	No típ.	Típicas	No típ.
Baird-Parker	55(21,8)*	31(0)	20(35,0)	7(0)	80(12,5)	17(0)	155(23,1)	55(0)
Giolitti-Cantoni	46(8,7)	35(2,8)	15(13,3)	6(0)	42(9,5)	30(0)	103(10,5)	71(0,9)
KRANEP	66(54,5)	18(16,6)	18(72,2)	7(28,6)	73(63,0)	19(31,6)	157(63,2)	44(25,6)
m-Staphyl.-azida	64(28,1)	21(19,0)	27(29,6)	6(0)	95(17,9)	26(26,9)	186(25,2)	53(15,3)
BFR-0	85(91,7)	19(0)	23(86,9)	2(0)	92(89,1)	17(11,7)	200(89,3)	38(3,9)
TOTAL	316	124	103	28	382	109	801	261

* Los números en los paréntesis representan los porcentajes de confirmación de *S. aureus*.

(b) *Especificidad*. Un medio es específico si al menos el 90% de las colonias consideradas típicas son verificadas como tales, y además, presenta menos del 10% de falsos negativos. La especificidad del BFR-0 se determinó ensayando la recuperación de estafilococos de diferentes muestras de agua. Las colonias típicas, presumiblemente identificadas como estafilococos, (manitol-positivas) y otras colonias no típicas, fueron aisladas e identificadas empleando las pruebas bioquímicas siguientes (14–17, 25, 35): tinción de Gram y morfología celular; citocromo c oxidasa; catalasa; movilidad; fermentación de glucosa, sacarosa, trehalosa y manitol; sensibilidad al lisostafín; producción de acetoína; hemólisis; resistencia a lisozima, furazolidona, novobiocina y bacitracina; ácidos del glicerol en presencia de eritromicina; producción de coagulasa, DNasa y fosfatasa alcalina; aglutinación en Staphyslide (BioMerieux). Todos los aislados se verificaron usando las galerías API 20STAPH (BioMerieux).

Los resultados del examen de más de 200 colonias en el medio BFR-0 se exponen en la Tabla 4. De aquéllas consideradas colonias típicas en el medio, aproximadamente el 90% fueron confirmadas como *S. aureus*, mientras que sólo el 3,9% de las colonias no típicas se identificaron como *S. aureus*.

(c) *Selectividad*. Un medio es selectivo si reduce el sobrecrecimiento de la flora acompañante en al menos tres órdenes de magnitud. Esta capacidad selectiva en el agar BFR-0 dependía de la naturaleza de la muestra de agua y del grado de contaminación fecal de dichas muestras, variando entre 975 para muestras de agua dulce, $2,03 \times 10^5$ para muestras de estuarios, y de 2.150 para muestras de agua de mar, con una media (60 muestras) de $6,87 \times 10^4$ (Tabla 5).

TABLA 5
CAPACIDAD DE DISCRIMINACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS SELECTIVOS DE ESTAFILOCOCOS PARA MUESTRAS DE AGUA

MUESTRAS	Reducción media de la microbiota*				
	Baird-Parker	Giolitti-Cantoni	KRANEP	m-Staphyl.-azida	BFR-0
Río (n=15)	1.380	1.600	395	397	975
Estuario (n=15)	2.930	2.770	50.200	74.400	203.000
Mar (n=15)	307	148	431	422	2.150
Promedio	1.540	1.500	17.000	25.000	68.700

* Proporción entre el recuento medio del número total de colonias/100 ml de muestra en PCA (medio de recuento control) y el promedio del número total de colonias/100 ml en el medio selectivo ensayado. Las cifras entre paréntesis representan el número de muestras analizadas.

(d) *Precisión.* La precisión de los recuentos usando el medio BFR-0 y la técnica de filtración por membrana se evaluó en términos de la desviación estándar de la media. El error fue expresado como un porcentaje de la media usando la fórmula de Niemela (26). El número medio de colonias por placa y la desviación estándar se calcularon por la fórmula de Stearman (36). El límite de confianza del 5% del error teórico de la media en los recuentos por placa se calculó aplicando la fórmula:

$$\% \text{ error teórico} = 200 / \sqrt{n\mu}$$

siendo, n un número hipotético de placas y μ una media hipotética de la población. Estos cálculos asumen que los recuentos bacterianos siguen una distribución de Poisson, y, por lo tanto, la media y la varianza son iguales.

Antes de determinar la precisión del medio BFR-0, se utilizaron series de réplicas de 5 placas de la misma muestra para determinar si los recuentos estaban distribuidos al azar, y por tanto, si podían ser tratados como una distribución de Poisson.

Los límites del 95% de confianza de la desviación estándar de la media, expresada como porcentaje de la media, se calcularon para cada réplica de 5 placas cuyos recuentos estaban distribuidos al azar. Las estimaciones del error de los datos se compararon con una curva del error hipotético, que representa el límite de confianza del medio. En todos los casos se obtuvo una alta precisión del medio usado en conjunción con la técnica de filtración por membrana.

4.3. Comparación con otros métodos selectivos.

Una vez comprobado que el medio BFR-0 cumplía con todos y cada uno de los requerimientos necesarios para ser considerado como un medio selectivo específico de *Staphylococcus*, y en especial de los estafilococos coagulasa-positivos, era necesario un

estudio comparativo de sus características con las de los otros medios específicos de *Staphylococcus* existentes en el mercado.

De los estudios de crecimiento cualitativo de diferentes cepas se habían seleccionado 8 medios y, posteriormente, basados en la recuperación de estafilococos de aguas naturales se descartaron 4, quedando los medios Baird-Parker, Giolitti-Cantoni, m-*Staphylococcus*-azida y KRANEP para realizar el estudio comparativo con el medio BFR-0.

En la Tabla 3 se expresa la exactitud de los medios ensayados. La recuperación media de las 7 cepas de *Staphylococcus* variaba entre el 26,1% para el G-C y el 87,8% para el BFR-1. Las recuperaciones variaban de cepa a cepa, y sólo en los medios KRANEP, BFR-0 y BFR-1 la exactitud excedía el 75% de recuperación.

La selectividad de los cinco medios evaluados se especifica en la Tabla 4. Esta selectividad era buena en todos los medios, con intervalos entre 1500 para G-C y de $6,87 \times 10^4$ para el BFR-0.

La especificidad de los medios se presenta en la Tabla 5. El porcentaje de falsos positivos varía entre el 89,5% para el G-C y el 10,7% para el BFR-0; mientras que el porcentaje de falsos negativos varía entre el 0% para el B-P y el 25,6% para el KRANEP.

Con todas las características comparadas se realizó un análisis estadístico no paramétrico (coeficiente de concordancia de Kendall) para establecer el orden de eficiencia de los medios comparados (Tabla 6). Como se aprecia, el medio BFR-0 es el que presenta mayor eficiencia, seguido del KRANEP, m-*Staphylococcus*-azida y posteriormente el B-P y el peor es el G-C.

TABLA 6
RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES MEDIOS SELECTIVOS DE ESTAFILOCOCOS ENSAYADOS

Pruebas	Baird-Parker	Giolitti-Cantoni	KRANEP	m-Staphyl.-azida	BFR-0
Recuperación	62,8 (3)*	26,1 (4)	80,8 (1)	ND	79,7 (2)
Selectividad					
Factor reducción ($\times 10^2$)	15,4 (4)	15,0 (5)	17,0 (3)	25,0 (2)	68,7 (1)
Especificidad					
% Falsos positivos	76,9 (4)	89,5 (5)	36,8 (2)	74,8 (3)	10,7 (1)
% Falsos negativos	0 (1)	0,9 (2)	25,6 (5)	15,3 (4)	3,9 (3)
Comparatividad					
% recuentos colonias típicas	34,4 (4)	28,6 (5)	100 (1)	96,9 (2)	72,8 (3)
% verificación <i>S. aureus</i>	11,3 (4)	6,3 (5)	54,4 (2)	21,9 (3)	76,8 (1)
Total	20	26	14	14	11
Rango	4º	5º	2º	3º	1º

* En paréntesis se representa el rango de eficiencia.

Bibliografía

1. Baker, R. M., Singleton, F. L., Hood, M. A. (1983). Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 930–940.
2. Bissonnette, G. K., Jezeski, J. J., McFeters, G. A., Stuart, D. G. (1975). Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. *Appl. Microbiol.* **29**, 186–194.
3. Borrego, J. J., Romero, P., Mariño, F. J. (1991). Epidemiological study on bathers from selected beaches in Malaga, Spain. MAP Technical Reports Series No. 53. United Nations Environmental Programme and World Health Organization, Geneva. 127 pp.
4. Borrego, J. J., Florido, J. A., Martínez-Manzanares, E. (1992). Evaluación de diferentes medios selectivos para la enumeración de *Staphylococcus aureus*. In: Borrego, J. J. (ed.), Métodos microbiológicos rápidos para análisis de aguas y alimentos, pp. 159–184. S.P.I.C.U.M., Málaga.
5. Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A., Palmer, L. M. (1985). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology* **3**, 817–820.
6. Craun, G. F. (1986). Statistics of waterborne outbreaks in the U.S. (1920–1980). In: Craun, G. F. (ed.), *Waterborne Diseases in the United States*, pp. 73–159. CRC Press Inc., Boca Raton.
7. Devriese, L. A. (1981). Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphamide for the selective isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated materials. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 351–357.
8. Evans, J. B. (1977). Coagulase positive staphylococci as indicators of potential health hazards for water. In: Hoadley, A. W., Dutka, B. J. (eds.), *Bacterial indicators/Health hazards associated with water*, pp. 126–130. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
9. Flowers, R. S., Ordal, Z. J. (1979). Current methods to detect stressed staphylococci. *J. Food Prot.* **42**, 362–367.
10. Green, B. L., Clausen, E. M., Litsky, W. (1977). Two temperature membrane filter method for enumeration of fecal coliform bacteria from chlorinated effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1259–1264.
11. Grimes, D. J., Colwell, R. R. (1986). Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**, 161–165.
12. Hartman, P. A. (1979). Modification of conventional methods for recovery of injured coliforms and salmonellae. *J. Food Prot.* **42**, 356–361.
13. Hood, M. A., Guckert, J. B., White, D. C., Deck, F. (1986). Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA, and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 788–793.
14. Kloos, W. E. (1980). Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**, 559–592.
15. Kloos, W. E. (1990). Systematic and the natural history of staphylococci. 1. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 1990, 25S–37S.
16. Kloos, W. E., Schleifer, K. H. (1986). *Staphylococcus*. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. L., Holt, J. G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1013–1035. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
17. Lachica, R. V. F., Genigeorgis, C., Hoeprich, P. D. (1971). Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* **21**, 585–587.
18. Lechevallier, M. W., McFeters, G. A. (1985). Enumerating injured coliforms in drinking water. *J. Am. Wat. Wrks. Ass.* **77**, 81–90.
19. Lechevallier, M. W., Singh, A., Schiemann, D. A., McFeters, G. A. (1985). Changes in virulence of waterborne enteropathogens with chlorine injury. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 412–419.

20. Lechevallier, M. W., Schiemann, D. A., McFeters, G. A. (1987). Factors contributing to the reduced invasiveness of chlorine-injured *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1358–1364.
21. Levin, M. A., Cabelli, V. J. (1972). Membrane filter technique for enumeration *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.* **24**, 864–870.
22. McDonald, L., Hackney, C. R., Ray, B. (1981). Enhanced recovery of injured *Escherichia coli* by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 360–365.
23. McFeters, G. A., Camper, A. K. (1983). Enumeration of coliform bacteria exposed to chlorine. *Adv. Appl. Microbiol.* **29**, 177–193.
24. McFeters, G. A., Bissonnette, G. K., Jezeski, J. J., Thomson, C. A., Stuart, D. G. (1974). Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl. Microbiol.* **27**, 823–829.
25. Mossel, D. A. A., Van Netten, P. (1990). *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxicogenesis, control and monitoring. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 1990, 123S–145S.
26. Niemela, S. (1965). The quantitative estimation of bacterial colonies on membrane filters. *Ann. Acad. Sc. Fenn. Serie A. IV. Biologica* **90**, 3–65.
27. Palmer, L. M., Baya, A. M., Grimes, D. J., Colwell, R. R. (1984). Molecular genetic and phenotypic alteration of *Escherichia coli* in natural water microcosms containing toxic chemicals. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**, 169–173.
28. Ray, B. (1979). Detection of stressed microorganisms. *J. Food Prot.* **42**, 346–355.
29. Ray, B., Adams, D. M., Jr. (1984). Repair and detection of injured microorganisms. *In: Speck, M. L. (ed.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 2nd ed., pp. 112–113. American Public Health Association, Washington, D.C.
30. Rose, R. E., Geldreich, E. E., Litsky, W. (1975). Improved membrane filter method for fecal coliform analysis. *Appl. Microbiol.* **29**, 532–536.
31. Roszak, D. B., Grimes, D. J., Colwell, R. R. (1984). Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* **30**, 334–338.
32. Seligmann, R., Reitler, R. (1965). Enteropathogens in water with low *Escherichia coli* titer. *J. Am. Wat. Wrks. Ass.* **57**, 1572–1574.
33. Singh, A., McFeters, G. A. (1990). Injury of enteropathogenic bacteria in drinking water. *In: McFeters, G. A. (ed.), Drinking water microbiology*, pp. 368–379. Springer-Verlag, New York.
34. Singh, A., Lechevallier, M. W., McFeters, G. A. (1985). Reduced virulence of *Yersinia enterocolitica* by copper-induced injury. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 406–411.
35. Sperber, W. H., Tatini, S. R. (1975). Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **29**, 502–505.
36. Stearman, R. L. (1955). Statistical concepts in microbiology. *Bacteriol. Rev.* **19**, 160–215.
37. Stevenson, L. H. (1978). A case for bacterial dormancy in aquatic system. *Microb. Ecol.* **4**, 127–133.
38. Stuart, D. G., McFeters, G. A., Schillinger, J. E. (1977). Membrane filter technique for the quantification of stressed fecal coliforms in the aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 42–46.
39. Walsh, S. M., Bissonnette, G. K. (1983). Chlorine-induced damage to surface adhesins during sublethal injury to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1060–1065.
40. Walsh, S. M., Bissonnette, G. K. (1987). Effect of chlorine injury on heat-labile enterotoxin production in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **33**, 1091–1096.

Medios de cultivo para la detección e identificación de *Streptococcus agalactiae*

Manuel de la Rosa,* Mercedes Pérez, Concepción Carazo, Lucía Pareja,
Ángela Orts, Purificación Cantudo

Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada

Summary

Streptococcus agalactiae, a Group B streptococcus, is the main cause of bacterial perinatal infection and is also an important opportunistic pathogen. Detection and identification of *S. agalactiae* are straight forward with special culture media, where Group B streptococci show a specific, typical pink or red pigment. To quickly and easily detect the pigment, culture media should contain: (i) starch; (ii) an inhibitor of the folate pathway; (iii) animal serum; (iv) a pepsic proteic hydrolysate; and (v) glucose, together with a high-capacity buffer. When selective antibiotics are added to culture media designed in this way, it is possible to detect *S. agalactiae* directly from clinical samples by observation of its pigment after less than 12 hours of aerobic incubation.

Key words: Culture media, *Streptococcus agalactiae*, Group B streptococci, pigment.

Resumen

Streptococcus agalactiae, estreptococo Grupo B de Lancefield, es uno de los principales agentes infecciosos implicados en patología perinatal, y también juega un papel importante como productor de infecciones en adultos, fundamentalmente en inmunodeprimidos. La identificación de *S. agalactiae* puede realizarse por detección de su pigmento carotenóide rojizo, que es específico de este microorganismo. Para que el pigmento sea detectable rápida y fácilmente en los medios de cultivo es necesario: (i) almidón; (ii) un inhibidor de la ruta metabólica del folato; (iii) suero animal; (iv) un hidrolizado proteico obtenido con

* Correspondence to: Manuel de la Rosa. Hospital Virgen de las Nieves. Av. Coronel Muñoz, 2. 18014 Granada. Tel.: 958-241109. Fax: 958-241282.

pepsina; (v) glucosa, en presencia de un tampón de alta capacidad.

Modificando estos componentes y añadiendo antibióticos selectivos es posible diseñar medios de cultivo que permiten detectar en muestras clínicas *S. agalactiae* mediante la observación de su pigmento, en menos de 12 horas de incubación aeróbica.

Streptococcus agalactiae (estreptococo del Grupo B de Lancefield) es la principal causa de sepsis y meningitis neonatal bacteriana (1, 8, 11). En mujeres fértiles, se estima una prevalencia de colonización vaginal del 10–30% (1, 5, 8, 12, 18, 20, 24, 25), con una tasa de transmisión vertical a los recién nacidos de madres colonizadas del 50% (36). Si la colonización maternal coincide con embarazo de riesgo, el peligro de sepsis neonatal es alto (12). En nuestro medio se estima una frecuencia de sepsis neonatal por *S. agalactiae* de 1/1000 recién nacidos, con una mortalidad que excede el 50% si el tratamiento no es muy precoz (5, 25). *S. agalactiae* es el segundo germen causante de bacteriuria en embarazo y cuando se aísla en orina materna, se asocia con alta morbilidad materno-fetal, aumentando la prematuridad y rotura prematura de membranas (10, 20). *S. agalactiae* es un importante patógeno oportunista que causa infección hospitalaria: úlceras isquémicas en diabéticos e infecciones post-quirúrgicas en cirugía vascular y en obstetricia (8, 11, 20).

La colonización vaginal por *S. agalactiae* no es eliminable con el uso de antibióticos. Por ello, la forma de evitar la transmisión materno-fetal de *S. agalactiae* es con el tratamiento antibiótico intraparto (ampicilina o amoxicilina) o en los días anteriores al parto de las gestantes colonizadas, lo que evita la colonización del recién nacido. Lógicamente, es necesario la detección de las embarazadas colonizadas por *S. agalactiae* antes del parto (12, 15, 35), lo que actualmente se considera práctica obligada en la correcta atención del embarazo.

La detección de la colonización materna por *S. agalactiae* puede realizarse:

(a) Por detección de antígeno específico de *S. agalactiae* por aglutinación con látex o coaglutinación. Esta técnica, aparte de su escasa sensibilidad (algunos estudios indican sensibilidades tan bajas como el 10%, 34) y elevado costo, plantea problemas prácticos para su empleo rutinario (2, 9, 12, 18).

(b) Por cultivo, detectando el pigmento carotenoides rojo específico de *S. agalactiae* (14, 19, 23, 30, 31, 32). Este pigmento es un proteocarotenoides, que en su forma más visible (rosa, rojiza) posee un espectro de absorción característico (16) con cuatro picos de absorción (435, 455, 485 y 520 nm). Dicho pigmento, salvo que se utilicen medios especiales, permanece unido a la membrana bacteriana y cuando difunde al medio se degrada rápidamente a una forma poco visible de color amarillento con un solo máximo de absorción a 415 nm (13). Las cepas virulentas de *S. agalactiae* son productoras de pigmento y la “totalidad” de cepas hemolíticas de *S. agalactiae* producen pigmento pues el gen que codifica la producción de hemolisina y el gen que codifica la producción de pigmento están situados en locus contiguos del cromosoma (33). Por ello, la detección e identificación de *S. agalactiae* por detección de su pigmento es totalmente específica (23).

Para ello se utilizan tres medios de cultivo, el ya clásico de Islam (14), el de Wang (31) y el GRANADA (23). El Islam y el medio de Wang son comercializados por OXOID® como

medios deshidratados y el GRANADA es comercializado como medio preparado por BIOMEDICS®. El medio de Islam sólo es utilizable en placas en anaerobiosis y la distinción de las colonias de *S. agalactiae* es a veces difícil por insuficiente contraste de color (colonias amarillo-rosa sobre fondo amarillo) y falta de selectividad. El medio de Wang (GBS medium OXOID®) tiene poca sensibilidad y es poco estable (23, 32).

Para que el pigmento sea detectable rápida y fácilmente en los medios de cultivo es necesario (14, 19, 21, 23, 29):

(i) Almidón, que estabiliza el pigmento en forma visible con formación de un complejo de absorción semejante al que se produce en la interacción yodo-almidón (7). Si no hay almidón en el medio, el pigmento se degrada rápidamente a su forma de un solo máximo de absorción y no es fácilmente visible. En esta función el almidón no puede ser substituido por ningún otro carbohidrato ni polisacárido salvo por su fracción amilosa. Al estudiar la función estabilizadora del pigmento de *S. agalactiae* de hidrolizados de almidón obtenidos con amilasa, la capacidad de estos hidrolizados de estabilizar el pigmento desaparece cuando el grado de hidrólisis es tal que elimina también la capacidad de formar el complejo violeta con el yodo (7).

(ii) Un inhibidor del folato. Nuestros estudios (17, 22) han demostrado que cuando *S. agalactiae* crece en un medio "rico" (capaz de proporcionarle los productos cuya síntesis es bloqueada por la inhibición de la vía del folato) y en este medio inhibimos la vía del folato, la producción de pigmento sufre un fuerte incremento. Esta inhibición puede realizarse de varios modos: Enzima condensadora del PABA (sulfamidas), dihidropteroato sintetasa (trimetoprima, metotrexato, o sus análogos), timidilato sintetasa (5-fluoruracilo, 5-fluorouridina, 5-fluorodexoxiuridina, etc.). Esta inhibición induce probablemente una alteración en la disponibilidad de "metilos activos" que provoca una respuesta celular incrementando la síntesis del carotenoide que sería una alarmona (molécula señal asociada con un particular estrés celular, 28), de manera semejante a lo descrito para la deficiencia de metilos activos en *Salmonella typhimurium* (4).

(iii) Determinadas proteínas existentes en suero humano, suero de otras especies animales (caballo, vaca, oveja, conejo, cobaya, ratón), en otros fluidos biológicos (líquido ascítico, peritoneal, pleural, saliva), en la clara de huevo, etc. (7), que no actúan en forma de nutrientes inespecíficos (6). Estas proteínas han sido aisladas recientemente por nuestro grupo aprovechando su capacidad de unirse a las matrices utilizadas habitualmente para la separación de proteínas por cromatografía en gel (Sephacryl y Sephadex). Poseen un peso molecular aproximado de 63 kD y una enorme capacidad de inducir producción de pigmento en *S. agalactiae* (presentan actividad detectable por bioatografía a concentraciones menores de 1 µg/ml). No se conoce el mecanismo de acción de estas proteínas. Experiencias preliminares no nos han permitido observar que modifiquen la hidrofobicidad de células aisladas ni de las colonias de *S. agalactiae*, medidas por el ensayo de adherencia a hidrocarburos (26) o el ensayo DOS (27), a diferencia del fenómeno descrito para ciertas proteínas de la saliva que modifican la hidrofobicidad de *S. sanguis* (3).

(iv) Un hidrolizado proteico obtenido con pepsina. Respecto a la acción de los hidrolizados proteicos, hemos demostrado (7) que en los medios de cultivos para detección de *S. agalactiae* por detección de su pigmento desempeñan dos funciones. Una como aporte de nutrientes y otra

proporcionando sustancias activadoras de la formación del pigmento. En este caso, y a diferencia del suero, estas sustancias son termoestables y de bajo peso molecular, ultrafiltrables por ultrafiltros de NMWC 1 kda. En algunos tipos de hidrolizados proteicos (p.e. triptonas) y en el extracto de levadura existen sustancias de bajo peso molecular (dializables, NMWC < 10 kda) que inhiben la producción de pigmento por *S. agalactiae*. Entre estas sustancias inhibidoras hemos identificado la tiamina (7).

(v) Glucosa, para acelerar el crecimiento de *S. agalactiae*, y un tampón adecuado (MOPS-fosfato, 23), para evitar la caída de pH que se produce al desarrollarse *S. agalactiae* (pH inferiores a 7 inhiben la producción de pigmento, 19).

Es interesante mencionar que, a pesar de que clásicamente se ha admitido que la producción de pigmento por *S. agalactiae* requeriría condiciones de anaerobiosis, nuestros resultados indican que la observación del pigmento de *S. agalactiae* en colonias que crecen en la superficie de placas de cultivo es mucho mejor en anaerobiosis. En cambio, cuando el crecimiento de *S. agalactiae* se realiza en el interior de un medio de cultivo (líquido o semisólido) que contenga suero y un inhibidor de la vía del folato, no hay diferencias en la producción y observación de pigmento entre la incubación en aerobiosis y en anaerobiosis (7, 23).

Modificando estos componentes, e incorporando antibióticos selectivos, es posible diseñar medios de cultivo donde *S. agalactiae* puede ser detectado e identificado directamente a partir de muestras clínicas en menos de 12 horas de incubación aeróbica (23).

Bibliografía

1. Anthony, B. F. (1987). Group B streptococcal infections. *In*: Feigin, R. D., Cherry, J. O. (eds.), Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 2nd. ed., pp. 1322–1336. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
2. Ascher, D. P., Wilson, S., Fischer, G. W. (1991). Comparison of commercially available Group B streptococcal latex agglutination assays. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2895–2896.
3. Babu, J. P., Beachey, E. H., Simpsom, W. A. (1986). Inhibition of the interaction of *Streptococcus sanguis* with hexadecane droplets by 55- and 60-kilodalton hydrophobic proteins of human saliva. *Infect. Immun.* **53**, 278–284.
4. Bochner, B. R., Ames, B. N. (1982). ZTP (5-amino 4-imidazol carboxamida riboside 5'-triphosphate): A proposed alarmone for 10-formyltetrahydrofolate deficiency. *Cell. Biol.* **29**, 929–937.
5. Bosh, J., Ros, R., Amorós, M., Olivares, R., Álvarez, E. (1993). Infecciones perinatales por *S. agalactiae*. Estudio clínico epidemiológico y evaluación de un programa de prevención. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* **11**, 70–79.
6. Bridson, E. Y. (1978). Natural and synthetic culture media for bacteria. *In*: Rechoigl, M. Jr. (ed.), Handbook series in nutrition and food. Vol. III. Section G, Diets, culture media and food supplements, pp. 91–281. CRC Press Inc., Cleveland, Ohio.
7. Carazo, I. (1993). Influencia de la composición del medio de cultivo sobre la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
8. Cueto, M. (1989). Aspectos microbiológicos y epidemiología de la infección por *S. agalactiae* en adultos. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
9. Cueto, M., Hernández, P., Luna, E., Gil, A., Pareja, A. (1992). Comparación del nuevo medio Granada y el test Icon-strepB en detección de estreptococos grupo B en gestantes. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* **10**, 290-293.

10. Daugaar, H. G., Thomsen, A. C., Henriques, W., Ostergaard, A. (1988). Group B streptococci in the lower genital tract and late abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **158**, 28–31.
11. Edwards, M. S., Baker, C. J. (1990). *Streptococcus agalactiae*. In: Mandel, G. L., Douglas, R. G., Bennet, J. E. (eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3rd. ed., pp. 1554–1563. John Wiley & Sons, New York.
12. Gibbs, R. S., Hall, R. T., Yow, M. D., McCracken, G. H., Nelson, J. D. (1992). Consensus: perinatal prophylaxis for Group B streptococcal infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**, 179–183.
13. Haug, R. H., Soderlund, E. (1977). Pigment production in Group B streptococci. *Act. Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B.* **85**, 286–288.
14. Islam, A. (1977). Rapid recognition of Group B streptococci. *Lancet* **1**, 256–257.
15. Lim, D. V., Morales, W., Walsh, A. (1986). Reduction of morbidity and mortality rates for neonatal Group B streptococcal disease through early diagnosis and chemoprophylaxis. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 489–492.
16. Merrit, K., Jacobs, N. J. (1978). Characterization and incidence of pigment production by human clinical Group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **8**, 105–107.
17. Pareja, L. (1992). Efecto de sustancias relacionadas con la vía del folato sobre la producción de pigmento de *Streptococcus agalactiae*. Memoria de licenciatura. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
18. Quentin, R., Dubarry, I., Gignier, C., Saulnier, M., Pierre, F., Goudeau, A. (1993). Evaluation of a rapid latex test for direct detection of *Streptococcus agalactiae* in various obstetrical and gynecological disorders. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**, 51–54.
19. Rosa, M., Villarreal, R., Vega, D., Miranda, C., Martínez Brocal, A. (1983). Granada medium for detection and identification of Group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 779–785.
20. Rosa, M., Cueto, M. (1989). *Streptococcus agalactiae*. Aspectos microbiológicos clínicos. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* **7**, 436–439.
21. Rosa, M., Peis, J., Carazo, C., Cueto, M., García, V. (1990). Effect of culture medium components on *S. agalactiae* pigment enhancing media. 11th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Siena.
22. Rosa, M., Carazo, C., Bañón, R., Peis, J., Miranda, C., Rodríguez-Contreras, R. (1990). Pigment enhancing effect of folate antagonists Group B streptococci. 11th. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Siena.
23. Rosa, M., Pérez, M., Carazo, C., Peis, J. I. (1992). New Granada Medium for detection and identification of Group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1019–1021.
24. Rosa, M., Pérez, M., Carazo, C., González, J., Hernández, F., Ruiz Bravo, A. (1992). Datos epidemiológicos de la colonización por *S. agalactiae* en mujeres no gestantes. *Clin. Invest. Ginecol. Obstet.* **19**, 376–379.
25. Rosa, M., Pérez, M., Orts, A., Cantudo, P., Alados, J. C., Miranda, J., Khouri, J., Herruzo, A. (1993). New Granada Medium for rapid intrapartum detection of Group B streptococci carriers. Abstract 439. 6th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Sevilla.
26. Rosemberg, M., Gutnick, D., Rosemberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**, 29–33.
27. Sar, N. (1987). Direction of Spreading (DOS): a simple method for measuring the hydrophobicity of bacterial lawns. *J. Microbiol. Meth.* **6**, 211–219.
28. Stephens, J. C., Artz, S. W., Ames, B. N. (1975). Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): positive effector for histidine operon and general signal for amino acid deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4379–4393.
29. Tapsall, J. W. (1986). Pigment production by Lancefield Group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). *J. Med. Microbiol.* **21**, 75–81.
30. Waitkins, S. (1982). A selective differential medium for Group B streptococci. *Med. Lab. Tech.* **39**, 185–188.

31. Wang, E. E., Hammerberg, O., Lyn, O., Hunter, D., Richardson, H. (1988). Rapid detection of Group B streptococcal carriage in parturient women using modified starch serum medium. *Clin. Invest. Med.* **11**, 52–56
32. Wang, E., Richardson, H. (1990). A rapid method for detection of Group B streptococcal colonization testing at the bedside. *Obstet. Gynecol.* **76**, 882–885.
33. Wennerstron, D. E., Lee, L. N., Baseman, A. G., Leblanc, D. J., Cerneglia, C. E., Trotter, K. M. (1991). Genetics and characterization of Group B streptococcal pigment. *In*: Dunny, G. M., Cleary, P. P., McKay, L. L. (eds.), *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci*, pp. 224–227. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
34. Wust, J., Hebisch, G., Peters, K. (1993). Evaluation of two enzyme immunoassays for rapid detection of Group B streptococci in pregnant women. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**, 124–127.
35. Yow, M. D., Mason, E. O., Leeds, L. J. (1979). Ampicillin prevents intrapartum transmission Group B streptococci. *J. Am. Med. Ass.* **241**, 1245–1247.
36. Yow, M. D., Leeds, L. J., Thompson, P. K., Mason, E. O., Clark, D. J., Beachler, C. W. (1980). The natural history of Group B streptococcal colonization in the pregnant woman and her offspring. I. Colonization studies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **137**, 34–38.

Culture media and Chaos theory—predicting the unpredictable

Eric Y. Bridson

Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK

Summary

Undefined culture media have played a major role in diagnostic microbiology for 100 years. Chaos theory explains why increased knowledge of microbial systems has failed to predict defined nutritional requirements for the isolation of organisms. A brief description of Chaos theory is given and three microbiological areas of unpredictability are discussed: uncertain identity of isolates, unknown stress damage, unexplored variation of individual colony populations. Probably all living biological systems are non-linear, complex interactions and operate within Chaos theory.

Key words: Chaotic systems, culture media, microbial variation, microbial growth, microbial interactions.

Resumen

Los medios de cultivo no definidos han desempeñado un importante papel en el diagnóstico microbiológico a lo largo de 100 años. La teoría del caos explica las razones por las que el avance en el conocimiento de los sistemas microbianos no ha sido capaz de predecir los requerimientos nutricionales necesarios para el aislamiento de organismos. En este trabajo se ofrece una breve descripción de la teoría del caos y se discuten tres áreas de impredecibilidad microbiológica: la identidad incierta de los organismos aislados; el desconocimiento del daño por estrés; la variación inexplorada de las colonias individuales. Con toda probabilidad los sistemas biológicos constituyen interacciones complejas no individuales que operan en la teoría del caos.

Introduction

Microbiologists reluctantly accept that the undefined, complex nitrogenous components of culture media (peptones, protein hydrolysates) are essential for the isolation of the majority of heterotrophic bacteria. These complexes of peptides, amino-acids and adventitious materials, such as trace metals minerals and other “growth factors” have been used in culture media for 100 years (5).

Sophisticated methods of analysis and separation have increased knowledge about peptones and hydrolysates. They have also increased expectations that defined mixtures of the essential factors would eventually be used in culture media. Such defined mixtures would be more expensive than the unknown components but would they overcome the problems of variation in growth performance of existing complex, undefined culture media (10). To achieve this expectation it may be necessary to build in large reserves of amino-acids structures that would support unpredictable demands of organisms, during resuscitation and growth.

Unfortunately, scientists are better at breaking natural materials down into their smaller units, than they are at restoring them to their original structures. An analysis of amino-acids obtained from peptone may list and quantify these small components but will not describe the peptide structures. This is similar to being presented with piles of bricks and stones from a destroyed building, was it a factory, palace or cathedral? Peptide analysis is more informative than amino-acids analysis but the action of unsuspected metals contained in the isolated peptides, may cause confusion (7).

It is interesting to compare and contrast the two greatest living microbiologists of the last century. Robert Koch, the physician, used natural, complex ingredients in his culture media (meat extract, blood, serum, egg) because he saw an analogy with his clinical experience of infectious diseases. Louis Pasteur, the chemist, followed a defined chemical pathway for his fermentation media. Later switching to animal inoculation for his studies on more demanding organisms. Table 1 shows how Koch and his associates isolated all the major pathogenic bacteria by the end of the 19th century. Only Yersin came from the laboratories of Pasteur, via a period in Koch’s laboratory. Thus the Berlin school of Koch was more successful than the Paris school of Pasteur in the isolation of bacteria. This comparison is not made to doubt the genius of Pasteur but to demonstrate that the instinctive, pragmatic approach of Koch was successful in such a short period of time. Without any prior knowledge of non-linear, complex interacting systems, Koch and his associates used undefined materials to meet the unpredictable demands of their organisms. By coincidence, a mathematician in Paris was establishing the theory of Chaotic systems in 1882, whilst Koch was establishing his methodology.

Chaos theory

Chaos theory is a mathematical concept, first described by Poincaré in 1882 when he observed the chaotic behaviour of numbers in abstract mathematical calculations (8).

TABLE 1
ISOLATION OF MAJOR PATHOGENIC BACTERIA BY THE END OF THE 19TH CENTURY

Discoverer	Disease or organism	Date
Koch	Anthrax	1881
Koch	Tuberculosis	1882
Pfeiffer	Bact. Influenzae	1882
Loeffler	Glanders	1882
Koch	Cholera	1884
Loeffler	Diphtheria	1884
Eberth	Typhoid	1884
Rosenbach	Staph/Strep	1884
Escherich	Bact. coli	1885
Neisser	Gonococcus	1885
Fraenkel	Pneumococcus	1886
Bruce	Malta fever	1887
Weichselbaum	Meningococcus	1887
Kitasato	Tetanus	1889
Israel	Actinomycosis	1891
Yersin	Plague.	1894
Ermengen	Botulism	1897
Shiga	Dysentery	1898

He commented that small differences in initial conditions produced large, unpredictable results in the final numbers. Although he used the term “chaotic” to describe his findings, he thought that undiscovered laws may control these events. He considered “chaotic systems” were not random and that Chaos theory operated between ordered, predictable systems and merely random, uncontrollable systems.

Poincaré’s work remained virtually unnoticed until Lorenz attempted to forecast weather patterns in the early 1960’s. Lorenz found that dynamic weather systems were unpredictable because they were very sensitive to small changes in initial conditions. He re-examined the work of Poincaré and came to the conclusion that his computer weather systems operated as described in Chaos theory. This was the first practical application of Chaos theory and when Lorenz published his findings in 1963 (2) it stimulated other workers to apply the theory to their own investigations. It then became evident that Chaos theory applied to fields as diverse as cosmology and chemistry, biology and macro-economics. May (4) studied population fluctuations in predator/prey circumstances and showed them to be unpredictable. Mandelbrot (3) coined the name «fractal» to denote scale invariant units which formed complex patterns. He used fractals to study time-sequence changes in stock market prices, as well as snow flake patterns and coast line profiles.

The following paradigm is offered to help explain the difficult concept of Chaos theory. All dynamic systems can be placed into one of three classes:

a) *Linear system*. An example is shown in Fig. 1. It describes, the most predictable of dynamic systems.

b) *Periodic system*. Fig. 2 shows a more complex plot of non-decaying oscillations. If a repeating pattern can be detected and measured, then it is possible to predict the shape of future peaks and troughs.

c) *Chaotic system*. Fig. 3 shows an unpredictable time-series of events, described as non-linear, complex interactions.

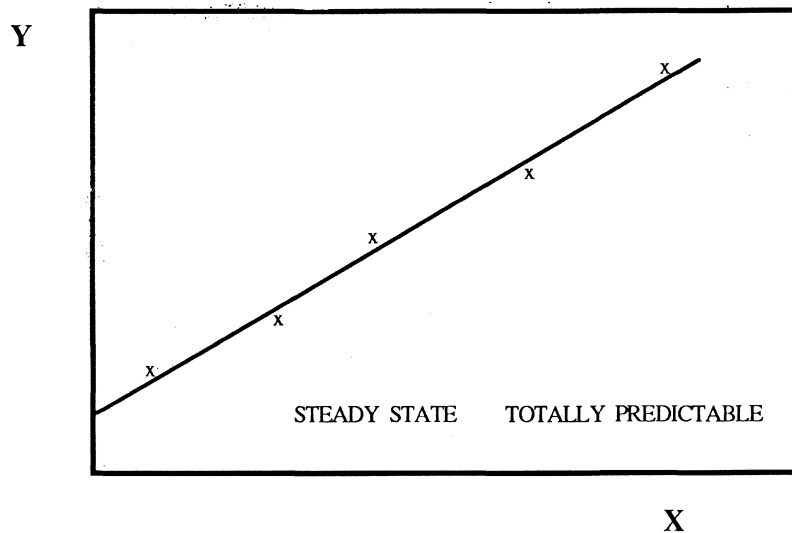


Fig. 1. Linear system.

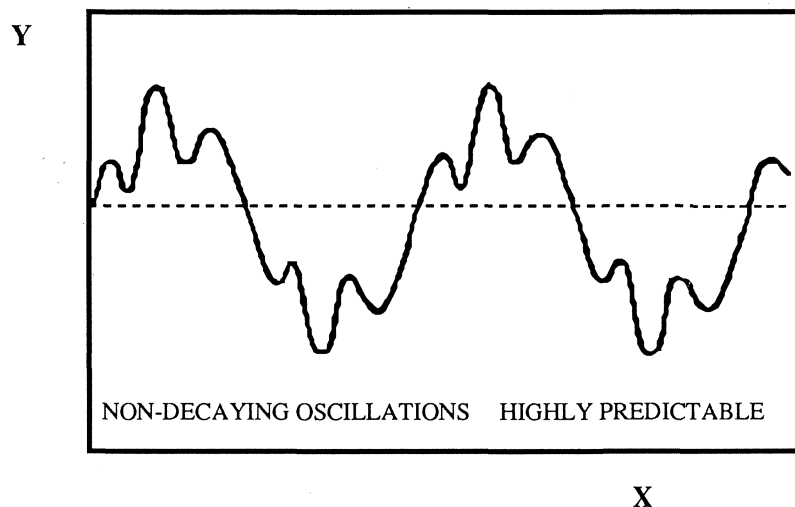


Fig. 2. Periodic system.

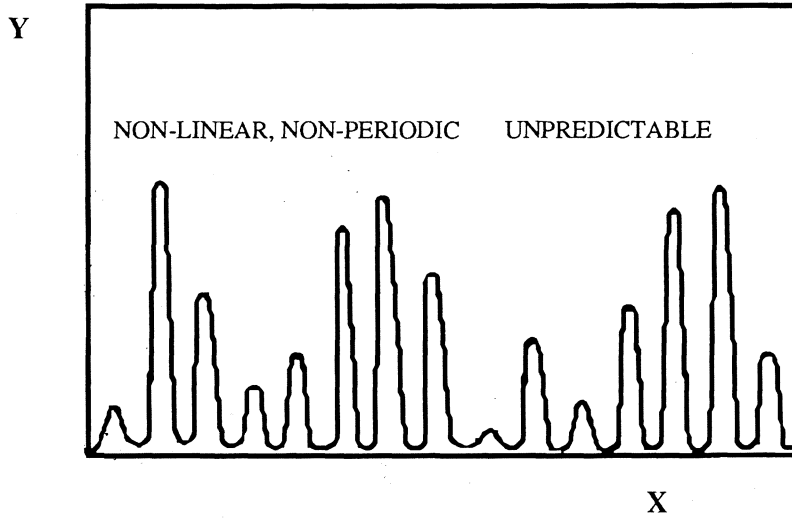
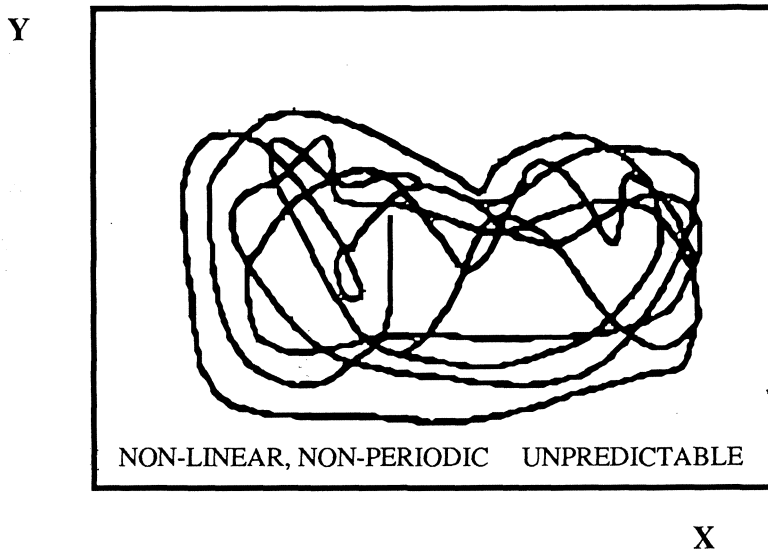


Fig. 3. Chaotic system.

Chaos data are commonly plotted as phase diagrams (Fig. 4) because they show more interesting information. The pattern of recorded data usually falls within a “basin-boundary”; giving an impression of a central attractor pulling the data towards a consensus point. Where the data bifurcates into two patterns, creating “butterfly wings”, the same central attractor force is seen in each “wing”. Although it is impossible to predict when the data will jump from one “wing” to the other.



REDRAWN AS A PHASE DIAGRAM

Fig. 4. Chaotic system.

Although the results are unpredictable, they are not random. Each time the same data is entered, the identical complex pattern is observed. This effect is sometimes called “deterministic chaos”.

Thus Chaos theory describes the unpredictability of results which are obtained from the complex interaction of separate events.

Unpredictability in microbiology

The unpredictability of the peptide/amino acid requirements for the cultivation of heterotrophic organisms is made up of at least three further unpredictable factors:

(i) The uncertainty of the population of organisms present in a clinical or ecological niche which is to be sampled. Figure 5 shows the schematic situation when a swab is dipped into a site of mixed organisms. Assuming the important physical difficulties of representative sampling have been overcome, there is still no accurate prior information about the numbers or types of organisms present. Such organisms may be obligate aerobes/anaerobes, capnophilic or nutritionally-demanding species and each may have different demands. This uncertainty is reduced by using broad-spectrum, enriched media, in both liquid and solid form, incubated at various temperatures in different gaseous environments. However, even these general

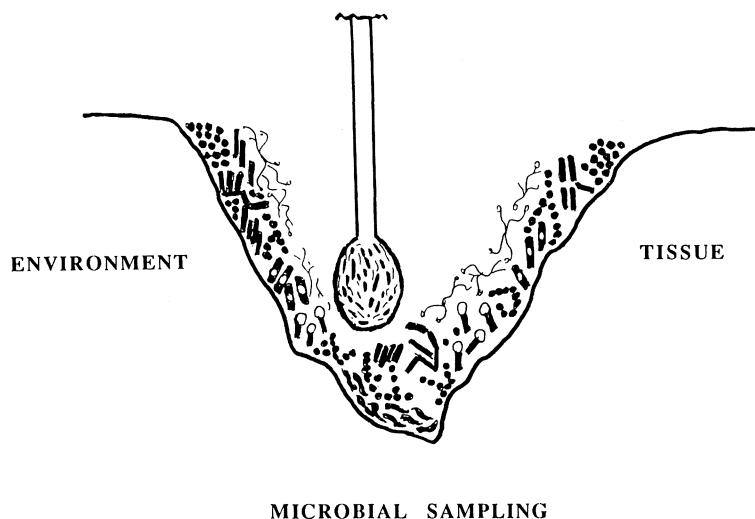


Fig. 5. Uncertainty of the population of organisms.

procedures, which have been traditionally evolved, are not entirely successful. The great success of antibiotic-selective media has been in the isolation of unsuspected organisms, or those which could not multiply in the presence of more vigorous competitors.

(ii) Unknown stress damage. All organisms in a mixed ecological site suffer stress from competing species. They may suffer further stress from low nutrition, dehydration, oxidation, disinfection, etc. Some bacteria may be so damaged that they cannot be recovered on culture media at all “viable but non-cultivable organisms” (9). Other organisms, less severely stressed, require careful resuscitation before exposure to conventional or selective media (6). It is important not to fall into the microbiological trap “What does not grow, does not exist”. Simple immersion of organisms into media containing suitable growth factors, does not necessarily result in multiplication. Nutrients do not diffuse into organisms, they are carried in by complex transport systems. Relatively little is known how these systems work, except that they are susceptible to stress damage. Transport systems are only part of the uncertainties involved: the outer membrane screen and the specific enzymes involved in nutrient utilization also play important parts in the growth process.

(iii) The unexplored variation of individual colony populations. Although phenotypic variants of organisms are occasionally seen in colonies e.g. heterogeneous MRSA strains, “mutant” sub-populations in colonies on indicator media, there is a general assumption that normal bacterial cells in a pure colony are identical, having been cloned from a single cell. This assumption is very unlikely to be true. The ancestors of present day organisms evolved 3.5 billion years ago, when this planet was highly toxic. Their survival depended on the development of a complex system of adaptation in which the required heavy genetic burden was distributed between cells, using transposons and plasmids. No other form of life can adapt so quickly to changes in their environment. This suggests that apart from genetic differences, small differences in cell structure, enzyme function, etc., exist which help provide a complex system for adaptation.

Computer modelling can mimic bacterial colonies, using random-walk fractals from Chaos theory. If very slight differences in movement are given to each initial fractal (as most likely happens in real life) it can be shown that changes in sub-populations take place during the development of the colony. A colony may start with 15 sub-populations but this figure can be reduced to seven or less, after several hours of “incubation” (1). Thus each colony is a mini-ecosystem in which the sub-population best able to survive will replace those less able to do so.

Outside the virtual reality of computers, is there other evidence of within clone variation? One sensitive indicator of identical cells is synchrony of division. In fact, it is very difficult to demonstrate synchrony without deliberate manipulation of cells, e.g. heat-treatment (which is probably selection of a single population). Such artificially-induced synchrony lasts only a few generations before normal heterogeneity reverts. A population of bacteria in chemostat can be considered “pure” until a major change is made to the medium formulation. Turbidostat recordings show chaotic change before settling down. This suggests that sub-populations are adapting differently to the changed environment and eventually the fastest and most successful population(s) take over.

Conclusions

If it were possible to eventually acquire total knowledge about all the uncertainties described above, would it be possible to predict the growth conditions to ensure 100% probability of growth? Chaos theory says No! To know all does not mean that all can be predicted. The non-linear interactions of complex systems create unpredictable results because undetectable initial differences produce very large end-effects. This does not mean stopping work on obtaining more information about living systems. Greater information will eventually lead to fewer undetectable initial differences. There may well be undiscovered laws which govern the behaviour of such systems. Chaos theory teaches humility, it provides for more and more information but contains infinite variations of complex interactions which open more and more pathways to explore. In microbiology, microbial variation should be studied at molecular, cellular and supracellular levels. Only by considering the whole system will it be possible to understand whole organisms.

References

1. Bazin, M. J., Prosser, J. I. (1992). Modelling microbial systems. *J. Appl. Bact. Symp. Suppl.* **73**, 89S–95S.
2. Lorenz, E. N. (1963). Deterministic non-periodic flow. *J. Atmosph. Sci.* **20**, 130–141.
3. Mandelbrot, B. B. (1982). *Fractal Geometry of Nature*. W. H. Freeman & Co, New York.
4. May, R. M. (1976). Simple mathematical models with very complicated dynamics. *Nature* **261**, 467–469.
5. Merck, E. (1893). Bericht über das Jahr 1892 p. 84. Cited by H. Metz (1990), *Culture media—then and now*. *The Medical Technologist*, 14–15.
6. Mossel, D. A. A., van Netten, P. (1984). Harmful effects of selective media on stressed microorganisms: nature and remedies. In: Andrews, M. H. E., Russell, A. D. (eds.), *The Revival of Injured Microbes*, pp. 329–369. *Soc. Appl. Bact. Symp. Ser. No.12*. Academic Press, London.
7. Nekvasilova, K., Sidlo, J., Haza, J. (1970). Effect of peptidic groups isolated from enzymatic casein hydrolysate on growth and toxogenesis of *Clostridium perfringens*. *J. Gen. Microbiol.* **62**, 3–16.
8. Poincaré, H. (1882). *Les méthodes nouvelles de la mécanique céleste*. Gauthier-Villars, Paris.
9. Rozak, D. B., Colwell, R. R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**, 365–379.
10. Sullivan, N. M. (1992). Culture media development: nutritional growth and metabolic requirements as affected by other factors. *Clin. Microbiol. Newsletter* **14**, 9–14.

A new approach in bacteriology with chromogenic media

Francis Doléans

bioMérieux SA, Marcy l'Étoile, France

Summary

The use of chromogenic or fluorogenic enzyme substrates for the detection, enumeration, and identification of viable bacteria from a sample is described. This method allows detection, enumeration and identification to be performed directly on the isolation plate, thus avoiding the use of subculture media and further biological tests. Tests carried out by using three new media from bioMérieux are described: CPS ID 2 to detect and identify *Escherichia coli*, *Proteus* and *Enterococcus*; SMID to detect *Salmonella*; and Albicans ID to isolate yeast and identify *Candida albicans*.

Key words: Chromogenic media, enumeration and identification, plate isolation, *Candida*, *Enterobacteriaceae*.

Resumen

El artículo describe la utilización de substratos enzimáticos cromogénicos o fluorogénicos para la detección, enumeración e identificación de bacterias viables de una muestra. Este método permite realizar la detección, enumeración e identificación directamente en la placa de aislamiento, lo que evita el uso de otros medios para subcultivos y tener que realizar otras pruebas biológicas. Se describen las pruebas realizadas con tres nuevos medios de cultivo de bioMérieux: CPS ID 2 para la detección e identificación de *Escherichia coli*, *Proteus* y *Enterococcus*; SMID para detectar *Salmonella*; y Albicans ID para aislar levaduras e identificar *Candida albicans*.

Correspondence to: Francis Doléans. bioMérieux SA. 69280 Marcy l'Étoile. France. Tel.: 33-78872000. Fax: 33-78872090.

Introduction

A new probabilistic approach to differential identification and characterization of viable bacteria from a sample is to use chromogenic or fluorogenic substrates specific for bacterial enzymes and to include them in a specific medium for recovering the most common bacteria isolated in a specimen collection. This approach allows the identification of microorganisms even from primary isolation media. The incorporation of chromogenic or fluorogenic enzyme substrates into a selective medium can eliminate the need for subculture and further biochemical tests.

To illustrate this new approach, we will look at these new media: CPS ID 2, SMID and Albicans ID from bioMérieux.

CPS ID 2

CPS ID is an agar plate medium for the enumeration, detection and identification of microorganisms responsible for urinary tract infection. Urinary tract infection diagnosis is the most frequent microbiological analysis. It usually involves culture of microorganisms on one or several agar media, followed by identification of the different types of colonies with biochemical tests. Uropathogens belong to few different species; *Escherichia coli* is the most frequently isolated species, and enterococci are the principal Gram-positive organisms recovered (5). CPS ID allows the identification of *E. coli*, *Proteae* and *Enterococcus* by direct detection on the medium of four metabolic activities: β -glucuronidase (*E. coli*) (9), β -glucosidase (*Enterococcus*), deaminase (*Proteae*), and indole production (*E. coli* and indole positive *Proteae*) (see Table 1).

TABLE 1
CPS ID 2 READING

	B-GUR	BGLU	INDOLE	TDA
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	+
Indologeneous <i>Proteae</i>	-	+/-	+	+
<i>Enterococcus</i> sp.*	-	+		
Enterobacteria K.E.S.	-	+	+/-	-

* Direct examination = cocci.

CPS ID 2, which is commercially available, is a new generation of CPS ID. It contains two chromogenic substrates instead of one fluorogenic and one chromogenic substrate from the first generation. The main limitation of the CPS ID 1 is due to the use of 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide for the detection of *E. coli* which produces a highly fluorescent and diffusive

compound when hydrolysed by β -glucuronidase. It is therefore difficult to distinguish *E. coli* colonies in mixed-cultures. On the new CPS ID 2 with a chromogenic substrate for β -glucuronidase, *E. coli* strains produce rose colored colonies. Since this change may influence all the properties of CPS ID, we have compared this new product to the previous one (3, 7).

244 well-characterized strains belonging to 33 bacterial and yeast species usually recovered from urinary tract infections were isolated on both the new CPS ID medium (chromogenic CPS ID 2) and the previous one (fluorogenic CPS ID 1). After overnight incubation at 35–37°C, plates were examined with no information on the species for growth and color of the colonies and color of the medium and the detection of tryptophanase (indole) and tryptophane deaminase (TDA) was performed.

After overnight incubation, 92% of *E. coli* strains (98% after 48 hours) produced rose-colored colonies due to β -glucuronidase activity, compared with 88% (97% after 48 hours) which released fluorescence on the previous medium (Table 2). The results for β -glucosidase, deaminase and indole detection were similar on both media. Growth of Gram-negative bacteria was equivalent or slightly better on the new medium. For most of the Gram-positive bacteria and yeast, growth was better on the new medium.

Chromogenic CPS ID 2 medium has improved sensitivity for the four metabolic activities. It is easier to read, since no UV lamp is required. Besides, it facilitates bacterial colony counts and the detection of mixed cultures.

TABLE 2
COMPARATIVE SENSITIVITY* BETWEEN FLUOROGENIC CPS ID 1 AND CHROMOGENIC CPS ID 2

	Media	Sensitivity (%)
<i>E. coli</i> (β -glucuronidase positive strains)	CPS ID 1	88
	CPS ID 2	92
<i>Enterococcus</i> (cocci, β -glucosidase positive strains)	CPS ID 1	100
	CPS ID 2	100
<i>Proteus mirabilis</i> (deaminase positive and indole negative)	CPS ID 1	100
	CPS ID 2	100

* After overnight incubation at 35–37°C.

Albicans ID

Albicans ID is an agar plate medium for the isolation of yeast and the immediate identification of *Candida albicans*. Infections caused by yeast are increasing as a consequence of the growing number of immuno compromised individuals and the development of antimicrobial therapy. *Candida albicans* is the pathogenic yeast most frequently isolated from

clinical specimens (about 60 to 80%). Its isolation and presumptive identification usually require time-consuming microscopic or biochemical techniques. Nevertheless, these techniques are not well-adapted to the detection of mixed cultures.

Albicans ID is a selective medium for yeast containing a chromogenic substrate for hexosaminidase (1, 8) which allows the detection of *Candida albicans*. After 24 to 48 hours of incubation at 35–37°C, *Candida albicans* produces blue pigmented colonies which can be easily differentiated from the colorless colonies of non *Candida albicans* yeast. Albicans ID is a selective medium which contains gentamicin and chloramphenicol.

In an initial study, the performance of Albicans ID was evaluated in two mycology laboratories of university hospitals in Lille and Grenoble (4), according to a standard protocol in which the reference was the classical isolation of yeast on Sabouraud-Gentamicin-Chloramphenicol medium followed by identification of species according to internationally recognized methods. 602 clinical samples from various origins were analyzed, leading to the isolation and identification of 188 strains (Table 3).

TABLE 3
ALBICANS ID. DISTRIBUTION OF SPECIMENS EXAMINED AND NUMBER OF STRAINS ISOLATED

Specimen collection	Number of negatives	Number of positives
Broncho-alveolar liquid	24	4
Sputum	163	94
Blood	77	2
Urine	53	17
Stools	54	55
Vagina	34	12
Skin	7	4
Cerebro-spinal fluid	7	0
Drain	6	0
Total	425	188

J. Fruit, B. Lebeau, Mycology Labs, CHU Lille & Grenoble, France.

Albicans ID showed a better recovery of the yeast due to the possibility of detecting the presence of two different species on the same plate. The strains distribution showed not surprisingly the high frequency of *Candida albicans* isolated from clinical samples (73%) (Table 4). Only four strains of *Candida albicans* did not produce blue colonies which gives a sensitivity rate of 98%. Four non albicans strains gave blue colonies: three for *Candida tropicalis* and one for *Trichosporon*. The colonies of *Trichosporon* are easily to distinguish because of their blue-green color and their dull and downy appearance.

TABLE 4
ALBICANS ID. DISTRIBUTION OF STRAINS ISOLATED

Species	Number of blue	Number of white
<i>Candida albicans</i>	133	4
<i>Candida tropicalis</i>	3	17
<i>Candida glabrata</i>	0	10
<i>Candida parapsilosis</i>	0	6
<i>Candida pseudotropicalis</i>	0	2
<i>Candida krusei</i>	0	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	3
<i>Trichosporon</i> sp.	1	1
<i>Geotrichum candidum</i>	0	3
Total	137	51

J. Fruit, B. Lebeau, Mycology Labs, CHU Lille & Grenoble, France.

In a second study by the Pasteur Institute and Antiquaille Hospital in Lyon (10), Albicans ID from bioMérieux and fluoroplate agar (from Merck) were compared to Sabouraud Gentamicin chloramphenicol agar. Fluoroplate agar is different from Albicans ID in that it uses a fluorogenic substrate, rather than the chromogenic substrate of Albicans ID, to reveal the hexosaminidase of *Candida albicans*. 106 specimens collected from various origins were analyzed leading to the isolation of 359 strains of *Candida albicans* (Table 5). None of three media detects all 359 strains of *Candida albicans* recovered samples, but with chromogenic and fluorogenic media, mixed cultures were well detected. 52 strains of *Candida albicans* were not detected on Sabouraud agar. None of the strains isolated on Albicans ID or Fluoroplate were negative with hexaminic substrate hydrolysis of *Candida albicans*. By comparison, the germ tube test gave fifteen false negative results.

TABLE 5
COMPARATIVE SENSITIVITY OF ALBICANS ID, FLUOROPLATE AND SABOURAUD GENTAMICIN CHLORAMPHENICOL AGAR

	Sabouraud	Albicans ID	Fluoroplate
Number of <i>C. albicans</i> detected	278	330	330
Germ tube tests (+)	268	315	315
Blue or fluorescent colonies	–	330	330
Sensitivity (%)	77.3	91.8	91.8

P. Roussel et al., Mycology Labs, Pasteur Institute, Lyon, France.

Albicans ID was found to be easier to read since it does not require a UV lamp and the blue color did not spread through the agar (Table 6).

TABLE 6
ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF ALBICANS ID AND FLUROPLATE MEDIA

	Fluoroplate	Albicans ID
Appearance of colonies	Fairly large, fluorescent colonies	Smaller, blue colonies
Reading accessories	UV lamp	–
Pigment substrate stability	Diffusion of fluorescence	Stability of blue color dye
Reading	Require training	Easy
Sensitivity at 24 hours	30%	36.5%

P. Roussel et al., Mycology Labs, Pasteur Institute, Lyon, France.

To summarize: Easy-to-use, time saving and simple to read, Albicans ID appears to be a very good medium allowing both the isolation of medically important yeast and the identification of *Candida albicans* with 92% to 97% sensitivity and 94% to 98% specificity. This performance is rather good if we consider that even the reference method (germ tube formation) can result in 1% to 5% false positive or false negative results. One must also underline the opportunity to detect the presence of two different species on the same plate.

SMID

SMID is a chromogenic ready-to-use medium for *Salmonella* detection. Detection of *Salmonella* using human polymicrobial collections is based on the ability to identify isolated suspect colonies on selective media. Traditional media (Hektoen, SS, DCL) detect biochemical characteristics such as lactose fermentation and production of H₂S. SMID (*Salmonella* medium), a new medium, uses chromogenic substrates to facilitate detection of all *Salmonella* serotypes (Tiphy and Paratiphy included), since these colonies are pink.

The deep pink color which characterizes suspect colonies is obtained by combining two substrates in the same medium (see Table 7):

- a chromogenic substrate reveals a blue colony with positive β -galactosidase strains (non *Salmonella*)
- a nutritive hydrocarbonated substrate (glucuronate) combined with a colored indicator (neutral red), gives pink colonies with *Salmonella* species.

TABLE 7
SMID

	<i>Salmonella</i>		Other bacteria	
β -galactosidase	+	+	+	-
Glucuronate	+	+	-	-
Colony pigmentation	pink	purple	blue	colorless

A study was carried out in the bacteriology laboratory of University Hospital in Limoges, France (2). During this comparative study, 3136 stool samples were inoculated directly and after enrichment with Mueller Kauffmann broth on SMID and Hektoen media. All the suspect colonies, pink colonies on SMID and blue-green with or without a black center on Hektoen, were further identified with API 20 E and serotyping. All the *Salmonella* identified were transmitted to the reference center for *Salmonella*.

In total, 41 *Salmonella* strains were detected on both media, 40 on SMID and 39 on Hektoen (Table 8). The number of false suspect colonies is clearly less with SMID medium than with Hektoen, 6.6% compared with 14.6%, which means less confirmatory testing is required. For traditional bacteriology methods, this means a decrease in the number of identification strips used and less technician time required.

TABLE 8
NUMBER OF ISOLATED *Salmonella* AND NON *Salmonella* STRAINS WITH SUSPECT APPEARANCE

	Hektoen	SMID
<i>Salmonella</i>	direct	19
	after enrichment	21
	Total true (+)	40
	Total false (-)	1
<i>Proteae</i>	355	104
Other bacteria	67	98
<i>Pseudomonas</i>	40	7
Total false (+)	462	209

Conclusions

We can conclude that the chromogenic substrates have proved to be a powerful tool (6) for identification. The rapid detection and identification of microorganisms are of great importance in the laboratory. Furthermore, the incorporation of synthetic enzyme substrates into primary isolation media, allows enumeration, detection and identification to be performed directly on the isolation plates.

References

1. Dalton, M. T., Haldane, D., MacDonald, J. (1989). Rapid identification of *Candida albicans* using 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -galactosaminide. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **12**, 521–523.
2. Denis, F., Doléans, F., Villeval, F. (1993). A new chromogenic ready-to-use medium for *Salmonella* detection. 6th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Abstract 356), Seville.
3. Freydière, A. M., Gille, Y. (1993). A new CPS medium for rapid identification and enumeration of bacteria in urine sample. 7th International Congress on R.A.M.I. (Abstract P14/5), London.
4. Fruit, J., Lebeau, B., Dessuant, H., Grillot, R., Vernes, A. (1993). Evaluation of Albicans ID, a ready-to-use medium for the isolation and identification of *Candida albicans*. 6th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Abstract 450), Seville.
5. Harrewyn, L., Bissardon, O., Mounier, M., Couturier, C., Terrot, C., Denis, F. (1990). Identification et numération rapide des germes urinaires sur boîte contenant des substrats chromogènes et fluorogènes. *Revue Française des Laboratoires* **212**, 73–77.
6. Manafi, M., Kneifel, W. (1991). Fluorogenic and chromogenic substrates. A promising tool in microbiology. *Acta Microbiologica* **38**, 293–304.
7. Orenga, S., Barboux, L., Berenguer, L., Doléans, F., Monget, D., Moser, C., Villeval, F. (1993). Urinary tract infections: CPS ID 2nd version, a new ready-to-use medium for enumeration and identification of *E. coli*, *Proteae* and *Enterococcus*. 7th International Congress on R.A.M.I. (Abstract P14/2), London.
8. Orenga, S., Berenguer, L., Doléans, F., Doucet, M. (1993). Albicans ID, a new ready-to-use medium for the isolation and detection of *Candida albicans*. 93rd ASM Meeting (Abstract C149), Atlanta.
9. Ralovich, B., Ibrahim, G. A. M., Fabian, A., Herpay, M. (1991). Beta D-glucuronidase (BDG) activity of Gram negative bacteria. *Acta Microbiologica* **38**, 283–291.
10. Roussel, P., Couillerot, J. P., Freydière, A. M., Demontclos, H., Gille, Y. (1993). Evaluation d'un nouveau milieu chromogène "Albicans ID" pour l'identification rapide de *Candida albicans*. Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Grenoble.

¿CÓMO DICE?

Vocabulario científico y técnico

En este número, presentamos una nueva sección cuya finalidad es discutir algunos problemas que pueden encontrarse al redactar un artículo sobre microbiología, así como comentar las posibles soluciones de esos problemas. Creemos que el mismo rigor que el científico aplica a su investigación debería extenderlo a la comunicación de los resultados obtenidos. Sin embargo, esto es menos habitual de lo deseable. Con cierta frecuencia llegan a la redacción de la revista trabajos que, independientemente de su calidad científica, están redactados de manera confusa, o contienen errores gramaticales evidentes. Y la experiencia como revisores de otras publicaciones, en diversas lenguas, nos indica que tales problemas no son exclusivos de nuestra revista. Los científicos deben convencerse de que sus comunicaciones, aparte de suministrar observaciones y resultados originales e interesantes, deben ser expuestas con un lenguaje claro, coherente e inteligible. Y, si es posible, incluso conciso y esmerado. Aunque en esta revista se publican muchos artículos en inglés —lengua a la que también hay que aplicar lo que estamos comentando—, esto no es óbice para pedir que los que lleguen en español estén mejor redactados.

La dolencia que aqueja a nuestros escritos científicos tiene dos causas principales. La primera, y quizá la más importante, es la gran influencia de la lengua inglesa. La segunda es la estrecha relación con el lenguaje de uso común, tan maltratado por los medios de comunicación. Mal que nos pese, resulta indudable que el inglés es actualmente la principal lengua de comunicación científica internacional, tanto oral como escrita. Si es conveniente o no que una lengua fonéticamente tan difícil para nosotros constituya el vehículo de comunicación oral preponderante, no vamos a tratarlo aquí. En cuanto a la comunicación escrita, el inglés se ha ido imponiendo en las revistas internacionales y ahora casi nadie discute su hegemonía.

El que la mayoría de los artículos científicos estén escritos en inglés tiene la ventaja de que basta conocer una lengua extranjera para poder acceder a un inmenso fondo bibliográfico, en muy diversos campos de la ciencia. Sin embargo, son varios los inconvenientes de dicha situación. Por una parte, el científico de habla no inglesa se encuentra en inferioridad de condiciones frente a los investigadores angloparlantes. ¿Cuántos artículos interesantes se habrán malogrado debido al insuficiente conocimiento del inglés de sus autores? ¿Cuántos trabajos habrán pasado desapercibidos por no haber sido publicados en esa lengua?

El vocabulario científico de muy diversas lenguas se ve supeditado al del inglés. En muchos casos, los investigadores adoptan la terminología inglesa, o se limitan a copiar términos o frases, por ignorar los correspondientes y correctos en su propia lengua. En esta

sección comentaremos algunas de esas palabras o expresiones que, actualmente, pueden considerarse innecesarias —por existir sus equivalentes en español— o sencillamente erróneas.

Pero no todos los problemas lingüísticos que nos afectan tienen su origen en la influencia del inglés. Comentaremos también errores gramaticales que entran de rondón en los artículos que recibimos, y que pueden detectarse en los medios de comunicación, independientemente de la expresión científica. Queremos recalcar ese “actualmente” del párrafo anterior. Los redactores de *¿Cómo dice?* no pretendemos, ni podemos, sentar cátedra. En primer lugar, porque no somos lingüistas; en segundo, porque creemos que una lengua es algo vivo y por tanto sujeto a evolución. Es posible que diversos neologismos, tecnicismos o calcos de otras lenguas, todavía extraños “actualmente”, terminen incorporándose al español. Podríamos poner muchos ejemplos. Al fin y al cabo, sería difícil hablar de trenes, túneles, vagones o raíles sin emplear términos venidos de otras lenguas en un pasado relativamente reciente. De no haber sido por los cambios experimentados en las lenguas a lo largo del tiempo, esta revista hubiera llegado a los lectores en latín.

Muchos de los problemas que se le presentan a un autor a la hora de redactar un artículo científico tienen una solución fácil: no hay más que consultar los diccionarios. Este trámite sencillo y previo, frecuentemente olvidado, mejoraría la calidad de los artículos, ahorraría muchas horas a los revisores o correctores de la revista, y serviría para que el autor estuviese seguro de comunicar lo que realmente quiere decir, en vez de quedar expuesto a la interpretación de personas que no conocen su trabajo tan bien como él. Y entre los diccionarios especializados en español tenemos uno de especial validez y utilidad, obra conjunta de lexicógrafos y científicos, que está considerado la máxima autoridad en el tema y que recomendamos consultar con frecuencia. Se trata del *Vocabulario científico y técnico*, de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Se han publicado dos ediciones, en 1983 y en 1990. Esta segunda ha sido editada por Espasa-Calpe, Madrid (I.S.B.N. 84-239-5987-2). La tercera edición aparecerá en otoño del presente año.

Finalmente, queremos dejar claro que no deseamos llevar la iniciativa. Esperamos que sean los propios socios de la SEM, u otros lectores o potenciales autores de la revista, quienes —interesados por el tema de la expresión científica en microbiología— sugieran puntos de discusión y envíen sus opiniones, sus dudas y..., si es posible, también sus soluciones.

VEÍAMOS AYER

La celebración de los congresos nacionales de microbiología se iniciaría en Madrid, donde tuvieron lugar el primero (1962) y el segundo (1969). A partir de entonces se organizarían regularmente cada dos años. En el curso de otras reuniones se irían constituyendo los grupos regionales y especializados.

Iniciamos esta sección de Veíamos ayer con una fotografía correspondiente al III Congreso Nacional de Microbiología, que se celebró en Barcelona del 3 al 5 de junio de 1971. Era el primero que se realizaba fuera de Madrid y, a partir de entonces, se fueron celebrando en una ciudad diferente en cada ocasión. Aquel tercer congreso de microbiología tuvo dos



conferenciantes invitados, el Prof. R. Sohier de Lyon y el Prof. John L. Ingraham —socio de Honor desde ese mismo año— de la Universidad de California en Davis. El Prof. Ingraham ha mantenido con la SEM una estrecha relación que dura hasta nuestros días.

La foto está tomada durante la cena del congreso en el Pueblo Español, de ahí el semblante risueño de los comensales. Seguramente antes de los chistes de rigor, porque provocan carcajadas que desfavorecen la fisonomía fotogénica, aunque uno se lo pase en grande. Unos cuantos años después —sólo veintidós— podemos reconocer todas las caras. Ha sido tiempo suficiente para consolidar vivencias y relaciones. “Los que eran entonces jóvenes promesas son ahora figuras relevantes y profesionales responsables —decía Rafael Gómez-Lus en su presentación del congreso de Zaragoza, al cual está dedicado este número de la revista—. En cualquier caso, todos jóvenes, entonces y ahora, seguimos laborando con la misma ilusión.”

Invitamos a aquellos compañeros que dispongan de fotografías sobre actividades de la SEM, a que las envíen para los próximos números de la revista. Será agradable pasear la mirada por esos acontecimientos que rememoran experiencias de nuestra historia reciente, con la Sociedad Española de Microbiología como el motivo que urdió la ocasión del encuentro.

Federico Uruburu
Valencia, 1994

Guidelines for authors

“Microbiología” (the official Journal of the Spanish Society for Microbiology, SEM) publishes original research articles, research notes and reviews covering all aspects of microbiology. All submissions should be written in English (preferably) or Spanish. The decision to accept manuscripts is made by the Editorial Board. Submission of an article to this Journal is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere. Consent is given for reproducing publication of this Journal if accredited as the source.

ORGANIZATION AND FORMAT OF THE MANUSCRIPTS. Type every portion of the manuscript double-space with wide margin at the left on UNE A-4 format sheets. Only one side of the sheet should be used and the pages should be numbered sequentially. Articles must be restricted to a maximum of 16 printed pages, including figures and tables (this corresponds to approximately 25 typewritten pages).

The front page should include title, name(s) of the author(s), institution affiliation(s) and complete address(es). Three to five “keywords” would also be included. Articles should be divided into: Abstracts in English and in Spanish (not exceeding 250 words each), Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgments, and References. Results and Discussion can be combined.

Abbreviations and symbols should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission and the *Système International d’Unités* (SI) is to be used throughout.

Cite each listed reference by numbers in the text. References should be numbered and arranged in alphabetical order as indicated in the following examples:

Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Seeberg, E., Nissey-Meyer, J., Strike, P. (1976). *denV* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylate specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* **35**, 790–797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria - The role for autolysins. *In*: Nombela, C. (ed.), *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, pp. 3–12. Elsevier Science Pub., Amsterdam.

References to thesis, manuscripts not yet accepted for publication or meetings should be indicated in the text as follows: (García, P. et al. 1985, in preparation), (Smith, T. 1985. Ph. D. thesis, University of Massachusetts, Amherst) or (Suárez, A., González, F. 1975. V Congr. Nac. Microbiol., p. 1845).

Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the article should be submitted. Photoprints must be of sufficient quality to ensure good reproduction. They should be numbered on the back and identified with the first author’s name written in pencil. Legends for line-drawings and photoprints must be typed double-space on a separate sheet. The size of the photographs should not exceed the printing area (13 x 20 cm). All elements in the drawing should be prepared to withstand reductions. Drawings and line figures should be drawn in black ink on tracing paper and should be prepared as indicated for the photographs. Colored illustrations are not accepted.

Tables should be compiled on separate sheets with a descriptive title and numbered independently of the figures using Arabic numerals. Please indicate with a soft pencil the approximate location of tables and figures in the left margin of the pages of the manuscript.

NOTES. Notes should be restricted to 6 typewritten pages and are intended to present experimental observations and descriptions of techniques or methodological changes of interest. They should be written according to the guidelines given for articles, but without the heading divisions, and their abstracts should not exceed 50 words. Figures and tables should be restricted to a maximum of 2 figures and 1 table or vice versa.

MINIREVIEWS. Minireviews articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write them. However, if some authors are interested in publishing minireviews, these will be submitted for publication. They should not be longer than approx. 12 to 20 double-spaced typewritten pages, including the space needed for figures and tables.

PROOFS CORRECTION. On acceptance of the article, galley proofs will be sent to the corresponding author to check for typesetting accuracy. The corrected proofs should be duly returned within one week’s time. If delays were observed, the proofs will be corrected by the editorial staff and published. Broader changes implying recomposition of the text will be at the author’s expense. Twenty five offprints of each article are supplied free of charge. Additional reprints will be billed at cost price if requested upon returning the corrected galley proofs.

Articles must be submitted, original and two copies, to “Microbiología SEM.” Apartado 16009, 08080 Barcelona, Spain, or to one of the members of the Editorial Board according to the discipline represented.

Normas para los autores

“Microbiología” (la revista científica de la Sociedad Española de Microbiología, SEM) acepta artículos y notas de investigación originales dentro del campo de la microbiología y, ocasionalmente, artículos de revisión. Textos en inglés (preferentemente) o español. La aceptación corresponde al Consejo Editorial. Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquier otra revista. Los originales publicados en “Microbiología” podrán ser reproducidos siempre que se indique su origen.

PRESENTACIÓN DE LOS ORIGINALES. Los artículos estarán escritos a máquina, a doble espacio, en hojas UNE A-4 por una sola cara, numeradas correlativamente y con un amplio margen en la parte izquierda. No deberán exceder de 16 páginas impresas, incluyendo tablas y figuras (lo que corresponde aproximadamente a 25 hojas mecanografiadas). Los artículos incluirán una primera página en la que se indicará por este orden: Título del artículo, nombre y apellido del autor o autores, centro en el que se ha realizado el trabajo y dirección completa del mismo, así como de tres a cinco “palabras clave.” En los artículos en español se deberá incluir una versión inglesa del título. Los artículos constarán de: Resúmenes en inglés y en español (de no más de 250 palabras cada uno), Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Bibliografía. Las secciones de Resultados y Discusión se podrán juntar en una sola.

Las abreviaturas, símbolos y siglas deberán seguir las recomendaciones de la Comisión IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica. Deberá emplearse siempre el Sistema Internacional de Unidades (SI).

La bibliografía será citada en el texto mediante números y se dispondrá numerada y en orden alfabético de acuerdo con los ejemplos que se ofrecen a continuación:

Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Seeberg, E., Nissez-Meyer, J., Strike, P. (1976). *denV* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylase specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* **35**, 790–797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria - The role for autolysins. *In*: Nombela, C. (ed.), *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, pp. 3–12. Elsevier Science Pub., Amsterdam.

Las referencias a tesis doctorales, originales no aceptados todavía o comunicaciones presentadas a congresos, deben incluirse en el texto del artículo de acuerdo con los siguientes ejemplos: (García, P. et al. 1985, en preparación), (Smith, T. 1985. Tesis doctoral University of Massachusetts, Amherst) o (Suárez, A., González, F. 1975. Res. V Congr. Nac. Microbiol., p. 1845).

Las fotografías, que deberán estar preparadas para su reproducción directa, se limitarán a las estrictamente necesarias para la comprensión del trabajo y serán de calidad suficiente para asegurar una buena reproducción. Deberán estar numeradas al dorso, indicando el apellido del primer autor a lápiz. Los textos de las mismas irán mecanografiados a doble espacio y en hoja aparte. En los artículos en español las figuras incluirán asimismo un texto en inglés. El tamaño de las fotografías no excederá de 13 x 20 cm. Las dimensiones de los rótulos deberán ser las adecuadas para ser legibles en caso de que se reduzca la fotografía. La presentación de dibujos en tinta china y papel vegetal seguirá las mismas normas. No se admitirán fotografías en color.

Las tablas se enviarán en hojas aparte, numeradas independientemente de las figuras, con números arábigos y deberán llevar el correspondiente título explicativo. Los autores deberán indicar a lápiz en el margen del texto de la situación aproximada en donde deben aparecer las tablas y figuras.

NOTAS. Las Notas, que no deberán exceder de seis páginas mecanografiadas incluyendo figuras y tablas, tienen por objeto la presentación de observaciones experimentales, descripción de técnicas o modificaciones metodológicas de interés. Su redacción se efectuará ateniéndose a las Normas previamente descritas para los artículos, pero suprimiendo las divisiones con encabezamiento. Los resúmenes no serán superiores a 50 palabras. Sólo incluirán, como máximo, dos figuras y una tabla, o viceversa.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN. Los artículos de Revisión versarán sobre temas de microbiología de gran interés, y su redacción se solicitará a especialistas. Sin embargo, si algún autor está interesado en publicar artículos de Revisión, éstos tendrán que ser supervisados. Los originales deberán comprender aproximadamente de 12 a 20 páginas (incluidas figuras y tablas), mecanografiadas a doble espacio.

CORRECCIÓN DE PRUEBAS. Los autores recibirán pruebas de imprenta, que deberán devolver en plazo no superior a una semana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, éstas serán corregidas por la revista y publicadas. Las correcciones se limitarán a errores tipográficos, gramaticales o de datos incorrectos. Modificaciones más importantes que impliquen recomposición del texto, deberán ser abonadas por el autor. Se enviarán 25 separatas gratuitas por artículo; si se desearan más, deberá indicarse por escrito cuando se devuelvan la pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

El artículo, original y dos copias, se enviará a: “Microbiología SEM.” Apartado 16009, 08080 Barcelona, o al miembro del Consejo Editorial de la revista que esté más relacionado con el contenido del artículo.

Editorial Board addresses/Direcciones de los miembros del Consejo Editorial

Salomón Bartnicki-García
Department of Plant Pathology
University of California-Riverside
Riverside, CA 92521, USA

Mariano Esteban
Centro Nacional de Biotecnología
CSIC
28049 Cantoblanco (Madrid)

Juan J. Borrego
Departamento de Microbiología
Universidad de Málaga
Campus Universitario Teatinos
29071 Málaga

Isabel Esteve
Microbiología
Instituto de Biología Fundamental
Universidad Autónoma de Barcelona
08193 Bellaterra (Barcelona)

Enrico Cabit
National Institutes of Health
Bldg. 10 Room 9H-11
Bethesda, MD 20892, USA

M. Luisa García López
Dpto. Higiene y Tecn. Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad de León
24071 León

Víctor Campos
Fac. de Ciencias Básicas y Matemáticas
Universidad Católica de Valparaíso
Av. Brasil, 2950
Valparaíso, Chile

Juan Iriberry
Departamento de Microbiología
Universidad del País Vasco
Apartado 644
48080 Bilbao

Josep Casadesús
Departamento de Genética
Facultad de Biología
Universidad de Sevilla
41012 Sevilla

Germán Larriba
Departamento de Microbiología
Universidad de Extremadura
06071 Badajoz

Esteban Domingo
Centro de Biología Molecular
CSIC-UAM
28049 Cantoblanco (Madrid)

Paloma Liras
Área de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de León
24071 León

José M. López Pila
Institute for Environmental Hygiene
Corrensplatz 1
D-1000 Berlin 33, FRG

Manuel de la Rosa
Servicio de Microbiología
Hospital Virgen de las Nieves
Av. Coronel Muñoz, 2
18014 Granada

Rubens López García
Centro de Investigaciones Biológicas CSIC
Velázquez, 144
28006 Madrid

Moselio Schaechter
Dpt. Molec. Biology and Microbiology
136 Harrison Avenue
Tufts University
Boston, MA 02111, USA

Manuel Benjamín Manzanal
Dpto. Interfac. de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Oviedo
33071 Oviedo

Josep M. Torres-Rodríguez
IMIM
Hospital del Mar
Pg. Marítim, s/n
08003 Barcelona

D. A. A. Mossel
Eijkman Found. for Medical Research
P.O. Box 6025
3503 PA Utrecht
Netherlands

Hans G. Trüper
Institute of Microbiology
University of Bonn
Meckenheimer Allee, 168
D-5300 Bonn 1, FRG

Juan A. Ordóñez
Dpto. Higiene y Microbiol. Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid

Antonio Ventosa
Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla
41012 Sevilla

José Claudio Pérez Díaz
Servicio de Microbiología
Hospital Ramón y Cajal
28035 Madrid

Miquel Viñas
Dpto. Microbiol. y Parasitol. Sanitarias
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona
08028 Barcelona

GUIA DE TERAPEUTICA ANTIMICROBIANA

4.ª Edición

J. Mensa
J.M. Gatell
M. Corachán
M.C. Escofet
J.A. Martínez

Formato 10,5 x 16 cm.
492 páginas

Nueva edición de este práctico manual de bolsillo cuyas ediciones anteriores han tenido una gran acogida entre todos los profesionales de la salud.

Esta guía expone de forma concisa, uniforme, fácil de localizar y comprender, toda la información sobre terapéutica antimicrobiana que debe conocer el médico práctico actual.

Todos los capítulos han sido revisados, ampliados y actualizados, y varios han sufrido renovaciones importantes.

Entre las novedades de esta 4.ª edición merecen destacarse:

- total actualización de los fármacos antibacterianos y del tratamiento de las infecciones;
- incorpora los fármacos comercializados en España durante 1993;
- se describen 37 nuevos microorganismos y nuevos síndromes;
- más completa información sobre nuevas situaciones de profilaxis en medicina, un apartado de normas para la profilaxis en cirugía y nuevas recomendaciones sobre la vacunación de la hepatitis B;
- actualización y ampliación del capítulo "Nombres comerciales y formas de presentación de los principios activos descritos en la guía", de gran utilidad en la práctica diaria.

1. Clasificación de los antimicrobianos	123
2. Tablas de interés práctico	145
3. Tratamiento de las infecciones	255
4. Etiología y tratamiento empírico de algunos síndromes de causa infecciosa	301
5. Prevención de las infecciones	333
6. Consejos generales para viajeros	337
7. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y SIDA. Tratamiento y prevención de las infecciones oportunistas asociadas	351
8. Nombres comerciales y formas de presentación de los principios activos en la guía	401
Índice alfabético de materias	

TARJETA DE PEDIDO

Agradeceré remitan a mi nombre el libro:

Mensa-Gatell: GUIA DE TERAPEUTICA ANTIMICROBIANA 1994 (4.ª edición)
PVP: 1.750 Ptas. con IVA y 1.699 Ptas. sin IVA (cód. 0239)

Deseo recibir el CATALOGO GENERAL gratuitamente.

FORMA DE PAGO: Nombre

Contra reembolso, Dirección



sin recargo alguno. C.P. Población

FIRMA: Provincia Teléfono

Fecha de nacimiento Especialidad

Puede dirigirse a
su librería habitual
o remitir esta tarjeta
de pedido a:

Ediciones Científicas y Técnicas, S.A.

Licenciataria de:  MASSON  SALVAT Medicina
Enfermería
Veterinaria
Odontología

Av. Ppe. Asturias, 20 - 08012 Barcelona - España - Fax (93) 416 12 19