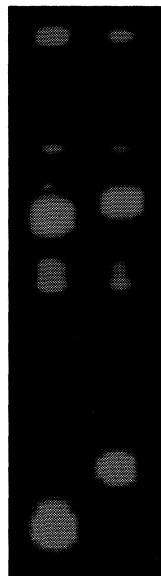


Volumen 10, nº4
Diciembre 1994
ISSN 02 13-4101

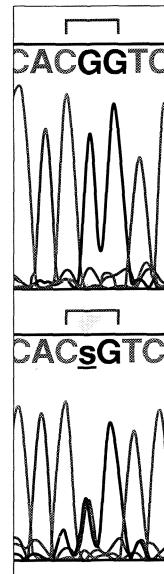
PUBLICACION DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGIA

Microbiología



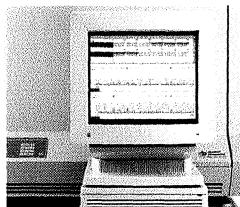


Barridos. Use métodos PCR como SSCP (ilustrado aquí) para buscar las diferencias entre los genes mutante (izquierda) y natural (derecha).



Secuenciación. Rápidamente localice los heterocigotos (secuencia inferior) con un software de análisis de secuencia especializado.

Imagine que productividad podría lograr con un sistema que pudiese realizar ambos.



Hemos automatizado el proceso completo de detección de mutaciones - desde la preparación de la muestra hasta la localización de los heterocigotos. De esta forma no tendrá que imaginarse nuevos niveles de productividad. Los alcanzará fácilmente.

Combinando técnicas de barrido con secuenciación comparativa, nuestro sistema puede ayudarle a aumentar su productividad y finalizar antes sus proyectos de investigación. Tendrá la flexibilidad que necesita para una caracterización genética más productiva.

La base de este sistema exacto y versátil es nuestro afamado equipo de electroforesis modelo 373, que incluye las herramientas más especializadas y necesarias para los análisis de datos más complejos.

Nuevo software Sequence Navigator para ofrecerle comparaciones de secuencias de alta resolución y exactitud. Elimina datos superfluos, alinea secuencias automáticamente y marca claramente los heterocigotos.

Con el analizador de fragmentos GenesCAN software junto con la tecnología GeneAmp PCR puede usar las más avanzadas técnicas de barrido, tales como polimorfismo conformacional de simple-hebra (SSCP) y análisis heteroduplex.

Además los reactivos de análisis PCR y de secuenciación ADN PRISM le facilitan la preparación de la muestra. Con nuestra tecnología básica de los cuatro-colorantes fluorescentes este sistema le permite incluir controles internos en cada carril para lograr una exactitud y una productividad que ninguna otra técnica es capaz.

Ahora dispone de un sistema que le permite expandir sus opciones experimentales en lugar de limitárselas.

Imagine la productividad. Imagine su valor.

Llame a la división Applied Biosystems de Perkin Elmer hoy mismo al teléfono: 91 / 803 42 10.



PERKIN ELMER

MADRID: Dr. Antonio Bradley y D^a Soledad Sánchez. Tel. (91) 803 42 10 . Fax (91) 804 (Ronda de Poniente, 5 - 28760 Tres Cantos (Madrid)

BARCELONA: D. Julio Martínez. Tel. (93) 212 22 58 . Fax (93) 212 60 01. General Vives, 25-27 - 08017 Barcelona

BILBAO: D. J. Mantecón. Tel. (94) 447 10 21 . Fax (94) 476 15 39.

Lehendakari Aguirre, 11 - 48014 Bilbao

SEVILLA: D. J. L. de la Matta. Tel. (95) 445 70 22 . Fax (95) 445 19 06.

Avda. República Argentina, 39 - 41011 Sevilla

Sequence Navigator, GENESCAN, and ABI PRISM are trademarks of The Perkin-Elmer Corporation.

The GeneAmp PCR process is covered by the U.S. patents owned by Hoffmann-La Roche, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Macintosh is a registered trademark of Apple Computer, Inc.

Perkin-Elmer is a registered trademark of The Perkin-Elmer Corporation.

EXPOANALITICA + BIOCIENCIA

MADRID 4-7 ABRIL 1995
Parque Ferial Juan Carlos I



7^{as} JORNADAS DE
ANALISIS
INSTRUMENTAL



3-6 ABRIL
1995

1^{as} JORNADAS DE
BIOCIENCIA



4-7 ABRIL
1995



Organizado por:
EXPOQUIMIA

SECRETARIA: Avda. Reina M^a Cristina, Palacio nº 1 - 08004 Barcelona (España)
Tel. (34-3) 423 31 01 - Fax (34-3) 423 86 51

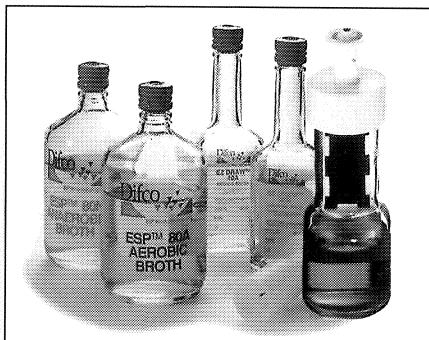
Hemocultivos ESP

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.

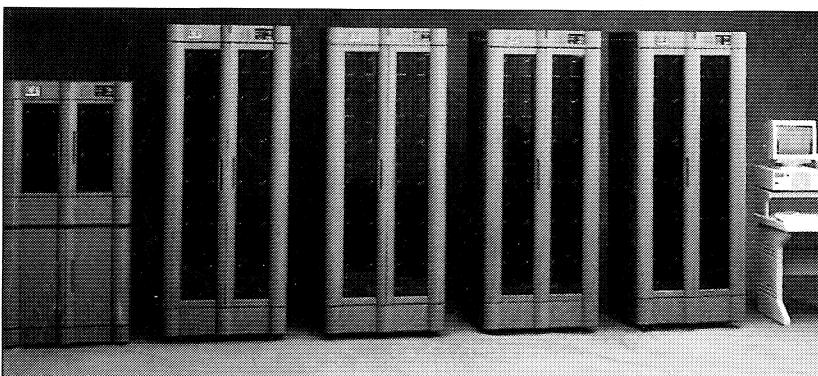
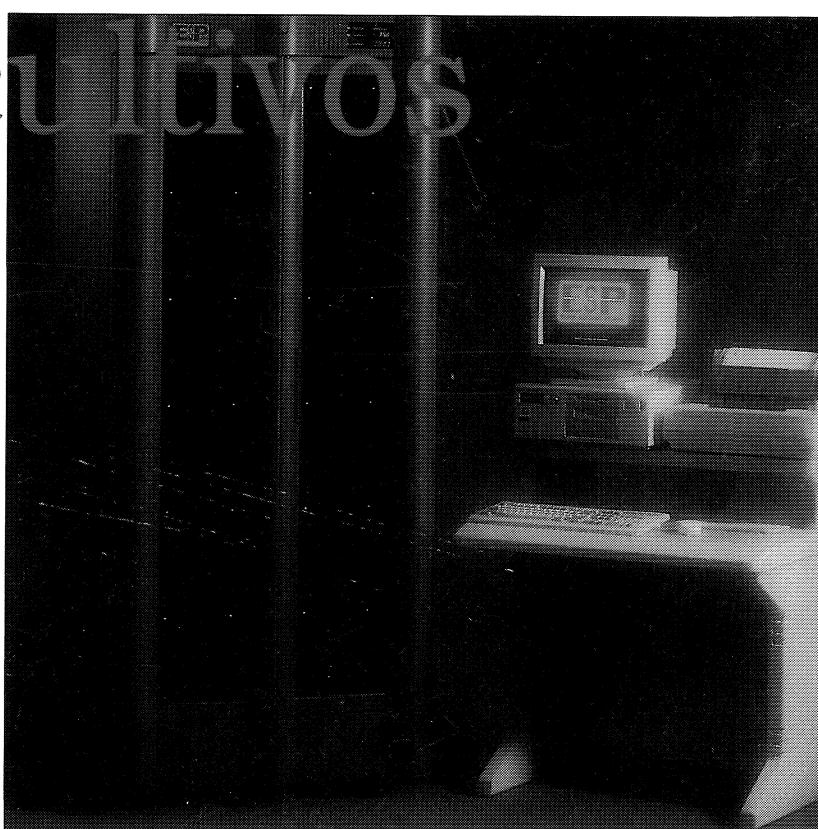
Configuraciones

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.

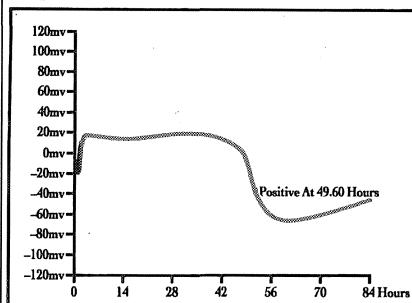


Formatos de botellas

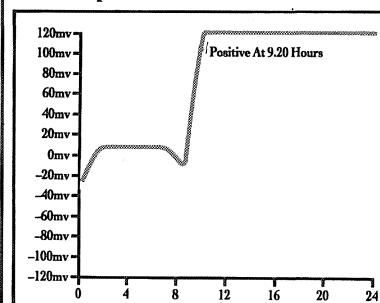
Los medios de nuevo desarrollo se ofrecen en una selección de tamaños. La botella de 30 ml. acepta muestras entre 0,1 y 10 ml. La botella pediátrica acepta hasta 5 ml. en extracción directa. La botella bifásica contiene además una lengüeta con Agar Chocolate y Sabouraud Dextrose.



Cryptococcus neoformans



Klebsiella pneumoniae



Mayor recuperación. Mayor rapidez

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

DISTRIBUIDOR PARA ESPAÑA:

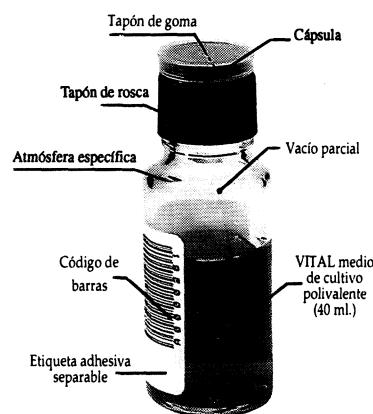


FRANCISCO
SORIA MELGUIZO, S

Caramuel, 38 - 28011 MADRID
Telf.: 464 94 50 - 464 36 00 • Fax: 46

VITAL

Sistema automático para hemocultivos



Tecnología H.F.T.

Lectura no invasiva:

- en continuo las 24 horas del día cada 15 minutos.

Introducción inmediata de frascos nuevos en el ciclo de análisis.

- Detección del crecimiento bacteriano mediante:

- producción CO₂.
- variación del PH.
- modificación del potencial de oxido-reducción.

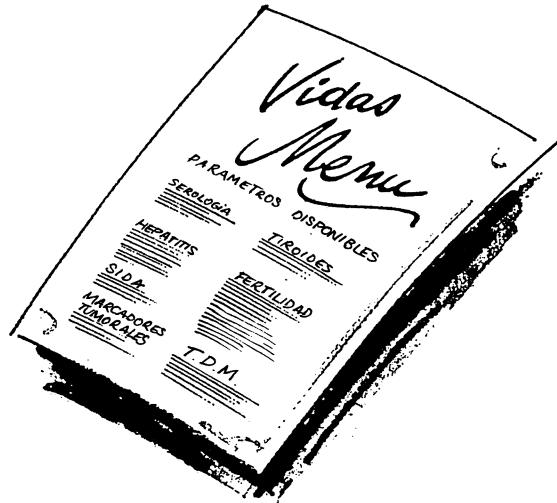
- Facilidad de Manejo.

- Interfase windows.
- Sistema modular.
- Conexión bidireccional.



bioMérieux

bioMérieux España, s.a. Manuel Tovar, 36 / 28034 Madrid / Tel. (91) 358 10 42 / Fax (91) 358 06 29



UN MENU CAPAZ DE SATISFACER LOS GUSTOS MAS EXIGENTES ¡Pídanos la carta!

Un menú de reactivos de inmunoanálisis no se puede improvisar. 30 años de experiencia han hecho posible para bioMérieux desarrollar un auténtico menú de "gourmet": Serología, Hepatitis, SIDA, Tiroides, Fertilidad, Marcadores tumorales, TDM, Detección de antígenos bacterianos y virales...

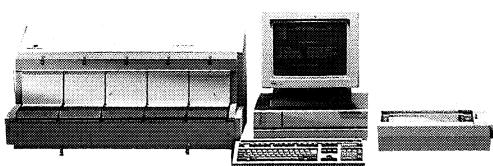
En nuestra "carta" encontrará más de 30 parámetros y lugar para muchos más.

VIDAS

La solución adaptada a cada laboratorio.



mini VIDAS



VIDAS



bioMérieux

bioMérieux España s.a. Manuel Tovar, 36 - 28034 MADRID

Tel. (91) 358 11 42 - Fax (91) 358 06 29

telex. 46620

MICROBIOLOGÍA SEM

Publicación de la Sociedad Española de Microbiología

Editorial Board/Consejo Editorial*

Editor-in-Chief/Director-Coordinador

Ricard Guerrero, Universidad de Barcelona

Bacterial Taxonomy/Taxonomía Bacteriana

Antonio Ventosa, Universidad de Sevilla

Hans G. Trüper, University of Bonn, FRG

Biodegradation/Biodeterioro

Margarita Flores, Universidad Complutense de Madrid

Harold W. Rossmeuse, Wayne State University, Detroit, USA

Environmental Microbiology/Microbiología Ambiental

Victoriano 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

David A. Mossel, Eijkman Found. for Medical Research, Utrecht, the 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 Iribarri, Universidad del País Vasco

Microbial Genetics/Genética Microbiana

Josep Casadesús, Universidad de Sevilla

Moselio Schaechter, Tufts University, Boston, USA

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 Cabib, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Isabel Esteve, Universidad Autónoma de Barcelona

Mycology/Micología

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

Josep 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-Coordinadores anteriores

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

Juan A. Ordóñez, Universidad Complutense de Madrid

* See addresses in pp. 455-456.

[MICROBIOLOGÍA SEM 10 (4): 325-462 (1994)]

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.

Publication Board/Comité de Redacción

Editor-in-Chief/Director-Coordinador:

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

Preparación y composición de originales:

Eulàlia Massana

Ana Fernández de Castillo

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

[MICROBIOLOGÍA SEM 10 (4): 325–462 (1994)]

Guidelines for Authors:

Information about the Journal, including guidelines on the preparation and submission of manuscripts, is published on pp. 453–454 of this issue, and may also be obtained from the Editorial Office.

ÍNDICE

	Página
Editorial	329
Forty years of screening programmes for antibiotics. <i>Mochales, S.</i>	331
Apuntes sobre la historia de la microscopía en España. <i>Fernández-Galiano, D.</i>	343
New methods in <i>Salmonella</i> genetics. <i>Casadesús, J., Flores, A., Beuzón, C. R., Torreblanca, J., Mouslim, C., Cano, D. A.</i>	357
Genetic regulation of nitrogen fixation in <i>Rhizobium meliloti</i> . <i>Cebolla, A., Palomares, A. J.</i>	371
Genes involved in the regulation of invertase production in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Del Castillo Agudo, L., Gozalbo, D.</i>	385
Autolytic effect of the antibiotic produced by <i>Myxococcus coralloides</i> . <i>Montoya, M. D., Gálvez, A., Arias, J. M., Montoya, E.</i>	395
Sibling species of the <i>Saccharomyces</i> sensu stricto complex in Spain. <i>Naumov, G. I., Naumova, E. S., Sancho, E. D.</i>	403
Diversity of actinomycetes and fungi on seaweeds from the Iberian coasts. <i>Genilloud, O., Peláez, F., González, I., Díez, M. T.</i>	413
Ensayos in vitro del comportamiento antagónico de <i>Trichoderma</i> spp. frente a especies patógenas de la zona hortícola de La Plata, Argentina. <i>Mónaco, C., Perelló, A., Rollán, M. C.</i>	423
Maclyn McCarty: Un sabio olvidado. Cincuenta años del redescubrimiento del DNA. <i>López, R.</i>	429
André Lwoff (1902–1994). <i>Soyer-Gobillard, M.-O.</i>	433
Opinión. <i>Reguant, S.</i>	435
Revisión de libros	439
Normas para los autores	453
Direcciones de los miembros del Consejo Editorial	455
Índice de autores del volumen 10	457
Índice de palabras clave del volumen 10	459

CONTENTS

	Page
Editorial [In Spanish]	329
Forty years of screening programmes for antibiotics. <i>Mochales, S.</i>	331
Notes on the history of microscopy in Spain. <i>Fernández-Galiano, D.</i> [In Spanish]	343
New methods in <i>Salmonella</i> genetics. <i>Casadesús, J., Flores, A., Beuzón, C. R., Torreblanca, J., Mouslim, C., Cano, D. A.</i>	357
Genetic regulation of nitrogen fixation in <i>Rhizobium meliloti</i> . <i>Cebolla, A., Palomares, A. J.</i>	371
Genes involved in the regulation of invertase production in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Del Castillo Agudo, L., Gozalbo, D.</i>	385
Autolytic effect of the antibiotic produced by <i>Myxococcus coralloides</i> <i>D. Montoya, M. D., Gálvez, A., Arias, J. M., Montoya, E.</i>	395
Sibling species of the <i>Saccharomyces</i> sensu stricto complex in Spain. <i>Naumov, G. I., Naumova, E. S., Sancho, E. D.</i>	403
Diversity of actinomycetes and fungi on seaweeds from the Iberian coasts. <i>Genilloud, O., Peláez, F., González, I., Díez, M. T.</i>	413
Laboratory study of the antagonistic behaviour of <i>Trichoderma</i> spp. versus pathogenic species from the horticultural area of La Plata, Argentina. <i>Mónaco, C., Perelló, A., Rollán, M. C.</i> [In Spanish]	423
Maclyn McCarty: 50 years from the rediscovery of DNA. <i>López, R.</i> [In Spanish]	429
André Lwoff (1902–1994). <i>Soyer-Gobillard, M.-O.</i> [In Spanish]	433
Opinion. <i>Reguant, S.</i> [In Spanish]	435
Book reviews [In Spanish]	439
Guidelines for authors	454
Editorial Board addresses	455
Author index, volume 10	457
Key word index, volume 10	459

Editorial

XV Congreso Nacional de Microbiología (Madrid, 25–28 de septiembre de 1995). Cincuenta años de microbiología en España

Van a cumplirse los primeros cincuenta años de existencia de la Sociedad Española de Microbiología, la SEM. Naturalmente, las circunstancias que vivimos son muy distintas de las que se daban en el momento en que los fundadores de la SEM decidieron asociarse para potenciar su trabajo científico y profesional, así como para aumentar su presencia en la sociedad española. Hoy la comunidad de microbiólogos en España constituye una colectividad notable en número y con una incidencia muy significativa en los diversos campos de la actividad profesional, investigadora, sanitaria, industrial, docente, etc.

Además de la SEM, otras asociaciones científicas y profesionales se basan en estudios en el campo de los microorganismos. Nuestra disciplina representa un ingrediente esencial en la formación de diversos titulados y especialistas. La microbiología que se hace en España tiene una presencia destacada en los foros europeos a través de la Federation of European Microbiological Societies (FEMS) y otras asociaciones del continente, y en diversos organismos de la Unión Europea. Finalmente, citemos como motivo de especial estímulo para los microbiólogos españoles el que en España funcionen varios centros multinacionales de aislamiento y selección de especies microbianas productoras de sustancias con actividad biológica, y se llevan a cabo varios proyectos de envergadura multinacional dedicados al estudio básico y desarrollo de fármacos antiinfecciosos. Sin ningún triunfalismo podemos decir que ello representa un espaldarazo para las investigaciones sobre microorganismos en nuestro país.

El XV Congreso Nacional de Microbiología se plantea ciertamente en la línea de continuidad de los congresos de la SEM, pero también pretende servir de conmemoración de esos cincuenta años de microbiología en España, para que la reunión nos ayude, sobre todo, a mirar hacia el futuro. Intentamos que todos los grupos que trabajan en microbiología en España puedan presentar su trabajo y sus inquietudes. Buscamos celebrar una serie de simposios y de mesas redondas que reflejen los avances en temas de frontera y que tengan la mayor actualidad, en todos aquellos campos que se cultivan en nuestro país. Para la organización de mesas redondas, hemos solicitado la habitual colaboración de los grupos especializados de la SEM. Trabajamos también para poner a punto actividades específicas de celebración del cincuentenario. En éstas han aceptado colaborar la Sociedad Española de Virología y la Sociedad

Española de Quimioterapia. Estos actos incluyen una exposición retrospectiva sobre la microbiología en España, una publicación que refleje la creación y evolución de diferentes centros (institutos, departamentos, servicios, etc.) y un simposio sobre el futuro de la microbiología. Y como la microbiología que hacemos es, sobre todo, ciencia, tampoco queremos que pase desapercibido el hecho de que el año próximo se cumplen cien años de la muerte de Louis Pasteur, uno de los grandes fundadores de nuestra disciplina.

Los nuevos tiempos, las nuevas metodologías, el avance en el conocimiento científico, plantean continuamente nuevos horizontes en el desarrollo de cualquier disciplina y nuevos retos en las aportaciones que esas disciplinas pueden ofrecer a la humanidad. La nuestra vive un momento particularmente brillante que nos permite abordar nuestro trabajo con herramientas experimentales insospechadas hasta hace poco. Hoy es razonable plantear el estudio global de organismos secuenciando por completo su genoma (ejemplos significativos son diversas levaduras, bacterias como *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Bacillus*, etc.), estudiar la transducción molecular de señales en células microbianas, analizar a fondo la resistencia a antibióticos y plantear el desarrollo de antimicrobianos estudiando nuevas “dianas”, profundizar en la patogenicidad de los microorganismos caracterizando los genes de virulencia, descubrir qué especies pueden causar biodeterioro de materiales, etcétera. Y, con todo ello, nos podemos plantear conceptos clásicos como el de especie microbiana y aportar nuevos métodos para la microbiología diagnóstica, la vacunación o la detección de patógenos en alimentos y medio ambiente, la producción de proteínas heterólogas, etc. La enumeración anterior representa solamente la mención de algunas de las temáticas que se abordarán en la reunión. Esperamos que en los próximos meses la colaboración de todos nos permita organizar el Congreso que la comunidad de microbiólogos españoles desea celebrar.

César Nombela Cano

Presidente del XV Congreso Nacional de Microbiología

Forty years of screening programmes for antibiotics

Sagrario Mochales

Centro de Investigación Básica (CIBE), Merck Sharp & Dohme de España, S.A., Madrid

Received 30 August 1994/Accepted 20 September 1994

Summary

The article gathers the reflections on the experiences of forty years doing research on the screening of natural products in the pharmaceutical industry. Over those years new technologies have improved the methodology. However, the steps followed in such a research are the same: the isolation and cultivation of microorganisms; the definition of assays with well defined targets; the demonstration of their efficacy for the discovery and selection of active substances produced by microorganisms; the classification and structural determination of the new products; and the study of their therapeutical efficiency. Examples of the processes which led to the production of several antibiotics (fosfomycin, cefoxitin and thienamycin) are described. One important lesson that the author has learnt is that microorganisms have unique fingerprints and that generalization should be avoided in the planning of this work.

Key words: antibiotic screening, active substances, fosfomycin, cefoxitin, thienamycin

Resumen

El artículo recoge las reflexiones sobre las experiencias de cuarenta años de trabajo en el cribado («screening») de productos naturales en la industria farmacéutica. A lo largo de estos años la metodología ha mejorado mucho gracias a las nuevas tecnologías. Sin embargo, los pasos a seguir continúan siendo los mismos: aislamiento y cultivo de microorganismos; diseño de ensayos con objetivos definidos; demostración de su eficacia en el descubrimiento de substancias activas producidas

Correspondence to: Sagrario Mochales. Centro de Investigación Básica (CIBE). Merck Sharp & Dohme de España, S.A. Josefa Valcárcel, 38. 28027 Madrid. Tel: 91-3210696. Fax: 91-3210614.

por microorganismos; clasificación y determinación estructural de los nuevos productos; y estudio de su eficacia terapéutica. Se describen ejemplos de procesos que condujeron a la producción de varios antibióticos (fosfomicina, cefoxitina y tienamicina). Una importante lección que la autora aprendió es que cada microorganismo es diferente y que deben evitarse generalizaciones sobre el estudio que requiere cada caso.

It is not the marble halls which make for intellectual grandeur—it is the spirit and brain of the worker (Alexander Fleming)

The kind readers whose attention is distracted from more important matters may be disappointed in the present article when they find out that it does not finish with an imposing list of references, as it is customary in a review. Rather, they will only find some reflections on my experience of working in the screening for antibiotics.

I have been encouraged by the editor of the journal to try to summarize some aspects of forty years accomplishment. Perhaps, he is correct and more people than I foresee may be curious about the job done by nearly prehistoric creatures. I do not mean Crichton–Spielberg's «Jurassic Park.» I mean the ancient history of human beings, like me, who grew up in the microbiological sciences before the usual tools, thought absolutely necessary today, were even imagined. The background in biology that my generation of university students, and those in the pharmaceutical industry enjoyed in the early '50s was «primitive» by today standards. Let me offer an example: I studied general microbiology at the University of Madrid when Prof. Arnaldo Socias lectured about DNA and RNA, probably for the first time. Our understanding of the distinctions between the two forms of nucleic acid was so scarce, that, at the end of the lesson, the class hot arguers divided in two groups: those who had written down in their notebooks «DNA» debated those who had recorded «RNA.» Only on one point did both groups agree: the substance should be either «DNA» or «RNA». None of us could consider the possibility of the existence of two different «things»!

Under these premises, I suppose you will accept that I form part of a microbiologists group which, though is becoming extinct, has been very lucky to witness the first appearance of many of the biological concepts that are nowadays so familiar to all of us. At the beginning of the '80s, my dear friend—and boss—Dr. Edward O. Stapley and I were so aware, and amused, at our situation that we dubbed ourselves «The Dinah Shores», after Ms. Dinah Shore, a famous American singer in the '40s and '50s. Not because we were fans or buffs of the popular singer but because her name resembled the antique creatures we were becoming. Perhaps my disclosure of the following old stories may be picturesquely curious for you.

Let me begin with my first and only job. The late and unforgettable Dr. Gregorio Baquero Gil provided me the opportunity of contact with Dr. Martínez Mata, director of a research joint project for the discovery of new antibiotics created by MSD and CEPA, a Spanish pharmaceutical industry, in 1954. In that first, decisive interview, Dr. Justo Martínez Mata, after asking me why on earth I wanted to work in a lab—girls were supposed not to work, let alone research in science—put to me the two most important questions: «Was I married?» «Not even engaged?». Luckily for me, both answers were negative so I realized that he was much more receptive to forget my female condition. I was finally hired as a microbiologist. But to work on what? On something called «Screening of natural products». «What?» «Yes, S-C-R-E-E-N-I-N-G.» «Oh!, I see... But what does it mean?» «Well, you see, there is

no good Spanish translation...» That happened back in 1954. Some 40 years later, we still have no adequate Spanish translation for it, but it has become a household word for us.

Working in «screening», I began my training as a microbiologist. I learned that the microorganisms isolated by us from natural sources were living beings with big egos, and that we had to treat them with utmost care. If we wanted to receive the eagerly expected and sought for secondary metabolites produced by them, we must provide the appropriate ambience. I also learned something that I have not forgotten: as with humans, fingerprints of microorganisms are also unique. Extrapolation of results from one microbe to another is as risky as extrapolating about humans. We look for specificity and uniqueness and in this field, generalization should be avoided. As there has never been more than one Beethoven, one Einstein or one Picasso, the same thing happens with *Streptomyces cattleya* and its metabolite, thienamycin. They have no counterparts. Although good modern musicians abound, few have been so important as the Beatles to create new schools of music; the same happens to be true of the specific strain of *Aspergillus terreus*, producer of lovastatin. Those are two good examples: *Streptomyces cattleya*, a microorganism very difficult to isolate from nature, produces a new antibiotic representative of a new family of compounds (thienamycin). *Aspergillus terreus*, a very common fungus, extensively studied in many microbiological laboratories, yet only one strain of this species produces a new depressor of cholesterol levels (lovastatin).

The conclusion is that, throughout all these years, I have devoted my interest and efforts to discern small differences among microorganisms. The methods have differed depending on the state-of-the-art of science at the moment. We began with observations of the macroscopic characteristics of isolated cultures and were helped by a microscopy not too advanced. We used assays for detection of activities with targets not too well established to the present stage, in which, before starting a culture, we have enough information about its DNA content, together with enzymatic assays with well defined targets.

In spite of all those methodological advances, we still take into consideration serendipity: the wonderful factors which convert screening work into a new daily adventure, our aim to find out «something» different from «something» that has been seen many other times. Or, conversely, this miraculous intuition that rings a bell to warn that this «something» has not been seen before. I have been fortunate enough to feel this extraordinary pleasure. On at least in four occasions, the product discovered is now curing human lives. On many others, they finished just as scientific discoveries defeated by adverse situations. Those who work on screening have experienced this feeling many times (5).

I know the tired epithet some people bestow on screening work: «routine». But this description is relative. Some screening work is not dissimilar to that involved even in the most exquisite scientific research. It is quite similar to that in any microbiological laboratory, for instance, the clinical one. Day in, day out, *Staphylococcus aureus* strains have to be classified. Some are nonresistant, and the patient goes home, whereas others are resistant to different antibiotics, and the patient must be treated and the strain kept for further studies. The procedure followed is the same in both cases, the result varies.

If you want to understand function, study structure (Francis Crick)

In the forty years devoted to screening, there have been many stories to tell. Some have happy endings, others just end. Because the aim is not simply the discovery of something new, the real

difficulties are the consequences of any first finding. Almost as an incontrovertible truth, to discover a new microorganism, or product, is difficult, to patent it is even more difficult, but, actually, the most difficult task is to adjust it to pharmaceutical use. The number of hazards to reach that point is so large that often it overwhelms the confidence of an optimistic person as I think I am.

I would like to comment on some of the efforts necessary before a new product is used on a patient. I have had the extraordinary good fortune of direct involvement in the discovery of four new products: a depressor of cholesterol levels, lovastatin, and three antibiotics, fosfomycin, cefoxitin and thienamycin. Mixing the stories of the three last, a simple scheme of the work involved emerges: the discovery and characterization of the compound produced by a microorganism and the development of steps required to reach clinical use gives the reader a schematic approach to how screening programs on natural products proceed in the pharmaceutical industry.

We start by establishing the scheme upon which is based our own «Screening on Natural Products».

1. Isolation of the microorganisms and documentation of their cultivation procedure.
2. Design of assays with well-defined targets.
3. Demonstration of the microorganisms usefulness for the discovery and selection of active substances (known or unknown).
4. Classification and structural determination of the new substances.
5. Further studies to determine the therapeutical efficacy of any new substance.

CIBE is closely related to the first three points. Our aim is the detection of new and powerful antimicrobial or chemotherapeutical substances produced by microorganisms isolated from nature. We design the adequate conditions for them to produce secondary metabolites. We selected from a broad array of assays those that allow detection of the presumptive activities. Finally, we selected active compounds with potential therapeutic value. Any natural source or geographical place may be adequate for sampling. As usually occurs in the world of fashion, modes exist: «This spring, direct sampling on plates may be "in" or "out", or dilution may be "in", or a treatment with a specific agent may be "out".» The best way may be to take advantage of all possible procedures to increase diversity. Diversity, a crucial word! Another point to consider is whether or not the culture has been isolated previously. Let us suppose that similar microorganisms have been isolated previously. We ask ourselves: Is the same compound usually produced by these microorganisms? In all cultivation media? Under which conditions? How can we change these conditions? On the other hand, we may take for granted that a microorganism is new, and therefore the possibility of discovering new metabolites increased. Luckily for us, all these approaches may be effective, an advantage for the angler fishing in unknown waters as we are.

An important point is to obtain a pure culture with which to begin the selection process. A process that implies, in most cases, morphological and microscopical studies, biotyping and taxonomic classification. The results of preliminary studies allow us to select those cultures for growth. The main factors involve components in the culture media, appropriate use of anions and cations, as well as incubation times and temperature. The success, or failure, in the selection of the multiple factors is checked, at least, by growth curves, glucose consumption and pH. Whenever the cultivation proceed from known compound producers, the production curves of such metabolites are also necessary.

The following examples presents the time course of one cultivation of *Streptomyces cattleya* illustrating pH variation, glucose consumption and thienamycin production (Fig. 1).

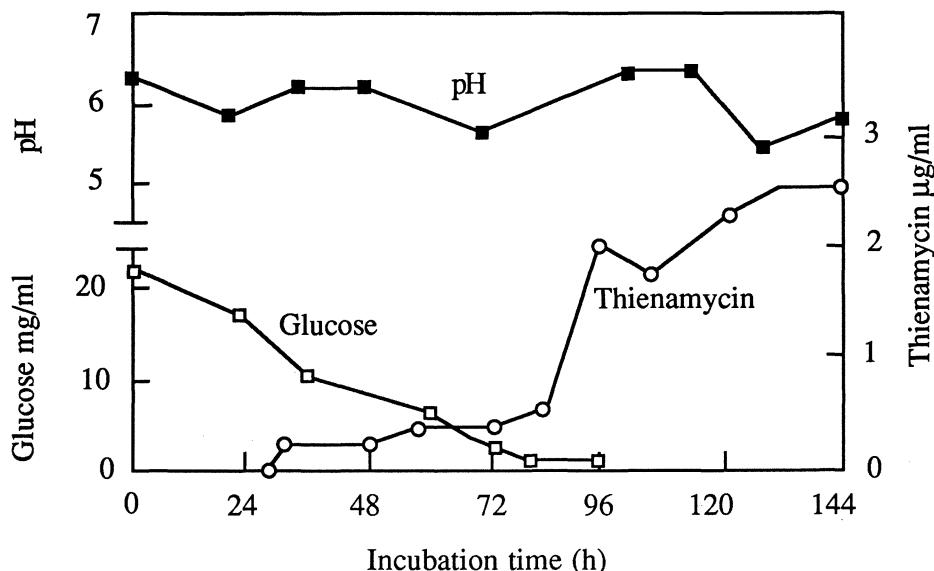


FIG. 1. Time-course of cultivation of *Streptomyces cattleya* illustrating pH variation, glucose consumption and thienamycin production (1).

We now reach one of the most controversial points. The microorganism has grown, and we may assume that, in the course of this cultivation, certain potentially useful secondary metabolites have been produced. But which ones? We do not know. However, one thing is clear: we know that we are looking for new antimicrobials, antivirals, cardiovasculars, immunomodulators, antiinflammatories and antiparasitical substances. Consequently, we require *in vitro* and *in vivo* assays which allow us to detect such type of activities.

The diversity of microorganisms, of cultivation processes, of detection assays and the difficulties of quantification of the complex relations among these factors, make us consider our work comparable to planning a successful strategy aimed to win at roulette! If, besides, we reckon the microorganism «personality» the ways in which different microorganisms produce the same or unique metabolites, the probability of finding unknown interesting compounds is always very slight indeed. Let me show just two examples.

In the genus *Streptomyces*, different species may produce different antibiotics or small differences in quantity of the same antibiotic but, also, the same antibiotic may be produced by different species.

Also, species of different taxa of fungi may produce the same compound (for instance, zaragozic acids) or, on the other hand, one single genus may produce a unique compound (for instance, lovastatin).

What happens when once (with a bit of luck, continuous effort, intuition, perseverance, patience and, again, a tiny little bit of luck) something really important is discovered? The answer is obvious: then and there the real difficulties begin.

A «personal» relationship between investigator and microorganism encourage the lucky poor investigators that, finally, have «something» on hand. Problems appear when new relationships must be established, for example, between one microorganism (the producer) and another (the human pathogen), or between the crude compound and the mouse, or between the pure compound and the human

immunological system. In such cases, there is no room for friendship or solidarity, only for a wild fight that finishes with the defeat of one of the contenders. Usually the victim is the metabolite produced by the microorganism we have cultivated. Sometimes, however, for the bosses' sake and for the financial stability of the scientists, the winner is our «dear old friend», the metabolite. In any such success, the retrospective story the incidents incurred during many years of study greatly compensates for previous failures.

With the selection of substances having potential therapeutic value, the following key steps generally follow:

1. Identification and classification of the microorganism
2. Studies of cultivation
3. Characterization and confirmation of the biological activities
4. Characterization of the chemical structure of the metabolites
5. Studies of toxicity and pharmacological tests in nonhuman mammals and then in humans
6. Industrial production
7. Clinical studies

Since the discovery of three antibiotics: fosfomycin, cefoxitin and thienamycin, until their release in hospitals and pharmacies, I have been very close to many of these processes. These three antibiotics were discovered through specific target assays and selected as bacterial cell wall inhibitors. Most of this information has to be now considered obsolete since, obviously, we do not use the same tools today, yet they have an historical value.

Out of pure culture, everything is confusion and *Penicillium glaucum* (Selman A. Waksman)

I am aware that by presenting data this way, I indulge myself in the enormous mistake of oversimplification. The extraordinary work of hundreds of scientists, required to define all the variables which made these drugs available to human beings, is impossible to describe accurately in this brief statement.

To illustrate points one to four, we begin with cefoxitin. First, we discovered the cephemycins family, compounds with three main differences when compared with other previously discovered betalactamases such as cephalosporins. The cephemycins were produced by bacteria instead of fungi; as they are active against both Gram-positive and Gram-negative pathogenic strains (instead of exclusively Gram-negatives) they cover a broad spectrum and, perhaps most importantly, they are highly resistant to degradation by betalactamases (2, 3, 4).

The personality of these microorganisms was evident: many strains of *Streptomyces* were capable of producing cephemycin A and B, whereas cephemycin C was rarely detected. Following Peter's Principle, the reader may easily conclude that the one selected for further studies was cephemycin C (Tables 1 and 2).

The personal “scientist–microorganism” relationship persisted in further studies of cultivation, antibiotic spectrum and betalactamases resistance. The difficulties appeared as a more careful analysis of the product began. It was the time for our friends, the chemists, to take an active part in the job and

TABLE 1
ANTIBACTERIAL RANGE OF CEPHAMYCINS A, B AND C

Strain	Diameter of inhibition zone (mm) ^a					
	Cephamycin A		Cephamycin B		Cephamycin C	
	5 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml	Raw	Pure	0.166 mg/ml
<i>Bacillus</i> sp. MB-633	22	9	16	7	8	
<i>Staphylococcus aureus</i> MB-108	26	19	18	7	7	
<i>Bacillus subtilis</i> MB-964	33	24	25	16	13	
<i>Sarcina lutea</i> MB-1101	26	17	23	9	10	
<i>Staphylococcus aureus</i> MB-698	19	14	15	7	11	
<i>Streptococcus faecalis</i> MB-753	7	7	7	7	7	
<i>Proteus vulgaris</i> MB-1012	29	25	21	21	22	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MB-979	7	7	7	7	7	
<i>Serratia marcescens</i> MB-252	7	7	7	7	7	
<i>Alcaligenes faecalis</i> MB-10	25	22	25	22	27	
<i>Brucella bronchiseptica</i> MB-965	21	22	7	28	24	
<i>Salmonella gallinarum</i> MB-1287	15	10	7	20	21	
<i>Vibrio percolans</i> MB-1272	36	24	24	37	30	
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> MB-815	15	7	7	12	19	
<i>Escherichia coli</i> MB-60	15	9	7	16	20	

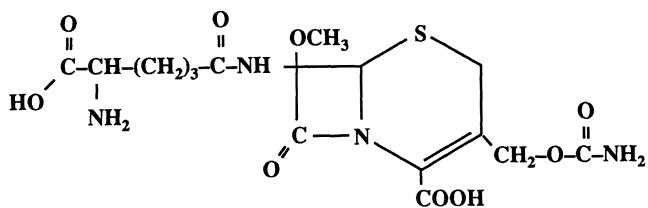
^a Diffusion assays on agar with 7 mm paper disk; thus, a result of 7 mm indicates non-inhibition.

TABLE 2
RESISTANCE OF CEPHAMYCIN C TO ENZYMATIC DEGRADATION

Source of the enzyme-washed cells	% of inactivated substrate ^a	
	Cephamycin C	Cephalosporin C
<i>Alcaligenes faecalis</i> MB-9	0	< 99
<i>Alcaligenes viscosus</i> MB-12	54	< 99
<i>Escherichia coli</i> 236	38	< 99
<i>Proteus morganii</i> 251	80	< 99
<i>Proteus morganii</i> 356	69	< 99
<i>Proteus mirabilis</i> 241	5	72

^a Exposition of a solution of 4 mg/ml for 3 h to washed cells in buffer phosphate 0.1 M, pH 7.5, with a cell concentration 10^x of a culture in nutrient broth after 18 h of incubation. Residual activity was determined by microbiological methods.

Cephamycin C



Cefoxitin

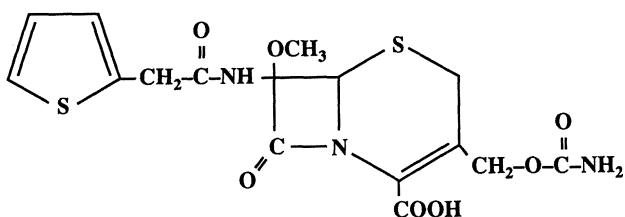


FIG. 2. Structural relationship of cephamycin C and cefoxitin (2).

they did it very well indeed. They added on a new radical, and removed one that the microorganism by itself had created. (We never knew why the microbe made it because we did not need it!) Out of these changes, cefoxitin, sprang up! No comparison between the previous antibacterial activities of cephamycin and the ones from cefoxitin (Fig. 2). Now, we had a real much better compound.

To continue my narrative, let us apply examples of points 4 and 5 above to work on fosfomycin. Fosfomycin has an extraordinary sentimental value for me. I was extremely lucky to have the opportunity of changing some of the conditions to increase the sensitivity of the assay where it was detected. I selected the original activity from a cultivation broth of its producer's culture. That culture later on became the producer of the first Spanish antibiotic ever discovered. And it was sheer Spanish! The sample from which the culture was isolated was taken on the road from Javea to Denia (Alicante).

Fosfomycin outstanding characteristics, as is well known, were based on the simplicity of the molecule, its low molecular weight and its broad antibacterial spectrum. Not only that. No substance previously discovered had any structural relationship to fosfomycin. Even more impressive was that because of its mode of action—and of interference with the catalytic reactions requiring phosphoenolpyruvate—the compound should be nontoxic (Fig. 3).

Again, as another example, microorganism individuality. One immediate question raised by this discovery was: why do we now find fosfomycin producers so easily when we spent so many long years to first detect them? Moreover, why had our competitors, the other hunters of the same captures, never discovered them either? As when, after many hours, the missing key to the door lock is found, the explanation became clear. First, a very low level of synthesis by the microorganism occurs in soil and it is rarely produced in most traditional cultivation media. Secondly, a very important reduction of the original activity occurs when evaluation of activity is made in the usual culture media, which include

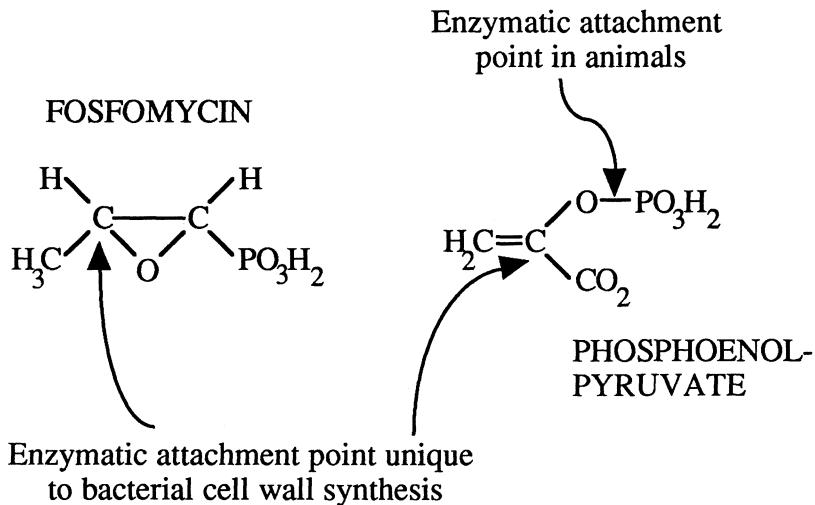


FIG. 3. Structural relationship between fosfomycin and phosphoenolpyruvate and contrast with the phosphoenolpyruvate utilization in bacterial wall synthesis and enzymatic transformations common to animals (6).

phosphate or glucose. Last, but not least, the presence of resistant colonies on the plates generally mask antibacterial activity.

Despite these peculiarities and because of the extraordinary effort of co-operating between microbiologists and chemists, production and evaluation continued.

Please allow me to be a little proud as I recall the first sensitivity test evaluation made by Spanish microbiologists (6). The results are summarized in Table 3.

Messieurs, c'est les microbes qui auront le dernier mot (Louis Pasteur)

My own guideline compels to me to deal with the last two points in the third antibiotic, thienamycin (1), one which has provided all kinds of stories of sleepless nights.

As the first representative of a new family of betalactamcs, the carbapenems, thienamycin was produced by a new species of *Streptomyces*, *S. cattleya*. A broad spectrum activity and resistance to betalactamases was demonstrated above for cefoxitin; yet I must mention that thienamycin has extraordinarily high antibacterial activity as well as extraordinarily high resistance to betalactamases. These two facts are due to its unique chemical structure, which presents stereochemical differences relative to other betalactams. In fact, it was the first molecule with trans configuration which still displayed antibacterial activity. Mentioning it in this manner, the statement sounds simple. Yet, how long have the chemists been using well-known ways of solving structures until the moment occurred that one of them realized that this was precisely the wrong way to go? Several months, I would say. The change of mind flashed suddenly in one of our chemists' brain, at 3 a.m. of a red letter day, and it worked.

This strange peculiarity was not the only unique character of this compound but one among others.

TABLE 3

SENSITIVITY TEST EVALUATION OF FOSFOMYCIN BY SPANISH MICROBIOLOGISTS

Microorganism	Number of strains tested	Number susceptible	Percentage
<i>Haemophilus influenzae</i>	28	28	100
<i>Salmonella</i> sp.	14	14	100
<i>Vibrio cholerae</i>	4	4	100
<i>Staphylococcus</i> sp.	2,891	2,864	99
<i>Neisseria meningitidis</i>	21	20	95
<i>Escherichia coli</i>	3,398	3,173	93
<i>Serratia marcescens</i>	336	314	93
<i>Streptococcus</i> sp.	609	487	80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,856	1,465	79
<i>Proteus mirabilis</i>	810	623	77
Group <i>Providencia</i>	38	25	66
<i>Klebsiella-Enterobacter</i>	958	594	62
<i>Proteus indoligenus</i>	494	256	52
Total	11,457	9,867	86

To begin with, the strong activity detected in Spain as «totally unknown» was just a mixture of betalactamic antibiotics including the new compound with penicillin N and cephalexins. A similar cultivation broth showed the effectiveness of the crude product in curing mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Interest in the culture greatly intensified, and much effort was devoted to increase the thienamycin concentrations by altering cultivation conditions. And it was done. But a new difficulty appeared, instability and accelerated autoinactivation in solution: due to the fact that the concentration of thienamycin put molecules on close contact destroying its own betalactam rings.

To make a long story short: it was necessary to look for new derivatives to avoid this inactivation. N-formimidole thienamycin was selected as the most effective. Even more surprises were waiting for us when the clinical studies began. The first studies on healthy volunteers showed that thienamycin was quickly degraded in the kidney and practically no levels were measurable in blood. These results totally limited its therapeutic properties. The main question was: Why? Again, sleepless people devoted their minds to think about it and, again, they were lucky to be able to show that the degradation in the kidney was due to the existence of a single enzyme, the dehydropeptidase I, known for many years as a curious kidney peculiarity with an unknown mode of action. We discovered that this enzyme specifically degraded our compound. One of the most important participants in this part of the work expressed the issue succinctly when he remarked: «No one knew the exact purpose of the enzyme, so maybe it's waiting there all these years to chew up our thienamycin...»

Once our colleagues understood these facts, the search for its effectiveness began immediately and, again, the obstacle was overcome. A compound which mimics thienamycin, with a similar structure,

cilastatin, was found. Recombining these two together, the enzyme was adequately deceived into choosing cilastatin and letting thienamycin act. It worked: 95% thienamycin was recovered in urine and high therapeutic levels in blood were achieved! In less than one year 4,000 patients had been studied and the results were outstanding.

Subsequent events then greatly complicated the whole chronicle. In the first steps for the production of the antibiotic three main phases could be established: the first in which 4,000 liters of culture had an activity of 2.4 mg/ml that, through resin extraction, yielded 1.64 g, with an activity of 940 mg/ml. This yield of 0.04% was nothing with which a product could be made. In the second phase, from 100,000 liters of culture, 100 g of pure substance were achieved, increasing the yield to 0.1%. Although an improvement, this was still far too low to insure future availability of the antibiotic. Then, after prodigious efforts, came success: the product was obtained by total chemical synthesis. For the first time in the history of MSD was such a complex product synthesized. We made it! It was the work of all of us (1, 6).

In research, you need the four German Gs: *Glück, Geduld, Geschick und Geld* [luck, patience, skill and money] (Paul Ehrlich)

How many years did the process take? The truthful answer is that thienamycin was sold in Spain only after 13 years of its discovery here!

As scientists, we could assume that the story has ended. But this is not true. After a drug is discovered, and after all the tricky problems for production of that drug are solved (?), more hurdles must be crossed: regulatory affairs, marketing and sales. Our colleagues in these activities need us as much as we need them. Since we all together compose the pharmaceutical industry, I must mention them here.

I have attempted to transmit at least, a small part of the complexity involved in a program like this, one whose role is the discovery of drugs useful to mankind. Our motivation derives from this, in the light of the outcome, all our efforts to solve the problems are worthwhile. The pleasure felt when «what you saw for the first time and you decided to select» produced, after many years, an antibiotic useful for curing patients may be remembered as one of the best moments in one's life. I feel extraordinarily lucky and happy to just have been a very, very small contributor to these true stories.

I have deliberately avoided mentioning names. There were many thousands of MSD people that have suffered and, also, have enjoyed the setbacks and accomplishments of these long years with the three products: fosfomycin, cefoxitin and thienamycin, that even a list of their names would be too long. Please consider I am here just as a humble representative of all of them.

There is one fortunate consequence of our work for which we congratulate ourselves: we are «guilty» of motivating many scientists all over the world to do much important work related to these discoveries. Perhaps, you, patient reader, are one of them. Thanks for it.

I would like to paraphrase two predecessors before finishing. After forty years of work in the natural product screening program, two thoughts have inspired me to continue; they are nearly «biblical» principles that keep us working on a job like this. The first is Perlman's admonition that «**Microorganisms are always right**», and the second is what Fleming said in the earliest days of antibiotic investigation: «**I did not discover penicillin, I was very lucky to stumble upon it.**»

References

1. Kahan, J. S., Kahan, F. M., Goegelman, R., Currie, S. A., Jackson, M., Stapley, E. O., Miller, T. W., Miller, A. K., Hendlin, D., Mochales, S., Hernández, S., Woodruff, H. B., Birnbaum, J. (1979). Thienamycin, a new β -lactam antibiotic. *J. Antibiotics* **32**, 1–12.
2. Martín, I., Mochales, S., Hernández, S., Mata, J. M. (1976). Cefoxitina. Nuevo antibiótico del grupo de las cefamicinas. I. Estudios «in vitro». *Anales del Instituto de Farmacología Española* **22**, 269–279.
3. Martín, I., Mochales, S., Hernández, S., Mata, J. M. (1977). Cefoxitina. *Farmaes* **139**, 285–298.
4. Stapley, E. O., Jackson, M., Hernández, S., Zimmerman, S. B., Currie, S. A., Mochales, S., Mata, J. M., Woodruff, H. B., Hendlin, D. (1972). Cephamycins, a new β -lactam antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**, 122–131.
5. Woodruff, H. B. (1959). Training for career in industrial microbiology: Industrial viewpoint. *Developments in Industrial Microbiology (Society for Industrial Microbiology)* **1**, 8–12.
6. Woodruff, H. B., Mata, J. M., Hernández, S., Mochales, S., Rodríguez, A., Stapley, E. O., Wallick, H., Miller, A. K., Hendlin, D. (1977). Fosfomycin: Laboratory studies. *Chemotherapy* **23**, 1–22.

Apuntes sobre la historia de la microscopía en España

Dimas Fernández-Galiano

*Profesor Emérito, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología,
Universidad Complutense de Madrid*

Recibido 4 julio 1994/Aceptado 30 julio 1994

Summary

Nowadays, many Spanish research centers have excellent electronic microscopy services. The current situation, however, should not allow us to forget that the initial steps of microscopy in Spain were very difficult. The construction of excellent optical microscopies in the late XIX century, and their almost immediate introduction in Spain, coincides with a period of thriving scientific activity in our country. Both micrography and histology saw the highlights of their development in Spain, with scientists such as Ramón y Cajal, Río Hortega, Ferrán, Simarro, among others, all of them widely known at present. This article evokes briefly the vicissitudes of Spanish microscopy, from its very beginning in 1843, when the *Allgemeine Anatomie* by Jacob Henle was translated into Spanish, to present. Scientific historical facts in this article are often accompanied with anecdotes, which show the human aspect of those great scientists. The persevering task carried out by researchers whose names have been recorded in the history of Spanish science and technology, have established the grounds in which our current development is based.

Key words: Spanish microscopy, Ramón y Cajal, micrography, histology, optical and electronic microscopes

Resumen

En la actualidad, numerosos centros de investigación españoles disponen de excelentes servicios de microscopía electrónica. Esta situación no debe hacernos olvidar que las etapas iniciales de la microscopía en España fueron mucho más dificultosas. La fabricación y casi inmediata introducción de

Correspondencia: Dimas Fernández-Galiano. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Tel.: 91-3944966. Fax: 91-3944962.

los excelentes microscopios ópticos de finales del siglo XIX coincide con un período de extraordinaria vitalidad científica en nuestro país. La micrografía y la ciencia histológica vivieron momentos que quedarían marcados en la historia con nombres propios que hoy son universalmente conocidos, como Ramón y Cajal, Río Hortega, Ferrán, Simarro, entre otros. En este artículo se evocan brevemente las vicisitudes de la microscopía en España, desde sus inicios en 1843, año de la traducción al español del texto *Allgemeine Anatomie*, de Jacob Henle, hasta nuestros días. Los hechos históricos vienen acompañados muchas veces por anécdotas que vivieron sus protagonistas, las cuales nos hacen ver el aspecto humano de los grandes científicos. La labor perseverante de investigadores cuyos nombres han quedado unidos a la historia de la ciencia y de la tecnología españolas forman la base sobre la que se asienta el desarrollo científico y tecnológico alcanzado en la actualidad.

Este artículo está basado en la conferencia pronunciada por el autor en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona el día 12 de mayo de 1994.

Introducción

Sin duda alguna, los primeros micrógrafos españoles fueron algunos de los ilustrados que a últimos del siglo XVII introdujeron en España la ciencia moderna, por lo que fueron llamados *novatores*. El más importante fue el valenciano Crisóstomo Martínez, que estudió las estructuras microscópicas óseas.

A lo largo del siglo XVIII la observación microscópica de los tejidos del cuerpo humano se cultivó en España de manera continuada. La guerra de la Independencia y el subsiguiente azaroso reinado de Fernando VII interrumpieron esos estudios, que se reanudaron a partir de la muerte del monarca, en 1833.

En 1843, los redactores de la Biblioteca Escogida de Medicina y Cirugía tradujeron al español la importantísima obra micrográfica *Allgemeine Anatomie*, de Jacob Henle, sólo dos años después de la aparición en Leipzig de la primera edición. Tras la revolución de 1868, establecida la libertad de enseñanza, se fundaron varias instituciones docentes privadas, fundamentalmente de carácter médico, en las que trabajaron eminentes doctores cuyos nombres forman parte de la historia de la microscopía española. Recordemos al médico y anatomista Pedro González de Velasco (1815–1882), creador de diversas instituciones, entre ellas el Museo Antropológico, conocido popularmente como Museo Velasco, del que fue fundador y mecenas; Rafael Martínez Molina (1816–1888), cirujano y anatopatólogo; Luis Simarro Lacabra (1851–1921), entre tantos otros. Estos primeros histólogos utilizaron microscopios, pero no se conocen detalles de su calidad, procedencia u origen.

Paradójicamente, el primer dato conocido sobre la existencia de un microscopio en un centro científico español, va acompañado de una nota peyorativa que Santiago Ramón y Cajal incluye en sus memorias (23). Copia del histólogo alemán Albert von Kölliker lo que éste cuenta en una carta a su familia sobre el Museo de Ciencias Naturales de Madrid: «Del director Graells debo contaros una anécdota. Luce en su laboratorio un magnífico microscopio francés, y como yo le preguntase si había investigado algo con él contestome que no había tenido todavía ocasión de aplicarlo a sus trabajos científicos por desconocer su manejo. Rogome que hiciera alguna demostración con dicho instrumento. Entonces procedí, en unión con un amigo (M. Witich) a mostrarle los glóbulos de la sangre humana y la fibra muscular estriada, ante cuyo espectáculo reveló alegría infantil y nos dio gracias calurosas.»

Mariano de la Paz Graells y Agüera (29) fue un competente zoólogo que no merece tal caricatura. Catedrático de Ciencias Naturales en la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelona, se trasladó posteriormente a Madrid, donde (en 1874) fue uno de los fundadores de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Profesor de Zoología durante 64 años en el Museo Nacional de Ciencias Naturales y director del museo durante veintitrés, organiza expediciones, reúne colecciones, promueve investigaciones de zoología aplicada, especialmente de piscicultura y ostricultura, e interviene activamente en la lucha contra la filoxera. Pero no es hombre de laboratorio, ni tiene afición alguna por los estudios microscópicos. De ahí el menospicio de Kölliker.

Probablemente, el microscopio que Kölliker vio a Graells sería adquirido por éste para el museo, pues, según dice Agustín J. Barreiro (3), "en 1845 fueron encargados a París algunos aparatos de Física para los experimentos más necesarios por la cantidad de 13.000 reales." Hacia la mitad del siglo XIX se utilizaban microscopios en las cátedras del Museo. En 1854 se presentó al Ministro «una lista de los aparatos... absolutamente necesarios para las demostraciones de las cátedras de Geología, Botánica y Zoología», lista en la que figuran un «microscopio de Euler» y un «microscopio de Obertein.» Claro que de la existencia de microscopios en los centros superiores de enseñanza no se deduce necesariamente que los profesores los utilizasen con provecho, ni siquiera que los considerasen como instrumentos útiles para la investigación. Y en parte tenían razón, pues hasta entrado el siglo XIX las imágenes proporcionadas por el microscopio estaban muy alteradas por fuertes aberraciones cromáticas y de esfericidad (Fig. 1).

El histólogo portugués A. Celestino da Costa (7), recuerda, refiriéndose al francés Mario Francisco Bichat, autor del concepto de tejido como unidad elemental del organismo: «El padre de la Histología no quería nada con ese instrumento, del que desconfiaba, por otra parte con cierta razón, pues en su vida no pasó de ser un mal utensilio, causante de muchas ilusiones e inferior a los métodos seguros de los que él se servía.»

En 1820, el alemán Fraunhofer construyó lentes acromáticas, es decir corregidas de la perturbadora aberración cromática, lo que permitió a Chevalier, en Francia, a Amici, en Italia, y a Lister, en Inglaterra, construir microscopios que proporcionaban imágenes de calidad. La consecuencia fue el progreso de la citología, la histología y la anatomía microscópica y el nacimiento de la teoría celular de Schleiden (1838) y Schwann (1839), así como la aparición de la obra de Henle (1841), que tan bien estudiada ha sido por mi amigo el historiador de la medicina Agustín Albarracín Teulón (2).

Claro está que la deficiente calidad de los instrumentos ópticos no nos puede servir para excusar a los profesores y científicos rutinarios o desidiosos, personajes que, por desgracia, han existido en todas las épocas, en España y en otros países. Limitándonos al nuestro, anota Cajal en sus memorias que «cierto catedrático de Madrid» calificaba la Anatomía Microscópica de «Anatomía celestial», y añade que «la frase hizo fortuna» (!)

Otra muestra de la desidia que reinaba por aquellas fechas en nuestras universidades se la debemos también a Cajal que, en 1877, siendo Auxiliar de Anatomía de la Facultad de Medicina en Zaragoza, difícilmente podía acceder al único microscopio que había en la facultad, en vista de lo cual adquirió en Madrid (a un comerciante de la calle del Prado, Francisco Chenel) un microscopio francés de marca Verick, por el que pagó, de su propio bolsillo, 140 duros en cuatro plazos. Nos puede dar una idea de lo que representaba esta cantidad el saber que en 1884, cuando obtuvo la cátedra de Anatomía de la Facultad de Medicina de Valencia, ganaba 52 duros al mes.

La ciencia se hacía por entonces con una gran austeridad de medios, y no solamente en España. Así, el gran microbiólogo alemán Robert Koch (1843–1910) empezó como médico de un barco, y se hizo

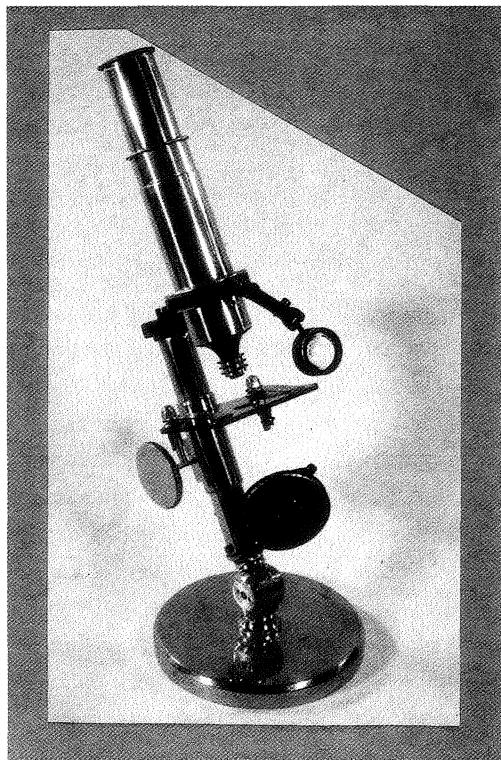


FIG. 1. Microscopio monocular Leitz de mediados del siglo XIX. El enfoque sólo podía hacerse con el tornillo lateral, que determinaba el desplazamiento de la platina. Véase la lente colectora, acoplada al tubo del microscopio, para hacer una iluminación episcópica. (Cortesía de Mercè Durfort, Museo de la Microscopía, Unidad de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.)

médico rural al casarse, posiblemente por influencia de su esposa, que no deseaba llevar una existencia nómada. Esta inteligente mujer demostró conocer perfectamente los gustos y vocación de su marido y así, cuando Koch cumplió los 28 años, recibió de ella el regalo que más podía complacerle, un microscopio. Con este instrumento, y en su propia casa, se dedicó a la investigación médica, su gran vocación. En su laboratorio casero, la patata cocida fue el primer medio sólido para el aislamiento de los microorganismos en colonias, y las ollas, platos y queseras de la cocina, los primeros recipientes de la técnica bacteriológica.

El laboratorio que Jaime Ferrán habilitó, en unión de su fiel ayudante Inocente Paulí, para estudiar el agente del cólera en 1885, en Tortosa, sería parecido al de Koch. De ello nos da una idea el fragmento del libro *;Vae Inventoribus Magnis!*, de Ángel Pulido, gran apologista de Ferrán (22): «Ferrán y Paulí habían establecido un laboratorio en la cocina de una casa que tenía en construcción el ilustrado ginecólogo Dr. Candela. En ella se había habilitado lo más indispensable: gas, agua, incubadoras, cubos, frascos, microscopios, etc., y allí se hacían las siembras y se recogían los cultivos... Por la mañana, por la tarde y por la noche, se les encontraba en la faena. Los matraces contenían los cultivos vivos,... y la jeringa estaba dispuesta siempre a la inoculación...»

La austeridad y pobreza de medios a finales del siglo pasado era el denominador común de muchos microscopistas. Lo confirma el caso de Eduardo Abreu, ilustre médico portugués y miembro de la Real Academia de Ciencias del vecino país, que, cuando tuvo conocimiento de las vacunaciones que contra el «cólera morbo asiático» estaba practicando Ferrán en el levante español, emprendió el viaje y se plantó en Tortosa, llevándose consigo el material científico que juzgó imprescindible para el estudio del microorganismo y de los métodos del bacteriólogo catalán.

Abreu escribió un libro basado en sus experiencias con Ferrán, que se agotó en seguida. Se tradujo después al español por iniciativa y encargo de Ángel Pulido, quien escribió el prólogo de esa edición (1). En un capítulo detalla el material que llevó consigo: «1º Un microscopio de Verich (sic), con un objetivo de inmersión nº 10 y una (sic) ocular nº 4, lo que me daba un aumento de 1,000 diámetros, según la tabla del constructor. Es lo cierto, no obstante, que hechas las debidas correcciones, nunca el poder de los objetivos es el que dicen los constructores, como asimismo que la lente de inmersión nº 10, sólo alcanzaba 900 diámetros; ya este aumento resultaba precioso para la observación de la bacteria. Estando, además, deterioradas las oculares 1 y 2, yo no podía disponer de pequeños aumentos. Y hay ciertas particularidades en el estudio de las bacterias, que deben ser observadas en globo; lo que se consigue con débiles aumentos, 90 a 200 diámetros. Mi maestro y amigo el Dr. Costa Simoes me cedió un buen microscopio Nachet, con el cual yo podría obtener aumentos lineales sucesivos, de 80 a 70 diámetros.» Sin comentarios...

Auge de la microscopía española a finales del siglo XIX

Si en 1820, con la fabricación de los objetivos acromáticos, se daba el primer paso para convertir el microscopio en un instrumento verdaderamente útil para la biología, el segundo y decisivo paso se daría en 1883, cuando el físico alemán Ernst Abbe desarrolló su famosa teoría sobre el microscopio. En la ciudad de Jena se asoció al fabricante de vidrios especiales Schott y al constructor de microscopios Carl Zeiss, lo que permitió la fabricación de los objetivos apocromáticos, que corregían la aberración cromática y la de esfericidad. El gobierno alemán concedió una subvención de 60.000 marcos a Abbe, Zeiss y Schott, quienes crearon una potente industria óptica. A la decisiva mejora en las lentes se sumaron otras novedades, como la del famoso condensador de Abbe.

La introducción de alguno de estos microscopios en España fue muy rápida, a lo cual contribuyó la epidemia de cólera que asolaba la Península en 1885, principalmente en la zona de levante y Aragón. La epidemia, que afectó durante el verano de ese año a más de 300.000 personas, causó casi 120.000 fallecimientos, provocando el terror en la población y la consiguiente alarma en los gobernantes.

Las ideas sobre la enfermedad eran muy confusas, pues hacía solamente un año que Koch había descubierto el agente causal, y no se conocían tratamiento ni profilaxis, salvo la precaución de hervir el agua. La clase médica, sin embargo, dudaba todavía del origen hídrico del contagio.

En este clima de preocupación y con la epidemia en plena expansión, comenzó Ferrán sus inoculaciones. Como es sabido, se produjo una amplia y confusa polémica sobre la vacuna anticolérica, con apasionamientos y descalificaciones junto a algunas actitudes serenas y científicas, como la que mostró la Diputación de Zaragoza, la provincia más afectada de España, con 54.943 casos y 12.788 fallecimientos. Esta corporación encomendó el estudio y prevención de la enfermedad a Santiago Ramón

y Cajal, entonces prestigioso catedrático de la Universidad de Valencia. Cajal se trasladó aquel verano a la «Torre de las Canales» casa de campo propiedad de su padre, donde estableció un «laboratorio de campaña» y estuvo trabajando y sacando importantes conclusiones científicas. Esta nueva experiencia fue para él tan apasionante que, según propia confesión, estuvo a punto de cambiar la histología por la bacteriología.

Su trabajo le valió un premio excepcional, pues la Diputación, agradecida al «celo y desinterés» mostrados por Cajal, le regaló un magnífico microscopio Zeiss, un «espléndido *Statif* (sic) con profusión de objetivos, entre otros el famoso 1,18 de *inmersión homogénea*, última palabra entonces de la óptica magnificante». Éste fue, probablemente, el primer microscopio con óptica apocromática que llegó a España, dos años después de su aparición en Alemania, y que permitió a Cajal jubilar su «pobre microscopio Verick» que, en sus propias palabras, parecía un «desvencijado cerrojo» al lado del nuevo (23). (La marca Verick dejó de fabricarse hacia el año 1900, siendo sustituida por la marca Sniassne.)

Muy pronto tendría Cajal otros microscopios con óptica apocromática. El 12 de diciembre de 1887 tomó posesión de la cátedra de Histología e Histoquímica Normales y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, ubicada entonces en el viejo y ruinoso Hospital de la Santa Cruz, pues la construcción del proyectado nuevo edificio no finalizaría hasta 1907. Sería el primer catedrático de esta asignatura, pues hasta entonces la histología sólo se cursaba en el doctorado de Medicina, en la Universidad de Madrid. Al tratarse de una cátedra nueva, no disponía de local, pero el decano, Dr. Rull le cedió «una sala, relativamente capaz, destinada a las manipulaciones y demostraciones de Histología y Bacteriología, amén de un buen microscopio Zeiss y de algunas estufas de esterilización y vegetación», tal como escribe, en 1917, en sus "Recuerdos" (23). Es posible, sin embargo, que la memoria no le fuera del todo fiel, porque mi buena amiga Mercè Durfort, en el capítulo correspondiente a Cajal del Simposio «Història de la Universitat de Barcelona» dice explícitamente que con mucho esfuerzo consiguió dos buenos microscopios, un Leitz y un Reichert, y una pareja de Nachet, además del Zeiss regalo de la Diputación de Zaragoza y el viejo Verick, que, como sabemos, eran de su propiedad. Y añade Mercè Durfort, con admiración: «Un parell de micròtomes de congelació i un de lliscada completaven la instrumentació del geni de les tècniques d'impregnació amb sals de metalls pesats.» (9)

Con el traslado de Cajal a Barcelona, donde permaneció hasta 1892, comienza la época más gloriosa de su vida científica y de la Escuela Española de Histología, no solamente por su labor y la de sus discípulos, sino porque esta ciencia alcanza un respaldo social muy importante (14).

Cajal no fue, cronológicamente, el primer histólogo de España, pues hacia la mitad del siglo pasado proliferan una serie de instituciones privadas que imparten diversas ramas de la medicina, y en muchas de ellas se montan laboratorios micrográficos donde a veces se llevan a cabo excelentes trabajos. Destaca la monografía sobre el cáncer de mama que publicó Martínez Molina, en 1853, y el *Tratado de Histología y Ovología* de López Mateos, redactado en 1847 y publicado en 1853. Además de Martínez Molina, que apoyó la carrera científica de Cajal en sus comienzos, otros tres microscopistas influyeron notablemente en la dedicación micrográfica de Cajal: Maestre de San Juan, López García y Simarro.

Maestre, catedrático de Anatomía de la Facultad de Medicina, y fundador en 1874 de la Sociedad Española de Histología, examinó a Cajal como alumno libre de doctorado en 1876. Aprobó al joven «fácilmente» en Histología, «aunque ni había visto una célula ni era capaz de efectuar un sencillo análisis micrográfico.» Durante ese y posteriores viajes a Madrid, Cajal tuvo ocasión de ver en la cátedra de Histología las magníficas preparaciones que amablemente le enseñó López García, lo cual, según el

propio Cajal, decidió su vocación micrográfica. Simarro, que procedía también de la Escuela de Velasco, trabajó en París de 1880 a 1885 con Ranvier y Charcot y, a su regreso a Valencia, fundó un laboratorio neurológico. Su influencia sobre Cajal fue posterior pero muy importante, ya que fue quien le enseñó la ejecución del método de Golgi; más tarde, Cajal modificó el «proceso fotográfico» de Simarro, consiguiendo el método del nitrato de plata reducido, su más famosa técnica y una de las más fértils.

La microscopía española en el primer tercio del siglo XX

La labor científica de Cajal, cada vez más copiosa y con mayor difusión en el extranjero, culminó con el Premio Nobel en 1906. Su fama y éxitos en el extranjero contribuyeron a aumentar el número de histólogos y la calidad de las investigaciones, y alrededor de 1900 se crearon cátedras de Histología en las Facultades de Medicina. En la Facultad de Ciencias de Madrid, única en la que entonces se impartía la Licenciatura en Ciencias Naturales, se creó en 1902 la primera cátedra de Histología Vegetal y Animal. La ocupó al año siguiente José Madrid Moreno, bacteriólogo y anteriormente jefe del Gabinete Micrográfico Municipal de Madrid, quien publicó trabajos de histología de invertebrados y de histología vegetal, así como un manual de Histología Vegetal y Técnica Micrográfica (18).

La Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona tardó algunos años en impartir la morfología microscópica. En 1910 se constituyó la Sección de Ciencias Naturales, y en ella la cátedra de Técnica Micrográfica e Histología Vegetal y Animal. La cátedra fue ocupada, en 1911, por Emilio Fernández Galiano, mi padre, quien permaneció en Barcelona hasta 1934, año en el que se trasladó a Madrid por la jubilación de José Madrid Moreno. Su actividad científica se centró en dos campos: la morfología y fisiología de los protozoos y la histología de invertebrados y vertebrados (fundamentalmente, el tejido muscular, y en especial de la fibra muscular cardiaca). Uno de los microscopios que utilizó durante ese tiempo se representa en la Fig. 2. Sus mejores logros en Barcelona los obtuvo con los protozoos, donde hizo algún descubrimiento fisiológico importante, como, por ejemplo, que la contracción del pedúnculo de las vorticelas obedece a la ley del "todo o nada." Se adelantó diecisésis años a Chatton y Lwoff, al aplicar, en 1916, la impregnación argéntica a los protozoos ciliados, trabajo que publicó en la revista *Treballs de la Societat de Biologia* de Barcelona (11).

Desde principios de siglo hasta la trágica interrupción de 1936, la histología española, prestigiada en todo el mundo, giró en torno a Cajal y sus discípulos, con la utilización de los métodos de impregnación argéntica del maestro y el estudio del sistema nervioso de los vertebrados, especialmente de los mamíferos.

La Escuela Española de Histología tuvo varias figuras señeras, casi todos médicos y profesores. Entre ellas, Pedro Ramón y Cajal, hermano del maestro; Jorge Francisco Tello Muñoz, discípulo predilecto y su sucesor en la cátedra; Nicolás Achúcarro Lund, uno de los mejores investigadores de la Escuela Española, que murió en 1918 a los 38 años de edad; el naturalista y médico Domingo Sánchez Sánchez, que se especializó en el estudio de los centros nerviosos de los insectos; el zaragozano Rafael Lorente de Nò, que emigró a los Estados Unidos, donde trabajó como neurólogo en el Instituto Rockefeller de Nueva York; y Fernando de Castro y Rodríguez, uno de los últimos discípulos de Cajal.

No puede olvidarse la figura de Pío del Río Hortega y su importantísima contribución a la histología española (17). Nacido en 1882 en Portillo, Valladolid, se licenció en Medicina y ejerció de médico rural en su pueblo. En 1913 fue a Madrid para especializarse en cáncer. Al no encontrar una acogida muy

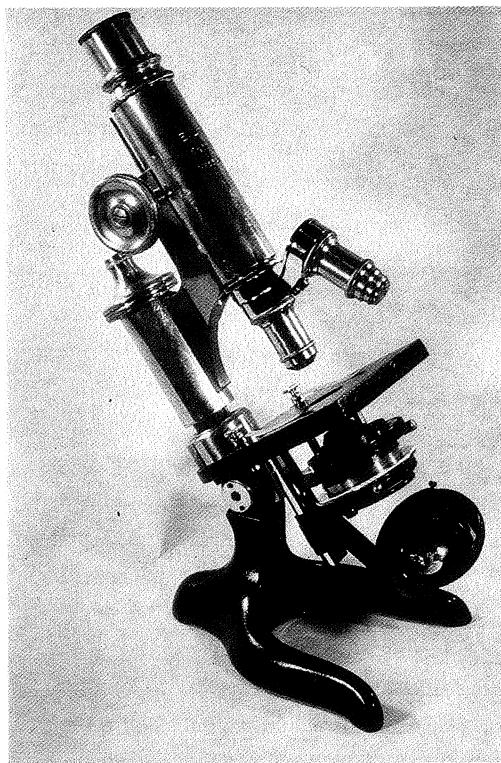


FIG. 2. Microscopio monocular Leitz de finales del siglo XIX, que fue utilizado por Emilio Fernández Galiano cuando ocupaba la cátedra de Histología Vegetal y Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona. Estaba dotado de dos tornillos, macro y micrométrico, revólver con dos objetivos y un condensador tipo Abbe, de gran abertura numérica. Una charnela permitía articular el estativo. Este modelo fue utilizado durante muchas décadas para las prácticas de Histología. Santiago Ramón y Cajal usó uno similar, si bien prefería el Zeiss de su propiedad. (Cortesía de Mercè Durfort, Museo de la Microscopía, Unidad de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.)

entusiasta por parte de Cajal y Tello, se fue a trabajar con Achúcarro, director del Laboratorio de Histopatología del Sistema Nervioso, en el Museo Nacional de Ciencias Naturales. Estuvo en París y Berlín, pero tuvo que repatriarse al declararse la Guerra Europea en 1914. Regresó al laboratorio de Achúcarro, que le tenía en gran estima, pero éste se había trasladado al Museo Velasco, donde estaba también el Laboratorio de Investigaciones Biológicas que dirigía Cajal.

En 1917, la enfermedad de Achúcarro, que murió al año siguiente, obligó a Río Hortega a hacerse cargo del Laboratorio, siendo nombrado director en 1920. Estalló una tormenta que venía larvándose desde su regreso. Cajal le profesaba una antipatía visceral y la coexistencia bajo un mismo techo de dos equipos independientes provocó continuos roces. La situación llegó al límite y, en octubre del mismo año, Cajal dirigió al vallisoletano una durísima carta en la que, a la par que le reprochaba una supuesta conducta desleal para con su persona, le decía literalmente «que no vuelva a poner los pies en el laboratorio» (17). Río Hortega se trasladó con sus discípulos a los locales habilitados en la Residencia de Estudiantes, quedando así físicamente escindida la Escuela Española de Histología: Cajal con sus colaboradores, en Atocha; Río Hortega con los suyos, en los altos del Hipódromo.

Lo cierto es que la Escuela Española de Histología es una formidable obra colectiva con tres pilares fundamentales: Santiago Ramón y Cajal, Nicolás Achúcarro y Pío del Río Hortega, los tres protagonistas de una obra científica en la que obtuvieron unos magníficos resultados, especialmente en la investigación del sistema nervioso (8). Crearon numerosos métodos de impregnación argéntica, entre los cuales el del *nitrato de plata reducido* de Cajal, el *tanoargéntico* de Achúcarro y el del *carbonato de plata* de Río Hortega, alcanzaron la mayor notoriedad.

Yo conocí de niño a Río Hortega, en un viaje que hizo a Barcelona hacia 1932, y durante el cual estuve invitado a comer por mi padre en la mesa familiar, tal como se hacía por entonces. Aunque éramos niños, D. Pío dejó en mí y en mis hermanos un recuerdo imperecedero. Era un hombre cordial, tímido y de una gran educación («de carácter apocado», decía de sí mismo), y muy cariñoso con los niños. A los postres nos confeccionaba unas sabanitas caladas con papel de fumar redoblado y pellizado por sus ágiles dedos.

Si comparamos estas «vidas paralelas», podemos afirmar que mientras Cajal fue un triunfador durante su larga vida, a Río Hortega no le sonrió demasiado el triunfo social. No obtuvo el Premio Nobel (lo que hubiera sido muy justo), ni pudo ingresar en la Real Academia Nacional de Medicina. En efecto, en 1934, tras el fallecimiento de Cajal, se le propuso para ocupar el sillón que había dejado vacante, pero los académicos eligieron otro candidato (que ni siquiera llegó a tomar posesión). El desaire produjo una violentísima crisis entre los académicos, que se saldó con la dimisión del neurólogo Gonzalo Rodríguez Lafora, quien abandonó para siempre la Academia, no sin antes escribir un artículo en un periódico de Madrid poniendo de vuelta y media a los académicos culpables del «bochorno de no votar a Río Hortega» (19). Es más, mientras Cajal murió en su patria, a edad muy avanzada, Río Hortega tuvo que emigrar en 1939 y falleció en Argentina, en 1945, a la edad de 63 años, de un tumor del que él mismo hizo el diagnóstico anatopatológico.

El desarrollo de la óptica del microscopio y de la microfotografía

Una característica común a los histólogos españoles de la época fue su extraordinaria habilidad para el dibujo: las ilustraciones de sus trabajos y libros son auténticas obras de arte. Y no deja de ser curioso que, siendo muchos de ellos aficionados a la fotografía, especialmente Simarro y Cajal, no emplearan casi nunca la microfotografía para ilustrar sus trabajos, sino el dibujo.

Pero no sólo estaba por entonces muy adelantada la histología, sino también el conocimiento del microscopio como instrumento y de la microfotografía. Son ejemplo de ello dos figuras notorias, los ingenieros Joaquín María de Castellarnau y de Lleopart (1848–1943) y Domingo de Orueta Duarte (1862–1926), ambos socios y presidentes de la Real Sociedad Española de Historia Natural.

Castellarnau, ingeniero de montes segoviano, que dominaba diferentes disciplinas científicas, debe su celebridad a sus estudios sobre microscopía (8). Fue uno de los primeros en comprender y divulgar la teoría de la visión microscópica de Abbe. La memoria *Visión microscópica. Condiciones de verdad de la imagen microscópica y modos de expresarla* se publicó en 1885. En 1911 las conferencias de Castellarnau en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid fueron publicadas por la Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas (6).

Orueta Duarte, ingeniero de minas malagueño, excelente microscopista y seguidor de Castellarnau, colaboró con varios fabricantes de microscopios, entre ellos Carl Zeiss, de Jena, y Watson and Sons, de Londres (12). Escribió artículos científicos sobre microscopía, aunque su obra fundamental es el libro *Teoría y Manejo del Microscopio*, publicado en Madrid en 1922. A un nivel científico inferior puede citarse un artículo de veinte páginas del jesuita Pedro Valderrábano, *La fotomicrografía aplicada a las Ciencias Naturales*, presentado en 1908 en Zaragoza, en el Primer Congreso de Naturalistas Españoles (30).

No puedo dejar de citar aquí a un personaje singular, el catedrático de Física y Química del Instituto de Pontevedra Ernesto Caballero, hombre hábil y paciente donde los hubiera. Especialista en diatomeas, se dedicaba a la confección de preparaciones microscópicas en las que aparecían ordenadas sistemática y artísticamente cientos de diatomeas diferentes. Publicó su técnica en 1897 en los *Anales de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, y más tarde en los *Trabajos del Museo Nacional de Ciencias Naturales*. En esas páginas aparecen microfotografías de preparaciones increíblemente bellas y complicadas: una de ellas tiene 1142 diatomeas perfectamente ordenadas y clasificadas (4, 5).

Entonces, como ahora, la principal fuente de información que tenían los microscopistas españoles para conocer y aplicar las técnicas de preparación de células y tejidos eran las revistas científicas extranjeras. Pero, además, durante el primer cuarto de siglo actual, los microscopistas se valían principalmente de libros de técnica histológica franceses (Rubenthaler [26], Langeron [16]) o alemanes, especialmente de la completísima *Enzyklopädie der mikroskopischen Technik*, en dos tomos, que en 1910 editaron cinco grandes de la Histología y de la Microbiología alemana de la época: Ehrlich, Krause, Mosse, Rosin y Weigert (10). Dos profesores españoles publicaron en esta época sendos manuales de técnica histológica, Arturo Núñez en Salamanca, en 1918 (reeditado en 1924), y José Madrid Moreno en Madrid, en 1921. También se editó en 1922 un libro sobre el microscopio con abundantes notas sobre técnica, *El microscopio y sus aplicaciones*, de H. Hager, traducido del alemán por Francisco Pardillo, catedrático de la Universidad de Barcelona (21, 18, 15).

Pero lo cierto es que los investigadores españoles no tuvieron a su disposición un libro de técnica histológica útil y completo en español hasta que en 1928 Emilio Fernández Galiano tradujera del alemán la *Guía-Formulario de Técnica Histológica*, de B. Romeis (25). En 1929, el profesor de la Facultad de Medicina de Barcelona, Diego Ferrer de la Riva, publicó un notable libro de técnica histológica (13). El año anterior a su fallecimiento, Cajal, en colaboración con Fernando de Castro, publicó su excelente obra especializada *Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso* (24).

La introducción de la microscopía electrónica

De 1927 a 1945 (con la excepción de los años de la Guerra Civil) se publicó en Madrid la revista *Investigación y Progreso*, dedicada a las novedades en el campo de la ciencia y la cultura. De influencia germánica, abundaban los artículos de autores alemanes, como también lo era la formación de muchos colaboradores españoles. Parece que en España la primera noticia sobre el microscopio electrónico fue un artículo de Ernst Ruska (27), *El microscopio de rayos catódicos como ultramicroscopio*, publicado en esa revista en 1934. El autor había creado ese instrumento que patentó, junto con su colaborador Bodo von Borries, en 1932. La noticia había llegado a España muy rápidamente y de primera mano. La misma

revista publicó en 1940 dos trabajos más sobre lo que entonces se denominó *hipermicroscopio*, uno firmado por los hermanos Ruska y von Borries (28) y el otro por el ingeniero Heinz Müller (20).

Desgraciadamente, los trágicos acontecimientos de la Guerra Civil y la inmediata segunda Guerra Mundial, aislaron científicamente a España y retrasaron en más de una década la llegada del primer microscopio electrónico. Esto sucedió en 1947, cuando el Instituto Nacional de Técnica Aeronáutica (hoy Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial), adquirió un microscopio electrónico, que se instaló en Torrejón de Ardoz, y se dedicó a investigaciones metalográficas, de acuerdo con los fines del I.N.T.A. Era un aparato de fabricación norteamericana, marca C.S.F., todavía muy primitivo, pues las lentes eran a base de condensadores (Fig. 3). El I.N.T.A. tuvo después un microscopio de fabricación checa, el Tesla RS 242A, dotado ya de lentes electromagnéticas. Además de investigaciones sobre materiales metálicos, se hicieron también algunas fotografías de bacterias.

A partir de entonces los principales centros de investigación, especialmente los de estudios biológicos, se van dotando de microscopios electrónicos. Así, en 1956, el Instituto Jaime Ferrán del Consejo Superior de Investigaciones Científicas adquirió un microscopio Siemens Emskop 1A, con el que se realizaron interesantes trabajos sobre bacterias y virus parásitos de vegetales, a cargo de Miguel

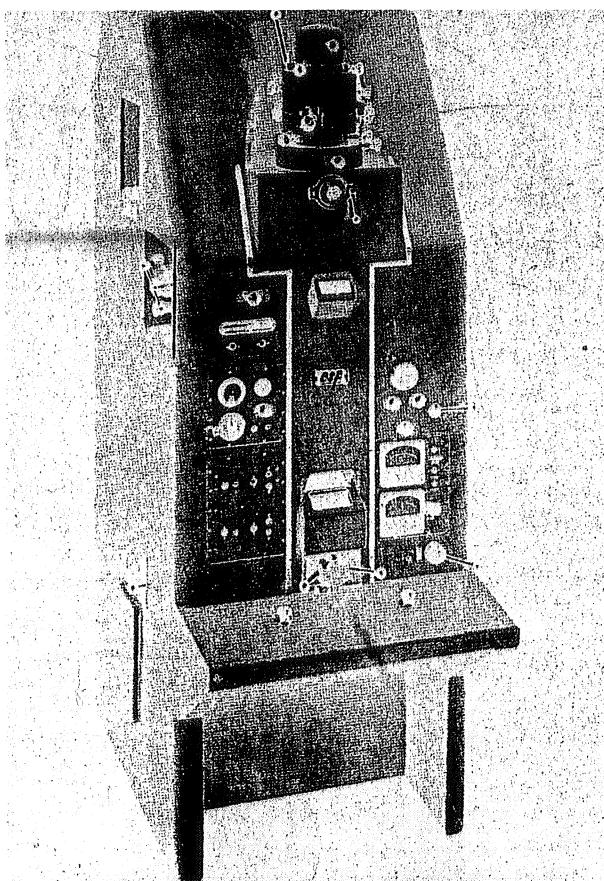


FIG. 3. Microscopio electrónico C.S.F. norteamericano, instalado en el Instituto Nacional de Técnica Aeronáutica en 1947. Estaba dotado de condensadores, en lugar de lentes electromagnéticas, como los actuales. (Cortesía del ingeniero aeronáutico Miguel Ángel Martín González, del Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial.)

Rubio. Por las mismas fechas, se instaló en el Instituto Antituberculoso de la Caja de Pensiones de Barcelona un AEG-Zeiss, que estuvo a cargo del microbiólogo médico Conrad Xalabarder, y que se dedicó al estudio del bacilo tuberculoso. Fue el primero en Barcelona, al que siguió un aparato Siemens en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Ciudad Condal.

Hasta aproximadamente 1955, el microscopio electrónico, de clara utilidad para físicos e ingenieros, no había mostrado una eficiencia semejante para los biólogos, quienes no lo podían utilizar más que para estudiar réplicas metalizadas de bacterias y virus. El progreso de las técnicas auxiliares y la posibilidad de hacer cortes ultrafinos del material celular amplió considerablemente su aplicación. El resultado es lo que hoy se conoce como microscopía electrónica de transmisión, tan decisiva para el desarrollo de la histología, de la citología y de la biología en general. Yo mismo, en 1956, tuve el privilegio de manejar el único microscopio electrónico que por aquellas fechas existía en el Laboratoire d'Évolution des Étres Organisés del Boulevard Raspail de París, que dirigía entonces el ilustre Profesor Pierre-Paul Grassé, y de hacer algunas fotografías de la opalina *Cepedea dimidiata*.

La aparición de la microscopía electrónica de transmisión, y después de la de barrido, convirtió en indispensables estos instrumentos que, en la década de 1950 a 1960, gracias a la mejora de las condiciones económicas, empezaron a aparecer en las universidades por dos vías diferentes: a través de la adquisición por diferentes cátedras y departamentos, y gracias a la instauración de Servicios de Microscopía Electrónica de carácter autónomo, no ligados directamente a ninguna cátedra. Este último fue el caso en la Universidad de Madrid (actual Complutense) y en la de Barcelona.

El Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Madrid se estableció en 1952 en el sótano del Pabellón de la Sección de Físicas de la Facultad de Ciencias, a iniciativa de su primer director, Luis Bru Villaseca, catedrático de Física del Estado Sólido. Con él colaboraron los Dres. Serna y Rojo Alaminos. Los aparatos al comienzo fueron una cámara Finch de difracción de electrones y un microscopio electrónico Philips 500. Posteriormente se incorporó al servicio el Dr. González Santander, que puso a disposición de los biólogos dos aparatos más, un Jeol 100 y un Jeol 200. Con el tiempo, el Servicio se trasladó a un edificio independiente y se ampliaron y mejoraron notablemente sus aparatos. Este centro, denominado hoy *Luis Bru*, dirigido por el químico Carlos Barba, se inauguró el 11 de julio de 1988. Está dotado con cuatro microscopios electrónicos muy modernos, todos ellos modelos de 1991, a saber, un Zeiss 902, un Jeol-SM 6400, un Jeol-2000 FX Temscan y un Jeol-4000 EX. Hay que destacar este último, con 400.000 voltios de aceleración, el de mayor potencia en España y del que, cuando se instaló, sólo había otros cuatro iguales en Europa.

El Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona vino algo más tarde y su fundación, instalación y funcionamiento en los primeros tiempos se debieron a la incesante labor de iniciativa y colaboración del catedrático de Histología Vegetal y Animal de la Facultad de Ciencias, Luis Vallmitjana Rovira.

Luis Vallmitjana logró que ya el 30 de noviembre de 1956 se constituyese en la Facultad de Ciencias una comisión para llevar a cabo la realización de un centro de este tipo. Las largas y fatigosas gestiones culminaron en 1964, con la concesión de un crédito del Ministerio de Educación y Ciencia para la puesta en marcha de un Gabinete de Microscopía Electrónica en las universidades de Madrid y Barcelona. Se procedió, pues, a la construcción de un pabellón en el edificio central de la Universidad de Barcelona (en la Plaza de la Universidad) y a la adquisición de dos microscopios electrónicos, uno principal, un Philips 200, y otro auxiliar, un Tesla BS-242-DN, así como de ultramicrotomos y material fotográfico.

Quedó instalado en julio de 1966 y las primeras fotografías se obtuvieron en octubre de ese año, aunque la inauguración oficial se había hecho el 27 de junio, en presencia del Ministro de Educación y Ciencia, Manuel Lora Tamayo, que era también catedrático (de Química Orgánica) de la Facultad de Ciencias de Madrid. Luis Vallmitjana fue nombrado director del centro en diciembre de 1966.

Tanto el Centro de Microscopía Electrónica de Madrid como el de Barcelona gozan hoy de medios mucho más valiosos que en sus comienzos. Pero no hay que olvidar que su nacimiento, modesto y laborioso, fue posible gracias a la entrega, tesón y eficacia de sus dos fundadores, que me honran con su amistad y a quienes quiero dedicar este artículo: Luis Bru Villaseca, el físico, y Luis Vallmitjana Rovira, el biólogo.

Bibliografía

1. Abreu, E. (Sin fecha de impresión). El Doctor Ferrán y el problema científico de la vacunación colérica. (Trad. del portugués por Sebastián Gomila). Impr. La Renaixensa, Barcelona.
2. Albaracín Teulón, A. (1983). La teoría celular. Alianza Universidad, Madrid.
3. Barreiro, A. (1944). El Museo Nacional de Ciencias Naturales. Prólogo de Eduardo Hernández-Pacheco. C.S.I.C., Madrid.
4. Caballero, E. (1897). Técnica de las preparaciones microscópicas sistemáticas. Procedimientos originales. *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural* **26**, 217–241.
5. Caballero, E. (1925). Técnica de las preparaciones microscópicas sistemáticas. *Trabajos del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Serie botánica* **20**, 1–73.
6. Castellarnau, J. M. (1911). Teoría general de la formación de la imagen en el microscopio. Junta para ampliación de estudios e investigaciones científicas. Impr. de Eduardo Arias, Madrid.
7. Celestino da Costa, A. (1945). O conceito de sistema celular. Impr. Lucas, Lisboa.
8. Díaz Tosaos, F. (1944). El Sr. Castellarnau † 23 Julio 1943. Nació en 1848 (Nota necrológica). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* **42**, 41–45.
9. Durfort, M. (1988). Santiago Ramón y Cajal i la Universitat de Barcelona (1887–1892). *In Història de la Universitat de Barcelona*, pp. 351–363. Publicacions de la Universitat de Barcelona, Barcelona.
10. Ehrlich, P., Krause, R., Mosse, M., Rosin, H., Weigert, K. (1910). *Enzyklopädie der mikroskopischen Technik*. Vol. 2. Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien.
11. Fernández Galiano, E. (1916). La acción del nitrato de plata reducido (fijación al urano-formol) sobre algunos protozoos. *Treballs de la Societat de Biologia* **6**, 1–15.
12. Fernández Navarro, L. (1926). Don Domingo de Orueta y Duarte. (Nota necrológica.) *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* **26**, 214–226.
13. Ferrer de la Riva, D. (1929). Manual de Técnica Histológica. Lib. Castells, Barcelona.
14. Ferrer, D. (1989). Cajal y Barcelona. Fund. Uriach, Barcelona.
15. Hager, H. (1922). El microscopio y sus aplicaciones. (Trad. española de Francisco Pardillo.) Ed. Gustavo Gili, Barcelona.
16. Langeron, M. (1912). *Précis de Microscopie*. Ed. Masson et Cie., Paris.
17. López Piñero, J. M. (1990). Pío del Río Hortega. Fund. Banco Exterior, Madrid.
18. Madrid Moreno, J. (1921). Elementos de Histología Vegetal y Técnica Micrográfica. Lib. General de Victoriano Suárez, Madrid.
19. Matilla, V. (1984). Historia de la Real Academia Nacional de Medicina. (Narrativa testimonial.) Ind. Gráf. España, Madrid.

20. Müller, H. (1940). Fundamentos y desarrollo del hipermicroscopio. *Investigación y Progreso* **11**, 3–12.
21. Núñez García, A. (1918). Manual de Técnica Histológica. Francisco Núñez, Salamanca. (Segunda edición en 1924.)
22. Pulido Fernández, A. (1921). ¡Vae Inventoribus Magnis! La odisea de un descubrimiento médico grandioso. El Doctor Ferrán y el cólera morbo asiático en la guerra europea. Imp. La Renaixensa, Barcelona.
23. Ramón y Cajal, S. (1917). Recuerdos de mi vida. Tomo II. Impr. y Libr. de Nicolás Moya, Madrid.
24. Ramón y Cajal, S., de Castro, F. (1933). Técnica micrográfica del Sistema Nervioso. Tipografía Artística, Madrid.
25. Romeis, B. (1928). Guía-Formulario de Técnica Histológica. (Trad. española de E. Fernández Galiano.) Ed. Labor, Barcelona.
26. Rubenthaler, G. (1908). Précis de Technique Histologique et Cytologique. Libr. J.-B.Baillièvre et Fils, Paris.
27. Ruska, E. (1934). El microscopio de rayos catódicos como ultramicroscopio. *Investigación y Progreso* **8**, 189–191.
28. Ruska, H., Von Borries, B., Ruska, E. (1940). La importancia de la hipermicroscopía en la investigación de los virus. *Investigación y Progreso* **11**, 71–79.
29. Salamero, F. (1907). Excmo. Sr. Mariano de la Paz Graells. In Sociedad Aragonesa de Ciencias Naturales (ed.), Linneo en España. Homenaje a Linneo, pp. 345–351. Mariano Escar, Zaragoza.
30. Valderrábano, P. (1909). La fotomicrografía aplicada a las Ciencias Naturales. In Actas y Memorias del Primer Congreso de Naturalistas Españoles, pp. 405–424. Imp. y Papel de Manuel Sevilla, Zaragoza.

New methods in *Salmonella* genetics

Josep Casadesús,* Amando Flores, Carmen R. Beuzón, Joaquín Torreblanca,
Chakib Mouslim, David A. Cano

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla

Received 10 September 1994/Accepted 10 October 1994

Summary

This review summarizes several recent developments in *Salmonella* genetics; some of the procedures described can be easily adapted to *Escherichia coli* and have also potential applications in non-enteric bacteria. The novel methods outlined include genetic mapping procedures, ancillary tools for cloning, a strategy for analyzing DNA–protein interactions *in vivo*, a method for plasmid curing and a procedure for the detection of bacterial virulence genes.

Keywords: genetic mapping, DNA packaging, plasmid curing, DNA–protein interactions, virulence genes

Resumen

Esta revisión describe métodos desarrollados recientemente para el análisis genético de *Salmonella*. Algunos de los procedimientos descritos son fácilmente adaptables a *Escherichia coli* y pueden tener aplicaciones en bacterias no entéricas. Entre esos métodos nuevos hay procedimientos de mapeo genético, herramientas auxiliares para la clonación, una estrategia para analizar interacciones DNA–proteína *in vivo*, un método de curación de plásmidos y un procedimiento para la detección de genes bacterianos de virulencia.

Introduction

Escherichia coli and *Salmonella typhimurium* have been paradigmatic organisms since the early days of bacterial genetics. Conjugation and transduction, the DNA transfer processes most widely

* Correspondence to: Josep Casadesús. Departamento de Genética. Universidad de Sevilla. Apartado 1095. 41080 Sevilla. Tel.: 95-4557105. Fax: 95-4557104.

employed in the genetic analysis of Gram-negative bacteria, were discovered in *E. coli* and *S. typhimurium*, respectively (34, 39). In the last decades, procedures for genetic analysis have been developed in many bacterial species (9), but the role of *E. coli* and *Salmonella* as model organisms remains largely undisputed. For this reason, analytical methods and technical procedures devised for *E. coli* and *Salmonella* are often of general interest for microbiologists. *Salmonella* offers the additional interest of being an animal pathogen; thus the study of salmonellosis can serve as a model system for the study of host-pathogen interactions (17).

This review describes recent developments in the genetics of *Salmonella*. The methods summarized below have been developed for *S. typhimurium*, but can be applied to other salmonellae, provided that they are sensitive to phage P22. Some of the procedures described can also be used in *E. coli*, mostly after the development of a method for P22 transduction in *E. coli* which offers the opportunity of overcoming the intricacies inherent to P1 transduction (28). None of the methods summarized below is directly applicable to non-enteric bacteria, but the general principles underlying these novel approaches can be expected to inspire applications in other bacterial species. Lastly, we believe that the elegance inherent to some of the new procedures described does not lag behind their practical interest.

Rapid mapping with «locked-in» Mud-P22 prophages

Genetic mapping in *Salmonella* has used two classical approaches: co-transduction of nearby markers by «high-transducing» (HT) derivatives of bacteriophage P22 (31) and conjugal transfer of DNA via Hfr formation (13). Co-transduction with P22 HT is probably the easiest and most reliable mapping method ever described (27). However, transductional mapping can only be applied to closely linked markers; large-scale mapping requires conjugal transfer. Many *Salmonella* strains contain endogenous plasmids, some of which are self-transmissible by conjugation. However, the conjugation systems of most *Salmonella* plasmids are tightly repressed and conjugation occurs at very low frequencies (30). In addition, most such plasmids give infrequent chromosome mobilization. These difficulties can be overcome by using the *E. coli* F episome (30). F can be easily transferred to *Salmonella* and Hfr strains can be obtained upon F integration into the chromosome. However, the absence of insertion elements IS1, IS2 and IS3 from the *Salmonella* chromosome reduces the efficiency of Hfr formation. The development of transposon technology has introduced a number of refinements for Hfr formation in *Salmonella*, such as the use of transposable elements as «portable» regions of homology to direct F integration (10, 11). In spite of these refinements, Hfr mapping in *Salmonella* still encounters problems derived from the instability of the Hfr donors.

A mapping procedure that can efficiently substitute for Hfr transfer has been recently developed in *S. typhimurium* (5). The method employs hybrids between two temperate bacteriophages, *Salmonella* phage P22 and coliphage Mu (38). The Mud-P22 hybrids constructed combine the P22 DNA packaging system with the transposition properties of phage Mu; as a consequence, the hybrids are able to transpose randomly to the host chromosome. Each hybrid consists of about two-thirds of the phage P22 genome positioned between the ends of bacteriophage Mu; the construction carries also a chloramphenicol resistance marker (Fig. 1). The hybrids do not carry the transposition functions of phage Mu; thus transposition requires transient complementation with Mu transposase, which can be provided either in

cis or in *trans* (19, 24). Isolates carrying Mud-P22 insertions can be easily obtained by selecting chloramphenicol resistance (38).

Mud-P22 hybrid prophages contain the P22 immunity region; therefore, they are able to be induced by DNA-damaging treatments. Upon induction, the entire prophage genome is replicated *in situ* but cannot excise because the construction lacks the P22 site-specific recombination region. As a consequence, replication forks initiated at the P22 replication origin invade neighbouring host DNA, causing a selective amplification of the chromosomal regions which flank the prophage. Replicated regions are then packaged into P22 capsids by the «headful» mechanism characteristic of phage P22 (8). The first headful will package a portion of the defective hybrid prophage and some adjacent host DNA; further headfuls will consist of chromosomal DNA only (Fig. 2). Consequently, induction of locked-in prophages leads to transduction of adjacent markers at high frequencies. The magnitude of this marker enrichment has been estimated as ranging between 50 and 1500 times (5).

Packaging from P22 *pac* sites proceeds in an oriented manner; thus a given locked-in prophage can be expected to package flanking host DNA from only one side (Fig. 2). The packaging direction will depend on the orientation of the prophage itself. Two different Mud-P22 prophages (MudP and MudQ) have been constructed, each packaging in one orientation. When inserted at the same locus, MudP will package in one direction and MudQ in the other. The packaging capacity of a P22 capsid is about 43 kb, that is, approximately one map minute (8, 14). The length of the amplified region allows packaging of 3–4 headfuls; however, a gradient of packaging efficiency is often observed (38).

A set of MudP and MudQ lysogens, each containing a different insertion, has been constructed by Benson and Goldman (5). The insertions are scattered along the entire *Salmonella* chromosome. Transduction with lysates from this collection allows specialized transduction and mapping with a resolution of 1–4 minutes, provided that a selection procedure is available. The technique is directly applicable to any mutation for which the wild-type allele is selectable. In addition, *Tn10* insertions can be mapped by selecting loss of tetracycline resistance on appropriate media (7, 25). Mapping can often be carried on a single Petri plate (or a few plates). For mapping, an exponential culture of the strain carrying the mutation to be mapped is spread undiluted on a selective plate. When dry, the plate is spotted in a grid pattern with lysates from the locked-in Mud-P22 collection (i. e., 5 ml from each lysate). Plates are then incubated for 1–3 days. Transfer of the selected allele gives a confluent spot of transductants, while the remaining spots appear similar to the background of cells that did not receive any phage. Since both the position and the packaging direction of the donor locked-in prophage are known, the approximate position of the transduced marker can be easily established.

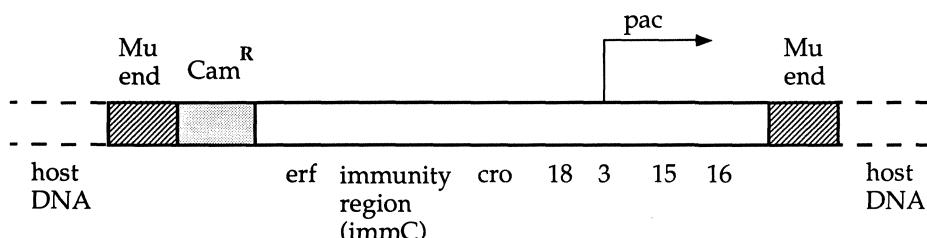


FIG. 1. Structure of a locked-in Mud-P22 hybrid when inserted into host DNA (adapted from ref. 5).

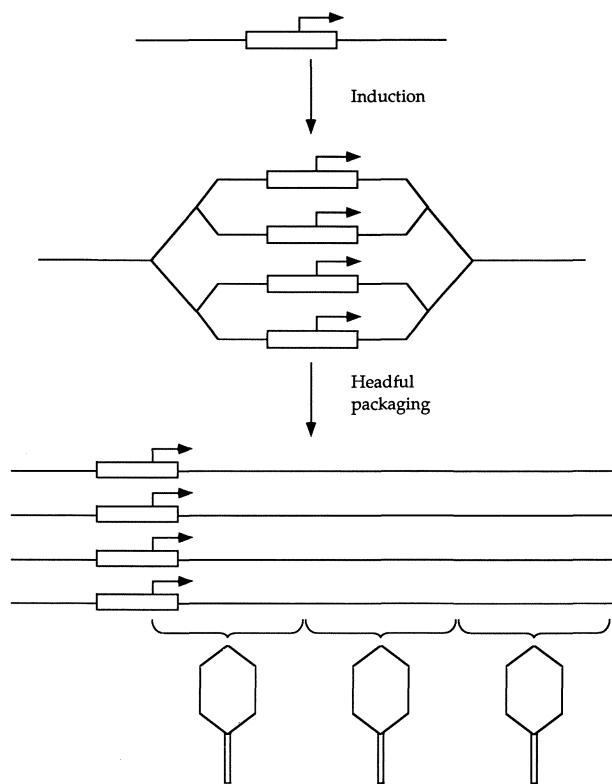


FIG. 2. Induction of a locked-in Mud-P22 prophage causes selective amplification of neighboring DNA sequences. Packaging by the P22 *pac* system permits specialized transduction of DNA sequences from one side of the prophage insertion. The first headful contains both phage and host sequences. Subsequent headfuls contain only host DNA (adapted from ref. 5).

Cloning of chromosomal regions packaged by «locked-in» Mud-P22 prophages

Given the packaging efficiency of locked-in Mud-P22 prophages, they can be used as sources of specific stretches of chromosomal DNA. Lysates obtained upon induction of a given locked-in prophage are not pure clones, for several reasons: (i) the first headful contains DNA from both the phage and the host; (ii) several headfuls of neighbouring DNA are packaged; (iii) induction of a locked-in prophage permits generalized transduction, since the P22 packaging system can recognize *pac*-like sequences elsewhere in the host DNA. Thus each locked-in lysate contains a heterogeneous mixture of host and phage DNA sequences. However, sequences adjacent to the prophage insertion site are highly enriched in the mixture. In practice, cloning from a locked-in lysate can be handled as a pure clone; as shown in Fig. 3, digestion of chromosomal DNA purified from a locked-in lysate yields discrete restriction fragments, while digestion of a standard chromosomal DNA preparation yields a «smear».

An additional advantage of cloning from a locked-in lysate is the gentle treatment required for capsid disruption; as a consequence, preparations made from packaged DNA usually give a high DNA yield. Moreover, the easy removal of capsid components makes these DNA preparations highly pure.

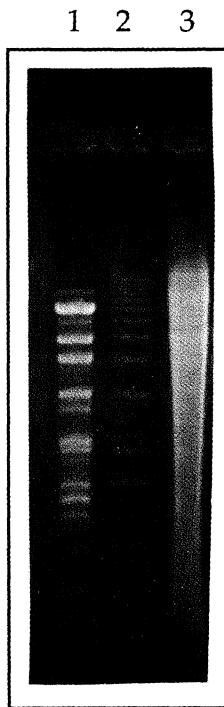


FIG. 3. Digestion of chromosomal DNA packaged into P22 capsids upon induction of a locked-in prophage yields discrete fragments (lane 1), while digestion of chromosomal DNA extracted from a batch culture yields a «smear» where individual fragments cannot be distinguished (lane 3). Both DNA preparations were digested with endonuclease *EcoRV*. Lane 2 contains the 1 kb DNA ladder from Gibco BRL.

Another advantage is the absence of nucleases from phage suspensions: the resulting DNA preparations are more stable than the standard preparations of chromosomal DNA (C. R. Beuzón and J. Casadesús, unpublished).

Genetic mapping by duplication segregation

Analysis of duplication segregation provides another rapid method to localize a genetic marker in a defined region. The procedure is based on the rationale that a marker introduced into a pre-existing duplication will segregate together with the duplication, while a marker outside the duplication will not (Fig. 4). The marker to be mapped (e. g., a transposon insertion) is transferred by transduction into a recipient carrying a duplication with known endpoints (15). The resulting isolates contain the duplication and the marker to be mapped. These isolates are then allowed to segregate (simply by growth under conditions that do not select the duplication). Haploid segregants are then scored for the presence of the insertion mutation. The interpretation of the results is simple and straightforward: if all the segregants contain the insertion, the latter maps outside the duplication interval. If the insertion is only found in a fraction of the segregants, it maps inside the duplicated region (Fig. 4).

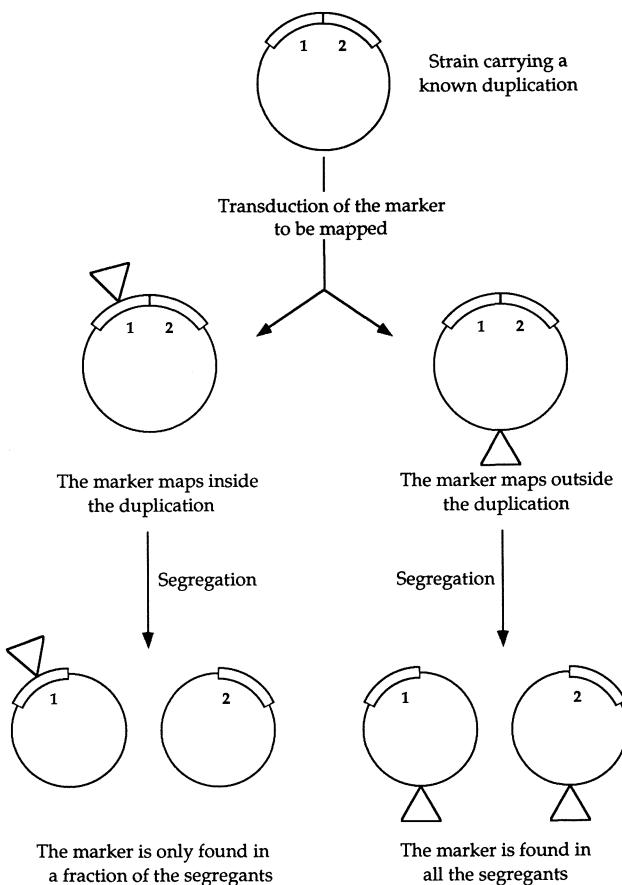


FIG. 4. Logic of genetic mapping by duplication segregation.

To map a mutation anywhere in the chromosome, a set of duplications covering all regions is required. Such a set is now under construction, using collection strains and a number of additional strains built *ad hoc* (A. Flores and J. Casadesús, in preparation). Construction of duplications with predetermined endpoints is achieved by an elegant method devised by Kelly Hughes and John Roth (18). Two genetic elements properly positioned (e.g., two *Mud* insertions in the same orientation) provide homologies to generate a duplication with endpoints at the sites of the original *Mud* insertions. Formation of the duplication requires a triple crossover; transductants generated by this rare event can be selected if the *Mud* insertions used cause auxotrophy: selection of the *Mud*-borne antibiotic resistance on minimal plates yields prototrophic transductants carrying the desired duplication (see example in Fig. 5). If selection is omitted, isolates carrying a *Mud*-held duplication only segregate antibiotic-sensitive prototrophs; this segregation pattern allows discrimination between *Mud*-held duplications and a second type of antibiotic-resistant prototrophs. Transductants of this second class arise when a transduced fragment containing one of the *Mud* prophages recombines into a preformed duplication (1). This second class of merodiploids can be easily distinguished because they segregate two types of colonies: antibiotic-resistant auxotrophs and antibiotic-sensitive prototrophs.

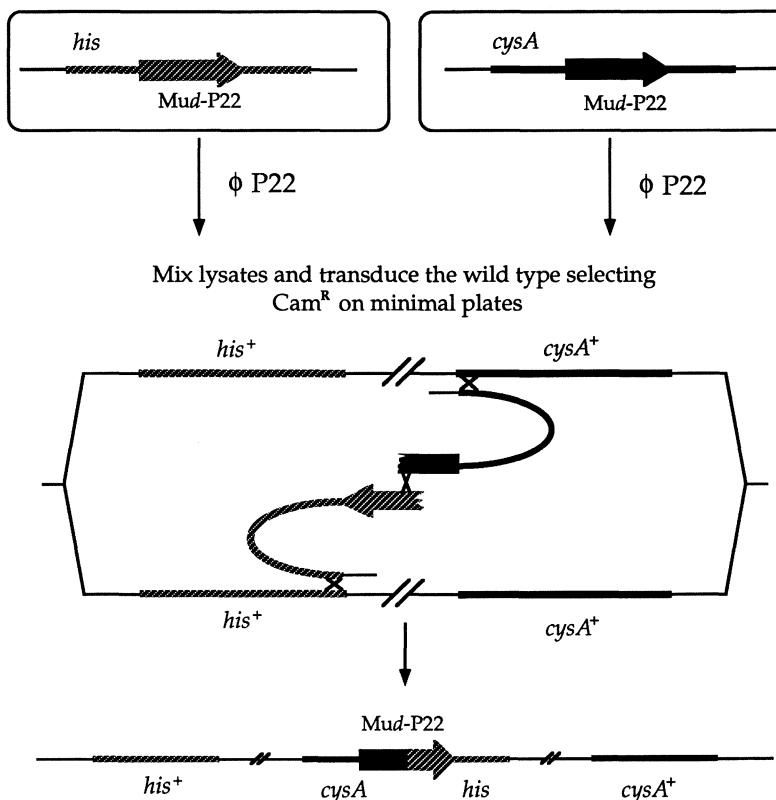


FIG. 5. Construction of Mud-held duplications with predetermined endpoints. In the example shown, one of the donor strains carry a *Mud-P22* insertion in *his* (min. 42); the other donor carry a *Mud-P22* insertion in *cysA* (min. 50). Transduction of the wild-type with a mixed lysate yields Cam^R prototrophic transductants at low frequency (<10⁻³ per plaque-forming-unit). These prototrophic transductants carry a Mud-held duplication of the 42–50 min. region. Other recombination events that can give rise to prototrophic Cam^R transductants are discussed in the text. Formation of the desired duplication can be proved by segregation: the Mud-held duplication only segregates Cam^S prototrophs (see refs. 15 and 18 for details).

Maintenance of a Mud-held duplication requires continuous selection of the corresponding antibiotic resistance marker; however, strains carrying one of such duplications can be frozen and later recovered on antibiotic medium. An alternative preservation procedure is the storage of the P22 lysates used to construct the duplication; high-titer lysates sterilized with chlorophorm are stable for years if kept at 4°C.

Virulence plasmid curing by destabilization of the *par* locus

Many *Salmonella* serovars contain large plasmids which confer properties associated with virulence. These plasmids can be eliminated by treatment with traditional curing agents, such as acridine orange, ethidium bromide, novobiocin or high temperature (3, 16). However, these treatments are tedious and

inefficient; moreover, some are mutagenic. An additional problem is that virulence plasmids do not contain selectable markers that might facilitate the detection of plasmid-cured isolates.

Albeit heterogeneous in size and content, all virulence-associated plasmids contain conserved regions which are easily detected by cross-hybridization (37). One of such regions is the *par* region, which is highly conserved among most *Salmonella* serovars, with the likely exception of *S. dublin* (35). Since the *par* region is involved in partition, any mutation that destabilizes the *par* region can be expected to give rise to plasmid-free daughter cells at high frequencies. On this rationale, Tinge and Curtiss III disrupted the *par* locus of the virulence plasmid of *S. typhimurium* by cloning of a 1.4 kb Kan^R cartridge from plasmid pUC-4K (35). In the absence of antibiotic selection (kanamycin resistance), the Kan^R-tagged plasmid becomes unstable, as indicated by the appearance of Kan^S colonies. Agarose gel electrophoresis indicates that most Kan^S derivatives have lost the virulence plasmid; deletions are rare (35).

The Kan^R cartridge can be easily transduced to *S. typhimurium* and to other serovars, provided that they are sensitive to phage P22 (or, as an alternative, to phage P1L4). The frequency of Kan^R transductants usually reflects the degree of homology between the donor and recipient virulence plasmids. If the frequency is low, recombination can be enhanced by irradiating the transducing lysate with UV (29). Since the sizes of all virulence plasmids exceed the packaging capacity of P22 or P1L4, Kan^R transductants can only arise from a double crossover between the resident virulence plasmid and regions flanking the Kan^R cartridge. Replacement of the native *par* region by the *par*:: Kan^R cartridge will result in abnormal partition; plasmid-free (Kan^S) isolates will be easily obtained if the antibiotic selection is omitted.

«Challenge phage»: a genetic approach to analyze DNA–protein interactions in vivo

Genetic analysis of DNA–protein interactions requires the isolation of mutants that affect regulation. A general approach to isolate regulatory mutants is to place the expression of a selectable reporter gene under the control of a specific DNA–protein interaction. If the DNA site is properly placed near the promoter of the reporter gene, transcription can be regulated by protein binding. This strategy can be applied to almost any specific DNA–protein interaction, because almost any protein may act as a transcriptional repressor if its binding site is close enough to the promoter (2, 12).

In the «challenge phage» system, the reporter is *ant*, a P22 gene that participates in the lysis-lysogeny decision (33). In bacteriophage P22, the *c2* gene is equivalent to the lambda *cI* gene; *c2* is located in the *immC* region and regulates expression from p_L and p_R . In addition, P22 contains a second regulatory region, *immI*, which is not present in phage lambda. The *immI* region contains three genes: *ant*, *arc* and *mnt*. The *ant* gene encodes an antirepressor that inactivates the P22 repressor by direct binding (33). Expression of the *ant* gene is repressed by the other two products encoded by the *immI* region: Mnt (for «maintenance of lysogeny») and Arc (for «antirepressor control»). Arc and Ant are expressed from the same promoter, p_{ant} . Early after infection, expression from p_{ant} results in a burst of Ant and Arc synthesis; Arc binding to the O_{arc} operator represses further transcription. Moreover, repression of p_{ant} by Arc activates p_{mntr} ; Mnt then binds to O_{mntr} , causing further repression of *ant* expression during lysogeny. Because of this dual regulation by Arc and Mnt repressors, *ant* does not normally affect the decision between lysis and lysogeny during infection of a sensitive (non-lysogenic) host. However, Ant is dramatically overproduced in *arc* mutants, preventing lysogeny of the infected cells. This overexpression of Ant does

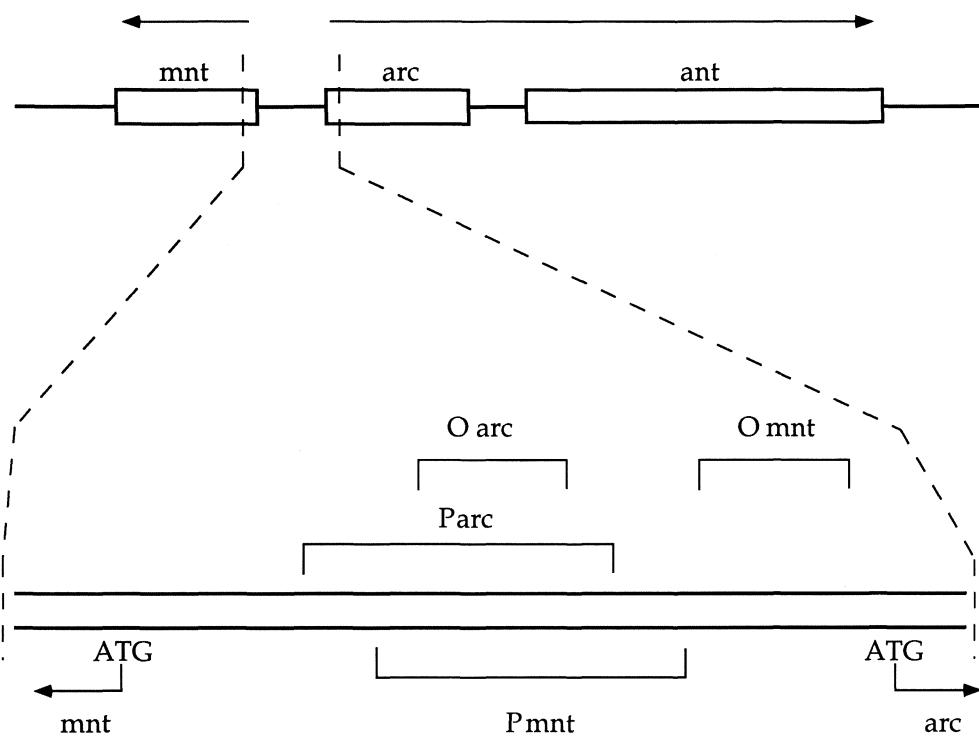


FIG. 6. A map of the *immI* region of bacteriophage P22 (adapted from refs. 26 and 33).

not occur when an *Arc*⁻ mutant phage infects a lysogen, because the *Mnt* repressor synthesized by the resident prophage binds to the *O_{mnt}* of the incoming phage, thus repressing *ant* expression. The consequence is that the superinfecting phage will lysogenize the cell. Thus, in *Arc*⁻ mutants, binding of *Mnt* repressor to *O_{mnt}* regulates *ant* expression and controls the decision between lysis and lysogeny (33).

A challenge phage is a P22 derivative containing a Kan^R disruption of the *mnt* gene, an amber mutation in *arc* and a cloned DNA-binding site replacing *O_{mnt}* (6, 26). Replacement of the latter with a cloned DNA-binding site will place *ant* expression under the control of a specific DNA-binding protein. In other words, *ant* will be expressed unless the DNA site is bound by its cognate protein. As a consequence, the phage will enter the lytic pathway if the DNA-binding protein is absent but will lysogenize the cell if the DNA-binding protein is present (See Fig. 6.)

Construction of a challenge phage involves two steps: (i) cloning of the DNA-binding site onto a plasmid that carries the P22 *immI* region; (ii) introduction of the DNA-binding site into P22 by homologous recombination. For the cloning step, a series of pBR322 derivatives carrying the P22 *immI* region have been constructed; the resulting vectors carry a number of suitable restriction sites (6, 26). Any DNA-binding site cloned on one of such vectors can be transferred to P22 *in vivo* by phage-plasmid crosses. Replacement of P22 *O_{mnt}* with the substituted DNA-binding site can be detected because the recombinant challenge phage has a distinct plaque phenotype on a suitable host strain (6). The latter is a lysogen carrying a *sieA* mutant prophage (to allow superinfection with the challenge phage). The resident prophage carries a wild-type *immC* region (to repress the incoming challenge phage) and a wild-type *mnt* gene (to repress phage carrying *O_{mnt}*). The high frequency of recombination between the multicopy plasmid and the lytic P22 mutant allows easy recovery of recombinant phage.

The challenge phage system provides several procedures for the study of DNA-protein interactions: (i) an *in vivo* assay for the affinity of a DNA-binding protein for a specific DNA sequence; (ii) a strong selection for mutations in either the DNA-binding site or its cognate DNA-binding protein domain. The logic behind these procedures is as follows:

(i) When a DNA-binding protein is expressed from a regulated promoter such as p_{lac} , the relative affinity of the DNA-binding protein for the binding site located on the challenge phage can be quantitated by measuring the frequency of lysogeny on media with different concentrations of IPTG (and hence different concentrations of the DNA-binding protein).

(ii) Since challenge phages form lysogens on hosts that express a DNA-binding protein which binds to the substituted O_{mnt} site, «operator-constitutive» mutants affected in the DNA-binding site can be isolated. Such mutant phages will be able to form plaques on a lawn of cells that express the DNA-binding protein. O^c mutations in the substituted DNA-binding site can be expected to define critical regions (or even single critical nucleotides) in the operator (4).

(iii) Several types of information concerning the protein domain(s) involved in the recognition of a DNA-binding site can be easily obtained. For instance, selection of Kan^R lysogens at suboptimal concentrations of IPTG can be expected to select mutants whose DNA-binding protein shows increased affinity for DNA. In turn, selection of Kan^R lysogens derived from O^c challenge phage mutants can be expected to allow the isolation of second-site suppressors in the DNA-binding protein (6, 26).

MudSacI, a transposable element with strong selectable and counterselectable markers

One of the main advantages of transposon technology is that transposons tag mutations with one or more selectable markers (21). However, certain genetic procedures become easier whenever counterselectable markers are also available. Unfortunately, efficient procedures to counterselect transposons are scarce; the only well-known exceptions are the counterselection of Tn10-encoded tetracycline resistance by fusaric acid (7, 26) and the use of Tn5 derivatives carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene (20). The sucrose sensitivity phenotype conferred by *sacB* has proved useful in a number of Gram-negative bacteria. However, the constructions described in the literature carry Tn5 transposase; thus they can undergo secondary transposition and promote other DNA rearrangements (36).

MudSacI, a mini-Mu derivative recently constructed, may be a useful tool in this field (22). The element carries both a selectable marker (a Kan^R gene) and a counterselectable marker (*sacB*, conferring sucrose sensitivity). MudSacI is transposition-defective; thus it is completely stable in the absence of Mu transposase. Counterselection is highly efficient on nutrient agar plates containing 5% sucrose and lacking ClNa (22). A temperature effect is also observed: the selection is less leaky if performed at 42°C or 30°C than at 37°C (22).

Detection of virulence genes specifically induced in the host: the IVET strategy

«IVET» is an acronym for «*in vivo* expression technology», a strategy which allows the detection of *Salmonella* genes that are specifically induced in host tissues (23). The strategy takes advantage of

the fact that purine auxotrophy greatly attenuates growth of *S. typhimurium* in the mouse; thus this deficiency provides a strong selection for a PurA⁺ phenotype in animal tissues. If a promoterless *purA* gene is used, any gene rearrangement that provides a strong promoter to *purA* will permit growth in the mouse.

The IVET system employs a plasmid, pIVET1, carrying a promoterless *purA-lacZ-lacY* operon constructed *in vitro*. Expression of this chimaeric operon requires that a properly positioned promoter is provided upstream of *purA*. pIVET1 contains a *Bgl* II site upstream of *purA*; this site can be used for cloning *Salmonella* DNA partially digested with *Sau* 3A. The plasmid contains the origin of replication of R6K and thus can only replicate in the presence of π protein. Since the latter is not naturally synthesized in *Salmonella*, transfer of pIVET1 derivatives to *S. typhimurium* selecting Amp^R permits the isolation of transconjugants that have integrated the pIVET derivative into the *Salmonella* chromosome. Integration is achieved by a single crossover between homologous regions located on the plasmid and the chromosome (Fig. 7). The recipient strain contains a deletion of the chromosomal *purA* gene, to prevent

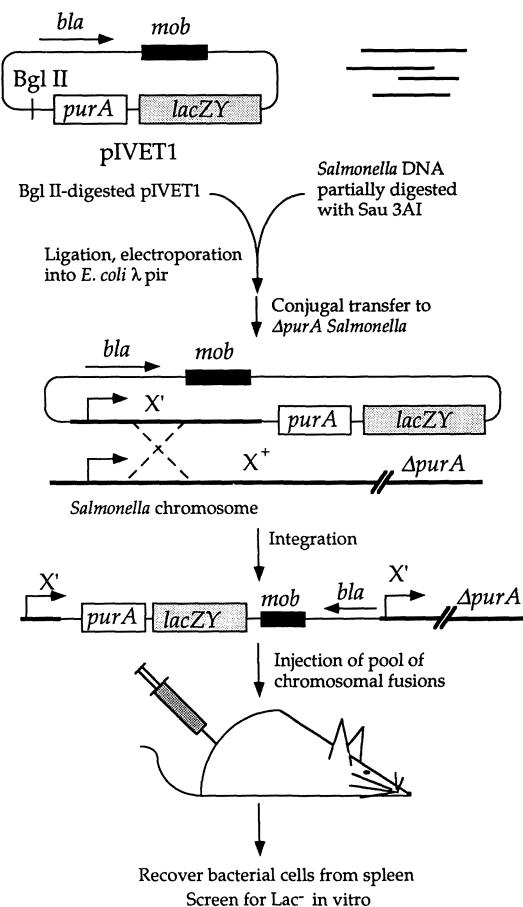


FIG. 7. Use of the IVET strategy for the positive selection of genes that are specifically induced in the host (adapted from ref. 23).

plasmid integration in this region. Thus each pIVET1 derivative can be expected to integrate at a region homologous to the fragment cloned upstream of *purA*. Cloning of *Sau3A* fragments at the *Bgl*II site can generate fusions of *S. typhimurium* promoters to the chimaeric operon *purA-lacZ-lacY*. Whenever a strong promoter is provided, expression of *purA* will permit survival and multiplication in the mouse. If a *S. typhimurium* population carrying a pool of pIVET clones is injected in mice, the population will be enriched in cells that carry an active promoter driving the *purA-lacZ-lacY* operon.

Because the chimaeric operon also contains *lacZ* and *lacY*, the fusion strain must be also Lac⁺, a phenotype that can be easily scored on appropriate media. However, isolates which are Lac⁻ on plates (in spite of having been enriched in the mouse) are of particular interest, because their Lac⁻ phenotype may indicate that the cloned fragment carries a promoter that is only active in host tissues. This assumption has been fully confirmed: fusions which are Lac⁻ on MacConkey plates usually yield high β-galactosidase activities in *Salmonella* cells recovered from spleens of infected mice (23). This simple and imaginative method has proved useful for the isolation of a number of *ivi* (for «*in vivo* induced») genes of *Salmonella*. Sequencing of 200-400 bp upstream of the *purA* gene is usually enough to establish whether the *ivi* promoter detected belongs to a previously known gene or identifies a novel locus (23).

Acknowledgements

Work in our laboratory has been supported by grants PB90-0898 and PB93-0649 from the DGICYT, Spain. Additional funds have been obtained from the Plan Andaluz de Investigación (Junta de Andalucía, Spain). We are grateful to Stanley R. Maloy (University of Illinois, Urbana, USA) for communicating unpublished data.

References

1. Anderson, R. P., Roth, J. R. (1979). Gene duplication in bacteria: alteration of gene dosage by sister-chromosome exchanges. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43**, 1083-1087.
2. Arvidson, D., Shapiro, M., Youderian, P. (1991). Mutant tryptophan aporepressors with altered specificities of corepressor recognition. Genetics **128**, 29-35.
3. Barrow, P. A., Lovell, M. A. (1988). The association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of *Salmonella pullorum*. J. Gen. Microbiol. **134**, 2307-2316.
4. Bass, S., Sorrells, V., Youderian, P. (1988). Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities. Science **242**, 240-245.
5. Benson, N. R., Goldman, B. S. (1992). Rapid mapping in *Salmonella typhimurium* with MuD-P22 prophages. J. Bacteriol. **174**, 1673-1681.
6. Benson, N., Sugiono, P., Bass, S., Mendelman, L. V., Youderian, P. (1986). General selection for specific DNA-binding activities. Genetics **114**, 1-14.
7. Bochner, B. R., Huang, H. C., Schieven, G. L., Ames, B. N. (1980). Positive selection for loss of tetracycline resistance. J. Bacteriol. **143**, 926-933.
8. Casjens, S., Hayden, M. (1988). Analysis *in vivo* of the bacteriophage P22 headful nuclease. J. Mol. Biol. **194**, 411-422.

9. Chater, K. F., Hopwood, D. A. (1989). Diversity of bacterial genetics. In Hopwood, D. A., Chater, K. F. (ed.), *Genetics of bacterial diversity*, pp. 23–52. Academic Press, London and San Diego.
10. Chumley, F. G., Menzel, R., Roth, J. R. (1979). Hfr formation directed by *Tn10*. *Genetics* **91**, 639–655.
11. Chumley, F. G., Roth, J. R. (1980). Rearrangement of the bacterial chromosome using *Tn10* as a region of homology. *Genetics* **94**, 1–14.
12. Collado-Vides, J., Magasanik, B., Gralla, J. (1991). Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**, 371–394.
13. Demerec, M., Blomstrand, I., Demerec, Z. E. (1955). Evidence of complex loci in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**, 359–364.
14. Ebel-Tsipis, J., Botstein, D., Fox, M. S. (1972). Generalized transduction by phage P22 in *Salmonella typhimurium*. I. Molecular origin of transducing DNA. *J. Mol. Biol.* **71**, 433–448.
15. Flores, A., Casadesús, J. (1995). Suppression of the pleiotropic effects of HisH and HisF overexpression identifies four novel loci on the *Salmonella typhimurium* chromosome: *osmH*, *sfiW*, *sfiX* and *sfiY*. *J. Bacteriol.*, in press.
16. Gulig, P. A., Curtiss III, R. (1987). Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **55**, 2891–2901.
17. Hsu, H. S. (1989). Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. *Microbiol. Rev.* **53**, 390–409.
18. Hughes, K. T., Roth, J. R. (1985). Directed formation of deletions and duplications using Mud(*Ap, lac*). *Genetics* **109**, 263–282.
19. Hughes, K. T., Roth, J. R. (1988). Transitory *cis* complementation: a method for providing transposition functions to defective transposons. *Genetics* **119**, 9–12.
20. Hynes, M. F., Quandt, J., O'Connell, M. P., Pühler, A. (1989). Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *Gene* **78**, 111–120.
21. Kleckner, N., Roth, J., Botstein, D. (1977). Genetic engineering *in vivo* using translocatable drug-resistant elements. *New Methods in Bacterial Genetics*. *J. Mol. Biol.* **116**, 125–159.
22. Lawes, M., Maloy, S. R. (1995). MudSacI, a transposon with strong selectable and counterselectable markers: use for rapid mapping of chromosomal mutations in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, in press.
23. Mahan, M. J., Slauch, J. M., Mekalanos, J. J. (1993). Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**, 686–688.
24. Maloy, S. R. (1990). Experimental techniques in bacterial genetics. Jones and Bartlett Pub., Boston.
25. Maloy, S. R., Nunn, W. D. (1981). Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **145**, 1110–1112; erratum **146**, 831.
26. Maloy, S., Youderian, P. (1994). Challenge phage: dissecting DNA–protein interactions *in vivo*. In Adolph, K. W. (ed.), *Methods in Molecular Genetics*, vol. 3, pp. 205–233. Academic Press, London.
27. Margolin, P. (1987). Generalized transduction. In Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umbarger, E. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, pp. 1154–1168. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
28. Neal, B. L., Brown, P. K., Reeves, P. R. (1993). Use of *Salmonella* phage P22 for transduction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 7115–7118.
29. Rupp, W. D., Wilde III, C. E., Reno, D. L., Howard-Flanders, P. (1971). Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **61**, 25–44.
30. Sanderson, K. E., MacLachlan, P. R. (1987). F-mediated conjugation, F⁺ strains, and Hfr strains of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella abony*. In Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umbarger, E. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, pp. 1138–1144. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
31. Schmieger, S. (1972). P22 mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol. Gen. Genet.* **119**, 75–88.
32. Susskind, M. M., Botstein, D. (1978). Molecular genetics of bacteriophage P22. *Microbiol. Rev.* **42**, 385–413.

33. Susskind, M. M., Youderian, P. (1983). Bacteriophage P22 antirepressor and its control. In Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W., Weisberg, R. A. (ed.), Lambda II, pp. 347–363. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
34. Tatum, E. L., Lederberg, J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **53**, 673–684.
35. Tinge, S. A., Curtiss III, R. (1990). Conservation of *Salmonella typhimurium* virulence plasmid maintenance regions among *Salmonella* serovars as a basis for plasmid curing. Infect. Immun. **58**, 3084–3092.
36. Tomcsanyi, T., Berg, C. M., Phadnis, S. H., Berg, D. E. (1990). Intramolecular transposition by a synthetic IS50 (Tn5) derivative. J. Bacteriol. **172**, 6348–6354.
37. Williamson, C. M., Baird, G. D., Manning, E. J. (1988). A common virulence region on plasmids from eleven serotypes of *Salmonella*. J. Gen. Microbiol. **134**, 975–982.
38. Youderian, P., Sugiono, P., Brewer, K. L., Higgins, N. P., Elliott, T. E. (1988). Packaging specific fragments of the *Salmonella* chromosome with locked-in Mu-P22 prophages. Genetics **118**, 581–592.
39. Zinder, N. D., Lederberg, J. (1952). Genetic exchange in *Salmonella*. J. Bacteriol. **64**, 679–699.

Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*

Ángel Cebolla,[†] Antonio J. Palomares*

Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

Received 8 November 1993/Accepted 15 July 1994

Summary

The soil bacterium *Rhizobium meliloti* fixes dinitrogen when associated with root nodules formed on its plant host, *Medicago sativa* (alfalfa). The expression of most of the known genes required for nitrogen fixation (*nif* and *fix* genes), including the structural genes for nitrogenase, is induced in response to a decrease in oxygen concentration. Induction of *nif* and *fix* gene expression by low oxygen is physiologically relevant because a low-oxygen environment is maintained in root nodules to prevent inactivation of the highly oxygen-sensitive nitrogenase enzyme. The genes responsible for sensing and transducing the low oxygen signal, *fixL* and *fixJ*, encode proteins (FixL and FixJ, respectively) that are homologous to a large family of bacterial proteins involved in signal transduction, the two component regulatory system proteins. The two components consist of a sensor protein, to which FixL is homologous, and a response regulator protein, to which FixJ is homologous. The sensor protein respond to an activating signal by autophosphorylating and then transferring the phosphate to its cognate response regulator protein. The phosphorylated response regulator, which is often a transcriptional activator, is then able to activate its target. A cascade model of *nif* and *fix* gene regulation in *R. meliloti* has been proposed, whereby FixL acts as an oxygen sensor as the initial event in the cascade and transmits this information to FixJ. FixJ, which possesses a putative helix-turn-helix DNA-binding motif, then activates transcription of the *nifA* and *fixK* genes. The *nifA* and *fixK* gene products, are transcriptional activators of at least 14 other *nif* and *fix* genes.

Key words: symbiotic nitrogen fixation, *nif/fix* genes, *Rhizobium meliloti*

* Correspondence to: Antonio J. Palomares. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla. Tel.: 95-4556766. Fax: 95-4628162.

† Present address: Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Velázquez, 144. 28006 Madrid.

Resumen

Rhizobium meliloti fija nitrógeno cuando se encuentra en los nódulos de su planta hospedadora, la alfalfa. La mayoría de los genes que se requieren para la fijación de nitrógeno (genes *nif* y *fix*) se inducen en respuesta a condiciones de microaerobiosis. Esto es importante porque en los nódulos se encuentra una baja tensión de oxígeno que salvaguarda al enzima nitrogenasa. Los genes responsables de detectar y transmitir la señal de oxígeno son *fixL* y *fixJ*, que codifican unas proteínas homólogas a otras encontradas en bacterias que están implicadas en señales de traducción, sistema regulatorio de dos componentes. Los dos componentes consisten en una proteína sensora, a la que es homóloga FixL y una proteína reguladora, a la que es homóloga FixJ. La proteína sensora responde autofosforilándose y transfiriendo el grupo fosfato a la proteína reguladora. El regulador fosforilado, activador transcripcional, activa sus dianas que son los promotores de los genes reguladores *nifA* y *fixK*. Se ha propuesto un modelo de regulación en cascada de genes *nif* y *fix* en *R. meliloti* donde FixL actúa como un sensor de oxígeno en los estados iniciales de la cascada y transmite esta información a FixJ. FixJ, que posee un motivo de unión a DNA hélice-vuelta-hélice, activa la transcripción de los genes *nifA* y *fixK*. Los productos de los genes *nifA* y *fixK* son activadores transcripcionales de al menos 14 genes *nif* y *fix*.

Introduction

After carbon, oxygen and hydrogen, nitrogen is the most common element in living matter representing from eight to sixteen per cent. Nitrogen forms part of molecules as important for their biological activity such as the nucleic acids, enzymes, proteins, etc. Nevertheless, combined inorganic nitrogen is the nitrogenated form commonly used by the plants and by almost all microorganisms. The fact that most soils have a low nitrogen concentration makes nitrogen the main limiting factor, after water, in the growth of plants, although they live immersed in an atmosphere of which four fifths are nitrogen.

Although nitrogen represents eighty per cent of the total content of the earth's atmosphere, it is at the same time one of the main factors limiting plant productivity. The direct cause of this apparently illogical phenomenon is the incapacity of eukaryotic organisms to use directly molecular nitrogen or dinitrogen despite its abundance. Plants can only use combined forms of nitrogen, mainly ammonium or nitrate, partly derived from abiotic or biological nitrogen fixation. Nitrogen oxides are produced by natural physicochemical processes or induced by man, whereas ammonium formation is mainly the result of biological processes. Biological fixation of nitrogen, which is performed by certain prokaryotic organisms, is quantitatively the most important process and is responsible for two third parts of the nitrogen fixed in the biosphere.

Nitrogen fixation capacity arises from the activity of an enzymatic complex known as dinitrogenase, the structure and properties of which are similar in all studied species. This complex is oxygen sensitive which is why different fixers have had to develop different strategies for the protection of the enzyme in aerobic conditions.

Fixation of nitrogen has been detected in many free-living and symbiotic organisms belonging to widely different microbial groups in which both the free-living and symbiotic fixation character have

been studied (52). Among these, the bacteria of the Rhizobiaceae family are worthy mentioning. These establish symbiosis with leguminous plants. The importance of this association is found in the high levels of fixed nitrogen, the efficiency of the process and the important social, economic and ecological meaning of the plants involved.

The fixation process performed by this symbiosis occurs in specialized structures called nodules found generally in the roots of the leguminous plants as a consequence of infection by the bacteria. In these nodules, bacteria are transformed into specialized forms, bacteroids, that use the compounds photosynthesized by the plant as a source of energy, and the electrons and carbon backbone to reduce the nitrogen to ammonium and incorporate it in the metabolism of the plant.

Conserved regulatory elements involved in the control of nitrogen fixation

The peculiarity of the regulation that occurs in *Rhizobium* is demonstrated by the presence of regulatory elements that do not exist in other free-living nitrogen fixers. Nevertheless, there are some elements that influence the expression of the genes necessary for the symbiotic nitrogen fixation, that are conserved in other eubacteria of the purple group. Among these elements, the alternative sigma factor, σ^{54} , can be found also necessary for other cellular functions, and the transcriptional activator necessary for the nitrogen fixation of a wide range of bacteria, NifA.

RpoN (σ^{54}) and dependent promoters. Besides the most abundant sigma factor, both the Gram-negative and the Gram-positive bacteria use alternative σ factors that confer specificity to the core RNA polymerase by different promoters (24). σ^{54} differs from other alternative sigma factors in that it is necessary for the transcription of genes the products of which have different physiological roles (35). σ^{54} , codified by the *rpoN* (*glnF* or *ntrA*) gene was identified as a positive regulatory factor necessary for the expression of the gene that codified for the glutamine synthetase, *glnA*, in enteric bacteria. Later, it was found that it was also required for the expression of other genes the products of which work in the assimilation of nitrogen, and for genes needed for nitrogen fixation in a larger number of bacteria including *Klebsiella pneumoniae* (22), *Rhodobacter capsulatus*, members of the *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* genera.

The RpoN holoenzyme complex (σ^{54} associated with the polymerase nucleus) recognizes and binds to promoters characterized minimally by a GC doublet located between base 11 and 14 bp upstream of the transcriptional start site and another conserved GC pair that lies exactly 10 bp upstream of the GC doublet (22). The recognition complexes between σ^{54} holoenzymes and the promoters (closed complex) are not transcriptionally productive as the DNA remains as a double chain. The start of transcription by σ^{54} holoenzyme depends on activator proteins.

Transcriptional activators of σ^{54} dependent promoters. The start of transcription in these types of promoters depends not only on the σ^{54} , but also on proteins that catalyze the isomerization of the closed complex between the σ^{54} holoenzyme and the promoter to open transcriptionally productive complex. In these complexes, the DNA chains are denatured in the region of the transcriptional start site (40). This isomerization reaction requires also ATP. In nitrogen fixation, the activator protein of the *nif* and *fix*

promoters is NifA (22); for the promoter *glnA* of *K. pneumoniae* the activator is NtrC (33); the transcription of *xylCAB* and *xylS* requires XylR (29). Aminoacid sequences of these activators show a high degree of homology in their central domain (domain D) each of them having a binding site for ATP. This central domain is believed to be specifically required for the formation of open complexes between σ^{54} holoenzymes and the promoters depending on it (35).

On the other hand, σ^{54} holoenzyme activators bind to sites located at least 80 bp upstream to the promoters regulated by them, known as upstream activator sequences (UAS; (46)). UAS consensus has been described in promoters activated by NtrC (38); NifA (10); DctD (36); and XylR (26). The E domain of activating proteins (C-terminus) has a helix-turn-helix structure that is thought to be responsible for promoters binding to the UAS.

NifA and dependent promoters. The *nifA* gene has been sequenced and characterized in different free-living and symbiotic fixers. There are sequences with a TGT-N₁₀-ACA (UAS) consensus in the NifA activated promoters that have been demonstrated to be NifA binding sites (37). Gubler (21) proposed that the presence and number of UAS elements in a NifA dependent promoter enables a slight adjustment of the regulation of the genetic expression, although a NifA mediated activation in the absence of UAS has also been described. In *R. meliloti*, a truncated form of the NifA protein that only retains its central domain, i. e., without the UAS binding domain, seems to keep the capacity for activating the *nifH* transcription of *R. meliloti* (28). Albright et al. (2) proposed that the presence of UAS increases the concentration of the regulator in the region where it has to cause the activation of the transcription, but that a high NifA concentration or a strong promoter may compensate for the loss of UAS.

Integration host factor (IHF). Although NifA could not be purified in an active manner, it has been demonstrated that this protein synthesized in an *in vitro* coupled transcription-translation system (extract 30S) may activate the genes operon promoter that codifie the *K. pneumoniae* nitrogenase (*nifHDK*). During the course of that study, it was found that the integration host factor (IHF), that was present in the 30S extract, bound to the regulatory zone of the *K. pneumoniae nifHDK* promoter in a site located between the binding site for NifA (centred in-132 relative to the transcriptional start site) and the promoter (42). IHF is a heterodimeric protein that induces a curvature in the DNA. In *E. coli*, besides being one of the most abundant binding proteins, IHF plays an important role in different processes including recombination in specific sites, start of plasmid replication and gene expression (18). IHF has been seen to regulate both positively and negatively the transcription mediated by σ^{70} holoenzyme. In the best studied cases, its effects on the σ^{70} holoenzyme seem to be direct as it does not involve other regulatory proteins (18).

It has been demonstrated how IHF stimulates the activation of the *K. pneumoniae* promoter, *PnifH*, mediated by NifA, and how it curves the adjacent DNA to the promoter (27). The stimulating effect of IHF binding is more noticeable in the weak promoters than in the strong ones. It has been proposed that the stimulation of the transcription of this promoter might occur by mechanism in which IHF would facilitate productive interactions between the two proteins, NifA and σ^{54} holoenzyme, curving the DNA at the appropriate site, Fig. 1. It has also been demonstrated that IHF binds to regulating regions of *nif* promoters of different nitrogen fixing bacteria and, in all cases, IHF binds somewhere between the promoter and the NifA binding site (27). Comparison of the IHF binding sites suggests the 5'WATCAAN₄TTR3' consensus sequence. Many sequences of potential IHF-binding sites have been

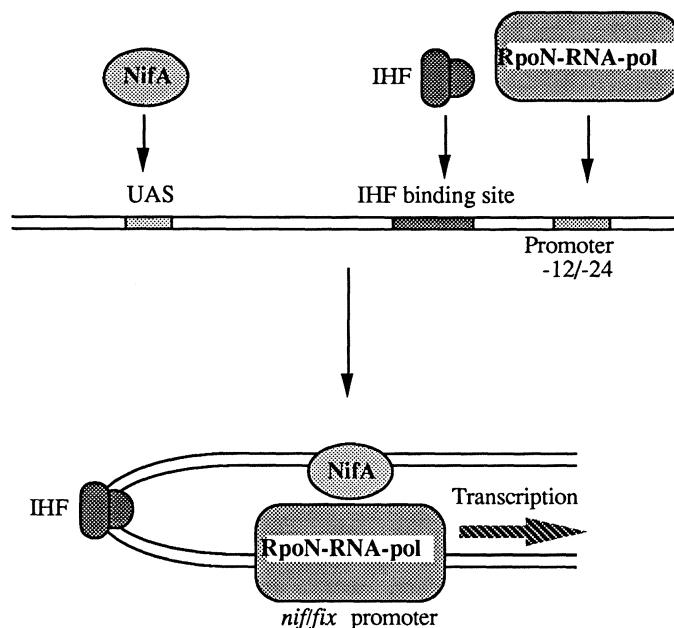


Fig. 1. Model of open complex formation in σ^{54} /NifA dependent promoters. The specific IHF binding site to promoter regulatory region, determines a productive contact between NifA transcriptional activator and holoenzyme. All involved proteins bind to DNA independently (27, 37).

found in *nif* and *fix* promoters (11, 27). Therefore, the aforementioned *PnifH* activating model (Fig. 1) seems to be utilized to numerous σ^{54} dependent promoters, as a IHF binding to promoters activated by NtrC (12), DctD (27) and XylR has been demonstrated.

Nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*

Structural genes of nitrogen fixation. In the last 10 years two groups of genes have been localized in the *R. meliloti* pSym megaplasmid. The group *nif/fix* carries the structural genes of the nitrogenase, *nifHDK*, and the *nifE*, *nifN*, and *nifB* genes necessary for the enzyme maturing. These genes are homologues of the *K. pneumoniae* *nifN* genes. The genes *nifHDKE* make up an operon. The *nifN* transcriptional unit is detached from the other *nif* genes by the main group of *nod* genes (1). An additional operon comprises the *fixA*, *B*, *C* and *X* genes that are thought to codify an electron transport chain to the nitrogenase. The three transcriptional units described are activated by the NifA regulatory protein (17, 44, 51). In a parallel way, the *nifA* expression leads the activation of the transcription of an operon with the *nifB* and *fdxN*

genes (6, 51), that codify a protein necessary for the processing of the nitrogenase FeMo cofactor and a protein, similar to a ferredoxine, necessary for nitrogen fixing, respectively.

Although a high homology is observed in the upstream sequences of the *nifHDKE* and *fixABCX* operon promoters, there is a high variation in the region between the transcriptional and the translational start sites (8). Different behaviors have been observed between the promoters, regardless of their NifA-dependent activation. Thus, for instance, although *E. coli PnifH* is activated by the *K. pneumoniae NifA* and *E. coli NtrC* proteins, no activation of *PfixA* by these heterologous proteins is observed. On the other hand, fusions of both promoters to the *lacZY* are expressed in different way under specific physiological conditions (9). Analysis of deletions of these promoters carried out in *R. meliloti* has revealed that the binding site to NifA (UAS) is not necessary for the symbiotic expression. Instead the microaerobic (but not the symbiotic) activation of the *nifH* promoter did require UAS (16). It has also been reported that the *PnifH* microaerobic (but not the symbiotic) activation seems also dependent on the downstream sequences of the transcriptional start site (50).

A second group of genes of symbiotic nitrogen fixation has been identified in the *R. meliloti* pSym megaplasmid 220 kb downstream of the *nifH* promoter. The central part of this group carries a portion of *fix* functional genes that are repeated. Their second copy is located 40 kb upstream of the *nifH* promoter. Four transcriptional units have been identified by complementation experiments and sequence analysis. Two of them, *fixNOQP* and *fixGHIS*, codify presumed membrane proteins (14, 30).

FixI is a protein high homologous to type P ATPases, that are thought to use a conformational change for the pumping of different cations through the eukaryotic and prokaryotic membranes, whereas FixG have properties characteristic of redox proteins (30). The *fixNOQP* is repeated and probably codifies an electron transport chain, as FixP is highly homologous to different *c* cytochromes. To date, no symbiotic function has been assigned to FixI and FixG. It has been observed that a different group of cytochromes is present in bacteroids (4) which may explain the existence of the *fixNOQP* genes. This explanation is also supported by the discovery that a mutant of the *B. japonicum* bcl cytochrome does not perform symbiotic nitrogen fixation (47).

General view of the regulation of *R. meliloti nif/fix* genes. The state of knowledge of the control of the expression of *R. meliloti* symbiotic fixation genes has allowed to elaborate a cascade regulation model of nitrogen fixation (Fig. 2). *R. meliloti nif/fix* genes belong to two regulons. *nifHDKE* and *nifN, fixABCX, nifA, nifB, fdxN* constitute regulon under the positive control of the NifA transcriptional activator, the activity of which is oxygen sensitive.

The second *fix* regulon is represented by the *fixNOQP, fixGHIS, fixK* and *fixLJ* repeated regulon. The *fixN* promoter is activated in microaerobiosis and symbiosis by the *fixK* product. Besides being a transcriptional activator, FixK produces a certain repression of the *nifA* and *fixK* activity. The expression of both genes is induced in microaerobiosis and symbiosis. This induction is mediated by the *fixLJ* operon products. In response to a low oxygen tension the FixL membrane protein catalyzes its own phosphorylation to a histidine residue and the subsequent phosphorylation of FixJ to an aspartate residue. The phosphorylated form of FixJ allows activation of the transcription of the *nifA* and *fixK* genes, the products of which induce the expression of the structural genes necessary for symbiotic nitrogen fixation. In aerobiosis, FixJ is dephosphorylated by the phosphatase activity of FixL, its capacity for activating transcription being inhibited.

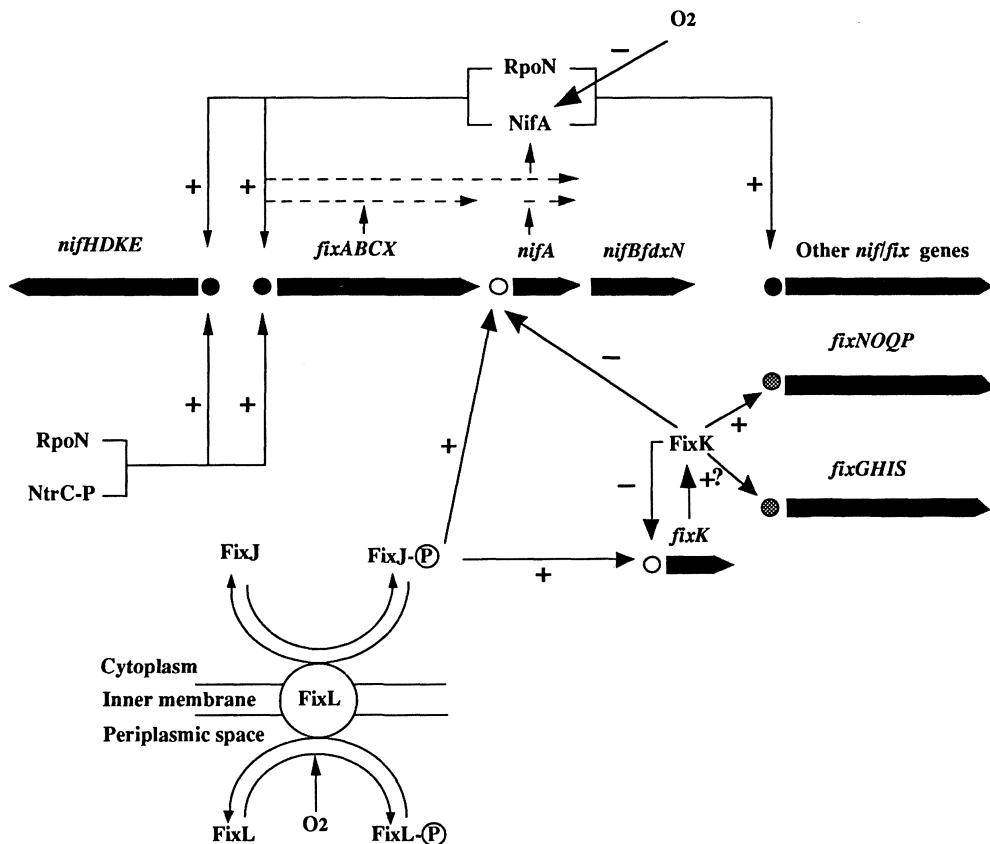


Fig. 2. Regulation of *nif/fix* genes expression in *R. meliloti*. Bold circles represent promoters activated by NifA. Open circles indicate promoters activated by FixJ. Grey circles represent promoters activated by FixK. +: activation or induction. -: repression. +?: may be activated by FixK (6).

***nifA* transcription control.** In *R. meliloti*, *nifA* transcription is not blocked in a *nifA* mutant, but it has been reported that NifA potentiated its own expression activating the *fixABCX* operon, that is upstream of the gene. By readthrough from the *fixA* promoter the quantity of *nifA* mRNA is increased (34) suggesting a positive control of its own expression. Oxygen concentration controls not only the activity of *R. meliloti* NifA protein but also the *nifA* expression through its own promoter, independently of NifA. *nifA* promoter activation may be achieved at a similar level in microaerobic culture and in symbiosis (17, 48). Therefore, O₂ tension is a regulatory effector both for the mechanisms controlling the *nifA* expression and for those that regulate the expression of the NifA-dependent *nif/fix* genes.

Characteristics, expression and function of the FixK protein. The sequence of amino acids of the FixK protein shows that it is homologous to Fnr, an *E. coli* protein necessary for the expression of the genes that codify for electron transport chains that do not use oxygen as terminal acceptor. Specifically,

both FixK and Fnr contain in their C-terminal domain a helix-turn-helix motif. This structure is probably responsible for the binding of Fnr to DNA sequences that carry a TTGAT-N₄-ATCAA consensus around -45 bp from the target genes transcriptional start site (20). This motif has been found over -45 bp upstream of the *fixN* transcriptional start site.

Although the transcriptional studies on the *fixGHIS* operon could not be performed due to a low level of expression, the presence of a TTGAC-N₄-ATCAA motif in the upstream region of the *fixG* gene suggests that the expression of the *fixGHIS* operon belongs, together with *fixNOQP*, to the FixK-dependent regulon.

An important difference between FixK and Fnr lies in the presence of a segment of 21 residues of aminoacids in the Fnr N-terminal extreme that is absent in FixK. It is believed that this segment carries a metal binding site responsible for the oxygen sensitivity of the Fnr transcriptional activity (20). FixK activity, on the other hand, is not regulated by the oxygen concentration, probably due to the absence of this fragment. The use of a *fixK::lacZ* fusion allows to know that *fixK* expression was induced in cultures subject to a low oxygen tension. The FixK protein has also a negative effect on *nifA* expression and on its own expression (5).

FixL and FixJ: regulatory proteins of the two component family that activate the *nifA* and *fixK* expression in response to microaerobic conditions. The regulation of *nifA* and *fixK* promoters arises from the fact that both of them are activated by the same pair of regulatory proteins, FixL and FixJ (5, 14). FixL and FixJ belong to the family of regulatory proteins with two components that provide a general mechanism for the transduction of signals of prokaryotic organisms and of which more than 20 examples are known. The process followed by this mechanism is the transference of a phosphate group from a histidine residue of a sensitive protein with autokinase activity, to an aspartate residue of an effector protein that is generally a transcriptional activator. The conservation of this biochemical process is reflected by homology of the aminoacid sequence between the C-terminal domains of the sensitive proteins, that carry the histidine that undergoes autophosphorylation and between the effector proteins at their N-terminus that carry in the aspartate residue a phosphate acceptor. It is possible that evolution combined these conserved modules kept with signal receptor domains and with transcription activator domains giving as a result sensory and effector proteins, respectively (31).

The state of phosphorylation of the transcriptional activator protein depends on an environmental signal that is detected by autokinase/phosphotransferase itself. Its phosphorylated state then determines the activity of the transcriptional activator. It has been demonstrated that FixL is an O₂ sensor (15) and has been characterized as a hemoprotein (19). The examination of the in vitro properties of truncated forms of FixL suggested a model of this protein based on three functional subunits: the N-terminal domain that contains three transmembrane helices, the central domain to which a hemo group is bound and that has a regulatory function, the state of oxidation of the group determining the kinase activity of the third C-terminal domain (23). The mechanism by which FixL responds to the O₂ concentration remains unknown. It has been proposed that by modification of the redox state of the hemo group at low O₂ concentrations, the autokinase and phosphotransferase activity of the FixL is activated. Alternatively, microaerobic conditions may reduce the phosphatase activity associated with FixL. This hypothesis is supported by more recent studies that have demonstrated that a soluble truncated derivative of the FixL protein shows in vitro phosphatase activity and, in the presence of ATP, this activity is suppressed by

microaerobiosis (23). The fact that other sensors of two components such as NtrB and EnvZ also show regulated phosphatase activity supports this hypothesis.

FixJ is able to activate the *nifA* and *fixK* expression when it over-expresses itself in *E. coli*, regardless of FixL and of the state of aeration of the culture, evidence that is consistent with the idea that FixJ is a transcriptional activator (25). Comparison of the C-terminal domains allows the definition of three classes corresponding to three different means of transcriptional activator of the two component family, the NtrC, OmpR, and FixJ types (31). The analysis of the deletions of the *nifA* (48) and *fixK* (49) promoters gave evidence for the necessity of a region between -62 and -45 with respect to the transcriptional start site, for the activation by FixJ. On the other hand, together with the FixJ activator the general σ^{70} factor proved to be necessary for the in vitro activation of the transcription of the *fixK* promoter (7).

Carbon metabolism and *nif/fix* regulation. Besides the aforementioned regulating elements, there is evidence that regulators from other metabolic routes of *R. meliloti* affect the expression of the symbiotic nitrogen fixation genes. Among the evidences that seem to link nitrogen fixation to the symbiotic bacterium metabolism, it has been reported that *Rhizobium* mutants unable to transport dicarboxylic acids (dCAs) form ineffective nodules in their respective plants. In free-living rhizobia, the transport of the dCAs requires the product of the *dct* genes (*dctA*, *dctBD*) and the σ^{54} (50). DctA protein is a permease located in the cytoplasmic membrane that is required for the transport of dicarboxylic acids both in free-living and in symbiosis. The DctBD regulatory system belongs to the family of two-component regulatory systems. By analogy with other systems, it is believed that DctB is a transmembrane protein with kinase activity that in response to the presence of dCAs outside the cell phosphorylates the cytoplasmic mediator, DctD. This modified form of DctD together with σ^{54} will then activate the *dctA* promoter.

It has been reported that the nature of *dct* mutations may influence the expression of nitrogen fixation genes. A mutation of the *dctBD* genes negatively affects the expression due to the *nifA* and *nifH* promoters (9). Other evidence for the existence of some type of binding between the metabolism of the carbon and the expression of the nitrogen fixation genes lies in the fact that the levels of expression produced by *nif* fusions in free-living microaerobic conditions are influenced by the available carbon source (9).

Nitrogen metabolism and nitrogen fixation regulation. A possible candidate for detecting the state of the nitrogen of the host plant, and therefore, the requirements for nitrogen reduction may be the NtrC regulatory protein. In enterobacteria, NtrC regulates different genes in conjunction with NtrB, the product of which are involved in nitrogen assimilation in response to limited nitrogen conditions. On the other hand, it also activates the *nifA* expression in *K. pneumoniae*.

A gene homologous to *E. coli* and *K. pneumoniae* *ntrC* has been identified in *R. meliloti* (43). As in *E. coli*, *R. meliloti* *ntrC* expresses itself when the cells grow in a medium with limited nitrogen. It has been demonstrated that under conditions of limited oxygen, *R. meliloti* *nif* genes may be induced and that expression of this *nif* gene is *ntrC*-dependent. Nevertheless, the fact that *ntrC* mutants are not affected in the symbiotic nitrogen fixation, indicates that the *nifA* expression is not *ntrC*-dependent in symbiotic conditions. The absence of an effect of the *ntrC* mutation on the symbiotic nitrogen fixation means that the centralized control of the bacterial nitrogen assimilation does not operate in adjusting nitrogen

fixation to the necessities of the plant. This becomes clear when we consider that in contrast to the situation with nitrogen fixing enteric bacteria, the reduced nitrogen, more than being assimilated is exported in its large part from the *R. meliloti* endosymbiotic cells to the plant.

Subsequently evidence has arisen on possible relations between the ammonium levels and the control of nitrogen fixation. Thus it has been shown that in *R. meliloti* cultures under free-living microaerobic conditions, the expression of *nifA* but not of *fixK* is negatively regulated by ammonium and nitrate, and it seems to be that this occurs through the FixL protein (39). It has also been demonstrated that when different species of *Rhizobium* are subject to nitrogen limitation, the expression of the *PnifH* and *PfixA* promoters of *R. meliloti* is activated (11), indicating a conservation of the response of *fix* promoter to ammonium levels.

***nif* and *fix* genes expression control in other symbiotic nitrogen fixer microorganisms.** In all species of *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* examined up to now, the expression of symbiotic nitrogen fixation genes is induced in microaerobic conditions. The first level at which oxygen concentration operates is the transcriptional activity of the NifA protein. All NifA proteins of *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *B. japonicum*, or *A. caulinodans* show the presence of the interdomain linker, responsible for the dependence of the NifA activity to O₂. The NifA expression is also controlled by oxygen by different mechanisms in various genera.

In *B. japonicum*, *nifA* is expressed itself at a basal level in cultures of the wild strain and of *nifA* mutants (45). At this basal level, the expression depends on the presence of an upstream activator sequence (UAS) around the -66. This UAS binds to a protein that could be a trans activator (46). In microaerobic conditions, active NifA protein induces a high level of *nifA* transcription, either directly or by repressing the expression of a hypothetical negative regulator. As has been mentioned above, there is also a *nifA* autoregulation mechanism in *R. meliloti*, *nifA* transcripts arising by readthrough the *fixA* promoter. Nevertheless, in this latter case, the NifA independent *nifA* transcription is also regulated by the O₂ concentration by means of the FixL and FixJ regulatory proteins. Although no FixL and FixJ homologous proteins have been identified in *B. japonicum*, they seem to be not necessary for *nifA* expression (3). Nevertheless, they must be necessary for the expression of other genes involved in the nitrogen fixation as indicated by the fact that mutations in the *B. japonicum* *fixL* and *fixJ* genes dramatically reduced the nitrogen fixation capacity and preventing its growth in anaerobic conditions with nitrate as electron acceptor (3). Two *B. japonicum* genes have been identified the expression of which depends on the FixJ activator: the *rpoN1* gene and the recently characterized *fixK* that seems to be repeated.

The expression of the genes needed for nitrogen fixation in *A. caulinodans* is a response to the fixed nitrogen and the oxygen tension. *A. caulinodans* *nifA* promoter has the holoenzyme σ⁵⁴ recognition sequence which explains its control over its expression by NtrC and σ⁵⁴. It has also been demonstrated that it has an upstream regulatory sequence for binding proteins similar to Fnr (41). Genes homologous to *fixL*, *fixJ*, and *fixK* have also been identified in *A. caulinodans* (32) and it has been demonstrated that mutants in these genes are deficient in symbiotic nitrogen fixation, as well as in the expression of *nifA* and *nifH* in free-living conditions. Nevertheless, a double mutant in the *ntrC* and *fixL* is necessary for the total suppression of the nitrogen fixation capacity. A nitrogen fixation regulation model has been recently proposed for *A. caulinodans* in free-living conditions. Under conditions of nitrogen limitation, NtrB might phosphorylate NtrC, that, therefore could induce *nifA* transcription. In microaerobic conditions,

the FixLJ proteins give rise to the expression of FixK, that in *A. caulinodans* works as a *nifA* positive regulator (32).

A gene similar to *fixK* has been isolated in *R. leguminosarum* bv. *viciae* (13). This gene known as *fnrN* was identified by restoring the *fixN* expression in a *R. meliloti* *fixJ* mutant. The *R. leguminosarum* *fnrN* mutant still fixed nitrogen but showed a reduced nitrogenase activity. It seems that *fnrN* controls genes in *R. leguminosarum* that contribute to the efficiency of the symbiotic nitrogen fixation. FnRN differs from *R. meliloti* FixK in that it contains a cystein motif in the N-terminal extreme that may be the cause of the oxygen sensitivity of the FnRN transcriptional activity. Another difference lies in the fact that *fixK* is subjected to a negative autoregulation (5), whereas *fnrN* seems to be positively autoregulated. Little more is known about nitrogen fixation regulation in other *Rhizobium* species.

In our laboratory, we have shown how the *R. meliloti* *nifH* and *fixA* promoters can be activated in heterologous bacteroids. Nevertheless, microaerobic conditions are not sufficient to achieve this activation in free life in most cases. On the other hand, *R. meliloti* *nifA* and *nifK* promoters induced gene expression in *Rhizobium tropici* bacteroids but not *ex planta* under a low oxygen tension (11). Therefore, there is a lot of evidence that, although oxygen can be accepted as key regulator in the expression of the symbiotic nitrogen fixation genes, there have to exist other regulatory signals. As nitrogen fixation in free-living conditions in *Rhizobium* remains undemonstrated, it is conceivable that signals exist that may repress the expression of nitrogen fixation genes in inappropriate conditions even in microaerobic conditions. The development of a nitrogenase functional complex may be a process codependent with others, of the nodule development and of the bacterial metabolism. Therefore, once the signals that remain unknown, were discovered it should be possible to have a more general vision of the complex phenomenon of the *Rhizobium*-legume symbiosis.

Acknowledgements

A.C. was a FPI fellowship recipient. Research support from the Spanish Ministry of Education and Science through CICYT projects PB87-0918 and BIO90-0521, and from Fundación Ramón Areces is gratefully acknowledged.

References

1. Aguilar, O. M., Reilander, H., Arnold, W., Pühler, A. (1987). *Rhizobium meliloti* *nifN* (*fixF*) gene is part of an operon regulated by a *nifA*-dependent promoter and codes for a polypeptide homologous to the *nifK* gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5393–5400.
2. Albright, L. M., Huala, E., Gu, Q., Ausubel, F. E. (1988) Regulation of *R. meliloti* NifA function. In Bothe, H., de Bruijn, F. J., Newton, W. E. (ed.), Nitrogen Fixation: Hundred Years After, pp. 345–349. Gustav Fischer, Stuttgart, Germany.
3. Anthamatten, D., Hennecke, H. (1991). The regulatory status of the *fixL* and *fixJ* genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **225**, 38–48.
4. Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 443–478.

5. Batut, J., Daveran, M. L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A. M., Kahn, D. (1989). *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.* **8**, 1279–1286.
6. Batut, J., de Philip, P., Reyrat, J. M., Waelkens, F., Boistard, P. (1993). Oxygen regulation of nitrogen fixation gene expression in *Rhizobium meliloti*. In Nester, E. W., Verma, D. P. S. (ed.), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction*, pp. 183–191. Kluwer, Netherlands.
7. Batut, J., Santero, E., Kustu, S. (1991). *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein FixJ from *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **173**, 5914–5917.
8. Better, M., Lewis, B., Corbin, D., Ditta, G., Helinski, D. R. (1983). Structural relationships among *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters. *Cell* **35**, 379–385.
9. Birkenhead, K., Nooman, B., Reville, W. J., Boesten, B., Manian, S. S., O'Gara, F. (1990). Carbon utilization and regulation of nitrogen fixation genes in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **3**, 167–173.
10. Buck, M., Miller, S., Drummond, M., Dixon, R. (1986). Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* **320**, 374–378.
11. Cebolla, A., Ruiz-Berraquero, F., Palomares, A. (1994). Analysis of the expression from *Rhizobium meliloti* *fix*-promoters in other *Rhizobium* backgrounds. *Microbiology* **140**, 443–453.
12. Claverie-Martín, F., Magasanik, B. (1991). Role of integration host factor in the regulation of the *glnH*p2 promoter of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**, 1631–1635.
13. Colonna-Romano, S., Arnold, W., Schlüter, A., Boistard, P., Pühler, A., Preifer, U. B. (1990). An FnR-like protein encoded in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* shows structural and functional homology to *Rhizobium meliloti* FixK. *Mol. Gen. Genet.* **223**, 138–147.
14. David, M., Daveran, M. L., Batut, J., Declien, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P., Khan, D. (1988). Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* **54**, 671–683.
15. de Philip, P., Batut, J., Boistard, P. (1990). *Rhizobium meliloti* FixL is an oxygen sensor and regulates *R. meliloti* *nifA* and *fixK* genes differently in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 4255–4262.
16. Ditta, G., Virts, E., Helinski, D. R. (1988) Oxygen regulation of *nif* genes in *Rhizobium meliloti*. In Verma, D. P. S., Palacios, R. (ed.), *Molecular Plant-Microbe Interactions*, pp. 109–110. APS Press, Saint Paul, MN.
17. Ditta, G., Virts, E., Palomares, A., Kim, C. K. (1987). The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.* **169**, 3217–3223.
18. Friedman, D. I. (1988). Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell* **55**, 545–554.
19. Gilles-Gonzalez, M. A., Ditta, G., Helinski, D. R. (1991). A haemoprotein with quinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* **350**, 170–172.
20. Green, J., Trageser, M., Six, S. (1991). Characterization of the FnR protein of *Escherichia coli*, an iron binding transcriptional regulator. *Proc. R. Soc. London B.* **244**, 137–144.
21. Gubler, M. (1989). Fine-tunning of *nif* and *fix* gene expression by upstream activator sequences in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiology* **3**, 149–159.
22. Gussin, G. N., Ronson, C. W., Ausubel, F. M. (1986). Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 567–591.
23. Helinski, D. R., Monson, E. K., Roberts, R. C., Weinstein, M., Lois, A. F., Agron, P. G., Ditta, G. (1992) The mechanism of oxygen-sensing in *Rhizobium meliloti* and the development of plasmid vectors stably maintained in *Rhizobium in planta* and *ex planta*. In Villa, T. G., Abalde, J. (ed.), *Profiles on Biotechnology*, pp. 677–689. Servicio Publicaciones Universidad Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
24. Helmann, J., Chamberlin, M. J. (1988). Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 839–872.
25. Hertig, C., Li, R. Y., Louarn, A. M., Garnerone, A. M., David, M., Batut, J., Kahn, D., Boistard, P. (1989). A *Rhizobium meliloti* regulatory gene, *fixJ*, activates the transcription of *R. meliloti* *nifA* and *fixK* genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 3354–3365.
26. Holtel, H., Abril, M.-A., Marques, S., Timmis, K. N., Ramos, J. L. (1990). Promoter-upstream activator sequences are required for expression of the *xylS* gene and upper-pathway operon on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Mol. Microbiol.* **4**, 1551–1556.

27. Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S., Kustu, S. (1990). The Integration Host Factor (IHF) stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* **63**, 11–22.
28. Huala, E., Ausubel, F. (1989). The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter. *J. Bacteriol.* **171**, 3354–3365.
29. Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1987). Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5182–5186.
30. Kahn, D., David, M., Domergue, O., Daveran, M.-L., Ghai, J., Hirsch, P. R., Batut, J. (1989). *Rhizobium meliloti fixGHI* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **171**, 929–939.
31. Kahn, D., Ditta, G. (1991). Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the –35 binding domain of sigma factors. *Mol. Microbiol.* **5**, 987–997.
32. Kaminski, P. A., Mandon, K., Arigoni, F., Desnoues, N., Elmerich, C. (1991). Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*: identification of a *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. *Mol. Microbiol.* **5**, 1983–1991.
33. Keener, J., Wong, P., Popham, D., Wallis, J., Kustu, S. (1987). A sigma factor and auxiliary proteins required for nitrogen-regulated transcription in enteric bacteria. In Reznikoff, W. S. (ed.), *RNA Polymerase and the Regulation of Transcription*, pp. 159–175. Elsevier, New York.
34. Kim, C. H., Helinski, D. R., Ditta, G. (1986). Overlapping transcription of the *nifA* regulatory gene in *Rhizobium meliloti*. *Gene* **50**, 141–148.
35. Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D., Weiss, D. (1989). Expression of the σ^{54} (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanisms. *Microbiol. Rev.* **53**, 367–376.
36. Ledebur, H., Gu, B., Sodja, J., Nixon, T. (1990). *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* *dctD* gene products bind to tandem sites in an activation sequence located upstream of σ^{54} -dependent *dctA* promoters. *J. Bacteriol.* **172**, 3888–3897.
37. Morett, E., Buck, M. (1988). NifA-dependent *in vivo* protection demonstrated that the upstream activator sequence of *nif* promoter is a protein binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9401–9405.
38. Ninfa, A. J., Reitzer, L. J., Magasanik, B. (1987). Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *Escherichia coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* **50**, 1039–1046.
39. Nooman, B., Motherway, M., O'Gara, F. (1992). Ammonia regulation of the *Rhizobium meliloti* nitrogenase structural and regulatory genes under free-living conditions: involvement of the *fixL* gene product? *Mol. Gen. Genet.* **234**, 423–428.
40. Popham, D., Szeto, D., Keener, J., Kustu, S. (1989). Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* **243**, 629–635.
41. Ratet, P., Pawloski, K., Schell, J., de Bruijn, F. J. (1989). The *Azorhizobium caulinodans* nitrogen fixation regulatory gene, *nifA*, is controlled by the cellular nitrogen and oxygen status. *Mol. Microbiol.* **3**, 825–838.
42. Santero, E., Keener, J., Kustu, S. (1989). *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7346–7350.
43. Szeto, W. W., Nixon, B. T., Ronson, C. W., Ausubel, F. M. (1987). Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.* **169**, 1423–1432.
44. Szeto, W. W., Zimmerman, J. L., Sundaresan, V., Ausubel, F. M. (1984). A *Rhizobium meliloti* symbiotic regulatory gene. *Cell* **36**, 1035–1043.
45. Thöny, B., Fischer, H.-M., Anthamatten, D., Bruderer, T., Hennecke, H. (1987). The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8479–8499.
46. Thöny, B., Hennecke, H. (1989). The 24/12 promoter comes from ages. *FEMS Microbiol. Rev.* **63**, 341–358.
47. Thöny-Meyer, L., Stax, D., Hennecke, H. (1989). An unusual gene cluster for the cytochrome *bcl* complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirements for effective root nodule symbiosis. *Cell* **57**, 683–697.

48. Virts, E. L., Stanfield, S. W., Helinski, D. R., Ditta, G. (1988). Common regulatory elements control symbiotic and microaerobic induction of *nifA* in *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 3062–3065.
49. Waelkens, F., Foglia, A., Morel, J.-B., Fourment, J., Batut, J., Boistard, P. (1992). Molecular genetic analysis of the *Rhizobium meliloti fixK* promoter: identification of sequences involved in positive and negative regulation. Mol. Microbiol. **6**, 1447–1456.
50. Wang, K., Birkenhead, K., Boesten, B., O'Gara, F. (1989). Genetic analysis and regulation of the *Rhizobium meliloti* C4-dicarboxylic acids transport genes. Gene **85**, 135–144.
51. Weber, G., Reiländer, H., Pühler, A. (1985). Mapping and expression of a regulatory nitrogen fixation gene (*fixD*) of *Rhizobium meliloti*. EMBO J. **4**, 2751–2756.
52. Young, J. P. W. (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In Stacey, G., Burris, R. H., Evans, H. J. (ed.), Biological Nitrogen Fixation, pp. 43–86. Chapman and Hall, New York, London.

Genes involved in the regulation of invertase production in *Saccharomyces cerevisiae*

Lucas del Castillo Agudo,* Daniel Gozalbo

Departamento de Microbiología, Sección de Farmacia, Universidad de Valencia

Received 10 March 1994/Accepted 7 October 1994

Summary

The expression of *Saccharomyces cerevisiae* *SUC* genes is exclusively regulated by catabolic repression, mediated by glucose. Genes involved in this process have been defined by means of mutants either unable to express invertase or with constitutive phenotype, although none of the genes is specific for invertase regulation. The affected genes in mutants unable to produce invertase are designated *SNFX*. These genes can be assorted into two groups considering either their function in regulation of gene expression or their epistatic relationships. Mutants with constitutive phenotype have been selected either by resistance to 2-deoxyglucose or by suppression of *snf* mutations. Among the different genes previously outlined, some of which code for transcription factors, only the *MIG1* product, a «zinc finger» protein, shows a clear capacity of binding DNA in vitro. Besides the ON/OFF switch mechanism of the expression of *SUC* genes, some genes seem to play a role in modulating invertase expression, either hindering or stimulating transcription. A model to define the relationship between the different gene products involved in the regulation of transcription of the *SUC* genes is proposed.

Key words: yeast, invertase, *SUC* genes, gene expression, catabolite repression

Resumen

La expresión de los genes *SUC* en *Saccharomyces cerevisiae* está regulada exclusivamente por represión catabólica, inducida por glucosa. Los genes implicados en este proceso han sido definidos

* Correspondence to: Lucas del Castillo. Departamento de Microbiología, Sección de Farmacia. Universidad de Valencia. Av. Vicente Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot. Tel.: 96-3864299. Fax: 96-3864682. E-mail: castillg@vm.ci.uv.es.

mediante mutantes incapaces de expresar invertasa, o expresarla de forma constitutiva; ninguno de estos genes es específico para la regulación de la producción de invertasa. Los genes afectados en mutantes incapaces de producir invertasa han sido designados *SNFX* y pueden clasificarse en dos grupos, según su función en la regulación de la expresión génica y por sus relaciones epistáticas. Los mutantes con fenotipo constitutivo se han aislado bien por resistencia a 2-desoxiglucosa o como supresores de mutaciones *snf*. De los diferentes genes anteriormente señalados, entre los que se encuentran algunos factores de transcripción, sólo el producto del gen *MIG1*, una proteína con motivos de «dedos de zinc», muestra afinidad por el DNA in vitro. Además del mecanismo de regulación ON/OFF de la transcripción de los genes *SUC*, algunos genes parecen actuar como moduladores de la expresión de invertasa, bien sea obstaculizando o estimulando la transcripción. Se propone un modelo que define las relaciones funcionales entre los productos de los genes implicados en la transcripción de los genes *SUC*.

Introduction

The expression of *Saccharomyces cerevisiae* *SUC* genes is exclusively regulated by catabolic repression, mediated by glucose, without any mechanism of induction of invertase synthesis by substrate.

The regulation of these genes is, apparently, a simple model to study the repression mechanisms in eukaryotes, without interference with other regulatory pathways. In prokaryotes, the catabolic repression paradigm is represented by the lac operon, a relatively simple mechanism; therefore, the regulation of *SUC* genes might involve a mechanism not much more complex than the prokaryote operon model. However, this is not the case since the regulation of *SUC* genes requires more than a dozen genes, as deduced from the study of mutants either constitutive or unable to express invertase. Such mutants display, as a general rule, pleiotropic effects, their function being required for the expression of other genes regulated by glucose repression, or even for the expression of genes apparently unrelated to this process. Due to their pleiotropy, mutants in a given gene have been obtained following different selection methods by different teams. Therefore, they appear in the literature under different names (14, 34).

The complex process of glucose repression having been already reviewed elsewhere, this article focus specifically on the regulation of *SUC* genes, although both processes overlap, since invertase synthesis is controlled by glucose repression.

Mutants unable to express invertase

Mutants unable to produce invertase do not ferment neither raffinose nor saccharose. The affected genes are designated *SNFX* (Sucrose Non Fermenting) (3). Six genes (*SNF1–SNF6*) were initially described, *SNF3* being implicated in glucose transport (2). The remaining genes can be assorted into two groups considering their function in regulation of gene expression or their epistatic relationships.

The (*SNF2*, *SNF5* and *SNF6*) genes are transcription factors, and they are epistatic with *SSN20* (*SPT6*). (20, 21).

SNF2, *SNF5* and *SNF6*, though functionally interdependent, seem to play different roles in the process of transcriptional activation (20, 21). Recent evidences suggest that they may modify the chromatin structure, thus facilitating the transcription process: (i) the structure of the chromatin in the promoter region of *SUC2* differs, under derepression conditions, among *SNF* or *snf* strains (23); (ii) mutations in *HTA1* and *HTB1*, coding for H2A and H2B histones, suppress the *snf2*, *snf5* or *snf6* mutations (Kruger et al., unpublished results referred by Winston and Carlson, [40]), and (iii) *SNF2*, identical to *SWI2*, shows sequence homology with helicases, which suggests a possible mechanism of action of the Snf2p protein (21).

The other group includes the functionally related *SNF1* and *SNF4* genes. Their function in the regulation of *SUC* genes is different from that of the previous group (*SNF2*, *SNF5* and *SNF6*), as suggested by their epistatic relationships with *SSN20*. Mutations in *SSN20* do not suppress *snf1* or *snf4* mutations, which are suppressed by mutations in *SSN6* (31), which suggests the existence of two or more pathways for the control of invertase synthesis. Snf1p possesses a protein (serine/threonine) kinase activity essential for an accurate regulation of invertase synthesis, its activity being stimulated by interaction with Snf4p (5, 18). Although its precise role is not yet known, the protein-kinase activity of Snf1p is important *in vivo*, as shown by the fact that a plant protein-kinase suppresses *snf1* mutations when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, indicating a well maintained function, even though the substrate of this activity has not yet been determined (1).

Another group of four genes (*SNF7*–*SNF10*) has been described by Vallier and Carlson (37), although their function has not been yet defined; *SNF7* has been cloned recently, and sequence analysis defines an acidic protein of 27 kDa (35).

Mutations with constitutive phenotype

This group includes genes with mutant alleles whose preeminent phenotype is the constitutive expression of invertase. The different mutants have been selected either by their resistance to 2-deoxyglucose (a non metabolizable glucose analogue) when saccharose or raffinose were used as carbon source, or by its role as suppressors of *snf* mutations.

The genes characterized by resistance to 2-deoxyglucose are: *HXK2* (9, 25), *HEX2* (*REG1*) (1, 24), *GRR1* (9) and *CID1* (26). The *HXK2* gene codes for hexokinase P2, one of the three enzymes able to phosphorylate glucose in yeast, which also seems to possess protein kinase activity (17). The role of *HXK2* in repression by glucose is clearly established, although its particular function has not been defined yet. There is evidence for a separated mechanism for each activity (8), as well as for a functional relationship between both regulatory and catalytic activities (22). Little is known about the function of *HEX2*, *CID1* and *GRR1*, though it has been suggested that their role is to generate and to transmit the signal that determines the repression by glucose (30).

The genes characterized by suppression of *snf* mutations are grouped into two categories: (i) those suppressing *snf1* mutations, including eight groups of complementation (*SSN1*–*SSN8*) (3, 4), and (ii) those which suppress *snf2* mutations, defining a unique group of complementation (*SSN20*) (3, 26, 27).

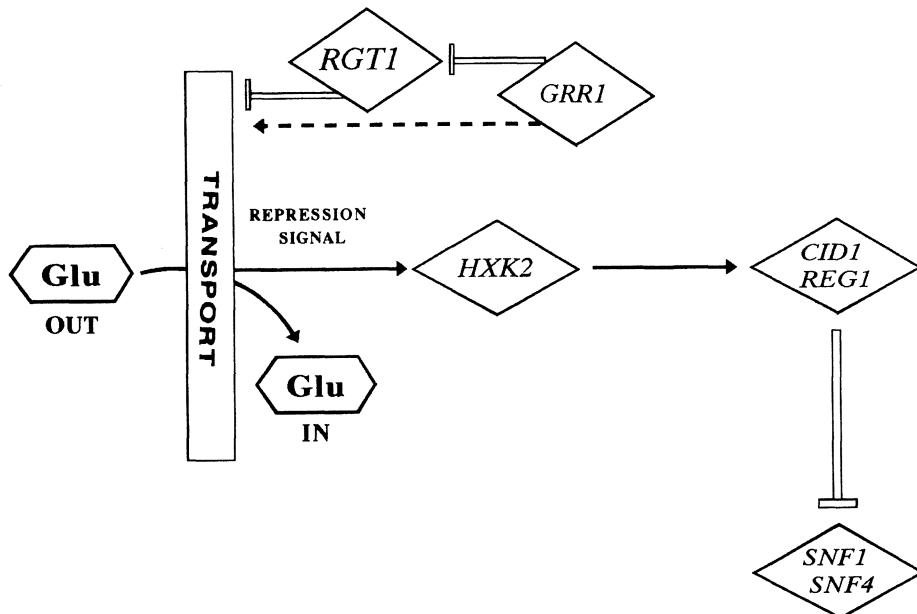


FIG. 1. Transmission of the repression signal for the transcription of *SUC* genes in the presence of glucose. The product of the *HXK2* gene would act as primary sensor and would transmit the repression signal by activating the functions determined by *CID1* and *REG1*, and then blocking the kinase activity of the *Snf1p*Snf4p* complex. The kinase activity can be blocked either at transcriptional level (of *SNF1* and/or *SNF4*), or, alternatively, by a direct action on *Snf1p*Snf4p*. *Grr1p* activates the transport of glucose into the cell by inhibiting *Rgt1p* activity. This process seems to be involved in the generation of repression signal.

SSN20 codes for a transcription factor involved in several functions (6); furthermore, *ssn20* mutations are able to suppress mutations in *SNF2*, *SNF5* and *SNF6*, suggesting a functional relationship among these genes.

The *SSN6* (CYC8) gene, which probably codes for another transcription factor, is epistatic with *SNF1* and *SNF4*, and *ssn6* mutants have a pleiotropic effect on the genes regulated by catabolic repression, as well as on genes involved in the determination of yeast mating type (31).

A relevant aspect is the phenotypic identity between *ssn6* cells and mutants in the pleiotropic *TUP1* gene, which were characterized by their capacity to utilize thymidine monophosphate, and that affect also several physiological functions (33, 39). *SSN6* and *TUP1* would form the *Ssn6p*Tup1p* complex, an unspecific transcriptional repressor, that would act throughout specific receptors able to bind the promoter region of a particular gene (19, 39). Among these specific receptors the product of *MIG1* is found (28) (see below).

The Ssn6p protein contains a TPR (Tetratrico Peptide Region) motif in the N-terminal domain (32), similar to that found in some proteins involved in regulation of transcription (revised by Goebl and Yanagida, [15]).

There are not data to establish the function of the other *SSN* genes.

Proteins that bind DNA

Among the products of the different genes previously outlined, only the *MIG1* product, a «zinc finger» protein, is able to bind to DNA in vitro; the Mig1p protein recognises specific sequences in the promoter region of *SUC2*, as well as in *GAL1* and *GAL4* promoters (28); once associated to its DNA target site, Mig1p would serve to bind to non specific transcription factors, probably through the Ssn6p*Tup1p complex, which blocks transcription by RNApolII.

Other genes coding for proteins with «zinc fingers» motifs, with potential capability of binding to DNA, have been characterised. One of these proteins is the product of *MSN1* (11). However, the capability of this protein to bind DNA in vitro is not specific for *SUC* genes; it can act either in a direct way on *SUC* promoters or activating the expression of other gene(s), which in turn would stimulate the synthesis of invertase.

Two additional genes designated *MSN2* and *MSH1*, also coding for «zinc fingers» proteins, have been isolated. Both genes are individually dispensable for the expression of the *SUC* genes, but their simultaneous absence reduces 2–3 fold the production of invertase (12).

Genes modulating the expression of *SUC* genes

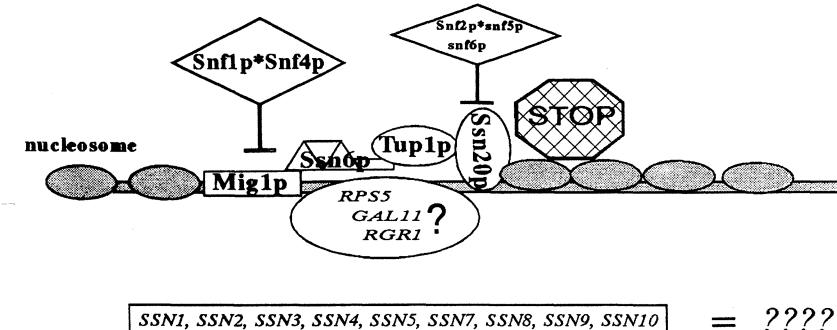
Some genes involved in the regulation of invertase expression do not have a drastic effect on the production of this enzyme, but they seem to play a role in modulating the expression, either hindering (*MSN2*, *MSH1*, *RPS5* or *GAL11*) or stimulating (*SNF7-SNF10*) transcription. The phenotype of the double mutant *msn2-msh1* is similar to that of strains carrying the *RPS5* gene, which express 2–3 fold less invertase (from *SUC5*) than strains with the *rps5* allele (7); since *RPS5* is dominant, its gene product may act as a repressor that, may slow down the transcription of *SUC5* (7). *RPS5* is pleiotropic, affecting also the synthesis of iso-1-cytochrome c, as well as the expression of *SUC1* and *SUC4* (36).

This phenotype (lower production of invertase) is not restricted to *RPS5*, as it is shared by several genes, such as *RGR1* (29) *GAL11* (37) and *SNF7-SNF10*.

From a genetic puzzle to a possible model

The expression of *SUC* genes neither corresponds with a simple model, since requires the intervention of numerous genes, nor represents a specific mechanism, since most of these genes are involved in several functions, whose pleiotropy affects not only the catabolic repression mediated by glucose, but also other processes (such as expression mediated by δ element promoters, differentiation between haploid or diploid condition, and sporulation [6, 31, 33]).

A: Repression state



B: Derepression state

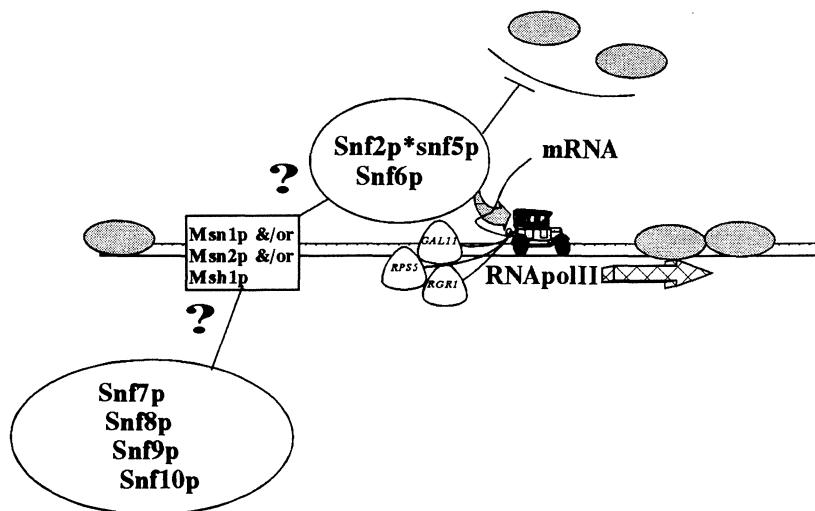


Fig. 2. Mechanisms of repression maintenance (A) and activation of the expression of *SUC* genes (B). (A): Mig1p protein binds to the promoter and allows interaction with Ssn6p and Tup1p, facilitating the binding of the transcription repression factor Ssn20p, that in turn prevents the access of the Snf2p*Snf5p/Snf6p activating complex, thus generating a «stop signal» for RNA polymerase II. The function of other *SSN* genes has not been determined. (B): Under expression conditions, Mig1p and Ssn6p (and probably Tup1p) are dissociated from the promoter by the action of Snf1p*snf4p, allowing Snf2p*Snf5p/Snf6p to open the chromatin in the regulatory region by releasing two nucleosomes and displacing Ssn20p. Snf2p*Snf5p/Snf6p could bind to the promoter through interactions with some of the Msn1p/Msn2p/Msh1p protein complexes. The function of the Snf7p-Snf10p proteins has not been yet defined. The products of *GAL11*, *RPS5* and *RGR1* would play the role of ballast for the RNA polymerase II, preventing an excessive synthesis of invertase.

In an attempt to establish a model to understand the order of events and the possible role of the different genes involved in invertase production, we can group the genes into the following three functional levels:

- (a) Generation and transmission of the repression signal.
- (b) Repression - Derepression of transcription.
- (c) Modulation of the expression

In the first level, the product of *HXK2* would have a role as primary sensor, detecting in some way the entry of glucose into the cell, and triggering the repression signal. This signal would be transmitted to the Snf1p*Snf4p complex; in this step, *REG1* (*HEX2*) and *CID1*, whose specific roles have not been determined yet would act. *GRR1* could play a central role in the repression by glucose, since a *grr1* mutant not only is not constitutive for invertase production, but *SUC2* expression becomes induced by glucose (13). This phenotype would involve a strong repressor effect, exercised by the product of *GRR1*, that would silence a possible latent mechanism of induction. However, *grr1* mutants also show an altered transport of glucose, suggesting the involvement of transport in glucose sensing (10, 37).

A gene (*RGT1*) that seems to play a role as inhibitor of glucose transport has been recently described (10, 36). The function of this gene is repressed by the product of *GRR1*. Fig. 1 shows the possible relationships among the different genes that generate and transmit the repression signal in the presence of glucose. This signal would block the function of both the Snf1p*Snf4p complex and Snf2p*Snf5p (Fig. 2).

In the second level, in the presence of glucose, Mig1p would bind a specific sequence in the UAS region of *SUC* genes (and other genes regulated by glucose), and would be the anchor for the negative transcription factors Ssn6p and Tup1p, thus blocking transcription (Fig. 2A). Binding of Mig1p to DNA would help to maintain a local chromatin structure packed enough to prevent the transcription process (23). This packed chromatin structure would be also favoured by the Ssn20p protein (40) (Fig. 2A).

In absence of the repression signal, Snf1p*Snf4p complex would act blocking the inhibition of transcription by Mig1p*Ssn6p*Tup1p complex, and other proteins that bind DNA, such as Msn1p, Msn2p and Msh1p, would act stimulating transcription (Fig. 2B).

In addition, in the absence of glucose, Snf2p, Snf5p and Snf6p would act on the structure of chromatin, exerting an antagonist effect to the product of the *SSN20* gene, which would generate a relaxed chromatin structure, with the loss of two nucleosomes in the promoter region (23) (Fig. 2B). The function of this set of genes is not specific for *SUC* regulation; they act either as activators (*SNF*) or as repressors (*SSN*) of transcription (40).

Activators and repressors of the transcription of the *SUC* genes could be affected by the products of some genes that we call modulators. The products of these genes would operate in the transcription without having a drastic effect. Consequently, a suitable expression of both the *SUC* genes, and other genes regulated by catabolic repression, requires this modulated regulation. Among these genes are *RPS5*, *GALL11*, *RGR1*, and probably some genes of the group *SNF7-SNF10* (Fig. 2B). Most of these genes have been hardly studied at physiological level to define their function.

Some of these transcriptional factors may be present in very small amounts, and they could become limiting factors when the copy number of target promoters increases, allowing partial expression of *SUC*

genes under repressing conditions, and probably limiting the activity of transformants carrying a high copy number of *SUC* genes (16).

This model takes into account only some of the genes with a known or supposed function in invertase production, and it certainly contains gaps not easily filled in with the present available data.

Acknowledgements

This work was supported by the European Community (Contract BAP 0264D to F. K. Zimmermann, Institut für Mikrobiologie, Technische Hochschule, Darmstadt, Germany) and by a research grant No. 0896-84 from the Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT), Spain, to L. del Castillo.

References

1. Alderson, A., Sabelli, P. A., Dickinson, J. R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P. R., Halford, N. G. (1991). Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by plant protein kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8602–8605.
2. Bisson, L. F., Neigeborn, L., Carlson, M., Fraenkel, D. G. (1987). The *SNF3* gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**, 1656–1662.
3. Carlson, M. (1987). Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**, 4873–4877.
4. Carlson, M., Osmond, D. C., Neigeborn, L., Botstein, D. (1984). A suppressor of *snf1* mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. *Genetics* **107**, 19–32.
5. Celenza, J. L., Carlson, M. (1989). Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae SNF1* protein kinase and the evidence for functional interaction with the *SNF4* protein. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5034–5044.
6. Clark-Adams, C. D., Winston, F. (1987). The *SPT6* gene is essential for growth and is required for delta-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 679–686.
7. del Castillo, L., Zimmermann, F. K. (1987). Novel genetic elements controlling invertase production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1583–1588.
8. Entian, K. D., Frölich, K. U. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering repression. *J. Bacteriol.* **158**, 29–35.
9. Entian, K. D., Zimmermann, F. K. (1982). New genes involved in carbon catabolite repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **151**, 1123–1128.
10. Erickson, J. R., Johnston, M. (1994). Suppressors reveal two classes of glucose repression genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **136**, 1271–1278.
11. Estruch, F., Carlson, M. (1990). Increased dosage of the *MSN1* gene restores invertase expression in yeast mutants defective in the *SNF1* protein kinase. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6959–6964.
12. Estruch, F., Carlson, M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a *SNF1* protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3872–3881.
13. Flick, J. S., Johnston, M. (1991). *GR1* of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5101–5112.

14. Gancedo, J. M. (1992). Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **206**, 297–313.
15. Goebel, M., Yanagida, M. (1991). The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 173–177.
16. Gozalbo, D. (1992). Multiple copies of *SUC4* regulatory regions may cause partial de-repression of invertase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **231**, 437–442.
17. Herrero, P., Fernández, R., Moreno, F. (1989). The hexokinase isoenzyme PII of *Saccharomyces cerevisiae* is a protein kinase. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1209–1216.
18. Hubbard, E. J. A., Yabg, X. L., Carlson, M. (1992). Relationship of the cAMP-dependent protein kinase pathway to the *SNF1*-protein kinase and invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **130**, 71–80.
19. Keleher, C. A., Redd, M. J., Schultz, J., Carlson, M., Johnson, A. D. (1992). Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* **68**, 709–719.
20. Laurent, B. C., Carlson, M. (1992). Yeast *SNF2/SWI2*, *SNF5* and *SNF6* proteins function coordinately with the gene-specific transcriptional activators *GAL4* and Bicoid. *Genes and Development* **6**, 1707–1715.
21. Laurent, B. C., Yang, X. L., Carlson, M. (1992). An essential *Saccharomyces cerevisiae* gene homologous to *SNF2* encodes a helicase-related protein in a new family. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1893–1902.
22. Ma, H., Bloom, L. M., Walsh, C. T., Botstein, D. (1989). The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5643–5649.
23. Matallana, E., Franco, L., Pérez-Ortíz, J. E. (1992). Chromatin structure of the yeast *SUC2* promoter in regulatory mutants. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 395–400.
24. Matsumoto, K., Yoshimatsu, T., Oshima, Y. (1983). Recessive mutations conferring resistance to carbon catabolite repression of galactokinase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **153**, 1405–1414.
25. Michels, C. A., Hanenberger, K. M., Sylvestre, Y. (1983). Pleiotropic mutations regulating resistance to glucose repression in *S. carlsbergensis* are allelic to the structural gene for hexokinase B. *J. Bacteriol.* **153**, 574–578.
26. Neigeborn, L., Carlson, M. (1987). Mutations causing constitutive invertase synthesis in yeast: genetic interactions with *snf* mutations. *Genetics* **115**, 247–253.
27. Neigeborn, L., Rubin, K., Carlson, M. (1986). Suppressors of *snf2* mutations restore invertase derepression and cause temperature-sensitive lethality in yeast. *Genetics* **112**, 741–753.
28. Nehlin, J. O., Carlberg, M., Ronne, H. (1991). Control of yeast *GAL* genes by *MIG1* repressor, a transcriptional cascade in glucose response. *EMBO J.* **10**, 3373–3377.
29. Sakay, A., Shimizu, Y., Kondou, S., Chibazakura, T., Hishinuma, F. (1990). Structure and molecular analysis of *RGRI*, a gene required for glucose repression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4130–4138.
30. Schüller, H. J., Entian, K. D. (1991). Exogenous suppressors of yeast glucose derepression mutants leading to constitutive synthesis of several glucose-repressible enzymes. *J. Bacteriol.* **173**, 2045–2052.
31. Schultz, J., Carlson, M. (1987). Molecular analysis of *SSN6*, a gene functionally related to *SNF1* protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3637–3645.
32. Schultz, J., Marshall-Carlson, L., Carlson, M. (1990). The N-terminal TPR region is the functional domain of *SSN6*, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4744–4756.
33. Stark, H. C., Fugit, D., Mowshowitz, D. B. (1980). Pleiotropic properties of a yeast mutant insensitive to catabolite repression. *Genetics* **84**, 921–928.
34. Trumbly, R. J. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**, 15–21.
35. Tu, J., Vallier, L. G., Carlson, M. (1993). Molecular and genetic analysis of the *SNF7* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **135**, 17–23.
36. Valentin, E., Zueco, J., Nieto, A., Sentandreu, R., del Castillo, L. (1992). Phenotype traits associated with different alleles at the *RPS5* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **21**, 291–293.

37. Vallier, L. G., Carlson, M. (1991). New *SNF* genes, *GAL1* and *GRR1*, affect *SUC2* expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **129**, 675–684.
38. Vallier, L. G., Coons, D., Bisson, L. F., Carlson, M. (1994). Altered regulatory responses to glucose are associated with a glucose transport defect in *grr1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **136**, 1279–1285.
39. Williams, F. E., Trumbly, R. J. (1990). Characterization of *TUP1*, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6500–6511.
40. Winston, F., Carlson, M. (1992). Yeast *SNF/SWI* transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends in Genet.* **8**, 387–391.

Autolytic effect of the antibiotic produced by *Myxococcus coralloides* D

M. Dolores Montoya,[†] Antonio Gálvez,[‡] José M. Arias, Enrique Montoya*

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

Received 20 July 1994/Accepted 14 September 1994

Summary

Myxococcus coralloides D secretes an antibiotic, named corallolysin, when grown on a rich medium. When a critical concentration is reached, this antibiotic lyses the producer bacterium either during vegetative growth or during morphogenesis. Corallolysin has no effect on resting cells nor on myxospores. The autolytic effect is caused by the early inhibition of RNA synthesis.

Key words: myxobacteria, antibiotic, autolysis, corallolysin, *Myxococcus coralloides* D

Resumen

Cuando *Myxococcus coralloides* D crece vegetativamente en un medio rico produce un antibiótico, llamado coralolisina. Al alcanzar una concentración crítica, este antibiótico induce la lisis de la bacteria productora, cuando ésta crece vegetativamente o durante el proceso de morfogénesis. La coralolisina no tiene efecto sobre células en reposo ni sobre mixosporas. El efecto autolítico parece estar causado por la inhibición temprana de la síntesis de RNA.

* Correspondence to: Enrique Montoya. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Avda. de Fuentenueva s/n. 18002 Granada. Tel.: 958-242857. Fax: 958-243246.

† Present address: Hospital General de Elda, Alicante.

‡ Present address: Departamento de Biología Experimental y Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén.

Introduction

The growth cycle of *Myxococcus coralloides* D when cultivated on suitable solid media culminates in the production of spore-forming fruiting bodies. In nutrient-rich liquid media the bacterium grows vegetatively in a dispersed manner and after the exponential growth phase undergoes rapid autolysis, with no stationary phase (1, 2).

During vegetative growth *M. coralloides* D produces an antibiotic active against *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria (3, 4). In routine disk-diffusion tests on solid media cultures, the antibiotic had no effect on *M. coralloides* D. In this work, however, we show that *M. coralloides* D growing vegetatively in a liquid medium is lysed by the antibiotic when the latter reaches a critical concentration.

Materials and methods

Organisms, media and growth conditions. *M. coralloides* D, isolated in our laboratory (1), was used both for the production of the antibiotic and the autolysis assays. *S. aureus* ATTC 6538P (240CECT) was used to test antibiotic activity. *M. coralloides* D was grown routinely in CT medium (1% Difco casitone plus 0.1 MgSO₄.7H₂O in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7). Antibiotic production was carried out in submerged culture, with agitation and aeration, using TTG medium (1% trypticase BBL plus 0.1% MgSO₄.7H₂O and 0.5% glucose in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7). All cultures were grown at 30°C. Optical density (OD) was measured at 650 nm with a Spectronic-20 spectrophotometer.

Antibiotic extraction and purification. Cultures at the beginning of the lytic phase were centrifuged and the cell-free supernatant was adsorbed onto 1.25% Florisil (Serva, Heidelberg, Germany) under continuous stirring for 30 min. Florisil was recovered by decanting and centrifuging; it was washed with water and extracted with 50% acetone in water. Eluates were acidified to pH 5 with HCl and then extracted with petroleum ether. The antibiotic was removed from the ether by extraction with 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 8. Finally, the antibiotic was extracted from aqueous solution with chloroform and the extracts were desiccated under reduced pressure.

The greenish-yellow oleaginous residue was redissolved in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7; the insoluble residue was discharged and the solution, adjusted to an antibiotic concentration of 500 units, was sterilized by filtration.

One unit of the antibiotic is defined as the concentration per ml causing an inhibition zone of 9 mm when the activity is determined by disk-diffusion assay against *S. aureus*, and is equivalent approximately to 0.25 µg per ml of dry residue.

Preparation of exponentially growing cells. Congo red (5 µg/ml) was added to exponential growing cultures of *M. coralloides* D in CT medium (OD about 0.3) to avoid agglutination (6) before

transfer to Spectronic tubes and incubated at 30°C with continuous agitation. The desired quantities of stock solution of the antibiotic were added at zero time.

Preparation of resting cells. Exponentially growing cultures of *M. coralloides* D were harvested, washed with 10 mM morpholine propanesulfonate (MOPS) buffer, pH 7.2, and resuspended in the same buffer at an OD of about 0.3. Prior to use the suspensions were incubated for two hours with agitation, so that the cells should complete their cellular cycle.

Myxospore induction. Myxospores were induced by the addition of 0.5 M glycerol (7). 24-hour cultures in CT medium were centrifuged and the cells were resuspended in 10 mM MOPS buffer, pH 7.2, with 0.5 M glycerol and incubated at 30°C with continuous agitation. Under these conditions myxospores were formed after about 12 h.

Macromolecule biosynthesis. Uptake of (5,6-³H) uridine, L(4,5-³H) leucine, (6,³H) thymidine and D,L-(+)-meso-2,6-diamino-(6-³H) pimelic acid (DAP) by exponential-phase cultures of *M. coralloides* D was used for testing the antibiotic effect on the synthesis of RNA, proteins, DNA and peptidoglycan respectively. Precursors were added at a concentration of 5 µCi/ml; culture optical density was approximately 0.5. Samples were precipitated with ice-cold 7% trichloroacetic acid, and the precipitates collected on glass fibre filters GF/C (Whatman). The radioactivity in filters was measured.

RNA polymerase assay. The technique described by Mossie et al. (14) was used, replacing the bacterial crude extract by two units of RNA polymerase from *Escherichia coli* (Boheringer, Mannheim, Germany).

Results

Effect of the antibiotic on *M. coralloides* D growing in a liquid medium. To determine the effect of the antibiotic on *M. coralloides* D, different concentrations (0 to 18 units/ml) were added to exponential cultures, and the optical density was measured during the following 5 h. The results (Fig. 1) show that concentrations of antibiotic above 15 units/ml caused lysis of the cultures. Given that the antibiotic is also produced by the bacteria, it is obvious that a critical concentration will have to be reached before this autolytic effect takes place. To determine the critical concentration we tested simultaneously the antibiotic concentration in the culture. Bearing in mind that the endogenous concentration of the antibiotic was 3 units/ml, the resulting critical concentration causing autolysis was 18 units/ml.

Effect of the antibiotic on cells and myxospores of *M. coralloides* D. Amounts of 0, 15, 30, and 45 units per ml of the antibiotic were added to resting-cell suspensions of *M. coralloides* D and incubated for 5 h at 30°C. Optical density was measured at regular intervals throughout this time and no appreciable lysis of the bacteria was observed. The same results were obtained when the bacterial cells were replaced by myxospores.

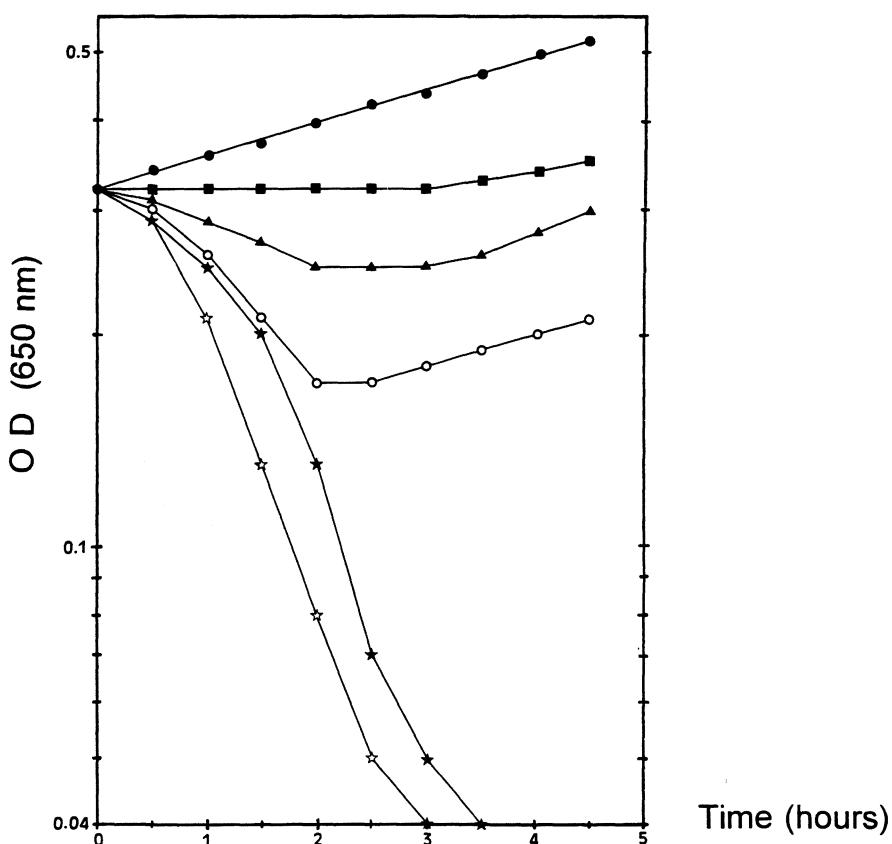


FIG. 1. Effect of different concentrations of added antibiotic on the growth of *M. coralloides* D in CT medium. The culture was incubated at 28°C under agitation. The OD 650 nm was followed at regular intervals. Symbols: ●, control; ■, 12 u/ml; ▲, 13 u/ml; ○, 14 u/ml; ★, 15 u/ml; ☆, 16, 17 or 18 u/ml of added antibiotic. At the beginning of the experiments, the initial concentration of antibiotic was 3 units/ml in controls.

Effect of the antibiotic on the production of myxospores. Myxospores were induced by glycerol in the presence of 3, 15, and 30 units of the antibiotic per ml. The antibiotic was added at the same time as the glycerol and then 2, 4, and 6 h afterwards; myxospore formation was observed 12 h after addition of glycerol. At a concentration of 3 units per ml there were no differences between treated cells and the control. When 15 or 30 units per ml of the antibiotic was added at the same time as or 2 h later than the glycerol morphogenesis of the bacteria was totally inhibited and complete lysis occurred. When it was added from 4 to 6 hours after the glycerol partial lysis occurred although some myxospores and stunted bacillae were still seen.

Effect of the antibiotic on biosynthesis of macromolecules. Radioactive precursor uptake by exponentially growing cells was tested at antibiotic concentrations of 0 and 15 units per ml (Fig. 2). At the concentration of antibiotic used, only RNA synthesis was clearly inhibited.

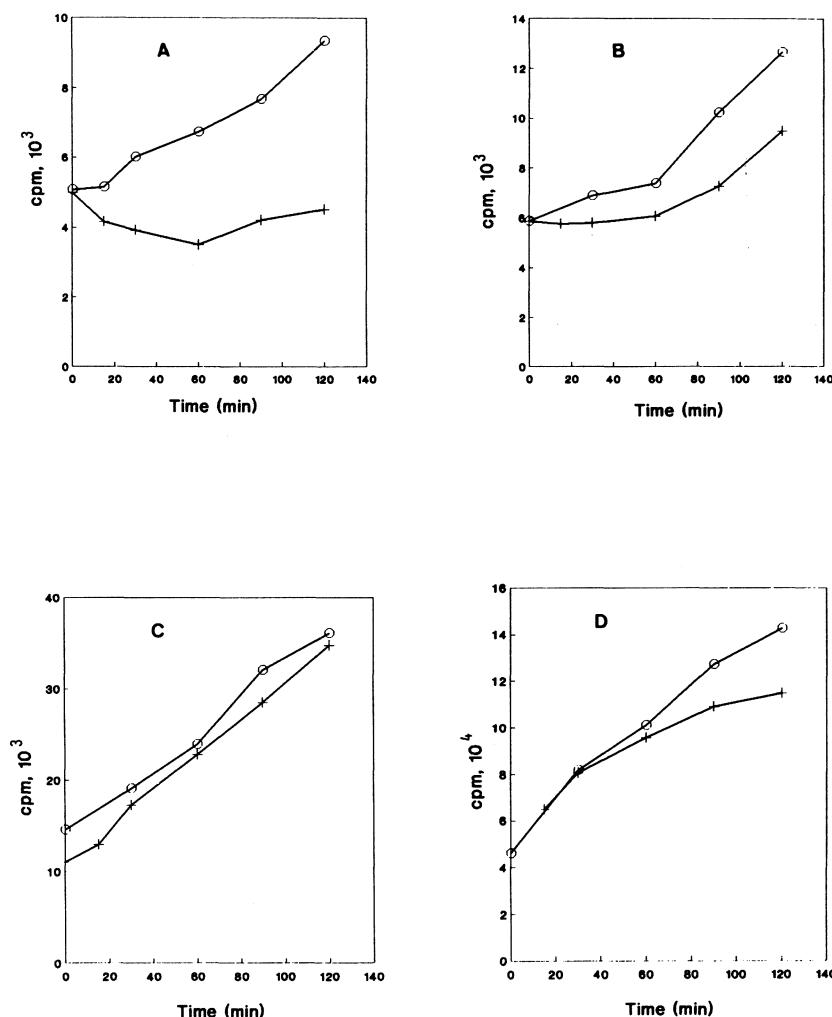


FIG 2. Effect of corallolysin on the incorporation by *M. coralloides* D of labelled precursors into RNA (A), DNA (B), protein (C) and cell wall (D); incubation took place in CT medium. Symbols: ○, controls; + corallolysin added (15 units/ml).

RNA polymerase assay. The effect of rifampicin (25 µg/ml) and the antibiotic (20 units/ml) was tested on RNA polymerase from *E. coli*. As shown in Fig. 3, RNA polymerase activity was inhibited in a similar way by both rifampicin and the antibiotic at the concentrations used.

Discussion

It has been reported that *M. xanthus* produces substances, known as autocides, which lyse the producing bacteria (9, 15, 16, 17). Nevertheless these autolytic substances have proven to be fatty-acid

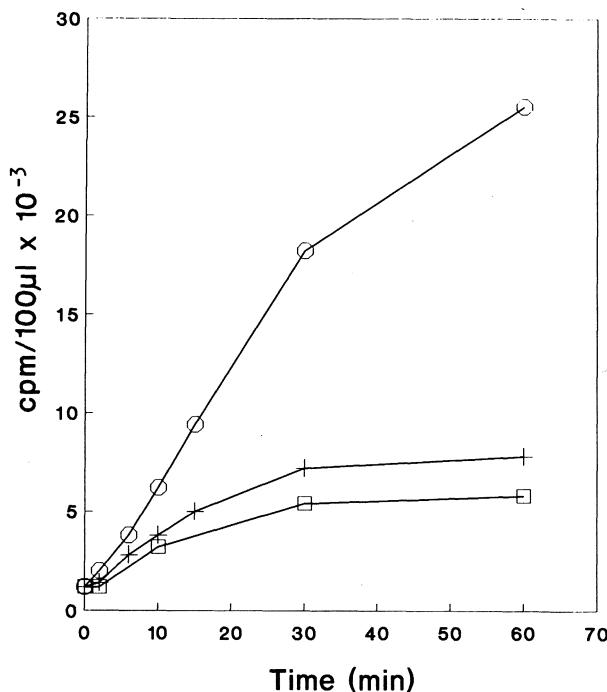


FIG 3. Effect of corallolysin on *E. coli* RNA polymerase activity. Symbols: (○) control RNA polymerase activity; (□) rifampicin (25 µg/ml); (+) corallolysin (30 units/ml).

components of the cell wall, which, although generated by growing cells, remain largely cell-bound throughout the growth cycle in a liquid medium. Thus only a small proportion is to be found in the extracellular fluid, this being the result of cell lysis rather than any specific secretion mechanism (16). Furthermore, no direct relationship has been found between the autocide activity of *M. xanthus* cultures and their antibiotic activity (16).

M. coralloides D, on the other hand, excretes into the medium during the exponential-growth phase (3) an antibiotic which is active against the bacteria themselves, to the extent that at concentrations of 15, 16 and 17 units per ml it interferes with the growth of the cultures and at concentrations of 18 units per ml and above it brings about rapid and total lysis, the antibiotic activity being perfectly correlated with the autolytic effect.

Apart from myxovirescines, which inhibit the growth of the producer organism by 50% when present in concentrations of 0.25 µg/ml (10), no similar effects to those of the antibiotic produced by *M. coralloides* D have so far been described; in fact, it normally requires concentrations of at least 50 µg/ml of the various antibiotics produced by myxobacteria to inhibit their growth (11, 12, 13) and nowhere, including the myxovirescines, has an autolytic effect been observed.

The autolytic effect of the antibiotic produced by *M. coralloides* D, which acts only upon growing cells or those undergoing morphogenesis, would explain the behaviour of these bacteria when cultivated in a liquid medium; after the exponential phase, growth decreases rapidly and the cells autolyse with no intervening stationary phase. The triggering of autolysis depends upon the cells reaching a critical

concentration (2); consequently, if this condition is fulfilled quickly, either because the medium is particularly rich in nutrients or the inoculum was large, then autolysis will occur earlier. It is clear from the results described here that autolysis occurs when the antibiotic reaches a critical concentration. Thus the autolytic factor excreted by *M. coralloides* D and described by Arias et al. (5), is identified as an antibiotic produced by the bacteria themselves, for which, we propose the name *corallolysin*.

The principal biochemical effect of corallolysin on the producer is the blockage of RNA synthesis probably as a consequence of RNA polymerase inhibition. We have shown in previous experiments (8) that antibiotics which inhibit RNA synthesis cause autolysis of *M. coralloides* D. Thus, we conclude that autolytic effect of corallolysin is due to RNA synthesis inhibition.

Acknowledgments

This work was supported by a grant to the Grupo de Investigación en Mixobacterias from the Junta de Andalucía (Spain).

References

1. Arias, J. M., Montoya, E. (1978). Dispersed growth and cell lysis in *Myxococcus coralloides* D. *Microbios Lett.* **5**, 81–84.
2. Arias, J. M., Montoya, E. (1982). Influencia de la densidad de inóculo y de la concentración de casitone sobre la autolisis de *Myxococcus coralloides* D. *Microbiología Española* **35**, 5–11.
3. Arias, J. M., Rodríguez, C., Montoya, E. (1979). Production and partial characterization of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides*. *J. Antibiotics (Tokyo)* **32**, 205–211.
4. Arias, J. M., Rodríguez, C., Montoya, E. (1979). Biological activity of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides*. *Microbios* **24**, 123–131.
5. Arias, J. M., Fernández-Vivas, A., Montoya, E. (1983). Evidence for an activating substance related to autolysis in *Myxococcus coralloides* D. *Arch. Microbiol.* **134**, 164–166.
6. Arnold, J. W., Shimkets, L. J. (1988). Inhibition of cell–cell interaction in *Myxococcus xanthus* by Congo red. *J. Bacteriol.* **170**, 5765–5770.
7. Dworkin, M., Sadler, W. (1966). Induction of cellular morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. I. General description. *J. Bacteriol.* **91**, 1516–1519.
8. Fernández-Vivas, A., Arias, J. M., Montoya, E. (1985). Relationship between several cellular functions and the autolysis of *Myxococcus coralloides* D in different physiological and culture conditions. *Microbios Lett.* **30**, 29–32.
9. Gelvan, I., Varon, M., Rosenberg, E. (1987). Cell-density dependent killing of *Myxococcus xanthus* by autocide AMV. *J. Bacteriol.* **169**, 844–848.
10. Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H., Trowitzsch, W. (1982). The myxovirescins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (Myxobacterales). *J. Antibiotics (Tokyo)* **35**, 1454–1459.
11. Irschik, H., Gerth, K., Höfle, G., Kohl, W., Reichenbach, H. (1983). The myxopironins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J. Antibiotics (Tokyo)* **36**, 1651–1658.
12. Irschik, H., Jansen, R., Höfle, G., Gerth, K., Reinchenbach, H. (1985). The corallopypyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from Myxobacteria. *J. Antibiotics (Tokyo)* **38**, 145–152.
13. Irschik, H., Jansen, R., Gerth, K., Höfle, G., Reichenbach, H. (1985). The sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J. Antibiotics (Tokyo)* **40**, 7–13.

14. Mossie, K. G., Jones, D. T., Robb, F. T., Woods, D. R. (1980). Rifampicin and bacteriocin resistance in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 838–841.
15. Rosenbluh, A., Rosenberg, E. (1989). Autocide AMI rescues development in *dgs* mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **171**, 1513–1518.
16. Varon, M., Cohen, S., Rosenberg, E. (1984). Autocides produced by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **160**, 1146–1150.
17. Varon, M., Teitz, A., Rosenberg, E. (1986). *Myxococcus xanthus* autocide AMI. *J. Bacteriol.* **169**, 356–361.

Sibling species of the *Saccharomyces* sensu stricto complex in Spain

Gennadi I. Naumov,¹ Elena S. Naumova,¹ Enrique D. Sancho^{2,*}

¹State Scientific-Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia

²Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Córdoba

Received 16 July 1994/Accepted 8 November 1994

Summary

By genetic hybridization, molecular karyotyping and Southern hybridization with the *ADC1* promoter probe three species *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* and *S. bayanus* were identified among wild *Saccharomyces* sensu stricto yeast in Spain. Wine strains fermenting melibiose belong to the biological species *S. bayanus* (syn. *S. uvarum*). *S. kluyveri* has been detected karyotypically.

Key words: taxonomy, electrophoretic karyotyping, *Saccharomyces* sensu stricto complex, *Saccharomyces kluyveri*

Resumen

Se han identificado tres especies, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. bayanus*, en poblaciones de levaduras salvajes de *Saccharomyces* sensu stricto en España, mediante hibridación genética, cariotipos moleculares e hibridación «Southern» utilizando como sonda el promotor *ADC1*. Las levaduras vínicas que fermentan melibiosa pertenecen a *S. bayanus* (sin. *S. uvarum*). Por otra parte, se ha identificado *S. kluyveri* mediante cariotipado molecular.

* Correspondence to: Enrique D. Sancho. Departamento de Microbiología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad de Córdoba. Apartado 3048. 14080 Córdoba. Tel.: 957-218520. Fax: 957-218563.

Introduction

According to modern classification three biological species *S. cerevisiae* Hansen, *S. bayanus* Saccardo (syn. *S. uvarum*) and *S. paradoxus* Bachinskaya, and the hybrid taxon *S. pastorianus* Hansen (syn. *S. carlsbergensis*) are recognized within the *Saccharomyces* sensu stricto complex. The three sibling species have been identified by genetic hybridization analysis (7, 9, 11) and DNA-DNA reassociation (15, 16). Recently, a genetically isolated population of the *Saccharomyces* sensu stricto yeast has been found in Brazil that apparently represents a new sibling species of the *Saccharomyces cerevisiae*. The species *S. kluyveri* Phaff, along with the *Saccharomyces* sensu lato group, viz. *S. castellii* Capriotti, *S. dairensis* Naganishi, *S. exiguum* Reess, *S. servazzii* Capriotti and *S. unisporus* Jørgensen, are not closely related to the *Saccharomyces* sensu stricto complex (4, 17).

The biological species *S. cerevisiae* contains cultured strains, viz. wine, baker's, distiller's, top brewing yeast and also strains isolated from fruit juices. Rare wild populations of *S. cerevisiae* have been described (9, 12). The wild *Saccharomyces* sensu stricto yeast belongs mostly to *S. paradoxus* species (7, 15). *S. paradoxus* is usually found in exudates of broad-leaved trees, insects and uncultivated soils. The ecological niche for *S. bayanus* is not clear. *S. bayanus* is represented by wine strains fermenting melibiose and wild yeast from breweries and spontaneously fermenting juices (7, 11, 16).

As the Iberian Peninsula has some geographic isolation it was interesting to study the natural yeast flora of this region. We focused our attention on *Saccharomyces* sensu stricto yeasts isolated in Spain by Santa María (13), Capriotti (2) and Somavilla *et al.* (14). Modern reidentification of some yeast strains isolated in Spain would allow further study and practical use of these large *Saccharomyces* collections. The second point of this study is to evaluate the significance of combined use of genetic and molecular methods for taxonomy of *Saccharomyces* yeast.

Materials and methods

Yeast strains. Table 1 lists the strains of *Saccharomyces* sensu stricto used in this study. Seven *Saccharomyces* sensu stricto strains isolated by Capriotti (2) from soil in Spain have been received from the Industrial Yeast Collection of the Department of Plant Biology of the University of Perugia (DBVPG) under the following numbers: DBVPG 1616, 1617, 1619-1623. The exact origin of these strains is unknown. According to Capriotti (2), they could be isolated from three locations: Valdepeñas, Manzanares (Ciudad Real) and Aranjuez (Madrid). Strains VKM Y-502 (CBS 5287) and CBS 5829 were used as reference testers for the *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* species, respectively (7). Earlier, *S. abuliensis* strain MCYC 623 (CBS 7001) isolated by Santa María in Spain (Table 1) has been reidentified as *S. bayanus* (7, 16). In the present study this strain was used as the *S. bayanus* reference tester. The methods for cultivation and hybridization of yeasts have been described elsewhere (8). Hybrids of homothallic yeasts

were obtained by the «spore-to-spore (haploid cell)» mating method using a micromanipulator. This method is based on a standard procedure of ascospore isolation on agar YPD medium. Usually 30–50 pairs of spores crossed were placed on agar slice in one view field under the microscope. After 3–5 hours of incubation at 28°C, their zygotes having a hybrid bud in the middle of the conjugation channel were isolated by a micromanipulator.

Yeast sample was collected from exudate of *Ulmus* sp. on June 3, 1993, from Cruz Conde Park in Córdoba. Isolation of *Saccharomyces* strains from mixed populations of yeast, fungi and bacteria have been described before (9).

CHEF gel electrophoresis. Preparation of chromosomal DNAs has been described elsewhere (9). A CHEF-DR™ II apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) was used to separate the chromosomal DNAs. The electrophoresis buffer was 0.5 × TBE. The buffer was circulated around the gel and cooled to 14°C. Electrophoresis was carried out at 200 V for 15 h with a

TABLE 1
STRAINS OF *Saccharomyces* SENSU STRICTO FROM WHICH MONOSPORIC CULTURES
WERE USED

Species (original) designation	CECT	MCYC	IFI	Source or origin
<i>S. abulensis</i>	—	623	—	<i>Mesophylax adopersus</i>
<i>S. abulensis</i>	10560	2609	—	Wine
<i>S. cerevisiae</i>	10176	544	—	<i>Noctua pronobula</i> (adult)
<i>S. cerevisiae</i>	10178	557	—	<i>Noctua pronobula</i> (adult)
<i>S. cerevisiae</i>	10308	1394	—	Frass in <i>Quercus lusitanicus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	10329	1500	—	Frass in <i>Quercus ilex</i>
<i>S. cerevisiae</i>	10331	384	—	Flowers of <i>Centaurea alba</i>
<i>S. cerevisiae</i>	10351	1755	—	Tomato
<i>S. oleaginosus</i>	10171	502	—	Larvae of <i>Dacus oleae</i>
<i>S. uvarum</i>	—	—	362	Campo de Borja
<i>S. uvarum</i>	—	—	369	La Nava
<i>S. uvarum</i>	—	—	371	El Bierzo
<i>S. uvarum</i>	—	—	373	Cacabelos
<i>S. uvarum</i>	—	—	391	Serrada

CECT = Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain; MCYC = Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Spain (13); IFI = Yeast Collection of the Departamento de Microbiología, Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid, Spain (14).

switching time of 60 s and then for 8 h with a switching time of 90 s. A standard set of *S. cerevisiae* YNN 295 chromosomes was obtained commercially (Bio-Rad).

Southern blot analysis. The chromosomal DNA separated by CHEF was treated with depurination solution (0.25 M HCl), denatured, neutralized and transferred to nitrocellulose filters which were then incubated at 80°C for 2 h (5). The *ADC1* probe was a 1.5 kb *BamHI-HindIII* fragment isolated from pAAH5 (1). The probe was prepared according to Maniatis et al. (5) and labelled with digoxigenin-11-dUTP using the nonradioactive DNA labeling kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Hybridization and colorimetric detection of hybridization were done as recommended by the supplier (Boehringer Mannheim).

Results and discussion

Monosporic cloning. Species assignment of strains by genetic hybridization analysis is determined on the basis of (1) the viability of sexual progeny of hybrids between the strain under examination and reference strains of different biological species, and (2) the possibility of gene exchange, i.e. the segregation of control auxotrophic markers. Only fertile inbred homozygotic parent strains can be used for genetic taxonomic analysis. Sometimes it is necessary to inbreed over several generations to achieve this genetic property. Such strains are also more suitable for electrophoretic karyotyping because they do not carry supernumerary chromosomes. Initially, all strains were tested for their ability to sporulate and 10–15 ascospores were dissected in each strain. Most of the strains studied were homothallic with ascospore viability of 70–100%. Among monosporic cultures of strains CECT 10331, DBVPG 1617 and DBVPG 1619 there were both sporulated clones and haploids having mating types. These strains are apparently heterozygotic on genes of homo-heterothallism. Five strains, CECT 10331, DBVPG 1619, DBVPG 1621–1623, had low ascospore viability: 0, 58, 32, 50 and 50%, respectively. The latter three strains also showed monogenic segregation on ascospore viability, while their monosporic cultures had high ascospore viability of 92–100%. Monosporic cultures in strain CECT 10331 were obtained by treatment of the sporulated culture with diethyl ether.

Wild *Saccharomyces* strain isolated by us from elm exudate in Córdoba was not suitable for genetic analysis because its ascospores were not separated from each other by the enzyme treatment with stomach juice of garden snails *Helix* sp. In this respect it is similar to strains of the *Saccharomyces kluyveri* (6).

Electrophoretic karyotyping. The karyotype pattern of *S. bayanus* is readily distinguishable from that of *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* while the latter two species have similar karyotypes (10). All strains under examination were compared by electrokaryotyping. Despite some chromosome length polymorphism, the karyotyping patterns of seven CECT (10331, 10178, 10308, 10171, 10176, 10329 and 10351) strains (Fig. 1, lanes 6–12, respectively)

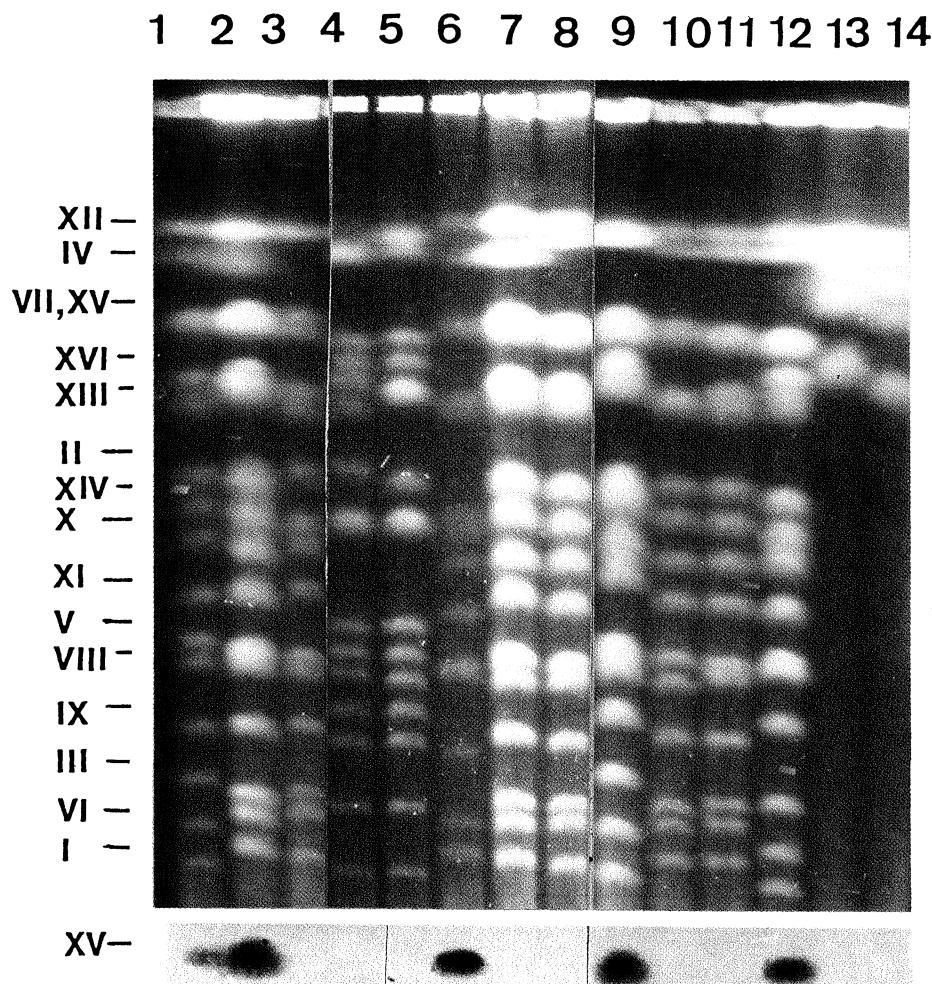


FIG. 1. Karyotyping and Southern hybridization analysis of chromosomal DNAs of wild *Saccharomyces* sensu stricto strains isolated by Santa Maria in Spain. Lane 1, 2, 6, 9 and 12, *S. cerevisiae*, YNN 295, BKM Y-502, CECT 10331, CECT 10171 and CECT 10351, respectively; lanes 3, 7, 8, 10 and 11, *S. paradoxus*, CBS 432, CECT 10178, CECT 10308, CECT 10176 and CECT 10329, respectively; lanes 4 and 5, *S. bayanus*, MCYC 623 and CECT 10560, respectively; lanes 13 and 14, *S. kluyveri*, N54 and CBS 3082, respectively. The ethidium bromide-stained CHEF gel was Southern transferred and hybridized with the *ADC1* promoter probe. The linkage group numbering refers to the chromosomes of the strain YNN 295. All strains are monosporic, except N54 and CBS 3082.

and seven DBVPG (1616, 1617, 1619-1623) strains (data not shown) were similar to each other and to those of reference strains of *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* (Fig. 1, lanes 1 and 3, respectively). Melibiose fermenting *S. uvarum* strains and one *S. abuliensis* strain CECT 10560 (Table 1) displayed band patterns similar to each other (Fig. 2, lanes 3-7; Fig. 1, lane 5, respectively) and to that of the *S. bayanus* tester MCYC 623 (Fig. 1, lane 4; Fig. 2, lane 2).

Strain N54 isolated from elm exudate in Córdoba was very different in terms of karyotype from other *Saccharomyces* strains studied, but very similar to the type culture of *S. kluyveri*

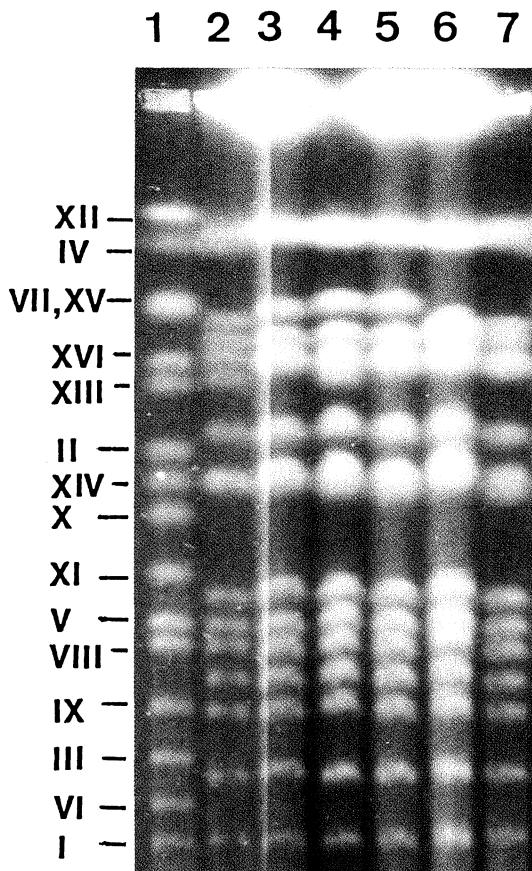


FIG. 2. Karyotyping analysis of chromosomal DNAs of wine *Saccharomyces bayanus* strains isolated by Somavilla *et al.* in Spain. Lane 1, *S. cerevisiae*, YNN 295; lanes 2–7, *S. bayanus*, MCYC 623, IFI 362, IFI 369, IFI 371, IFI 373, IFI 391, respectively. The linkage group numbering refers to the chromosomes of the strain YNN 295. All strains studied are monosporic.

CBS 3082 (Fig. 1, lanes 13 and 14, respectively). Two *S. kluyveri* strains were further compared by using another karyotyping conditions: 150 s for 24 h at 150 V, then 300 s for 24 h at 150 V. Chromosomal DNAs of both strains resolved into 8 bands ranging in size from 1000 to 5000 kb (not shown). *S. kluyveri* yeasts are known to grow well at 37°C (3). It is not surprising that only *S. kluyveri* was isolated by us in hot climatic conditions of Córdoba.

Southern hybridization analysis. An earlier study of genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus* by using eight cloned *S. cerevisiae* genes (*ADC1*, *CUP1*, *GAL4*, *LEU2*, *rDNA*, *SUC2*, *TRP1* and *URA3*) and telomere-associated *Y'* sequences having multiple chromosomal location (10) demonstrated that *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* have the same sizes of homeologous chromosomes. With the exception of the *ADC1* (alcohol dehydrogenase) promoter probe, all *S. cerevisiae* cloned genes used showed strong homology with the genes of *S. paradoxus*. Thus, *S. paradoxus* can

be differentiated from *S. cerevisiae* by using the *ADC1* promoter sequence as a specific probe for Southern hybridization.

Chromosomal DNAs of strains having *S. cerevisiae*-*S. paradoxus* karyotype pattern were probed with the *ADC1* cloned gene (Fig. 1). The Southern hybridization revealed that all strains isolated by Capriotti from soil in Spain belong to *S. cerevisiae* (not shown). Strains from the CECT collection fell into two groups. Three strains CECT 10331, 10171 and 10351 showed

TABLE 2
GENETIC ANALYSIS OF HYBRIDS OF THE BIOLOGICAL SPECIES *S. paradoxus* AND *S. cerevisiae*

Origin of hybrids	Number of spore pairs crossed	Number of zygotes obtained	Number of tetrads isolated	Proportion of viable ascospores of hybrids (%)	Segregation of control markers (+:-) ^a
<i>S. paradoxus</i> × <i>S. paradoxus</i>					
5829 × 10176	35	4	28	65	33:40
5829 × 10178	40	9	23	63	29:29
5829 × 10308	40	12	23	63	28:29
5829 × 10329	55	3	28	63	36:33
<i>S. paradoxus</i> × <i>S. cerevisiae</i>					
5829 × 10331	34	5	26	0	—
5829 × 10351	40	7	28	0	—
10176 × 502	30	5	30	0	—
10178 × 502	34	3	26	0	—
10308 × 502	40	3	24	0	—
10329 × 502	41	5	29	0	—
<i>S. cerevisiae</i> × <i>S. cerevisiae</i>					
10331 × 502	31	6	28	69	2:2 (6)
10351 × 502	29	4	22	74	2:2 (7)
10171 × 502	34	3	23	75	2:2 (14)
1616 × 502	36	3	28	84	2:2 (14)
1617 × 502	40	4	28	78	2:2 (15)
1619 × 502	35	1	25	59	30:29
1620 × 502	40	5	23	92	2:2 (19)
1621 × 502	36	4	26	89	2:2 (15)
1622 × 502	43	9	23	78	2:2 (14)
1623 × 502	42	12	28	91	2:2 (14)

^a Data of random spore analysis of tetrad analysis are presented. Number of tetrads is indicated in parenthesis.

TABLE 3

GENETIC ANALYSIS OF HYBRIDS OF THE BIOLOGICAL SPECIES *S. bayanus* AND *S. cerevisiae*

Origin of hybrids	Number of spore pairs crossed	Number of zygotes obtained	Number of tetrads isolated	Proportion of viable ascospores of hybrids (%)	Segregation of control markers (+:-) ^a
<i>S. bayanus</i> × <i>S. bayanus</i>					
623 × 10560	35	8	26	51	27:26
623 × 362	34	4	28	41	21:20
623 × 369	35	12	25	96	2:2 (14)
623 × 371	33	8	23	60	26:28
623 × 373	42	7	23	57	26:26
623 × 391	39	7	28	64	2:2 (9)
<i>S. bayanus</i> × <i>S. cerevisiae</i>					
623 × 10171	42	10	27	0	—
10560 × 502	32	5	25	0	—
362 × 502	39	3	25	0	—
369 × 502	30	5	24	0	—
371 × 502	36	8	28	0	—
373 × 502	35	1	25	0	—
391 × 502	35	2	24	0	—

^a Data of random spore analysis of tetrad analysis are presented. Number of tetrads is indicated in parenthesis.

strong hybridization with the *ADC1* probe (Fig. 1, lanes 6, 9 and 12, respectively); they apparently belong to *S. cerevisiae*. The remaining strains (CECT 10178, 10308, 10176 and 10329) (Fig. 1, lanes 10, 7, 8 and 10, respectively) and strain CECT 10560 with a typical *S. bayanus* pattern (Fig. 1, lane 5) did not show any hybridization signals.

Genetic identification. In order to establish the fine species belonging of the strains, monosporic cultures of the collection strains were studied by genetic hybridization analysis (Tables 2 and 3). All parent strains used were homothallic, except haploid cultures of strains CECT 10331, DBVPG 1617 and 1619. Reference strains CBS 5829 and MCYC 502 were marked by a UV-induced *ade1* and *ade2* auxotrophies (red colonies), respectively. Reference strain MCYC 623 was marked by an *ura3* auxotrophy.

Zygote formation was observed in all crosses. This confirms the karyotyping data and shows that all strains belong to the *Saccharomyces* sensu stricto complex. As expected, intraspecific hybrids were fertile while control interspecific hybrids were sterile. In all hybrids

normal meiotic segregation of control markers and viability of hybrid ascospores indicated the high homology of the genomes of the parent strains and their belonging to the same biological species. According to the results obtained (Tables 2 and 3), three species *S. paradoxus* (CECT 10176, 10178, 10308 and 10329), *S. cerevisiae* (CECT 10331, 10351, 10171) and *S. bayanus* (CECT 10560, MCYC 623) were found among strains isolated by Santa María (Table 1). All seven Capriotti's strains (DBVPG 1616, 11617, 1619-1623) were identified as *S. cerevisiae* as they yielded fertile hybrids with the *S. cerevisiae* reference strain (Table 2). *S. uvarum* strains (IFI 362, 369, 371, 373, 391) fermenting melibiose belong to *S. bayanus*, as their crosses only with the *S. bayanus* tester showed high ascospore viability (Table 3).

Therefore, despite certain geographic isolation of the Iberian peninsula, no new *Saccharomyces* species have been found in Spain. Genetic and karyotypic analyses revealed the biological species *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus* and *S. kluyveri*. Classical genetic hybridization method and molecular karyotyping give consistent and reliable results for identification of the *Saccharomyces* species.

Acknowledgements

This research was supported by a grant of the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Ministerio de Educación y Ciencia).

References

1. Ammerer, G. (1983). Expression of genes in yeast using the *ADC1* promoter. *Methods Enzymol.* **101**, 192-201.
2. Capriotti, A. (1958). Las levaduras de algunos terrenos españoles. *Rev. Cienc. Apl.* **61**, 97-115.
3. Kreger-van Rij, N. J. W. (1984). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 3rd ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
4. Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1991). Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast* **7**, 61-72.
5. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
6. McCullough, J., Herskowitz, I. (1979). Mating pheromone interaction between *Saccharomyces kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **138**, 146-154.
7. Naumov, G. I. (1987). Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts. *Stud. Mycol.* **30**, 469-475.
8. Naumov, G. I., Kondratieva, V. I., Naumova, E. S. (1986). Methods for hybridization of homothallic yeast diplonts and haplonts. *Soviet Biotechnol.* **6**, 29-32.
9. Naumov, G. I., Naumova, E. S., Korhola, M. (1992). Genetic identification of natural *Saccharomyces* sensu stricto yeasts from Finland, Holland and Slovakia. *Antonie van Leeuwenhoek* **61**, 237-243.
10. Naumov, G. I., Naumova, E. S., Lantto, R., Louis, E. J., Korhola, M. (1992). Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes. *Yeast* **8**, 599-612.

11. Naumov, G. I., Naumova, E., Gaillardin, C. (1993). Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeast isolated in France and Italy. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 274–279.
12. Naumov, G. I., Nikonenko, T. A. (1988). The East Asia is a probable land of the cultured yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. Nauk.* **20**, 97–101 (in Russian).
13. Santa María, J. (1978). Biotaxonomic studies on yeast. *Comunicaciones Inst. Nacion. Investig. Agrarias* **3**, 1–61.
14. Somavilla, J. F., Arroyo, V., Iñigo, B. (1977). Levaduras presentes en velos de vinos de la provincia de Valladolid. *Rev. Agroquímica y Tecnol. Alimentos* **17**, 277–280.
15. Vaughan Martini, A. (1989). *Saccharomyces paradoxus* comb. nov., a newly separated species of the *Saccharomyces* sensu stricto complex based upon nDNA/nDNA homologies. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**, 179–182.
16. Vaughan Martini, A., Kurtzman, C. P. (1985). Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces* sensu stricto. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 508–511.
17. Vaughan Martini, A., Kurtzman, C. P. (1988). Deoxyribonucleic acid relatedness among species of *Saccharomyces* sensu lato. *Mycologia* **80**, 241–243.

Diversity of actinomycetes and fungi on seaweeds from the Iberian coasts

Olga Genilloud,* Fernando Peláez, Ignacio González, María Teresa Díez

Centro de Investigación Básica, Merck Sharp and Dohme de España, S. A., Madrid

Received 10 September 1994/Accepted 14 October 1994

Summary

As a part of a screening program for natural products from microorganisms, 465 actinomycetes strains and 278 fungal strains were isolated from 44 seaweed specimens (Rhodophyta and Phaeophyta), collected in the Iberian peninsula seashore (Atlantic and Mediterranean coasts). Six different isolation procedures were followed, and seven isolation media were used, some of which included seawater in their composition. The isolated microorganisms were identified to the level of species or genus by microscopic morphology. Determination of species of *Streptomyces* was performed through total fatty acid analysis by gas chromatography. Richness and diversity of the *Streptomyces* and actinoplanetes species isolated from the seaweeds are compared, taking into account the geographic location of the samples. Most of the fungi recovered from these samples were terrestrial, although several marine species (*Dendryphiella arenaria*, *Dendryphiella salina*, *Varicosporina ramulosa*, *Corollospora intermedia* and *Asteromyces cruciatus*) were also isolated.

Key words: seaweeds, fungi, actinomycetes, *Streptomyces*

Resumen

Como parte de un programa de búsqueda ("screening") de productos naturales a partir de microorganismos se han aislado 465 cepas de actinomicetos y 278 de hongos a partir de 44 muestras de algas (Rhodophyta y Phaeophyta) recogidas en las costas atlánticas y mediterráneas de la península Ibérica. En el aislamiento se emplearon seis métodos y siete medios, algunos de los cuales incluían agua

* Correspondence to: Olga Genilloud. Centro de Investigación Básica. Merck Sharp and Dohme de España, S.A. Josefa Valcárcel, 38. 28027 Madrid. Tel.: 91-3210719. Fax: 91-3210614.

de mar. La identificación de los microorganismos aislados se realizó por morfología microscópica hasta el nivel de especie o género. La determinación de especies de *Streptomyces* se hizo mediante análisis total de ácidos grasos por cromatografía de gases. Se comparó la riqueza y diversidad de *Streptomyces* y actinoplanetas teniendo en cuenta la localización geográfica de las muestras. La mayor parte de los hongos eran terrestres, aunque también se aislaron algunas especies marinas (*Dendryphiella arenaria*, *Dendryphiella salina*, *Varicosporina ramulosa*, *Corollospora intermedia* y *Asteromyces cruciatus*).

Introduction

Programs of screening for natural products invest a considerable effort in the isolation of microorganisms as potential producers of bioactive compounds. It is well known that discoveries of new natural products can be potentiated by the examination of novel and diverse groups of microorganisms. In the search of new ecological niches that can provide unexplored microbial communities, seaweeds were evaluated as a source for the isolation of actinomycetes and filamentous fungi.

The presence of fungi on seaweeds has been repeatedly described in the literature (7, 11, 13, 18). Obligate marine fungi have been found as parasites or saprophytes on living and decayed seaweeds, while standard isolation techniques have also revealed the presence of terrestrial fungi on algae. Actinomycetes have been frequently isolated from seawater and marine sediments (3, 10, 19, 20), but less information is available about their presence on seaweeds (1, 3). These microorganisms have also been suggested to be, together with bacteria and yeast, primary agents of macroalgal decay (1, 14).

In this work, populations of actinomycetes and microfungi present on seaweeds collected along the Iberian coasts have been analyzed. This is the first time that a survey of both types of microorganisms was carried out in parallel from the same marine sources, and it also represents the first work about fungi and actinomycetes from seaweeds collected from Iberian coastal waters.

Materials and methods

Collection of samples. Forty-four seaweed specimens were collected during the winter and the spring of 1993 from 13 different geographic locations in 6 different areas of the Atlantic and Mediterranean Iberian coasts. Locations were grouped together according to criteria of maximum proximity into 6 collection sites: San Sebastián, Oyambre and Unquera (site I), Gijón and Otur (site II), Vigo and Oporto (site III), Cádiz, Torremolinos and Almería (site IV), Denia and Alcoceber (site V) and Menorca (site VI).

Seaweeds were identified when possible upon collection: *Gelidium* sp. and *Cystoseira* sp. were collected from site I, *Chondrus crispus*, *Himanthalia elongata*, *Dictyota dichotoma*, *Fucus vesiculosus* from site II, and *Chondrus crispus* from site III. The collection sites included diverse environments, ranging from seafloors 3–10 m depth (site VI) to sandy and rocky sea coasts more influenced by terrestrial runoff (sites I–V). All samples were aseptically removed and shipped fresh to the laboratory, except those from site I, which were air dried *in situ* before shipment. Samples were immediately processed upon arrival.

TABLE 1
ACTINOMYCETES AND FUNGI RECOVERED FROM SIX GEOGRAPHIC AREAS

Collection sites	Number of samples	Actinomycetes		Fungi	
		Total isolates	Isolates per sample ^a	Total isolates	Isolates per sample ^a
I	4	191	47.75	118	29.5
II	10	56	5.6	34	3.4
III	4	23	5.75	21	5.25
IV	6	31	5.16	35	5.83
V	7	129	18.42	62	8.86
VI	13	35	2.69	8	0.62
Total	44	465	10.57	278	6.32

^aDifferences in the number of cultures recovered from the six sites are statistically significant, according to chi-square goodness-of-fit test ($P > 99.9\%$).

Culture isolation. Three methods were used for the isolation of fungi: the thalli were cut into pieces (< 1 cm²) that were plated on the surface of isolation media, either directly or after a 3 min washing in ethanol (70%, v/v). Alternatively, the samples (1 g) were homogenized and seeded following a modification of the soil washing technique (17). For the isolation of actinomycetes all samples (1 g) were initially lyophilized, ground to powder and plated following three isolation methods: membrane filter method, Chelex pretreatment and yeast extract pretreatment (6, 8, 9).

Fungi were isolated on two agar media, DRBC (Oxoid, Hampshire, England) and SW (11), prepared with artificial seawater (Hw-Marinemix, Wimax, Wiegandt GMBH, Germany) and supplemented with streptomycin and chlorotetracycline 50 mg/l. Five media were used in the isolation of actinomycetes, soil extract agar (12), chitin agar (12), glycerol arginine agar (15), humic acid-vitamins agar (5) and starch casein agar (16), supplemented with cycloheximide (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) (1 mg/ml) and pimaricin (Merck, Darmstadt, Germany) (2.5 mg/ml).

Identification of fungi and actinomycetes. For identification purposes, fungi were incubated up to 3 months at 18°C under near-UV light, following a 12 h photoperiod, in potato dextrose agar (PDA, Difco), oatmeal agar (Difco), cornmeal agar (Difco, Detroit, Michigan, USA) and seawater (SW). Those cultures that failed to sporulate were classified as sterile mycelia and subgrouped as strain types according to macroscopic characters and growth rates. Actinomycetes were initially assigned to genera on the basis of their microscopic morphology upon growth on yeast malt extract agar (YME) at 28°C for at least 21 days. *Streptomyces* strains were assigned to species-clusters upon analysis of the fatty acid composition determined by gas chromatography.

Analysis of fatty acid by gas chromatography. Cultures were grown as confluent patches on trypticase soy broth agar (BBL, Cockeysville, Maryland, USA) at 28°C for 4 days. Vegetative growth

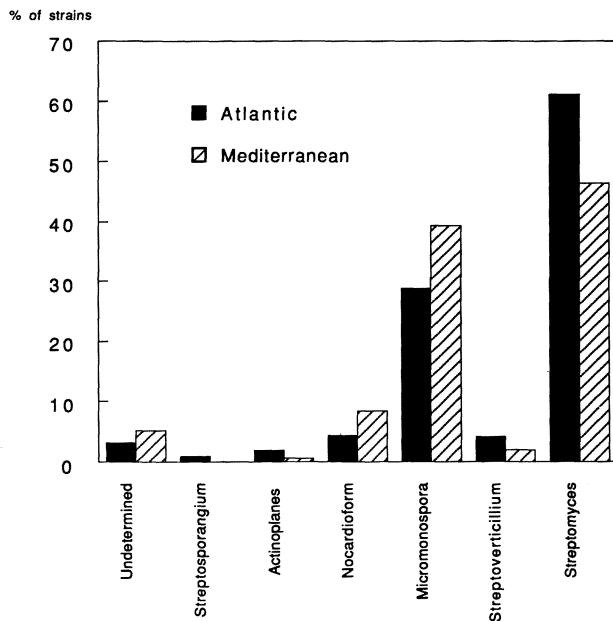


FIG. 1. Distribution of actinomycetes isolates in the Atlantic and Mediterranean seaweeds.

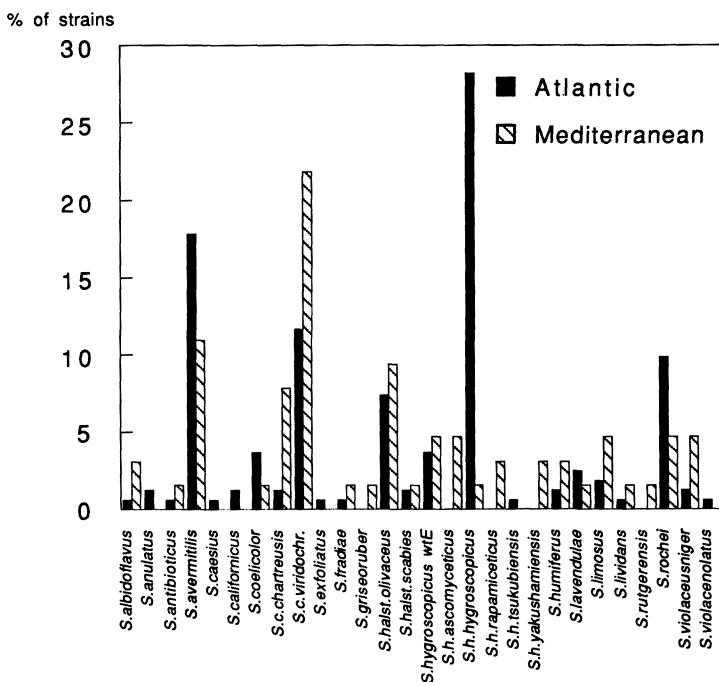


FIG. 2. Distribution of *Streptomyces* on the Atlantic and Mediterranean seaweeds. Strains were assigned to named cluster-groups on the basis of their FAMEs patterns, which were analyzed by the Microbial Identification System supplied by MIDI and compared to a library of reference organisms (M.ACT_2, version 1.23, G.Garrett, personal communication).

(Abbreviations: *S. c.chartreusis* = *S.cyaneus chartreusis*; *S.c.viridochr.* = *S.cyaneus viridochromogenes*; *S.halst.olivaceus* = *S.halstedii olivaceus*; *S.halst. scabies* = *S.halstedii scabies*; *S.h.* = *S.hygroscopicus*)

was then scraped (100–200 mg) and fatty acid methyl esters (FAMEs) were prepared using a modified sample preparation (2). Analysis of FAMEs was carried out by capillary gas chromatography using a Hewlett-Packard Model 5890 gas chromatograph/MIDI system (Microbial ID, Newark, Delaware, USA) equipped with a phenylmethyl silicone column (0.2 mm x 25 m). Chromatography conditions were as recommended by the manufacturer. Individual FAMEs were identified using the Microbial Identification Software (MIS).

Results and discussion

A total of 278 fungal strains and 465 actinomycetes were isolated from 44 samples of seaweeds collected in six geographical areas along the Iberian peninsula coasts. Usually, the samples were richer in actinomycetes than in fungi, in terms of number of isolates. The same behavior, in terms of abundance of recovered strains, was observed for both types of microbial communities along the different sites and seaweed specimens in study.

Samples from site I yielded higher numbers of both types of microorganisms than the rest, while those from site VI were comparatively much poorer. This could be related with the different conditions of the samples collected from both sites (see Materials and methods): it seems quite likely that samples collected from deeper marine zones will harbor lesser amounts of saprobic microorganisms than those from superficial waters, and it is also likely that the process of air-drying might result in an increase of cross contamination with terrestrial microorganisms.

Diversity and geographical distribution of actinomycetes. A total of 465 actinomycetes colonies, 279 with aerial mycelia and 186 with only vegetative mycelium, were isolated from the 44 seaweed samples. After a preliminary morphological characterization, almost half of the observed actinomycetes could be assigned to the streptomycetes group (265 isolates). These were followed in terms of abundance by members of the genus *Micromonospora* (152 isolates) and by nocardioform actinomycetes (27 isolates). In total, 89.6% of the observed actinomycetes colonies could be identified as streptomycetes and micromonosporae. It has to be noted that whereas streptomycete colonies were observed in all the seaweeds in study, *Micromonospora* strains were only obtained in half of the tested samples.

To establish the existing diversity among the actinomycetes isolates, 351 strains were selected as representative of the actinomycetes population to be analyzed for their fatty acid composition. Strains were assigned to named cluster-groups on the basis of their FAMEs patterns. Two hundred and thirty five were assigned to the genus *Streptomyces* and distributed into 28 different species-clusters. Forty did not match with any of the existing entries. Five clusters accounted for 66.7% of the total *Streptomyces* isolates (*S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus*, *S. avermitilis*, *S. cyaneus*, *S. viridochromogenes*, *S. rochei*, and *S. halstedii*, *olivaceus*) whereas 23 different minority species-clusters were identified among the remaining 33.3% of the strains (75 isolates).

When grouping the samples in two main geographic areas, Mediterranean or Atlantic coasts, no significant differences in the number of species recovered could be observed. Nevertheless, the samples from the Atlantic sea were richer in streptomycetes than those collected in the Mediterranean (Fig. 1). The populations from both geographic regions were observed to be quite distinct, with a different pattern

TABLE 2
DISTRIBUTION OF FUNGAL GENERA AMONG THE SIX GEOGRAPHIC AREAS

Fungal taxa	Collection site ^a					
	I	II	III	IV	V	VI
HYPHOMYCETES						
<i>Acremonium</i> spp.* (6 spp.)	4 ^b	— ^c	—	—	7	—
<i>Alternaria</i> spp.* (4 spp.)	1	—	1	2	—	1
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	—	—	—	—	—	1
<i>Aspergillus</i> spp.* (9 spp.)	4	3	3	3	2	—
<i>Asteromyces cruciatus</i> *	—	1	—	—	—	—
<i>Beauveria</i> sp.	—	1	—	—	—	—
<i>Cladosporium</i> spp.* (3 spp.)	1	3	—	1	3	—
<i>Dendryphiella arenaria</i> *	—	—	—	1	—	—
<i>Dendryphiella salina</i> *	1	—	—	—	—	—
<i>Epicoccum purpurascens</i> *	—	—	—	1	—	—
<i>Fusarium</i> sp.*	1	—	—	—	—	—
<i>Geotrichum</i> sp.*	—	—	—	1	—	—
<i>Graphium</i> sp.	—	1	—	—	—	—
<i>Heliscus lugdunensis</i>	—	1	—	—	—	—
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	—	1	—	—	—	—
<i>Paecilomyces</i> sp.*	—	—	—	1	—	—
<i>Penicillium</i> spp.* (6 spp.)	1	2	2	3	4	3
<i>Scopulariopsis</i> spp. (3 spp.)	4	—	—	—	—	1
<i>Scytalidium</i> sp.	—	—	1	—	—	—
<i>Stemphyllium</i> sp.*	1	—	—	—	—	—
<i>Trichoderma</i> sp.	1	1	—	—	—	1
<i>Tritirachium</i> sp.	1	—	—	—	—	—
<i>Varicosporina ramulosa</i> *	—	—	—	—	1	—
Undetermined #1	—	—	1	—	—	—
Undetermined #2	—	—	—	—	1	—
COELOMYCETES						
<i>Ascochyta</i> sp.*	1	—	—	—	—	—
<i>Libertella</i> sp.	—	1	—	—	—	—
<i>Microsphaeropsis</i> spp. (2 spp.)	1	—	—	—	1	—
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1	1	—	—	—	—
<i>Phoma</i> spp.* (5 spp.)	3	—	—	2	1	—
<i>Truncatella</i> sp.	—	1	—	—	—	—
ASCOMYCETES						
<i>Chaetomium</i> spp.* (2 spp.)	—	—	1	—	—	1
<i>Corollospora intermedia</i> *	—	—	—	—	1	—
<i>Emericella</i> spp. (2 spp.)	1	1	—	—	1	—
<i>Eupenicillium</i> sp.	—	—	—	1	—	—
<i>Dichotomomyces</i> sp.?	—	—	—	—	1	—
<i>Microascus cinereus</i>	1	—	—	—	—	—

(Continued)

TABLE 2 (cont.)
DISTRIBUTION OF FUNGAL GENERA AMONG THE SIX GEOGRAPHIC AREAS

Fungal taxa	Collection site					
	I	II	III	IV	V	VI
BASIDIOMYCETES (2 strains)	-	2	-	-	-	-
ZYgomycetes						
<i>Cunninghamella</i> sp.	-	-	-	1	-	-
<i>Mortierella</i> sp.	2	-	-	-	-	-
STERILE MYCELIA (6 strains)	3	2	1	-	8	-
YEAST	-	1	-	-	-	-

*Species previously reported from seaweeds (8, 13, 15, 20).

^a See materials and methods.

^b The data indicate the number of strains of every genus isolated from each site, after discarding replicate isolates within specimens.

^c -, Not detected.

of species distribution (Fig. 2). The high occurrence of cultures assigned to the cluster *S. hygroscopicus* *hygroscopicus* observed in the Atlantic area corresponds to isolates only observed in *Gelidium* sp. from site I. Members of this cluster were almost non-existent in the Mediterranean samples. No common patterns could be established when evaluating the *Streptomyces* species distribution obtained from each collection site.

With regard to the micromonosporas, the samples from the Mediterranean sea were richer in this taxon than those collected in the Atlantic. In fact, 39.9% of the observed actinomycetes from the Mediterranean samples corresponded to *Micromonospora* strains, compared to 28.8% observed in Atlantic seaweeds (Fig. 1). In addition, 76 of the 91 strains recovered from these samples were obtained from a single specimen of *Cystoseira* sp. from site I. On the contrary, members of this taxon were more evenly distributed among the Mediterranean samples. The occurrence of *Micromonospora* has been already described in dead marine algae and sediments, but the observed distribution differs from previous studies where they were the predominant actinomycetes (3, 19, 20). The relationships between the *Micromonospora* isolates were studied by cluster analysis, selecting 43 FAMEs patterns as representative of all these isolates (Fig. 3). *Micromonospora* strains were grouped into 18 different clusters defined at Euclidian distances higher than 6.0, the value usually considered as defining the relatedness of the entries at the species level. The Mediterranean isolates (30 strains) were distributed among 12 different clusters, 3 of them being single member groups. With regard to the 13 Atlantic isolates, they were included in 9 different groups, 6 of them corresponding to unique isolates. Only four clusters contained *Micromonospora* strains isolated from both areas (clusters 3, 4, 7 and 11), showing the low overlapping existing between strains isolated from both areas. Again, as in the case of streptomycetes, in addition to the differences in the *Micromonospora* distribution observed in both geographic regions, a wide diversity of strains was obtained within each one.

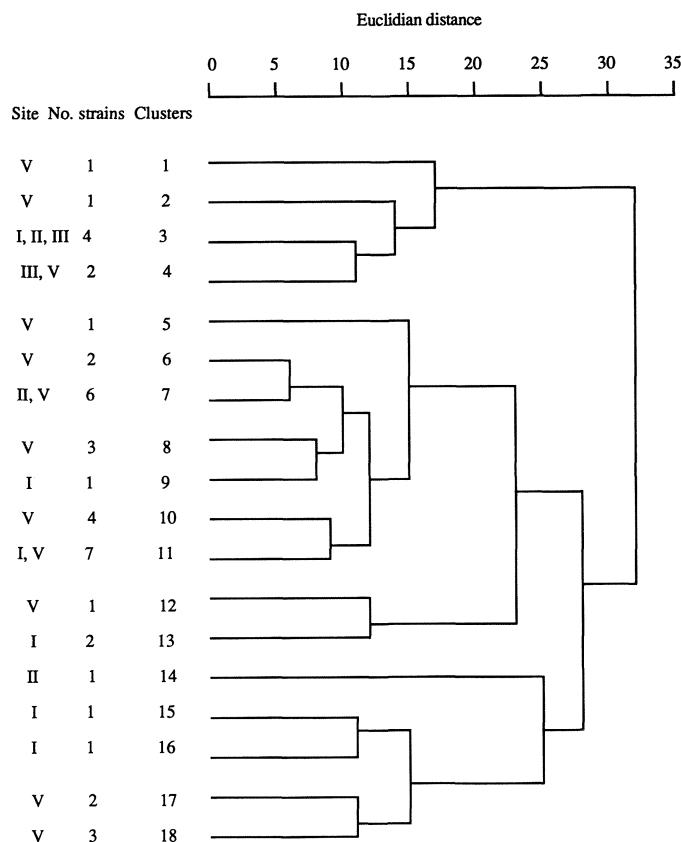


FIG. 3. Relatedness of the *Micromonospora* strains isolated from both collecting areas. The dendrogram was generated with the cluster analysis package supplied by the Microbial Identification System software, that treats the Euclidian distances of the fatty acids with the Unweighted Pair Group Method

Diversity and geographical distribution of fungi. Eighty fungal species or strain types were isolated from the 44 samples of seaweeds (Table 2), and at least five species (*Asteromyces cruciatus*, *Corollospora intermedia*, *Dendryphiella arenaria*, *Dendryphiella salina* and *Varicosporina ramulosa*) are considered true marine fungi, well-known saprophytes of algae and other marine materials (7, 11, 13, 18). Symbiotic marine fungi were not detected in this study, but this was expectable, due to the methods used. *Asteromyces cruciatus* was isolated from a sample of the red algae *Chondrus crispus*, and *D. salina* from *Gelidium* sp., both from the Atlantic coast. The rest of marine fungi were isolated from unidentified decaying seaweeds collected in the Mediterranean coast. Interestingly, no marine fungi were isolated from deep sea floors (site VI). *Asteromyces cruciatus* and *D. salina* have been recorded in different points of the Atlantic Ocean, including France and other European countries (11), although never from Iberian coastal waters. On the other hand, this is the first record of *V. ramulosa*, *D. arenaria* and *C. intermedia* from the Mediterranean sea. However, these species have been commonly found in other temperate areas (11), suggesting that the mediterranean marine mycobiota is not significantly different from other temperate coastal environments, in agreement with the observations by Grasso *et al.* on lignicolous marine fungi (4).

Many of the fungal taxa listed, which are considered terrestrial, have been reported previously in the literature as isolated from seaweeds (7, 11, 13, 18). This work extends the range of terrestrial fungi isolated from macroalgae to more than a dozen species further, included in genera *Arthrinium*, *Beauveria*, *Graphium*, *Heliscus*, *Metarrhizium*, *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Tritirachium*, *Liberella*, *Microsphaeropsis*, *Pestalotiopsis*, *Truncatella*, *Microascus*, *Mortierella* and *Cunninghamella*. Yeasts were limited to a single species present only in one sample.

Table 2 also shows the distribution of the isolated fungi, grouped by genera, among the six geographical areas. Most of the genera and species were observed just in one site. Only a few genera of common saprobic fungi (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* and *Cladosporium*) were recovered from more than three areas.

As previously noted for actinomycetes, no common patterns of species distribution could be detected among the different collection sites. Even samples collected from the same locations did not share the same fungal populations (data not shown). This fact, that can be extended also to actinomycetes, suggests that each seaweed specimen should be considered as an individual source containing its own microbiota highly influenced by the particular environmental conditions.

In summary, our results show that seaweeds can be a suitable source for the isolation of actinomycetes and fungi. It was evident from earlier studies that both types of microorganisms are not uncommon in marine habitats, but we have shown that seaweeds constitute a reservoir of microbial diversity, from which a large number of different microorganisms can be recovered just by means of standard isolation techniques. This might suggest that the microbial communities found on seaweeds could be considered as an alternative gene pool largely unexplored, which makes them interesting for programs of screening for natural products.

References

1. Cross, T. (1981). Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 397–423.
2. Garrity, G. M., Heimbuch, B. K., Motamedi, H., Shafiee, E. (1993). Genetic relationships among actinomycetes that produce the immunosuppressant macrolides FK506, FK520/FK523 and rapamycin. *J. Indust. Microbiol.* **12**, 42–47.
3. Goodfellow, M., Haynes, J.A. (1984). Actinomycetes in the marine environment. In Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L. F., Yakoleff, V. (ed.), *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, pp. 453–472. Academic Press, New York.
4. Grasso, S., Panebianco, C., La Ferla, R. (1990). Lignicolous marine fungi in the Straits of Messina, Italy. *Hydrobiologia* **206**, 149–154.
5. Hayagawa, Y., Nonomura, N. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**, 501–506.
6. Hayakawa, M., Nonomura, H. (1989). A new method for the intensive isolation of Actinomycetes from soil. *Actinomycetologica* **3**, 95–104.
7. Haythorn, J. M., Gareth-Jones, E. B., Harrison, J. L. (1980). Observations on marine algicolous fungi, including the hyphomycete *Sigmoidea marina* sp. nov. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **74**, 615–623.
8. Herron, P. R., Wellington, E. M. H. (1990). New method for extraction of *Streptomyces* spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1406–1412.

9. Hirsch, C. F., Christensen, D. L. (1983). Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 925–929.
10. Jensen, P. R., Dwight, R., Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1102–1108.
11. Kohlmeyer, J., Kohlmeyer, E. (1979). *Marine Mycology: The higher fungi*. Academic Press, New York.
12. Makkar, P., Cross, T. (1982). Actinoplanetes in soil and on plant litter from freshwater habitats. *J. Appl. Bacteriol.* **52**, 209–218.
13. Miller, J. D., Whitney, N. J. (1981). Fungi from the Bay of Fundy. II. Observations on fungi from living and cast seaweeds. *Botanica Marina* **25**, 405–411.
14. Miller, J. D., Whitney, N. J. (1981). Fungi of the Bay of Fundy. III. Geofungi in the marine environment. *Marine Biology* **65**, 61–68.
15. Nonomura, H., Takagi, S. (1977). Distribution of actinoplanetes in soils of Japan. *J. Ferment. Technol.* **55**, 423–428.
16. Okazaki, H., Serizawa, N., Enokita, R., Torikata, A., Terahera, A. (1983) Taxonomy of actinomycetes capable of hydroxylation of ML-236B compactin. *J. Antibiotics* **36**, 1176–1183.
17. Parkinson, D., Williams, S. T. (1961). A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant and Soil* **13**, 347–355.
18. Schatz, S. (1984). Degradation of *Laminaria saccharina* by saprobic fungi. *Mycologia* **76**, 426–432.
19. Takizawa, M., Colwell, R. R., Hill, R. T. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 997–1002.
20. Weyland, H. (1981). Distribution of actinomycetes on the sea floor. In Schaal, K. P., Pulverer, G. (ed.), *Proceedings of the 4th International Symposium on Actinomycetes Biology*, Cologne, pp. 185–193. Springer-Verlag, Stuttgart.

Ensayos in vitro del comportamiento antagónico de *Trichoderma* spp. frente a especies patógenas de la zona hortícola de La Plata, Argentina

Cecilia Mónaco,^{*1,2} Analía Perelló,¹ M. Cristina Rollán²

¹ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

² Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Recibido 23 septiembre 1993/Aceptado 8 octubre 1994

Summary

The antagonistic properties of seven *Trichoderma* species in front of the pathogens *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *F. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *Rhizoctonia* sp. and *Sclerotium rolfsii* was evaluated in vitro. Those microorganisms were isolated from horticultural soils of La Plata in order to test the antagonistic-pathogenic relationship. Dual cultures on PDA 2% were used. All the species of *Trichoderma* grew in the culture medium with a colonization value higher than 50%. Differences in the antagonistic behaviour of the pathogens were observed depending on the species with which they interacted. The presence of diffusible metabolites to the medium was demonstrated in almost 80% of the pathogens antagonists tested.

Key words: *Trichoderma* spp., antagonistic behaviour, biocontrol, pathogenic fungi, horticulture

Resumen

Se evaluó la capacidad antagónica in vitro de siete especies de *Trichoderma* frente a los patógenos *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *F. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *Rhizoctonia* sp. y *Sclerotium rolfsii*, aislados de la región hortícola de La Plata y se estableció el modo de interacción patógeno-antagonista. Se empleó la técnica de cultivo dual en APG al 2%. Todas las especies de *Trichoderma* crecieron en el medio de cultivo con valores de colonización superiores a 50%. Se

* Correspondencia: Cecilia Mónaco. Lab. de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Calles 60 y 119, 1900 La Plata. Argentina. Tel.: +54-21-215883. Fax: +54-21-252346.

observaron diferencias en el comportamiento antagónico según la especie patógena con la que interactuaron. En el 80% de las combinaciones patógeno-antagonista, se comprobó la presencia de metabolitos difusibles al medio.

Introducción

En los últimos años se están estudiando diferentes especies del género *Trichoderma* por su comportamiento antagónico frente a distintos patógenos que causan daños económicamente significativos en numerosos cultivos (2,5). En Argentina se han obtenido resultados prometedores que indican su eficiencia como agentes biocontroladores de varias especies fúngicas habitantes del suelo (1, 6).

Se ha señalado que las especies de *Trichoderma* se comportan como hiperparásitos frente a numerosos hongos patógenos al afectar directamente sus micelios de forma mecánica (“coiling”) y producir su vacuolización y/o lisis (2, 9, 11). Muchos aislamientos tienen la habilidad de producir antibióticos no volátiles activos contra un amplio rango de hongos, encontrándose marcadas diferencias en el comportamiento fisiológico de cepas morfológicamente similares respecto a la producción de sustancias difusibles inhibitorias (5). Asimismo se ha indicado que ciertos aislamientos de *Trichoderma* poseen efecto fungicida y/o fungistático, dependiendo del patógeno ensayado (10).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de diferentes especies de *Trichoderma* frente a hongos patógenos aislados de suelos en la región hortícola de La Plata y establecer el modo de integración patógeno-antagonista.

Materiales y métodos

Antagonistas y patógenos. Se utilizaron seis cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos de la zona hortícola de La Plata: *T. harzianum* 2, *T. harzianum* M., *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. aureoviride* y *T. hamatum* y una cepa de *T. viride* obtenida de un producto comercial (Viridin®) originario de Francia.

La capacidad antagónica de las mismas se evaluó frente a hongos patógenos de plantas hortícolas, aislados de los mismos suelos: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *Rhizoctonia* sp. y *Sclerotinia rolfsii*.

Los aislamientos se realizaron utilizando la técnica del suelo diluido modificada por Dal Bello (3).

A. Capacidad antagónica y tipos de antagonismo en confrontación directa. Sobre placa de agar patata glucosado (APG) al 2% en cajas de Petri de 9 cm de diámetro, se sembraron discos de 6 mm de diámetro del patógeno y antagonista obtenidos de cultivos de 7 días, colocados a 4 cm de distancia entre sí. La incubación se realizó a) en estufa a 25°C y b) a temperatura ambiente (15–20°C) en oscuridad, durante 48 h. De cada combinación patógeno-antagonista se efectuaron tres ensayos.

Para evaluar la capacidad antagónica de las diferentes especies de *Trichoderma* utilizadas se tuvo en cuenta su aptitud colonizadora, la cual se determinó calculando el porcentaje de colonización por *Trichoderma* spp. del espacio que separa ambos hongos según la siguiente fórmula (2):

$$C = DT/DE \times 100$$

donde DT = distancia recorrida por la colonia de *Trichoderma* spp. sobre el eje que separa ambos

explantes; DE = distancia entre los dos explantes; C = porcentaje de colonización de *Trichoderma* spp.

A los 7 días de incubación se determinó el tipo de antagonismo siguiendo la clasificación establecida por Porter (8).

B. Modo de acción de *Trichoderma* spp. *B.1. Interacción de las hifas.* Se cortaron bloques de agar de 1 × 1 cm de lado de la zona de interacción de las colonias de cada combinación patógeno-antagonista de 7 días mantenidas en agar agua y se observaron microscópicamente con un objetivo seco (640×).

B.2 Presencia de metabolitos difusibles en el medio de cultivo. En cajas de Petri que contenían 10 ml de AGP al 2% se colocó un disco de papel celofán estéril, y se sembraron sobre el mismo, discos de 6 mm de diámetro de cada una de las *Trichoderma* spp. procedentes de colonias de 7 días.

Se realizaron 3 repeticiones de cada combinación patógeno-antagonista. Se incubaron en una estufa a 25°C y oscuridad durante 72 h. Al cabo de ese tiempo, se retiró el celofán donde se desarrolló el antagonista y en el centro de cultivo se sembró un disco de 6 mm de diámetro de cada uno de los patógenos a fin de observar la difusión de sustancias al medio por cada especie de *Trichoderma* spp.

Para los testigos se siguió el mismo procedimiento, excepto la siembra del antagonista. A los 7 días se midió el diámetro de la colonia del patógeno, calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento (I) según la siguiente fórmula:

$$I = (100 - DT/DC) \times 100$$

donde DT = diámetro (cm) de la colonia del patógeno en el medio tratado con *Trichoderma* spp.; DC = diámetro (cm) de la colonia del patógeno en el medio no tratado.

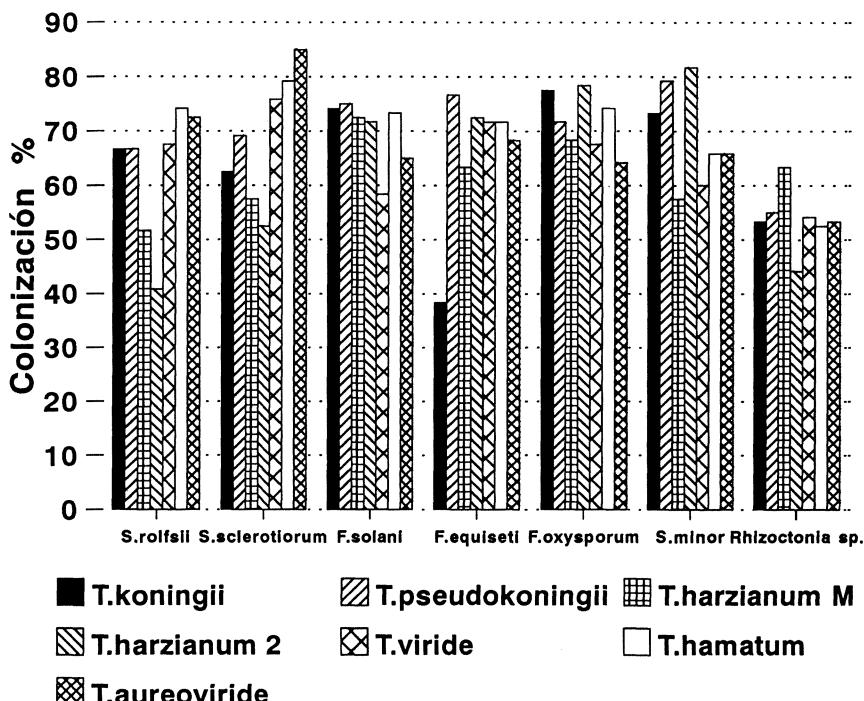


FIG. 1. Porcentaje de colonización de *Trichoderma* spp. a 25°C.

TABLA 1
DIFERENTES TIPOS DE ANTAGONISMO Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* spp.
CONTRA *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *S. minor*, *S. sclerotium* Y *Rhizoctonia* sp.

Patógenos	Antagonistas						
	<i>T. koningii</i>		<i>T. harzianum</i> M		<i>T. viride</i>		<i>T. aureoviride</i>
	<i>T. pseudokoningii</i>			<i>T. harzianum</i> 2		<i>T. hamatum</i>	
<i>Sclerotinia minor</i>	D+	B+-	D++	D++	D+	D+	D+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	A++-	B+-	B++	B++	A++	D+-	D+-
<i>Sclerotiorum rolfsii</i>	D	B+	A	A+-	A	A-	A+-
<i>Rhizoctonia</i> sp.	A+	B+-	B+-	A++	A+-	A-	B+
<i>Fusarium solani</i>	D+	D	D+	B+	E	D+	D+
<i>Fusarium equiseti</i>	D	C	D+	D+	E+	D+	D+
<i>Fusarium oxysporum</i>	D+	B+	B+	B+	D+	D	D+

(A) Ambos, antagonista y patógeno, frenan su crecimiento en la zona de intersección de las colonias, entremezclando sus hifas; (B) el antagonista crece superficialmente sobre el patógeno, el cual resulta inhibido; (C) espacio angosto entre las dos colonias (halo) claramente marcado (inhibición a distancia); (D) el antagonista crece alrededor del patógeno, inhibiéndolo; (E) presencia de un halo más ancho entre el patógeno y el antagonista (inhibición a distancia); (++) inhibición debida a la secreción de metabolitos difusibles con acción fungicida; (+ -) metabolitos difusibles con efecto fungicida e interacción hifal; (+) metabolitos difusibles con efecto fungistático; (-) metabolitos difusibles con acción fungistática e interacción hifal; (-) interacción hifal.

En los casos en que se sospechó acción fungicida del antagonista ($I=100$) se trasladó el disco de agar con el patógeno a una placa de Petri con APG al 2% para comprobarlo.

Los ensayos fueron realizados basándose en un modelo lineal aditivo sobre poblaciones homogéneas distribuidas normalmente. Se aplicó un análisis de la varianza con la prueba de F y el test de comparaciones múltiples de Norman-Kewls.

Resultados

A. Capacidad antagónica y tipos de antagonismo en confrontación directa. Tanto a temperatura ambiente como a 25°C, la mayoría de las especies de *Trichoderma* crecieron bien con valores de colonización superiores al 50%. La Fig. 1 indica los resultados obtenidos a 25°C.

Se consideraron como valores relativos eficaces de colonización los crecimientos que superaron el 50% de los casos.

T. pseudokoningii, *T. hamatum* y *T. aureoviride* fueron las especies de mayor crecimiento a 25°C y a temperatura ambiente, respectivamente. En la Tabla 1 se indican los tipos de antagonismo observados en las especies de *Trichoderma* ensayadas.

B. Modo de acción de *Trichoderma* spp. *B.1. Interacción hifal.* En la intersección de *T. koningii*-*S. sclerotiorum*, *T. pseudokoningii*-*S. minor*, *T. aureoviride*-*S. sclerotiorum*, *T. hamatum*-*Rhizoctonia* sp., *T. aureoviride*-*S. minor*, *T. pseudokoningii*-*Rhizoctonia* sp., *T. harzianum* M-*Rhizoctonia* sp., *T. viride*-*Rhizoctonia* sp., *T. pseudokoningii*-*S. sclerotiorum*, *T. hamatum*-*S. rolfsii* y *T. aureoviride*-*S. rolfsii* se observaron ramificaciones hifales cortas del antagonista rodeando estrechamente las hifas de dichos patógenos ("coiling".)

En el cultivo doble de *T. pseudokoningii*-*S. sclerotiorum* y *T. aureoviride*-*S. minor* se observó coagulación y granulación del citoplasma o rotura de las hifas de los patógenos.

En los cultivos dobles de *T. aureoviride*-*T. pseudokoningii*, y *T. hamatum*-*Rhizotocnia* sp. y *T. harzianum* M-*S. sclerotiorum* se observó la penetración de las hifas del antagonista dentro de la hifa del patógeno.

B.2. Presencia de metabolitos difusibles en el medio. Hubo inhibición del crecimiento de los patógenos por acción de los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp. en porcentajes variables según la combinación patógeno-antagonista (Fig. 2).

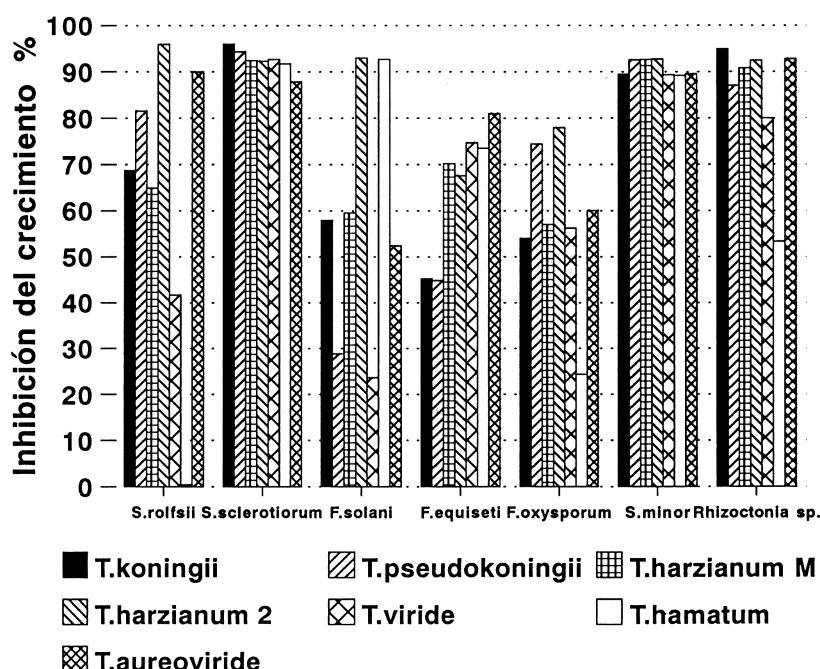


FIG. 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *S. minor* y *Rhizoctonia* sp. por efecto de los metabolitos difusibles de *Trichoderma* spp.

T. harzianum 2 indujo un elevado grado de inhibición del crecimiento de todos los patógenos ensayados, presentando además acción fungicida contra *S. minor*, *S. sclerotiorum* y *Rhizoctonia* sp.

Discusión

Montealegre y Henríquez (7) observaron que las tasas de crecimiento de las distintas cepas de *Trichoderma* varían con la temperatura, tal como comprobaron Goldfar et al. (4) quienes destacan la importancia de la respuesta de las cepas de *Trichoderma* a la temperatura, en función del antagonista apropiado. Las diferencias en el crecimiento de *Trichoderma* a las dos temperaturas ensayadas ponen de manifiesto la necesidad de analizar diferentes cepas de una misma especie en un rango amplio de temperatura, a fin de determinar su capacidad como agentes biocontroladores a diferentes condiciones térmicas. Si bien las especies con acción fungicida aparecerían a priori como las más prometedoras, también se debe tener en cuenta su aptitud colonizadora y su micoparasitismo. Los resultados presentados en este trabajo permiten una selección preliminar de antagonistas, siendo necesaria la posterior evaluación de su comportamiento en el campo, donde las variadas condiciones climáticas, edáficas y de interacción con otros microorganismos podrían modificar el comportamiento esperado.

Agradecimientos

A la Ing. G. Lori por la determinación de las especies del género *Fusarium*.

Bibliografía

1. Alippi, H., Mónaco, C. (1990). Antagonismo «in vitro» entre hongos fitopatógenos y saprobios de suelos hortícolas. Rev. Arg. Microbiol. **22**, 90–92.
2. Camporota, P. (1985). Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp. vis - à - vis de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Agronomie **5**, 613–620.
3. Dal Bello, G. (1987). Hongos fitopatógenos en suelos de la región hortícola platense: estudios cualitativos y de patogenicidad. Ciencia del Suelo **5**, 189–192.
4. Goldfar, B., Earl, N., Hansen, E. (1989). *Trichoderma* spp. growth rates and antagonism to *Phellinus weiri* in vitro. Mycologia **81**, 375–381.
5. Lederer, W., Lorenz, K., Seermuler, E. (1992). Studies on antagonistic effects of *Trichoderma* isolates against *Phytophthora cactorum*. J. of Phytopathol. **136**, 154–164.
6. Mónaco, C., Perelló, A., Pasquaré, A., Alippi, H. (1991). *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent in the presence of *Fusarium* spp. and *Sclerotium rolfsii* by seed treatment. Adv. Hort. Science **5**, 60–63.
7. Montealegre, J., Henriquez, J. (1990). Posibilidades de control integrado de *Sclerotium rolfsii* Sacc, mediante hongos del género *Trichoderma* y fungicidas. Fitopatología **25**, 68–74.
8. Porter, C. (1924). Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. Amer. J. Bot. **11**, 168–188.
9. Webster, J., Dennis, C. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III: Hyphal interaction. Trans. Br. Mycol. Soc. **57**, 363–369.
10. Webster, J., Dennis, C. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. **57**, 25–39.
11. Whipps, J., Budge, S., Mitchell, S. (1993). Observations on sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycol. Research **97**, 697–700.

Maclyn McCarty: un sabio olvidado. Cincuenta años del redescubrimiento del DNA

Rubens López

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

“En 1944, después de años de meticulosos análisis químicos, Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod y Maclyn McCarty, tres investigadores del Instituto Rockefeller, comunicaron uno de los trabajos más importantes jamás realizados en biología. En él se describía que el «principio transformante» era DNA, una estructura química capaz de cambiar (transformar) las propiedades de la célula.” Así ha resumido la magnitud de aquel hallazgo un microbiólogo actual (3). Este año se cumple medio siglo de la publicación de aquel artículo que demostraba que el DNA era la molécula encargada de transmitir los caracteres hereditarios.

Los científicos de finales de los años 40 y principio de los 50 ya barruntaban la importancia del descubrimiento de Avery y sus colegas, que fue dado a conocer a la comunidad científica en la prestigiosa revista *Journal of Experimental Medicine* (1). Sin embargo, y salvo honrosas excepciones, la disposición de los científicos a aceptar la grandeza del mismo fue, por aplicar un calificativo caritativo, poco generosa. Esta toma de posición de la colectividad científica no es una actitud nueva en la historia de la ciencia. Basta remontarse tan sólo a los dos últimos siglos para hallar otros ejemplos. Mencionaremos únicamente lo que sucedió con otro acontecimiento señero en la historia de la ciencia. A mediados del siglo XIX, el monje agustino Gregor Johann Mendel (1822–1884) tuvo la genialidad de seleccionar características fácilmente identificables en las semillas de las plantas de guisantes que crecían en el huerto del convento. Esas características eran su color, su forma, su superficie rugosa o lisa, etcétera. Mediante cruces de las plantas y análisis de la descendencia, sentó las bases de la genética moderna, particularmente de la transmisión de los caracteres de padres a hijos. Es lo que hoy se estudia en todos los libros de texto de bachillerato como “las leyes de Mendel”. El sabio agustino publicó el resultado de su investigación en una revista de poca difusión en 1865 y 1869 y, pese a sus esfuerzos por convencer a sus colegas, aquellos trabajos no fueron tenidos en cuenta. En 1900, una sorprendente coincidencia puso de actualidad el trabajo de Mendel. Tres científicos diferentes, que trabajaban en países distintos —Hugo de Vries en Holanda, Karl Correns en Alemania y Erich Tschermark von Seysenegg en Austria— repitieron sus descubrimientos, que elaboraron cada uno por separado. Al buscar bibliografía sobre aquel

Correspondencia: Rubens López. Departamento de Microbiología Molecular. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Velázquez, 144. 28006 Madrid. Tel.: 91-5611800. Fax: 91-5627518.

tema dieron con los artículos publicados más de treinta años antes por Mendel. Sólo entonces se reconoció la importancia fundamental de tales hallazgos.

Tratando de ser comprensivo con mis colegas, señalaría que ciertos hallazgos se adelantan a su tiempo; es decir, cuando se realiza un descubrimiento prematuro la comunidad científica carece de la necesaria disposición mental para reconocer su significado e importancia. Nuestra tan pregonada capacidad para aceptar lo nuevo, cuando viene acompañado de un riguroso análisis científico, se desmorona probablemente como consecuencia de la falta de perspectiva histórica. No obstante, no siempre sucedió así. Einstein corrió mejor suerte que Mendel. Su teoría de la relatividad fue pronto aceptada, pese al gran trabajo intelectual que acarreaban sus propuestas y a que se precisaría de grandes esfuerzos para dotar a sus geniales ideas de una sólida base experimental. Quizá los físicos contemporáneos de Einstein tenían sus mentes mejor dispuestas que sus colegas biólogos.

A manera de moralina me gustaría, sin embargo, aprovechar el aniversario que recordamos en el título de estas líneas y las leves reflexiones que acabo de realizar. Querría mencionar, una vez más, que en el fondo de estos comportamientos no siempre aflora la imparcialidad de nuestros juicios apoyada en la natural solidez que preside el riguroso análisis al que sometemos todo descubrimiento. Por el contrario, el rigor se utiliza como coartada para justificar el olvido y esconder la injusticia que hemos cometido con algunos de los más brillantes miembros de nuestra comunidad. Tampoco está ausente de estos comportamientos una mal disimulada y peor entendida “competitividad” científica, tan necesaria en muchos sentidos, siempre y cuando no sobrepase los límites que marca la honestidad. Aún tendríamos que añadir un nuevo ingrediente a la succulenta pócima intelectual que alimenta la leyenda del científico insobornable: la tendencia a anteponer, en algunos casos muy llamativos, el “magister dixit”—es decir, las enseñanzas emanadas de un prestigioso investigador—al análisis objetivo de los hechos. El caso del descubrimiento del DNA, en su actual dimensión, nos puede valer de nuevo de ilustración.

En los años 30 y 40, Alfred Mirsky, un reconocido especialista en el estudio de las proteínas, se convirtió en el auténtico protector de Avery—un médico interesado en combatir al neumococo, principal agente microbiano responsable de la muerte por neumonía que en aquellos años era la primera causa de fallecimientos—y trató de convencerle de la necesidad de investigar la función biológica del DNA. La incorporación al laboratorio de Avery de jóvenes investigadores como McCarty aportó el desarrollo de la tecnología necesaria para demostrar de forma incontrovertible que el DNA era la estructura necesaria y suficiente para cambiar las propiedades de la célula. Pero esto era demasiado para Mirsky; se trataba de una estructura, al menos en apariencia, excesivamente simple para esconder la maravillosa variabilidad que adorna a los seres vivos. Que el DNA, una molécula “excesivamente monótona”, guardara la clave que determina, entre otras características, el color de nuestros ojos o nuestro grupo sanguíneo, era muy difícil de aceptar para investigadores familiarizados con estructuras tan ricas y variadas como las que proporcionan los aminoácidos que conforman las proteínas. Asumo que, por simplicidad divulgativa, cuanto he dicho sea sólo una caricatura de la situación real que se vivió en el Instituto Rockefeller en 1944, pero las caricaturas sólo exageran las realidades que se esconden en nuestra personalidad, poniéndolas de manifiesto. El final de la historia fue que, desde la publicación de un trabajo que será recordado como paradigmático en el descubrimiento del DNA, Avery y sus colegas cayeron en el olvido. Injustamente, ninguno de los tres investigadores recibió el Premio Nobel, aunque muchos creyeron entonces—y otros lo seguimos creyendo ahora—que habría sido una de las recompensas más justas para premiar un largo esfuerzo culminado con una increíble brillantez.

Con motivo de haber sido invitado recientemente a presentar los trabajos de mi grupo al IV Congreso Internacional de Genética de *Streptococcus*, celebrado en Santa Fe, New Mexico (EE. UU.), tuve la fortuna de volver a saludar a Maclyn McCarty. McCarty, un venerable anciano, impartió la conferencia inaugural. Tuve la sensación de charlar con una persona extremadamente sencilla y plenamente satisfecha; se diría que lleva con ejemplar y natural modestia la púrpura que supone haber sido corresponsable de desarrollar los estudios que demostraron que el DNA era la molécula básica en el esquema de la vida. Este descubrimiento hizo posible que, nueve años más tarde, James Watson y Francis Crick determinasen la estructura de la doble hélice. No creo que me ciegue ningún tipo de pasión hacia un maestro lejano para poder sustanciar cuanto aquí digo. Tengo para mí que una lectura desapasionada del libro publicado en 1985 por McCarty, *The Transforming Principle* (2), enriquece y documenta, con un relato pormenorizado, la historia que aquí se resume. Asimismo ilustraría a los lectores interesados sobre la trayectoria de un sabio olvidado que supo debilitar los lazos obsesivos, a veces inhumanos, que conjugan en exceso el éxito personal y la absoluta necesidad de publicar. Esta actitud condiciona peligrosamente la investigación de calidad, algo que se ha convertido en un auténtico clamor en los editoriales de las más prestigiosas revistas. En resumen, una trayectoria a imitar, si nos dejan.

Según nos contaba, en 1984, McCarty en el prefacio de su libro: "Han pasado cuarenta años desde que Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod y yo publicamos nuestro artículo identificando la sustancia responsable de la transformación de los tipos de neumococo como ácido desoxirribonucleico (DNA). Debido a la naturaleza de la transformación de los neumococos, este descubrimiento implicaba que el DNA debía de estar funcionando como un transportador de información genética, por lo que el artículo aportaba la primera prueba experimental de la naturaleza del material de la herencia. En realidad, describimos los resultados experimentales con un mínimo de interpretación y especulación, por lo que a algunos les quedó la duda de si realmente habíamos comprendido el significado de nuestros descubrimientos. Pasaron muchos años antes de que MacLeod y yo nos pusiéramos a discutir la posibilidad de escribir la historia del descubrimiento, en un intento de clarificar la secuencia de hechos observados y la interpretación que les dimos. Nunca fuimos muy lejos con esa idea. Yo tenía demasiadas obligaciones para pensar en llevar a cabo el trabajo. En una ocasión, en 1969, Colin pensó que teníamos tiempo libre suficiente para empezar y me pidió que le pusiera las notas de laboratorio en una habitación del Hospital Rockefeller. Me alegró satisfacer esta petición, que estaba basada en el convencimiento de que las notas no saldrían de la institución. Sin embargo, muy pronto tuvo que ocuparse de otras actividades que le impidieron dedicarse al trabajo aun antes de comenzar. Cuando murió, en febrero de 1972, no había preparado más que unas pocas notas preliminares."

El joven científico no piensa normalmente en la historia de su tema de investigación, y a menudo se ha sugerido que esto debe ser así si quiere realizarse un trabajo creativo. Sin embargo, los esfuerzos que hice para recapturar los detalles de la investigación tras cuarenta años me hicieron pensar lo valioso que hubiera sido tener muchas cartas, notas y diarios de la época. Solamente dispongo de muy pocos de esos materiales y por tanto tengo que basarme en las notas de laboratorio e informes de trabajo, que tienden a ser no solamente impersonales sino que carecen de la descripción del razonamiento y motivaciones de los experimentos emprendidos."

Estas líneas pretenden ser un agradecido homenaje al superviviente de aquella apasionante aventura que daría carta de naturaleza a la biología molecular hace ahora cincuenta años, al tiempo de servirme

de trampolín para llevar al ánimo del lector una dimensión más real, cargada de miseria y grandeza, del espíritu que anida en esos hombres que dedican su vida al noble oficio de la investigación científica, que tan gran influencia ejerce en la cultura contemporánea. Una dimensión humana, a la poste, muy alejada del estereotipo del sabio ausente de cuanto sucede en su entorno.

Bibliografía

1. Avery, O. T., MacLeod, C. M., McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**, 137–158.
2. McCarty, M. (1985). The Transforming Principle. Discovering that Genes are made of DNA. W. W. Norton & Co., New York. [Trad. española: El principio transformador. Cómo se descubrió que los genes están hechos de DNA. Ed. Reverté, Barcelona. 1988.]
3. Mester, E. N., Roberts, C. E., Nester, M. T. (1995). Microbiology. A Human Perspective. Wm. C. Brown Pub., Dubuque, Iowa.

André Lwoff (1902–1994)

Marie-Odile Soyer-Gobillard

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-mer, France

El 30 de septiembre de 1994 la comunidad científica internacional perdió a uno de sus representantes más prestigiosos, André Lwoff, Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1965 (junto con Jacques Monod y François Jacob), miembro del Institut de France, miembro extranjero de la National Academy of Sciences de los Estados Unidos, miembro de la Royal Society (Londres) y de la Academia de Ciencias Médicas de la anterior Unión Soviética.

Más que presentar una recopilación exhaustiva de toda la contribución de este famoso científico, he preferido escribir unas breves palabras como homenaje respetuoso y cordial.

Nacido en 1902 en Ainay-le Château (Allier, Francia), André Lwoff heredó de su padre, médico psiquiatra, su inclinación por el trabajo y su pensamiento independiente. Su padre había nacido en Sínteropol (Rusia), pero la situación política y social de su país, donde sufrió prisión por verse envuelto en actividades políticas siendo estudiante, le empujó a trasladarse a Francia, y en París estudió medicina y se convirtió en psiquiatra. Lwoff ha evocado en ocasiones el carácter de sus progenitores y la forma en que las situaciones sociales y políticas pueden ir desviando el curso previsto de una trayectoria vital. Su padre tenía veintiún años cuando llegó a Francia en 1880, donde también residía la joven escultora rusa con quien se casaría más tarde.

El propio Lwoff no descarta que su decisión de estudiar biología y dedicarse a la investigación pudiera deberse a Ilya Ilich Metchnikoff. Amigo de su padre, les visitaba con asiduidad y fue quien mostró por primera vez al joven André, un adolescente de trece años, un microbio, que por cierto no fue capaz de ver, seguramente por la poca práctica que tenía con el microscopio que Metchnikoff puso delante de él. Sin embargo, el hecho no se borró jamás de su mente. Entró en el Institut Pasteur (París) tras haber recibido una beca de investigación en 1921. Fue sucesivamente auxiliar de laboratorio (1925), jefe de laboratorio (1929), Doctor en Medicina (1927) y Doctor en Ciencias (1932). Su tesis estuvo dedicada al estudio de la bioquímica de la nutrición de parásitos y protozoos de vida libre. Desde 1920 pasaba sus vacaciones en la estación de biología marina de Roscoff, donde en 1921 conoció a Edouard

Correspondencia: Marie-Odile Soyer-Gobillard. Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire. Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-mer. 66650 Banyuls-sur-mer. France. Tel.: +33-68887369. Fax: +33-68887398.

Chatton. El famoso protistólogo se convirtió en su mentor y amigo. Su trabajo conjunto sobre los ciliados se continuaba cada año en Banyuls-sur-mer, Roscoff, Wimereux, Sète,... hasta la muerte de Chatton en 1947. Las aportaciones más significativas de André Lwoff en el campo de la protistología, realizados entre 1934 y 1949, incluyen estudios del ciclo vital, morfología, fisiología y morfogénesis de diferentes grupos de ciliados. La monografía de estos ciliados fue completada casi totalmente en el Laboratoire Arago de Banyuls-sur-mer. En 1938, Lwoff fue nombrado director del recién creado departamento de Fisiología Microbiana del Institut Pasteur, donde permaneció hasta 1968. Allí inició sus investigaciones sobre los factores de nutrición y crecimiento de las bacterias, estudiando bacteriófagos, profagos y otras partículas víricas. La dedicación de sus esfuerzos hacia la naturaleza biológica, incluyendo los aspectos genéticos, de las bacterias, lo separó definitivamente del camino de la protistología. André Lwoff fue un maestro indiscutible en la joven ciencia de la virología, a la que contribuyó con el desarrollo del concepto de virus. Además, sus observaciones e hipótesis sobre la lisogenia, y especialmente sobre los factores que influyen en el desarrollo de enfermedades víricas (los agentes carcinogénicos que inducen la transformación vírica de los provirus) ejercieron una gran influencia sobre la investigación médica en el estudio del cáncer.

Desde 1959 hasta 1968 ocupó la cátedra de Microbiología en la Facultad de Ciencias de la Universidad de la Sorbona, en París, y, de 1968 a 1972, el que sería su último cargo profesional como director del Instituto de Investigación Científica (CNRS) en Villejuif. Su retiro en 1972 le permitió dedicar más tiempo a su principal afición, la pintura al óleo. El montañoso y extenso paisaje que se extiende cerca de Banyuls-sur-mer, la luminosidad mediterránea, los colores de las flores y los árboles le inspiraban maravillosas pinturas. Durante los meses del año que pasaba en su austera y a la vez majestuosa fortaleza ("Mas Guillaume"), desde donde se dominaba la bahía de Banyuls, visitaba con frecuencia nuestro laboratorio, mostrándose siempre interesado en nuestros últimos resultados sobre la biología celular de los dinoflagelados y otros protistas. Sus consejos y orientaciones, avalados por rigurosos razonamientos, nos impresionaban. Le invitamos a participar en la reunión francesa de Protistología (G.P.L.F.) en 1979, y más tarde en la tercera reunión de la Sociedad Internacional de Protistología Evolutiva (I.S.E.P.), en 1984, donde reencontró a algunos de sus antiguos alumnos.

Lwoff fue un científico excepcional, a quien cupo el honor de vivir una época, también excepcional, llena de avatares sociales y descubrimientos científicos de gran transcendencia. Fue una época en la que se asentaron las bases científicas de una gran parte de nuestro conocimiento sobre las células y se impulsó el desarrollo de las ciencias biológicas en general.

André Lwoff fue también un artista de talento, cuyas pinturas pudieron ser admiradas por el público en diversas exposiciones, las últimas de las cuales tuvieron lugar en una galería de arte de París en 1976 y 1987. Hombre de buen corazón, tenía un gran sentido del humor, en ocasiones mordaz. Todos aquéllos a los que distinguió con su amistad le recordaremos por su espíritu amable y su disposición a otorgar su ayuda.

Referencia

Lwoff, A. (1971). From protozoa to bacteria and viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **25**, 1–26.

Diez avisos para el científico español

Salvador Reguant

Facultad de Geología, Universidad de Barcelona

Opinión nace con la idea de ser una Sección no fija en la que aparezcan declaraciones, comentarios, artículos, etc., sobre materias, no necesariamente microbiológicas, cuyo contenido pueda ser de interés para los miembros de la Sociedad Española de Microbiología y otros lectores de la revista.

Con satisfacción he accedido al requerimiento de la revista para que se reprodujera este artículo que fue publicado en el periódico “El País” el día 22 de septiembre de 1993. Pienso que el texto reflejaba el pensar de muchos investigadores españoles en aquel momento y, posiblemente, sigue siendo válido en muchas de sus afirmaciones.

El artículo decía:

La ciencia española ha progresado notablemente en los últimos diez años, tanto en calidad como en cantidad. Los contactos con los centros internacionales más importantes en los distintos campos científicos se han multiplicado ejemplarmente. No obstante, persisten situaciones de desequilibrio que son objeto de preocupación, no sólo por parte de los responsables de la política y la gestión científicas a los distintos niveles sino también de los mismos científicos. El texto siguiente, fruto de muchos contactos informales,

pretende incentivar una reflexión más generalizada sobre estos temas a la vez complejos e inevitables.

1. España es un país rico, pero menos. Pertenece al grupo de países desarrollados, pero es uno de los menos desarrollados, en particular por lo que atañe a tradición científica y a gasto público en investigación científica. Por tanto, es de esperar que se comportará en este aspecto, como en los demás, al estilo del menos rico, siempre atento a imitar lo bueno y lo malo de los más ricos.

2. La riqueza está asociada a la potencia y a la preeminencia, tanto industrial como comercial y científica. Por consiguiente, la ciencia puntera está asociada a los países más ricos. Actualmente, Estados Unidos representa la punta de la ciencia.

3. Los países ricos son expansivos y opresores. Siguiendo la conocida ley que dice que el poder es expansivo, los países más desarrollados

tienden a ir más allá de su propio terreno y aún de sus posibilidades honestas e imponen sus lenguas, sus criterios, sus tics,....

4. No podemos menospreciar ni prescindir de la ciencia de los países ricos. Es absurdo pensar que los países menos desarrollados puedan vivir a espaldas del progreso científico y técnico que se consigue en los países más ricos. Sin un contacto y asimilación constantes de este progreso, la ciencia española se perdería en la más absoluta inanidad.

5. No podemos imitar servilmente la ciencia de los países ricos. Sus problemas son, en grado elevado, nuestros problemas. Nosotros hemos aportado poco a la ciencia, pero hemos aportado algo. Nuestra situación y cultura en el espacio y en el tiempo hacen de nuestra ciencia algo no totalmente traducible, ni totalmente *traducción* de otras situaciones y culturas. Hemos de adaptar la ciencia contemporánea a nuestra situación contemporánea.

6. La adaptación (o no adaptación) de nuestra ciencia a la ciencia puntera tiene connotaciones objetivas, subjetivas y económicas. Los objetivos de la ciencia española deben ser constantemente redefinidos para nuestro ámbito, posibilidades y necesidades, a partir de la ciencia más avanzada. Los científicos españoles deben realizar constantemente el esfuerzo de vivir la ciencia universal, donde se produce solamente una pequeña parte de ella, por la real fatalidad de que pertenecen a un país menos rico y potente. No cumplir esta condición nos alejaría cada vez más de la ciencia moderna. No redefinir nuestros objetivos propios nos convierte en contribuyentes, con nuestro esfuerzo y nuestro dinero, de los programas científicos de los países más ricos. Es un hecho que sufragamos a menudo los programas estadounidenses, al escoger proyectos y solicitar financiación española para ellos, en función de las exigencias de investigadores americanos de prestigio. Ellos nos indican qué deberemos hacer

y, a cambio de facilitarnos un currículum mejor valorado, nos convertimos en sus esclavos.

7. El problema de la lengua no es un problema menor. La ciencia tiende a adoptar como lengua de comunicación o lengua franca el inglés. Estudios recientes demuestran que, por lo menos en algunos ámbitos de la ciencia, la adopción del inglés como lengua de comunicación es: en parte verdad; en parte, un deseo y una tendencia relativamente lenta y en parte, un espejismo; muchos científicos, sobre todo anglosajones, creen que es una realidad, pero no lo es.

Aceptando que es bueno incrementar el uso del inglés y que es muy importante conocer bien esta lengua porque entre el 50% y el 80% de la información científica posiblemente se vehicula a través de ella, quedan en pie aún muchas cuestiones. Mucha información científica está escrita en otras lenguas. Conocer el francés, el alemán, y a ser posible el ruso y el japonés, ampliaría considerablemente nuestro horizonte científico. Llegar a un *fluent English* por parte de los científicos no angloparlantes es difícil, y, en la práctica, sólo un porcentaje muy bajo de españoles es capaz de intervenir eficazmente en reuniones científicas.

De esto se derivan, por lo menos, dos consecuencias: el foro científico es significativamente deficiente, ya que no intervienen todos los que pueden decir algo, sino sólo una minoría; los españoles deben, teniendo en cuenta este hecho, aportar por escrito y formalmente el máximo caudal de información científica. De aquí la necesidad de hacer reuniones en la propia lengua —congresos nacionales, por ejemplo— para madurar, matizar y perfeccionar las propias aportaciones en foros de discusión.

8. Los criterios que equiparan difusión con calidad son, en algunos aspectos, falsos y engañosos en ciencia. La valoración de la calidad a través de la difusión (las famosas revistas de impacto) es una primera aproximación válida, ya

que en líneas generales, la ciencia de los países ricos que tienen más fuerza difusiva, es la más avanzada. La valoración exclusiva a través de este tipo de índices es falsa porque la proposición contraria, es decir, que en los países menos ricos, o en revistas de menor difusión en los países ricos, no es posible encontrar ciencia de primera calidad, es absolutamente falso.

Es falsa también conceptualmente hablando. No el programa más visto de televisión es el de mejor calidad. Además es engañosa porque contribuye a la destrucción de la ciencia en aras de la comercialización, como se ha denunciado repetidamente. Para nosotros los españoles, supone aceptar que las *modas* científicas impuestas por ciertos grandes *sabios* son siempre adecuadas al desarrollo de la ciencia. No siempre es así, recordemos temas como la periodicidad de las extinciones cada 26 millones de años; el invierno nuclear; la fusión fría... que son cuando menos muy discutibles. Tampoco nuestros objetivos son exactamente los objetivos impuestos por los grandes *pontífices* de la ciencia.

9. La ciencia no es una sino múltiple. La perspectiva de los diversos científicos sobre la propia ciencia es tan poco coincidente, que en las discusiones sobre el procedimiento y valoración de la ciencia se observan claros síntomas de incomunicación. Como dice John Dupre en *The Disorder of Things: Metaphysical Foundations of the Disunity of Science*, no hay un método científico general, ni un proceso o actitud científicos únicos. Este hecho es importante porque invalida cualquier valoración *comercial* única de los resultados de la ciencia. En concreto, no es válida la perspectiva dominante actualmente en el mundo desarrollado de aceptar la física como paradigma universal de la ciencia. Y, por consiguiente, no es correcto aplicar criterios de trabajo, planificación y valoración perfectamente válidos para la ciencia física a las demás ciencias.

10. Aunque el tránsito de los avances científicos circula predominantemente desde los

países más avanzados a los países menos desarrollados, se producen cambios de sentido con alguna frecuencia; en las ciencias ligadas al espacio geográfico, por su propia idiosincrasia; en las ciencias más abstractas, por la categoría de algunos de sus cultivadores en países menos desarrollados. En este aspecto y a fin de que los resultados novedosos para la ciencia producidos por España lleguen adecuadamente a la comunidad científica internacional, es muy conveniente que se incremente entre nosotros el uso del inglés.

No conviene olvidar, sin embargo, que estas aportaciones, en inglés o en otra lengua, de los científicos de los países menos desarrollados pueden ser poco considerados por causa de un desprecio, consciente o inconsciente, por parte de los científicos de países más avanzados. La honradez no es necesariamente una cualidad existente en todos los miembros de la comunidad científica. Para paliar este *desaguisado* convendrá, a veces, hacer ver de dónde proceden inicialmente determinadas aportaciones. Algunas, al ser orquestadas luego por científicos de los países más avanzados, pueden hacer pensar a la comunidad internacional que nacieron en ellos, cuando en realidad son debidas al esfuerzo de científicos de países menos desarrollados.

Hasta aquí el texto de *Diez avisos para el científico español*. Quisiera, ahora, ya que tengo la ocasión de dirigirme a colegas de áreas distintas a las mías, añadir algo más de lo que yo conozco sobre tres de los diez puntos señalados.

En el punto 3 resulta evidente que hipótesis de mayor o menor valor son aceptadas acríticamente y usadas, a veces, inadecuadamente por el hecho de provenir de científicos de países de primera línea en ciencia. Entre los casos referentes a las ciencias geológicas, la hipótesis del meteorito como explicación de la extinción masiva en torno al límite Cretácico-Terciario (1), la aceptación de la periodicidad de extinciones masivas cada 26 millones de años

aproximadamente (2) y la ciclicidad global basada en los movimientos de variación del nivel del mar (3) se han aceptado y aplicado en la mayoría de países, incluido Estados Unidos, con una alegría y frivolidad que no se corresponden con los fundamentos y pruebas presentados ni, frecuentemente, con la opinión de sus propios autores.

El problema de la lengua (punto 7) es enormemente complejo. Se ha progresado, por parte de los países no angloparlantes, particularmente España, en el uso del inglés como lengua franca, pero poco se ha progresado en la lectura de lenguas no inglesas por parte de los angloparlantes (4). El planteamiento de normas de "fair play" en las reuniones internacionales con inglés exclusivo ni siquiera se ha planteado formalmente.

El punto 9 es particularmente espinoso. El papanatismo de juzgar todas las ciencias a través de un sólo paradigma universal, normalmente el paradigma de la física, es una "enfermedad" muy extendida en todas partes. Stephen Jay Gould lo denuncia repetidamente en su libro "La vida maravillosa" (5).

Notas

(1) Hipótesis primeramente expuesta por Álvarez et al. en 1980 (*Science* **208**, 1095–1108). La literatura sobre ella, normalmente favorable a la misma, es inmensa. Recientemente se han expuesto supuestas pruebas del hallazgo del emplazamiento del meteorito. Más que la hipótesis en sí, lo que no queda claro es la evaluación de los resultados catastróficos por esta sola causa, el tipo

y localización del cuerpo impactante y la generalización de algunos aspectos de la hipótesis inicial.

(2) Hipótesis expuestas por Raup y Sepkoski en 1984 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 801–805) sobre la base de datos poco homogéneos. No obstante, ha sido aceptada de una manera acrítica por muchos científicos. Algunos de ellos, dándola como probada, han buscado fuera de la Tierra las posibles causas de estas extinciones. La revista *Nature* publicó de 1984 a 1987 varias de estas contribuciones.

(3) Ésta es una teoría de pretendido alcance global desarrollada por los estratígrafos del grupo Exxon y expuesta en varios trabajos (por ejemplo, Vail et al., 1977, *AAPG Mem.*, **26**, 49–212). Sus conceptos a menudo se aplican de una manera acrítica, usando sus conclusiones como un corsé rígido al que se pretenden ajustar los datos constantemente adquiridos por los estratígrafos.

(4) Una discusión general para las ciencias geológicas puede encontrarse en Reguant, S., Casadellá, J. en *Scientometrics* (**29**, 335–351 [1994]). La ignorancia y problemas que lleva consigo la no lectura de textos no ingleses por parte de los investigadores angloparlantes se reflejan, por ejemplo, en mi carta publicada en *Nature* (**361**, p. 107 [1993]), y en Kennedy et al. en *Microbiology* (**140**, p. 2513 [1994]).

(5) Gould, S. J. *La vida maravillosa*. Ed. Crítica, Barcelona. 1991. Edición original americana: 1989. Véanse, por ejemplo, las páginas 100, 283 y 284–286.

Revisión de libros

Descifrar la vida

Ensayos de historia de la biología

J. Casadesús, F. Ruiz Berraquero (eds.)
Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, 1994. 400 pp. ISBN 84-7405-990-9

Esclarecer los orígenes de la vida ha ocupado desde siempre a personas diversas por motivos muy variados, desde la simple curiosidad a la explicación religiosa. Ésta, por mucho tiempo, fue no solo la que imperó sino la que puso coto a cualquier otra interpretación, por poco que se alejara de sus presupuestos celestiales. Bien es cierto que la vida, limitada a la concepción religiosa, ha estado referida casi exclusivamente al ser humano y, en menor instancia, y sometida a éste, la vida animal y vegetal. También en esa concepción estaba limitada la situación espacial: la vida aparecía, crecía y moría en nuestro planeta, la Tierra. Los otros espacios estelares se reservaban para la “postvida”, por decirlo en términos modernos.

Ya en tiempos más recientes, por los orígenes de la vida y su evolución se han interesado biólogos, químicos, físicos, geólogos, antropólogos y las variantes y combinaciones de esas disciplinas, bioquímicos, fisicoquímicos, geofísicos, paleontólogos. Dentro de estas mismas especialidades no hay concurrencia total de pareceres, de manera que, si bien los biólogos evolutivos se adhieren a teorías estrictamente neodarwinistas, otros biólogos presentan discrepancias con esa corriente interpretativa.

Dicen los editores del libro que al convencer a una veintena de científicos para que escribieran informalmente sobre temas de su especialidad o de su afición, insistieron en que lo hicieran con una orientación histórica. Querían lograr un texto a modo de divertimento, en el que cupieran, también, la arbitrariedad, la inspiración y el capricho. Los autores obedecieron la consigna, y el resultado es ventajoso para el lector. Es grato, además, dar la bienvenida a textos originales españoles, de autores activos y conocidos en sus respectivos campos. Y es doblemente grato, por el interés del tema y por el tratamiento serio que, a pesar de la distensión, la inspiración y el capricho, domina la obra.

En la no fácil tarea de *descifrar la vida* han trabajado 25 autores que, a lo largo de los 20 capítulos del libro, aportan su personal y documentada visión sobre los avatares de la investigación biológica hasta nuestros días. El contenido de la obra se puede distribuir en tres grandes bloques temáticos, que abarcan: 1) el origen y evolución temprana de la vida, desde la biopoyesis hasta la aparición del linaje humano, 2) algunos hitos en el desarrollo de la biología (avances tecnológicos, nuevas tendencias) y 3) ensayos globales de indole histórica, ético-filosófica, ecológica. El primer capítulo es un paseo por los principales descubrimientos científicos (físicos, químicos y biológicos) en compañía de sus protagonistas, mediante un relato analizado desde una perspectiva histórica. Van apareciendo después capítulos que discuten los

cambios de conceptos que se han sucedido en la interpretación de la evolución biológica, la pugna por datar la antigüedad de la Tierra y del linaje humano por medio del estudio de los fósiles y moléculas. También se tratan algunas de las contribuciones de la ecología, la microbiología, la medicina, la neurología y la biología molecular, así como las técnicas de la genética molecular, el nacimiento de la teoría atómica y la teoría celular, etcétera.

Por los capítulos del libro desfilan brevemente personajes como Monod, Lwoff (recientemente fallecido, véanse las pp. 433–434 de este número de *Microbiología SEM*) y Jacob, entre otros, y las técnicas y conceptos que desarrollaron y que tan importantes resultarían para la biología. El libro se adentra en la época de las grandes hipótesis, algunas de las cuales se mostrarían ciertas y otras no, lo que provocó que hombres de prestigio se mantuvieran en el error durante mucho tiempo, hasta que las pruebas ya fueron irrefutables. Y es que, cuando con esfuerzo y entrega se ha edificado un cuerpo de conocimiento sobre una base que resulta errónea, puede llegar a ser tremadamente difícil proceder al derribo de la idea anterior. Y aún así, de procedimientos e hipótesis equivocadas surgieron a veces notables descubrimientos que contribuyeron al avance de la ciencia.

Ante una obra que trata de un tema complejo desde tantos puntos de vista, cabría hacerse tres preguntas: 1) ¿Qué le falta al libro? 2) ¿A quién se le podría recomendar? 3) ¿Qué es lo más interesante de esta obra?

1) Le falta una corrección tipográfica por parte de la editorial. Debido quizás al programa informático utilizado, las separaciones de sílabas al final de línea son arbitrarias. Además, se han introducido errores en algunas fechas significativas. Ya que los autores y coordinadores se esmeraron en entregar sus originales correctos, la editorial no puede, ni debe, eliminar una última revisión del texto antes de imprimir el libro.

2) La obra es un libro de lectura de nivel universitario, que discute el origen y desarrollo de la vida en el contexto de la historia de la biología. Por tanto, el público receptor puede ser muy amplio: todo el que se interese por esos temas sin necesidad de que tenga conocimientos especializados. Aunque, si los tiene, también puede sacar provecho de su lectura y encontrar en las referencias que se incluyen en cada capítulo material para profundizar más en la materia. Se recomienda especialmente a los estudiantes de biología, medicina, bioquímica y geología, y también a los de historia y de filosofía.

3) Presenta los hitos del desarrollo de la biología que han influido profundamente en el conocimiento actual de muchos mecanismos de la vida. Y lo hace de una manera sencilla, comprensible y amena. Además, el libro es motivador, capta el interés del lector y deja con ganas de querer saber más. Que es lo más importante.

Carmen Chica

Redacción de *Microbiología SEM*

Introduction to Microbiology

J. L. Ingraham, C. A. Ingraham
Wadsworth Publishing Co., Belmont, California,
1995. 800 pp. ISBN 0-534-16728-4

La editorial Wadsworth acaba de publicar este libro de texto de microbiología, que recoge el trabajo de ocho años del Prof. John L. Ingraham y de su hija, doctora en medicina, Catherine A. Ingraham.

John Ingraham, profesor de Bacteriología de la Universidad de California, Davis, durante más de treinta años, pertenece a la escuela de Roger Y. Stanier, a cuyo lado trabajó, y de quien ha sido digno continuador. Ha formado a su vez una conocida escuela, de donde han salido muy acreditados investigadores, líderes en diversos campos de la microbiología.

La obra más conocida de Ingraham, en el aspecto docente, ha sido las últimas ediciones (4^a y 5^a) de *The Microbial World*, el famoso libro de Roger Y. Stanier, Michael Doudoroff y Edward A. Adelberg, publicado inicialmente en 1957. Este libro ha sido (acompañado, en los últimos años, por *The Biology of Microorganisms* de Thomas D. Brock) el texto de microbiología general por excelencia en nuestras universidades, con cuyas explicaciones han accedido a los conocimientos generales de nuestra materia los estudiantes de diversas facultades en el transcurso de varias generaciones.

En España conocemos también otras obras del autor, más especializadas, que recogen años de intensa investigación en el campo de la genética y la fisiología bacterianas. Son algunas (junto con otros varios autores): «Growth of the Bacterial Cell» (1983), «The Molecular Biology of the Bacterial Growth» (editor, 1985), «Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology», volúmenes 1 y 2 (editor,

1987), y «Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach» (1990). John Ingraham ha estado muy vinculado con la microbiología de nuestro país—es socio de honor de la SEM—, nos ha visitado en varias ocasiones, con motivo de actividades científicas a las que ha sido invitado, y son varios los investigadores españoles que han completado su formación científica con él en Davis.

Sirva este preámbulo a modo de “por sus frutos los conoceréis”, y sirva también como justificación de que el conocimiento de la solvencia científica de un autor es garantía de un trabajo bien hecho, independientemente de la adecuación del producto a otros programas de estudio, y de los aspectos comerciales que propicien su distribución. Pero, en cualquier caso, ante la proliferación de textos que se disputan un mercado de grandes proporciones, es a los profesores a quienes compete hacer sus recomendaciones bibliográficas.

Este libro, que no se adapta estrictamente a ningún programa de los nuevos planes de estudio (que son muy limitados), puede en cambio ser muy útil a los estudiantes y profesores de todas las facultades donde se imparta microbiología, especialmente allá donde se requiera un enfoque médico.

Muchos enseñantes de microbiología y materias relacionadas recordamos épocas de muy pocos libros de texto y éstos eran los que escribían quienes habían dedicado largos años a la enseñanza y a la investigación. En nuestros días, con la cantidad de información disponible, esta tarea puede emprenderla una persona con menos experiencia. Pero, en este caso, salvo honrosas excepciones, nos encontraremos ante un texto que recoge y ordena datos extraídos fundamentalmente de esos otros libros seminales a los que nos hemos referido. Más que en su propia experiencia como enseñante y como investigador, el autor deberá basarse en la experiencia y prestigio de otros.

Manteniendo este símil, *Introduction to Microbiology* pertenece al rango de fuente, de semilla. Contiene en esencia toda la microbiología que se puede enseñar. Mejor dicho, la que no se puede enseñar, porque no hay programa de estudio en ninguna facultad española, sea de medicina, biología, farmacia, veterinaria, etcétera, que permita profundizar tanto en nuestra materia como lo hace, paradójicamente, esta "introducción" de cerca de 800 páginas. Ni en los programas de estudio anteriores, ni mucho menos en los actuales, en los que a duras penas el profesor puede proporcionar una visión somera de la disciplina.

El libro está escrito con mimo y una gran dosis de didáctica, prueba de la larga experiencia docente de John Ingraham. Se presenta con un enfoque moderno, que se advierte a lo largo de todo el texto, como, por ejemplo, en la forma de empezar los capítulos, con una síntesis de los acontecimientos y personajes sobre los que se va a desarrollar el tema.

El texto se presenta con un estudiado equilibrio entre las materias básicas (biología de los microorganismos) y las aplicadas (dedicadas a la microbiología clínica). Esta estructura obedece, por un lado, a los programas de las universidades americanas, donde ambos enfoques son más comunes que en las nuestras, y, por otro, a las respectivas formaciones y experiencias de cada uno de los autores.

No podemos olvidar que muchos de los estudiantes de biología de los Estados Unidos lo hacen con la intención de entrar después en las Escuelas de Medicina. Por ello la microbiología que necesitan, y piden, debe contener una parte muy importante de microbiología clínica.

El tema de las infecciones humanas, probablemente la parte más importante del libro, se desarrolla a partir de casos reales de pacientes hospitalarios tratados por la autora, Catherine Ingraham, o a los que ha tenido acceso directo. El texto se agrupa en cinco partes: I) Principios de la

microbiología (9 capítulos, técnicas, metabolismo, genética). II) Los microorganismos (4 capítulos, descripción breve y moderna de los principales grupos, incluyendo algunos parásitos, gusanos y artrópodos, por las razones aducidas en el párrafo anterior). III) Principios de las interacciones microbios-humanos (8 capítulos, patogenia, inmunología, antibiosis). IV) Enfermedades humanas causadas por microorganismos (6 capítulos, principales enfermedades micobianas, sus causas y mecanismos). Y V) Utilización de los microorganismos (2 capítulos, ecología y biotecnología). Tiene, además, 5 apéndices, glosario e índice general. Cada capítulo finaliza con un resumen muy amplio, que incluye los títulos de los temas tratados, las páginas donde se localizan, preguntas de repaso y bibliografía recomendada. Esta última, concisa y seleccionada, se limita a no más de cinco citas por capítulo. La calidad de la edición es magnífica, así como las numerosas fotografías y dibujos. Prácticamente todas las páginas, a excepción de los índices, contienen esquemas y fotografías.

Cuando son objeto de programas prioritarios de investigación, algunos aspectos de la microbiología están sometidos a un continuo cambio. En estos casos, los autores han invitado a conocidos investigadores a explicar los estudios que están realizando y su importancia para la microbiología actual. En el texto estas aportaciones se recogen en secciones llamadas *estado de la investigación* ("focus research").

Estamos, para resumir, ante un digno sucesor de *The Microbial World*, el cual, sin perder la profundidad y gracia del modelo, lo supera en algunos aspectos, tales como en actualidad (lógicamente) y enfoque aplicado, especialmente en los temas de microbiología médica.

Ricard Guerrero
Universidad de Barcelona

Biology of Microorganisms, 7th ed.

T. D. Brock, M. T. Madigan,
J. M. Martinko, J. Parker

Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey,
1994. 909 pp. Ilustraciones en color y blanco y
negro. ISBN 0-13-042169-3.

Está próximo a cumplirse un cuarto de siglo desde la aparición, en 1970, de la primera edición de este libro, de la cual fue único autor Thomas D. Brock, uno de los más prestigiosos microbiólogos de la actualidad. La obra se ha convertido en un texto clásico de microbiología general, que ha sabido mantenerse al día en un campo de la ciencia que tantos cambios ha experimentado desde esa fecha. Prueba de este saber estar al día y mantener al lector al corriente de los rápidos avances de la microbiología es la frecuencia (entre tres y cuatro años) con que aparecen nuevas ediciones. Desde la 4^a, Brock cuenta con la inestimable colaboración de Michael Madigan, gran investigador y reconocido didacta. En esta 7^a edición que comentamos participan dos nuevos autores (John Martinko y Jack Parker), que han aportado su experiencia en microbiología médica e inmunología, el primero, en genética y biología molecular, el segundo.

Cada edición del libro es una grata sorpresa para la persona que lo ha de manejar o que simplemente lo consulta esporádicamente. Esta 7^a edición mantiene los cambios introducidos en las más recientes, en cuanto al uso de colores en dibujos, esquemas y fotografías, así como el diseño general del libro. Un examen del índice general no parece mostrar diferencias tan notables como las existentes entre la 5^a y la 6^a ediciones, por ejemplo. Sin embargo, un examen detallado muestra algunos cambios importantes.

Todos los capítulos han sido revisados, algunos de ellos profundamente. Una novedad de

esta 7^a edición es la inclusión, en cada capítulo, de un miniglosario, con la explicación de algunos términos microbiológicos utilizados en el capítulo correspondiente. Impreso sobre un fondo de color, resulta de fácil localización. Estos miniglosarios, que contienen unos veinte términos cada uno, no substituyen el glosario al final del libro, que no solo se mantiene, sino que se ha ampliado. La bibliografía, que con el título de *lecturas suplementarias* se encuentra al final de cada capítulo, ha sido actualizada con la inclusión de artículos y libros de publicación muy reciente.

Desde el punto de vista didáctico, *Biology of Microorganisms* es un libro de texto muy adecuado. A ello contribuye la profusión de ilustraciones, figuras y tablas, que en la presente edición han sido revisadas o, en bastantes casos, incluso renovadas totalmente. Herramientas didácticas muy importantes son las preguntas al final de cada capítulo —muchas de las cuales también son nuevas—, los breves resúmenes al final de muchas de las secciones en que se dividen los capítulos, y los miniglosarios antes mencionados.

En cuanto al contenido, lo más destacable es la extensa revisión de algunos temas relacionados con la genética molecular, la ingeniería genética, la inmunología y la microbiología clínica; revisiones que suponemos obra de los nuevos coautores del libro, especialistas en estas áreas. Los capítulos que han experimentado cambios más profundos son el 5^o, Macromoléculas y genética molecular, introducido en la 5^a edición del libro; el 8^o, Ingeniería genética y biotecnología; con un nuevo título, incorpora material procedente del capítulo 10^o de la 6^a edición, y muestra en el mismo capítulo los resultados prácticos de la biotecnología y la ciencia básica en la cual se inspiran; el 12^o, Inmunología e inmunidad, que es uno de los campos de la biología que más cambios está experimentando en la actualidad; incluye material nuevo sobre inmunotolerancia y

estrategias para la vacunación; y el 13º, Microbiología clínica y diagnóstico microbiológico; ha puesto al día y aumentado la información sobre el sida, incluyendo también novedades en cuanto a hongos patógenos, choque tóxico, rabia, enfermedad de Lyme y malaria, además de unas magníficas fotos en color y cuadros estadísticos de la prevalencia de dichas enfermedades. El capítulo 17, dedicado a la ecología microbiana (no olvidemos que Brock es uno de los fundadores de esa disciplina), incluye nuevo material sobre métodos moleculares, la biogeoquímica del mercurio, y el diseño y utilización de insecticidas bacterianos.

Queremos destacar algunos aspectos relacionados con la nomenclatura y la lengua. En esta edición se adoptan las formas «Prokaryotes» y «Eukaryotes», en vez de Procaríotes y Eucariotes, utilizadas en anteriores ediciones. Hemos detectado también la substitución de la palabra «microbes», que parece poco científica, por «microorganisms». A título anecdótico comentaré que a finales de la década de los sesenta los estudiantes de microbiología contábamos con un magnífico libro de texto cuyo título español era *El mundo de los microbios*. Antes de ver el libro, este

título me hizo creer durante algún tiempo que se trataba una obra de divulgación. Después descubrí que era la traducción de *The Microbial World*, de R. Y. Stanier, un clásico de la microbiología.

Biology of Microorganisms es un libro que presenta una visión muy completa del estado actual de la microbiología, y puede satisfacer las necesidades de los estudiantes que se acercan a esta disciplina desde distintos campos de las ciencias de la vida y de la salud. Será útil a estudiantes de biología, medicina, veterinaria, farmacia y, en general, a todos aquellos que, en cualquier carrera científica, deban iniciar el estudio básico, pero moderno, de los microorganismos. Es una lástima que la versión en castellano de esta obra, cuyo original se cuenta entre los mejores libros de texto de microbiología actuales, suela aparecer con un notable retraso en relación a la versión original inglesa correspondiente, que se imprima en blanco y negro (por lo menos, la versión en rústica que conocemos), y que, además, contenga errores graves de traducción.

Mercè Piquer

Redacción de Microbiología SEM

Medical Microbiology

C. Mims, J. Playfair, I. Roitt, D. Wakelin, R. Williams.

Mosby Year Book Europe Ltd, London, 1993. 600 pp. Ilustraciones en color. ISBN 0-397-44631-4.

Habitualmente, los libros de microbiología médica, orientados hacia su uso por microbiólogos, se estructuran basándose en una descripción de géneros de microorganismos y en un resumen de los cuadros clínicos que producen. A la inversa, cuando están orientados hacia la clínica de las enfermedades infecciosas, se describen los grandes síndromes y se relacionan los diferentes procesos clínicos, con sucinta referencia a los métodos microbiológicos. El libro que nos ocupa no se ajusta a ninguno de esos esquemas; en una primera lectura destaca la organización de las materias y la profusión de esquemas, tablas y fotografías en color.

Los temas se agrupan en cuatro grandes bloques, cuyos títulos denotan la ironía británica de los autores: 1) los adversarios, 2) los conflictos, 3) los métodos diagnósticos y las manifestaciones clínicas, y 4) el control.

El primer bloque consta de dos partes: a) los microbios, con tres capítulos (microorganismos y parásitos, relaciones entre el huésped y el parásito, los organismos causantes de procesos infecciosos) y b) los mecanismos de defensa del huésped, con seis capítulos (las defensas naturales, adaptación de las respuestas inmunitarias, bases del reconocimiento antigénico, bases de la respuesta immunocelular, valoración de los sistemas de defensa del huésped y de los antígenos microbianos).

En el segundo bloque, siete capítulos describen la situación previa a una enfermedad infecciosa, la puerta de entrada y diseminación, las defensas naturales en acción, la diseminación y replicación, la inmunidad específica en acción,

las estrategias del parásito en la infección persistente y las consecuencias patológicas de la infección. En la medida de lo posible, en un texto de estas características, los autores incorporan la descripción de los mecanismos moleculares que intervienen en las enfermedades infecciosas, destacando la patogenia y el control de las mismas.

El tercer bloque recoge en doce capítulos los métodos diagnósticos de muestreo, técnicas microbiológicas y la descripción de los procesos infecciosos (infecciones de: vías respiratorias altas, ojo, vías respiratorias bajas, urinarias, gastrointestinales, obstétricas y perinatales, del sistema nervioso central, y de la piel, músculos, articulaciones, huesos y sistema hematopoyético). Las infecciones multisistémicas comprenden las descripciones de infecciones víricas, infecciones transmitidas por artrópodos, zoonosis, fiebre de origen desconocido e infección en el huésped inmunocomprometido.

El bloque dedicado al control de las infecciones incluye: estrategias de control, agentes antimicrobianos, vacunaciones, inmunoterapia inespecífica, aspectos epidemiológicos e infección hospitalaria, esterilización y desinfección. Dos apéndices sobre microorganismos y metodología para procesar muestras biológicas complementan los capítulos de recogida de muestras y técnicas microbiológicas, con indicación de los microorganismos que pueden aislarse mediante técnicas microbiológicas básicas y los que necesitan técnicas más especializadas, para lo que se requiere la información del médico clínico.

Un aspecto destacable del libro es que todos los temas están desarrollados en esquemas y tablas de fácil lectura e interpretación, junto a muy buenas fotografías a todo color. Estos cuadros son lo fundamental de este libro, en el que el texto es un complemento útil.

El libro se completa con biografías resumidas de los más importantes personajes que colaboraron en el desarrollo de la Microbiología y en el

conocimiento de los procesos infecciosos. Tiene un particular interés el apéndice final, con la descripción esquemática de los agentes infecciosos, sus características, morfología, fisiología y taxonomía, tipo de enfermedad que producen, tratamiento y prevención.

No se debe esperar del libro una descripción pormenorizada sobre los métodos diagnósticos, síntomas clínicos o tratamientos. Lo que ofrece es una visión amplia y claramente esquemática de los procesos infecciosos y agentes etiológicos. Esta característica diferenciadora de los textos clásicos lo hace recomendable tanto para los estudiantes de microbiología clínica como para el personal docente de esta disciplina, así como para licenciados en postgrado que necesiten una visión sistematizada de los procesos infecciosos que pueden encontrar en el desarrollo de sus respectivas especialidades.

En palabras de los autores, se ha dejado de lado la organización tradicional de un texto de microbiología, algo que ya hemos comentado al principio, y se propone un enfoque que incorpore los cambios que se producen en los planes de enseñanza de la microbiología en las facultades de medicina de una amplia gama de países occidentales. Sin embargo, este propósito es difícil de cumplir; a lo máximo que puede aspirar cualquier texto de estas características es a presentar de forma más a menos original los aspectos básicos y generales que todo microbiólogo clínico tiene que conocer para desarrollar su labor profesional. El objetivo que sí cumple esta obra es el de presentar las materias de forma racional y comprensible, lo cual es importante porque la base de la permanencia de los conocimientos se encuentra en la captación comprensiva de los mismos.

Núria Martín Casabona
Ciutat Sanitària i Universitària Vall d'Hebron,
Barcelona

Métodos microbiológicos rápidos para análisis de aguas y alimentos

J. J. Borrego (ed.)

*Secretariado de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Málaga, 1992. 386 pp.
ISBN 84-7496-224-2.*

El trabajo presentado en este libro ha sido fruto de la colaboración entre una empresa privada y la universidad. En sí, este tipo de colaboraciones no es totalmente extraña, aunque menos numerosas de lo que desearía y sería justo para la universidad. Pero sí que es infrecuente que el resultado de esta colaboración vea la luz como un libro. Una forma tan adecuada de difusión para el beneficio de los interesados y profesionales de la microbiología de los alimentos.

Esta monografía persigue el objetivo de mostrar los trabajos de investigación realizados en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, por los autores, sobre nuevos métodos más rápidos y precisos para el análisis y control de microorganismos indicadores y patógenos contenidos en diversos tipos de alimentos.

La obra posee un total de 15 capítulos agrupados en dos secciones; la primera, denominada «Técnicas generales», está compuesta por tres capítulos, que nos muestra tres interesantísimos métodos rápidos de detección. El primero es eléctrico y se basa en la variación de la conductancia y capacitancia de un medio de cultivo cuando se produce el crecimiento de los microorganismos. El segundo método es por epifluorescencia, y nos muestra la aplicación de esta técnica de tinción al recuento de microorganismos. Y, por último, nos encontramos ante un interesante método fluorogénico que se basa en la incorporación al medio de cultivo de

substratos que, al ser metabolizados, producen fluorescencia. La segunda sección, denominada «Técnicas específicas», se compone de doce capítulos. Cada uno de ellos trata de la problemática del recuento y enumeración, así como del uso de medios selectivos, para un variado abanico de microorganismos entre los que encontramos las principales especies de bacterias patógenas. En sus capítulos encontramos información para detectar y controlar, con eficacia y rapidez, *Salmonella*, coliformes, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, levaduras y colifagos somáticos y específicos de fimbrias.

La segunda sección contiene dos capítulos sobre toxicología, un tema que a menudo se olvida dentro de los estudios de control microbiológico de alimentos y que, a mi juicio, requiere un apartado independiente. La incorporación de estos capítulos de toxicología, enfocándola como toxicidad, genotoxicidad y mutagénesis (mediante bioensayos de corta duración con bacterias), es loable y acorde con la preocupación actual sobre la toxicología alimenticia, así como sobre las metodologías analíticas rápidas de alta eficacia (y elevada concordancia con los test que emplean animales o plantas). En sus páginas encontramos información sobre las técnicas del test de Ames, del SOS-cromotest y de tests de inhibición del crecimiento.

Me ha gustado que cada capítulo se desarrolle siguiendo el esquema de un artículo, es decir, «introducción, material y métodos, resultados y discusión». Eso te hace entender y seguir el tema de una manera muy adecuada. Las introducciones suelen ser amplias y dan información adicional sobre conceptos y fundamentos que tienen que ver con el tema del capítulo, o con el método de determinación que emplea. Además, incorporan una explicación más o menos amplia sobre la problemática de la determinación que ocupa el capítulo. Al proseguir la lectura, nos encontramos

con otro aspecto interesante: para cada microorganismo se valoran y contrastan un variado pero amplio número de medios selectivos de cultivo. Además, al final de cada capítulo nos encontramos con un valiosísimo apartado de bibliografía, que nunca es inferior a las dos páginas. Y, para completar el libro, encontramos un amplio y también utilísimo apéndice con la descripción e información necesaria para la preparación de los medios de cultivo que se mencionan en los capítulos.

Otro aspecto que me ha gustado es la importancia que concede a los enriquecimientos. Esta técnica ayuda a eliminar falsos negativos producidos por bacterias en condiciones de estrés, a clarificar resultados y, en ocasiones, permite una mayor especificidad.

Quizás el principal inconveniente es que el libro está muy centrado en el control de alimentos líquidos, resultado de la colaboración con una empresa de bebidas. Pero, aunque hay poca información sobre tratamiento de muestras sólidas, los métodos que se describen son perfectamente aplicables también a este tipo de muestras.

Nos encontramos ante un libro de trabajo; una recopilación de información beneficiosa, investigaciones y pruebas aplicadas al control microbiológico alimenticio. Pretende solucionar problemas. Está escrito y diseñado de una forma adecuada al trabajo. Es un libro enfocado a profesionales y conocedores del control microbiológico de alimentos. Agradará a curiosos del tema y a muchos puede dar ideas sobre el uso de los medios selectivos.

Por último, este libro nos recuerda que en microbiología no está todo hecho en el control de alimentos, contrariamente a lo que pudiera pensarse.

Jorge Romero Lacal
AGBAR-Sociedad General de Aguas de
Barcelona, S.A.

Manual práctico de microbiología

R. Díaz, C. Gamaza, I. López-Goñi (directores)

Masson, S.A., Barcelona, 1995. 200 pp.
ISBN 84-458-0281-X

Comenta el Prof. Ramos Cormenzana, en el prólogo a este *Manual práctico de microbiología*, que cuando R. Koch visitó a R. Virchow para explicarle la manera de obtener cultivos puros de microbios, sin que se mezclaran otros microorganismos de distinta especie, se daba el primer paso para su aislamiento y cultivo. Desde ese paso temprano ha pasado ya mucho tiempo, que ha visto indudables mejoras en las técnicas del trabajo microbiológico. Sin embargo, todos sabemos que las prácticas docentes en los laboratorios universitarios no disponen, en muchos casos, de los suficientes medios (aparte de los de cultivo), ya se trate de medios técnicos, recursos materiales, o del tiempo imprescindible para desarrollarlas con eficacia. Es la continua queja, y con razón, de enseñantes y enseñados. Pero todo ello no tiene que ser impedimento para que el estudiante logre un buen entrenamiento en el trabajo microbiológico básico, porque éste se apoya en requerimientos sencillos. Lo que sí resulta imprescindible es disponer de tiempo y elementos tales como guías o manuales que expliquen los fundamentos y los procedimientos con detalle y claridad. A conseguirlo contribuye el *Manual práctico de microbiología*, que ha preparado un grupo de 16 autores del Departamento de Microbiología de la Universidad de Navarra, con un claro objetivo: conseguir una obra en español susceptible de ser utilizada en los centros universitarios y en otros laboratorios de técnicas y análisis microbiológicos.

Será útil, sin duda, en la realización de las prácticas de microbiología en los estudios

(licenciaturas, diplomaturas y cursos prácticos) de medicina, biología, farmacia, veterinaria, enfermería, etc. El manual presenta una exposición metodológica detallada, con gráficos que facilitan el aprendizaje de las técnicas de laboratorio, así como apéndices y tablas de identificación microbiana. En total, se describen 40 métodos en los siguientes 10 módulos interactivos, que abarcan el estudio de bacterias, hongos y virus:

–*Cultivo de bacterias, Observación de los microorganismos, Técnicas de recuento de bacterias, Pruebas bioquímicas para identificación bacteriana, Micología*. Dirigido a quienes acceden a la práctica microbiológica y donde se presentan los fundamentos de la manipulación de bacterias y hongos.

–*Virología y Genética bacteriana*. Unos experimentos sencillos acercan al alumno a la manipulación del material genético y a los métodos aplicables en un pequeño laboratorio para la observación y recuento de fagos.

–*Microbiología clínica*. Con los métodos de muestreo, siembra, identificación y estudio de la sensibilidad a antibióticos de las bacterias patógenas presentes en las muestras.

–*Microbiología ambiental y de los alimentos*. Expone los métodos más comunes de muestreo y las técnicas especiales de recuento e identificación de bacterias y hongos en aguas y alimentos, todo ello de gran utilidad por la actualidad del tema.

–*Técnicas serológicas*. Incluye las más significativas y que, a la vez, se pueden realizar sin grandes medios, así como las técnicas de inmunización de animales y obtención de los antisueros.

Se completa el manual con cuatro apéndices que, junto a la información práctica que caracteriza todo el libro, ofrece los fundamentos teóricos de los temas tratados.

Isabel Esteve
Universidad Autónoma de Barcelona

Power Unseen How Microbes Rule the World

B. Dixon

W.H. Freeman & Company Limited. New York, 1994. 237 pp. Con ilustraciones en blanco y negro. ISBN 0-7167-4504-6.

A lo largo de la historia de la humanidad, los microbios han estado siempre presentes, acompañando a los humanos prácticamente de forma inseparable. Pero esta vecindad no ha sido ni bien compartida ni mucho menos comprendida y, de las múltiples posibilidades de acción de los microbios, la capacidad maléfica ha sido la que los humanos han conocido y destacado más frecuentemente.

La irrupción en la historia de personajes como Pasteur, Koch, Metchnikoff o Beijerinck, entre otros, contribuyó enormemente a cambiar esta concepción al incidir, junto a la capacidad destructiva de los microbios, en los grandes beneficios que, desde el principio, habían estado prestando a sus vecinos humanos. El libro de Dixon refleja las actitudes y el cambio de actitud en relación a las bacterias «malas» y «buenas».

Sutilmente Dixon va destruyendo la percepción de los microbios como patógenos, para destacar el papel de las bacterias en la historia de la civilización. Baste como ejemplo el petróleo, cuya utilización en tan extensa gama de actividades económicas e industriales, pone de manifiesto la dependencia de la industria moderna y de las naciones de unos recursos que no pueden producir, y cuyo origen está precisamente en los microbios, en las cianobacterias. Éstas, consideradas plantas durante un tiempo, recibieron el nombre de cianofitas o algas azules, hasta ocupar su lugar actual como auténticas bacterias. Se ha especulado que el petróleo crudo pueda provenir de lípidos producidos por estas antiguas bacterias fotosintéticas.

Aunque Dixon confunde las distintas formas de vida microbiana (ciano- y otras bacterias, algas, hongos) y los virus, de manera que todos aparecen agrupados, sus apartados monográficos sobre la vida microbiana son únicos, convincentes y de deliciosa lectura. La exquisita diversión que procuran al lector las anécdotas y explicaciones del texto, le predisponen a disculpar al autor cuando, en algunos casos, confunde las cianobacterias procarióticas con el alga verde *Botryococcus*, que es eucariota nucleada, igual que nosotros. Como perdonable es también su confusión a la hora de escribir correctamente, con subrayado o versalitas, los nombres de géneros y especies.

Entra en escena —no podía faltar un episodio tan trágico como éste en la historia de la humanidad— la peste bubónica, llamada también la Muerte Negra. Devastadora enfermedad que, causada por *Yersinia pestis*, trajo a Europa un terror rayano en la paranoia, que exacerbó el fanatismo político y religioso. Es cierto que la mitad de sus víctimas morían en la primera semana de haber contraído la enfermedad. Y, no disponiendo de un agresor visible, se la consideró una venganza divina por las culpas humanas y terrenales, algo propio de la época. *Y. pestis* redujo a una velocidad atroz la población de aquellos estados europeos, lo cual a su vez disminuyó la lucha y la competencia para la obtención de comida, albergue y trabajo, permitiendo a los supervivientes heredar las riquezas de los que habían muerto. Y ocurrió que junto a una inesperada y repentina prosperidad surgió un florecimiento intelectual que fue la base del Renacimiento. Cuatro años después del gran brote epidémico, *Y. pestis*, huésped de roedores pero transmitida a los humanos por picaduras de pulgas, había matado cerca de 25 millones de personas, de una población de 75 millones. Es muy difícil estimar objetivamente, y encargarlo en su tiempo, el impacto social y cultural de un desastre semejante. Podría, quizás pensarse, por

citar un ejemplo, en los efectos del sida en nuestra sociedad, si esta enfermedad atacara a una de cada tres personas.

En este libro, Dixon evoca la atmósfera de sorpresa, misterio y aventura con que se topan los científicos que, ayudándose de la inteligencia, hurgan en los secretos de acontecimientos de tiempos pasados, remotos unos, algo más cercanos otros, ya que la dimensión del tiempo, en medición humana, es algo muy relativo.

El libro está dividido en cinco secciones, en las que los microbios son *creadores, impostores, destructores, defensores y artesanos*. Aunque Dixon puede ser criticado por infravalorar la evolución microbiana y las herramientas moleculares, no se le puede, en cambio, reprochar que haya ignorado los atributos de los propios microbios. El apartado de *Lactobacillus* muestra que las bacterias del yogur reducen el peligro de disentería al destruir las *Shigella sonnei* en el intestino. Sucesivamente, se pone de manifiesto también que *Rhodococcus chlorophenolicus* rompe fenoles policlorinados; que *Alcaligenes eutrophus* fabrica Biopol, un plástico biodegradable; que los virus de bacteriófagos pueden resultar un buen complemento de los antibióticos tradicionales; que *Crinalium epipsammum* ayuda a endurecer la arena de las dunas, protegiendo así a los Países Bajos de los efectos de la erosión. Y hay otros microbios a los que se puede considerar una alternativa prometedora en la conservación de los alimentos, y aun otros muy eficaces en el control ambiental,

porque con su actividad contribuyen a eliminar el calentamiento atmosférico y proteger la capa de ozono.

Si algo hay que objetar a la obra que nos ocupa es el corto alcance de la visión del mundo microbiano, ya que se le considera sólo en relación al presente. Pero las bacterias empezaron a colonizar la Tierra poco después de que cesaran los choques de meteoritos que convulsionaban la corteza terrestre. Ellas han sido testigo del nacimiento y desarrollo de todas las otras formas de vida. Sus 3500 millones de años de experiencia en la Tierra, donde han permanecido y sobrevivido, no son solo un recurso para las posibilidades de la ingeniería biotecnológica sino también una historia de ética, repleta de lecciones de vida, que merecerán la atención de las generaciones futuras. Pero esto ya es opinar sobre el libro que Dixon no ha escrito y que sería: *Power Unseen. How Microbes Ruled the World*. Esta “d” es la que marca la diferencia. El libro de Dixon, subtulado *How Microbes Rule the World*, cumple los objetivos que se propuso su autor: despierta y mantiene el interés y derrocha perspicacia. Su brevedad no permite la inclusión de un enfoque histórico evolutivo con datos y explicaciones. Dixon ha de ser felicitado sinceramente por poner la vida detrás de la microbiología, al menos la microbiología de estilo bacteriano.

*Lynn Margulis
Distinguished Professor
University of Massachusetts, Amherst*

Catálogo de publicaciones del Profesor Gregorio Marañoñ

Equipo catalogador: E. Cabrero, M. A. Hermida, C. López Hermida, M. J. Vilela. *Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) y Consejería de Salud de la Comunidad de Madrid, 1994. 107 pp. ISBN 84-4510754-2*

En este Catálogo, que comprende las publicaciones del Profesor Gregorio Marañoñ Posadillo existentes en los fondos de la Biblioteca del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, se recoge la relación bibliográfica de escritos de carácter profesional del ilustre médico endocrinólogo y ensayista que desarrolló, además de una fecunda labor docente, una intensa actividad en los campos clínico, científico, literario y humanístico durante más de cincuenta años.

El Instituto Gregorio Marañoñ existió bajo ese nombre en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas desde 1960 hasta 1983, fecha en la que quedó integrado, junto con otros, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Los trabajos y manuscritos de Marañoñ, encuadrados en 33 tomos por su autor, formaron parte del legado hecho por sus herederos a la Biblioteca del Instituto que llevó su nombre, y cuyos fondos pasaron a la actual Biblioteca del CIB.

La preocupación personal de la bibliotecaria María Antonia Hermida González sobre este legado, ha permitido su conservación a través de los años y mantener su integridad a pesar de las sucesivas mudanzas. Este Catálogo es fruto de la iniciativa y trabajo de todo el equipo bibliotecario, actualmente constituido por la mencionada y por E. Cabrero Alonso-Majagranzas, C. López Hermida y M. J. Vilela Manrique. El resultado ha

sido un magnífico opúsculo de 107 páginas, de fácil consulta y presentación austera y elegante a la vez.

La idea de hacer esta obra surgió como una tarea interna de ordenación de los fondos existentes. Pero, ante su posible interés general, el equipo catalogador buscó financiación y la Comunidad de Madrid, a través de su Consejería de Salud, acogió con entusiasmo la iniciativa de su edición. El Catálogo recoge la relación bibliográfica de los 623 escritos que se encuentran en el CIB, agrupados alfabéticamente en el marco de la cronología de sus fechas de publicación (desde 1909 hasta 1960), y sus descripciones se han adecuado en lo posible a las Reglas de Catalogación (1. Monografías y Publicaciones Seriadas,) de la Biblioteca Nacional. El libro fue presentado el día 2 de noviembre de 1994 en la Residencia de Estudiantes, en un acto organizado por la Consejería de Salud de la Comunidad de Madrid y el CSIC. En ese acto intervinieron Pedro Sabando Suárez, Consejero de Salud, Emilio Octavio de Toledo y Ubieto, Secretario de Estado de Universidades e Investigación, y Guillermo Giménez Gallego, Director del CIB.

Los estudiosos y admiradores de la obra de Marañoñ disponen ahora de un instrumento que sin duda facilitará su labor y que, además, ya ha sido distribuido por numerosas bibliotecas y centros. Así mismo, y mientras existan ejemplares, la Biblioteca del CIB podrá facilitarlos a quienes lo soliciten. La dirección es:

Centro de Investigaciones Biológicas
(Biblioteca). C/ Velázquez, 144. 28006 Madrid.
Tel.: 91-5611800. Fax.: 91-5627518

Sara I. Pérez Prieto

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC,
Madrid

LIBROS REVISADOS
VOLUMEN 10

Biology of Microorganisms, 7th ed.
 T. D. Brock, M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker
Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1994. 909 pp. ISBN 0-13-042169-3.

Catálogo de publicaciones del Profesor Gregorio Maraño

Equipo catalogador: E. Cabrero, M. A. Hermida, C. López Hermida, M. J. Vilela
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) y Consejería de Salud de la Comunidad de Madrid, 1994. 107 pp. ISBN 84-4510754-2.

Descifrar la vida

Ensayos de historia de la biología
 J. Casadesús, F. Ruiz Berraquero (ed.)
Publicaciones de la Universidad de Sevilla, 1994. 400 pp. ISBN 84-7405-990-9.

Introduction to Diagnostic Microbiology

E. W. Koneman, S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, W.C. Winn Jr.
J. B. Lippincot Co., Philadelphia, 1994. 527 pp. ISBN 0-397-51215-5.

Introduction to Microbiology

J. L. Ingraham, C. A. Ingraham
Wadsworth Publishing Co., Belmont, California, 1995. 800 pp. ISBN 0-534-16728-4.

Manual práctico de microbiología

R. Díaz, C. Gamaza, I. López-Goñi (directores)
Masón, S. A., Barcelona, 1995. 200 pp. ISBN 84-458-0281-X.

Medical Microbiology

C. Mims, J. Playfair, I. Roitt, D. Wakelin, R. Williams
Mosby Year Book Europe Ltd., London, 1993. 600 pp. ISBN 0-397-44631-4.

Micología médica

J. M. Torres-Rodríguez, A. del Palacio Hernanz, J. Guarro-Artigas, R. Negroni-Briz, M. Pereiro-Miguens
Masón, S. A., Barcelona, 1993. 378 pp. ISBN 84-311-0632-8.

Microbiología

Mecanismo de las enfermedades infecciosas. Enfoque mediante resolución de problemas
 M. Schaechter, G. Medoff, B. Eisenstein, H. Guerra
Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1994. 2ª ed., 960 pp. ISBN 84-7903-126-3.

Métodos microbiológicos rápidos para análisis de aguas y alimentos

J. J. Borrego (ed.)
Secretariado de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Málaga, 1992. 386 pp. ISBN 84-7496-224-2.

Microbiología médica

Cuaderno de prácticas y demostraciones
 Dirigido por G. Prats
Ediciones Doyma S. A., Barcelona, 1993. 114 pp. ISBN 84-7592-524-3.

Power Unseen

How Microbes Rule the World
 B. Dixon
W. H. Freeman & Co. Ltd., New York, 1994. 237 pp. ISBN 0-7167-4504-6.

Trends in Microbial Ecology

Proceedings of the 6th International Symposium on Microbial Ecology
 Dirigido por R. Guerrero, C. Pedrós-Alió
Spanish Society for Microbiology, Barcelona, 1993. xxii + 718 pp. ISBN 84-604-7996-X.

Normas para los autores

Microbiología SEM (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 SEM* 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., Nisseez-Meyer, J., Strike, P. (1976). *denV* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosilate 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 del 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.

ARTICULOS 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 estar de vuelta en la redacción en el plazo de una semana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, éstas serán publicadas tal como han sido enviadas a los autores. Las correcciones se limitarán a errores tipográficos, gramaticales o de datos incorrectos. Modificaciones más importantes que impliquen recomposición del texto, deberán ser abonadas por los autores. Se enviarán 25 separatas gratuitas por artículo; si se desean 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 en papel, más una copia en disco de ordenador, se enviará a la siguiente dirección: *Microbiología SEM*. Apartado 16009, 08080 Barcelona, o al miembro del Consejo Editorial de la revista que esté más relacionado con el contenido del artículo.

Guidelines for authors

Microbiología SEM (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 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 "key words" 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., Nissez-Meyer, J., Strike, P. (1976). *denV* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosilate 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 published as they have been sent. 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 in paper, plus a diskette, to the following address: *Microbiología SEM*. Apartado 16009, 08080 Barcelona, Spain, or to one of the members of the Editorial Board

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

Juan J. Borrego
Departamento de Microbiología
Universidad de Málaga
Campus Universitario Teatinos
29071 Málaga

Enrico Cabib
National Institutes of Health
Bldg. 10 Room 9H-11
Bethesda, MD 20892, USA

Victoriano Campos
Fac. de Ciencias Básicas y Matemáticas
Universidad Católica de Valparaíso
Av. Brasil, 2950
Valparaíso, Chile

Josep Casadesús
Departamento de Genética
Facultad de Biología
Universidad de Sevilla
41012 Sevilla

Esteban Domingo
Centro de Biología Molecular
CSIC-UAM
28049 Cantoblanco (Madrid)

Mariano Esteban
Centro Nacional de Biotecnología
CSIC
28049 Cantoblanco (Madrid)

Isabel Esteve
Microbiología
Instituto de Biología Fundamental
Universidad Autónoma de Barcelona
08193 Bellaterra (Barcelona)

Margarita Flores
Departamento de Microbiología III
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid

M. Luisa García López
Dpto. Higiene y Tecn. Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad de León
24071 León

Juan Iribarri
Departamento de Microbiología
Universidad del País Vasco
Apartado 644
48080 Bilbao

Germán Larriba
Departamento de Microbiología
Universidad de Extremadura
06071 Badajoz

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

Rubens López García
Centro de Investigaciones Biológicas CSIC
Velázquez, 144
28006 Madrid

Manuel Benjamín Manzanal
Dpto. Interfac. de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Oviedo
33071 Oviedo

David A. Mossel
Eijkman Found. for Medical Research
P.O. Box 6025
3503 PA Utrecht
The Netherlands

Juan A. Ordóñez
Dpto. Higiene y Microbiol. Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid

José Claudio Pérez Díaz
Servicio de Microbiología
Hospital Ramón y Cajal
28035 Madrid

Manuel de la Rosa
Servicio de Microbiología
Hospital Virgen de las Nieves
Av. Coronel Muñoz, 2
18014 Granada

Harold W. Rossmoore
Department of Biological Sciences
Wayne State University
Detroit, MI 48202, USA

Moselio Schaechter
Dpt. Molec. Biology and Microbiology
136 Harrison Ave.
Tufts University
Boston, MA 02111, USA

Josep M. Torres-Rodríguez
Unidad de Microbiología
Inst. Municipal de Investigación Médica
UDIMAS, Univ. Autónoma de Barcelona
Pg. Marítim, 25-29
08003 Barcelona

Hans G. Trüper
Institute of Microbiology
University of Bonn
Meckenheimer Allee, 168
D-5300 Bonn 1, FRG

Antonio Ventosa
Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla
41012 Sevilla

Miquel Viñas
Dpto. Microbiol. y Parasitol. Sanitarias
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona
08028 Barcelona

**AUTHOR INDEX
VOLUME 10**

- Abalde, J., 263
Abd-Alla, M. H., 273
Agut, M., 279
Aldea, M., 27
Alonso, M. C., 285
Alonso, M. P., 249
Amils, R., 121
Arias, J. M., 395
Ascaso, C., 103
Barbé, J., 57
Barja, J. L., 69
Bayó, M., 279
Beuzón, C. R., 357
Blanco, J., 249
Blanco, J. E., 249
Blanco, M., 249
Borrego, J. J., 169, 285
Bridson, E. Y., 187
Calvo, M. A., 279
Cano, D. A., 357
Cantudo, P., 181
Carazo, C., 181
Cardoza, R. E., 49
Casadesús, J., 343
Casas, Carmen, 257
Casas, Cèlia, 27
Castillo Agudo, L. del, 385
Cebolla, A., 371
Chica, C., 439
Cid, A., 263
Conchas, R. F., 69
Coque, J. J. R., 49
Coto, O., 297
Cutrín, J. M., 69
Davies, J., 9
Díez, M. T., 423
Doléans, F., 195
Espinet, C., 27
Esteve, I., 448
Fernández, A. I., 297
Fernández-Galiano, D., 331
Finlay, B. B., 229
Flores, A., 357
Gallego, C., 27
Gálvez, A., 395
García, E., 13, 19
García, J. L., 13
García, M. L., 257
García, P., 13, 19
García-Calzada, J., 49
García-del Portillo, F., 229
Genilloud, O., 413
Gibert, I., 57
Gimeno, B. S., 145
Gómez-Alarcón, G., 111
Gómez-Lus, R., 7, 83
González, I., 413
Goodwin, S., 131
Gozalbo, D., 239, 385
Guardans, R., 145
Guerrero, R., 131, 441
Hernández, C., 37
Herrero, C., 263
Herrero, E., 27
Laborda, F., 159
Lafarga, M. A., 83

- Lafuente, R., 131
Larraz, V., 83
León, T., 297
Liras, P., 49
López, A. I., 121
López, R., 13, 19, 429
Lorenzo, P., 305
Margulis, L., 449
Marín, I., 121
Marín, M. L., 257.
Marín, M. M., 159
Martín Casabona, N., 317, 445
Martínez, J. P., 239
Mas-Castellà, J., 131
Méndez, B. S., 316, 318
Méndez, C., 37
Mochales, S., 329
Mónaco, C., 423
Montero, F., 93
Montoya, E., 395
Montoya, M. D., 395
Moriñigo, M. A., 285
Mouslim, C., 357
Naumov, G. I., 403
Naumova, E. S., 403
Navarro, M., 83
Olano, C., 37
Oren, A., 217
Ortiz, M. L., 159
Orts, A., 181
Palomares, A. J., 371
Pareja, L., 181
Peláez, F., 413
Perelló, A., 423
Perera, J., 305
Pérez, M., 181
Pérez Llarena, F. J., 49
Pérez Prieto, S., 451
Pin, C., 257
Pintado, J. L., 93
Piqueras, J., 319
Piqueras, M., 443
Quirós, L. M., 37
Reguant, S., 435
Reiriz, S., 263
Rodríguez, A. M., 37
Rodríguez, D., 297
Rollán, M. C., 423
Romero, J., 446
Ronda, C., 13
Rosa, M. de la, 181
Salas, J. A., 37
Sánchez, J. M., 285
Sancho, E. D., 403
Selgas, M. D., 257
Silóniz, M. I. de, 305
Soria, G., 57
Soyer-Gobillard, M.-O., 433
Toranzo, A. E., 69
Tormo, J., 257
Torre, M. A. de la, 111
Torreblanca, J., 357
Torres, E., 263
Trüper, H. G., 315
Urmeneta, J., 131
Uruburu, F., 205, 311
Velasco, A., 305
Vilches, C., 37
Wierzchos, J., 103

KEY WORD INDEX

VOLUME 10

A

acidophiles, 121, 305
Acinetobacter calcoaceticus, 159
actinomycetes, 49, 413
active substances, 331
Aeromonas spp., 257
antagonistic behaviour, 423
antibiotic, 9, 395
 biosynthesis, 49
 resistance, 19, 37
 screening, 331
antimicrobial agents, 9
Aspergillus niger, 279
Aspicilia intermutans, 103
autolysins, 13
autolysis, 395
Azotobacter chroococcum, 273

B

bacteremia, 249
bacteria
 intracellular, 229
 sulfate-reducing, 131
bacterial counting, 169
biocontrol, 423
biocorrosion, 121
biodegradation, 273
 plastic, 131
 fuel oil, 159
biodeterioration, 111
biofouling, 93
bioleaching, 297
bioremediation, 159

C

calorific transfer, 93
Candida, 195
 albicans, 239
catabolite repression, 385

cefoxitin, 331

cell
 cycle, 27
 epithelial, 229
 invasion, 229
 wall, 239
cephamycin C, 49
cloning, 19
coliphages
 somatic, 285
copper, 263
corallolysin, 395
critical load, 145
chaotic systems, 187
chemolithotrophy, 121
chitin, 239
 synthetases, 239
chitosomes, 239

D

depolymerase activity, 131
DNA
 packaging, 357
 protein interactions, 357
drug design, 9

E

ecosystem, 145
efflux mechanism, 37
electrons
 back-scattered, 103
electrophoretic karyotyping, 403
electroporation, 69
Enterobacteriaceae, 195
enumeration
 and identification, 195
 method, 285
environmental sources, 83
enzyme diversity, 217

epidemiology, 83

Escherichia coli, 249

evolution

modular, 13

F

fingerprinting, 57

flow cytometry, 263

food, 257

borne pathogens, 257

fosfomycin, 331

fungi, 111, 413

G

gene(s)

clusters, 49

expression, 385

capsular, 19

nif/fix, 371

SUC, 385

genetic mapping, 357

glycosilation, 37

H

Haloarcula, 217

Halobacterium, 217

Haloferax, 217

halophilic archaea, 217

histology, 343

horticulture, 423

human sources, 83

I

immunodiffusion, 297

invertase, 385

IS200-typing, 57

L

β-lactams, 49

Lecidea auriculata, 103

M

macrolides, 37

marine microalgae, 263

media

chromogenic, 195

culture, 181, 187

recovery, 169

membrane

filtration, 285

plasma, 239

microbial

degradation, 131

diseases, 9

growth, 187

interactions, 187

variation, 187

micrography, 343

microscope(s)

optical and electronic, 343

microscopy

Spanish, 343

scanning electron, 103

immunolectron, 297

myxobacteria, 395

Myxococcus coralloides D, 395

N

nitrogenase activity, 273

nitrogen fixation

symbiotic, 371

O

otitis, 279

otomycosis, 279

ozone, 145

P

pathogenic

bacteria, 169

fungi, 423

pathogenicity, 249

petroleum microbiology, 159

Phaeodactylum tricornutum, 263

phages, 13

phenolic compounds, 273

pigment, 181

plasmid curing, 357

plate isolation, 195

pneumococcus, 13

pollutants

atmospheric, 145

poly-β-hydroxyalkanoates, 131

Proteus mirabilis, 279

Pseudomonas aeruginosa, 279

R

Ramón y Cajal, 343
Rcs1, 27
 resistance
 multidrug, 9
Rhizobium meliloti, 371
 rock-decay, 111

S

Saccharomyces
 sensu stricto complex, 403
 kluyveri, 403
Salmonella, 229
 thyphimurium, 57
 science
 history of, 343
 seaweeds, 413
Staphylococcus aureus, 169
 START, 27
 stone alteration mechanisms, 111
 storage
 long-term, 305
 streptocci
 group B, 181
Streptococcus
 agalactiae, 181
 pneumoniae, 19

Streptomyces, 37, 413
Sulfolobus, 305

T

taxonomy, 403
Thiobacillus, 121
 ferrooxidans, 297, 305
 titanium, 93
 toxicity, 263
 toxins, 249
 transformation, 69
Trichoderma sp., 423

V

vacuole, 229
 virulence, 19, 249
 genes, 357
 virus-ozone interactions, 145

W

water
 drinking, 285
 samples, 169

Y

yeast, 27, 385
Yersinia, 83
 ruckeri, 69

SCIENCE, CULTURE & COMMUNICATION FOR THE 21st CENTURY

IFSE-8

**Eighth International Conference of the
International Federation of Science Editors**

9 – 13 July 1995, Barcelona, Spain

Organized by:

- International Federation of Science Editors
- Catalan Research Foundation

Venue:

- School of Biology
- University of Barcelona

International Federation of Science Editors

The International Federation of Science Editors (IFSE) will hold its biennial conference and assembly in Barcelona on 9–13 July 1995. The meeting will cover every aspect of science communication: between scientists (science authors, science editors) and to the public (science writers, journalists).

IFSE (formerly IFSEA) was founded at the United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization (UNESCO) in 1978 and is a scientific associate of the International Council of Scientific Unions (ICSU). Among IFSE's aims are the following:

- To improve scientific communication throughout the world and the quality of science editing
- To serve as an international reference point for science editors and their regional associations
- To help form regional associations of science editors and to integrate them into this worldwide network, with particular assistance to organizing groups in developing regions
- To coordinate science publications worldwide and to foster their distribution
- To aid in building curricula for professional excellence in science editing, and to serve as a source of expertise and advice
- To sharpen awareness of the editor's role. IFSE has established the School for the Communication of Science at the Consorzio Mario Negri Sud in Chieti, Italy, where international courses are taught by expert science editors and communicators.



PRE-REGISTRATION FORM

To be returned no later than November 30, 1994

Family name:

I intend to submit:

First name:

() an oral presentation () a poster

Institution:

Tentative title:

Address:

.....

.....

.....

.....

Phone: Fax:

Abstract forms will be sent with the second announcement

E-mail:

Photocopy and send to: IFSE-8 Secretariat. Apartado 16009. E-08080 Barcelona. Spain