VOLUMEN 9 JULIO-SEPTIEMBRE 1956 NUM. 3

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Gonadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 peretas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativo al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE D ESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 144 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

A. LOBO. - Libertad, 33 - Teléf. 21 31 61 - MADRID

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Arnaldo Socias Amorós, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Presidente de la Sociedad de Microbiólogos españoles.

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

SUMARIO

Páginas

Bacterias que atacan la pectina en las plantas jóvenes de *Lycopersicum esculentum* Mill, por *Camilo Torras Casals* 239

Estudio de una variante no proteolítica de *Inflabilis mangenoti*, por *C. González* 269

Nueva especie de levadura, aislada de cencentrado de tanino, *Candida majoricensis* nov. sp., por *Rafael Genestar Serra* 275

Fijación del nitrógeno atmosférico por microorganismos distintos de los *Azotobacter, Rhizobium* y *Clostridium*, por *J. Morales* 281

Nueva técnica para la identificación del *Pseudomonas savastanoi*, por *R. Beltrá* 293

Estudio bacteriológico del proceso de curtición de pieles mediante taninos, por *J. Morales* 315

Estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de una especie nueva de *Clostridium: Cl. albuminolyticum* nov. sp., por *C. González* 327

Contribución al estudio de la acción de la luz ultravioleta sobre los neumococos, por *A. Guerra Sabater* 333

GRANJA ESCUELA DE AGRICULTURA DE CALDAS DE MONTBUY
(BARCELONA)

BACTERIAS QUE ATACAN LA PECTINA EN LAS PLANTAS JOVENES DE *LYCOPERSICUM ESCULENTUM* MILL

POR

CAMILO TORRAS CASALS

En el verano de 1950, después de un mes de julio sin ninguna precipitación y grandes temperaturas, aparecieron en nuestras huertas sobre las nuevas plantaciones de tomate, de la variedad *pometa tardía,* una enfermedad que amenazaba acabar con toda la plantación de unas parcelas, que son las que nos proporcionaron todo nuestro material. En la región del cuello de la planta presentaba una mancha negruzca, blanda, que motivaba un casi fulminante marchitamiento total de la planta. Antes de la citada hortaliza, había existido en la misma parcela una plantación de zanahorias y un vivero de hortalizas, de la familia de las Crucíferas.

Por medio de tubos grandes, esterilizados, trasladamos varias plantas en distintos grados de ataque a nuestro laboratorio, separando de las indicadas lesiones unas bacterias que luego se describirán con detalle y son el objeto de esta contribución. Según nuestros resultados, creemos que se trata de la *Erwinia carotovorus* W.

ANTECEDENTES Y LITERATURA

Nuestro microorganismo es conocido ya desde hace bastantes años.

E. F. Smith (23) la llamaba *Bacillus carotovorus,* que se distingue por la producción de pectinasa, que hidroliza la protopectina, que forma parte de la laminilla media de las células vegetales. En este caso, de la raíz de la zanahoria *(Daucus Carotta* L.); de ahí su nombre de *carotovorus,* que significa devoradora de zanahorias.

Según Bergey et al. (4) existen varias especies que actualmente son vistas como sinónimos de la *Erwinia carotovora* W.; así tenemos el *Bacillus apiovorus Wor* (3), Wald (28); *Bacillus omnivorus,* van Hall (13); *Bacillus of coconut,* Johnson (15); *Erwinia Cypripedii,* Bergey (2); *Erwinia dahlia* (Hori y Bo-Kura), Magrou (18); *Erwinia Hyacinthi* (Heinz), Magrou (19); *Erwinia olorácea* (Harrison), Bergey et al. (op. cit.); *Pseudomonas destructans* (Potter), Bergey et al. (op. cit.); *Pseudomonas dissolvens,* Rosen (22).

La circunstancia de que nuestro microorganismo fermenta la lactosa igual que las bacterias coliformes, tan importante en Higiene médica, ha motivado una serie de estudios de las reacciones químicas de los cultivos, que lo relacionan con los de los géneros *Escherichia* y *Aerobácter,* Bergey et al. (4); en la clasificación sitúan el género *Erwinia* entre la familia de las Enterobacteriáceas. Se ha reconocido también la posibilidad (4) de que las *Erwinia* tengan los cultivos iguales a los del grupo coliforme. Stanley (24) llama a estos microorganismos «causantes de la pudrición blanda», y dice se encuentran dentro del colon de los enfermos de disentería tífica, señalando también que microbios muy parecidos a los del género *Erwinia* están estrechamente relacionados con la *Escherichia coli.* Según Parr (21), la clasificación del género *Erwinia* ha sido establecida sobre una base puramente utilitaria y no de conocimiento genético.

Dawson (7), siguiendo la práctica general británica, abogaba por la inclusión de los microorganismos de la pudrición blanda en el género *Bacterium.* Desgraciadamente las características bioquímicas de estos microorganismos son parecidas a las del grupo coliforme (Stanley, ob. cit.) (Elrod (9)).

El primero sostiene que este parecido se adquiere por mutación de unos y otros microorganismos motivados por cambios de ambiente, como de medio aerobio a anaerobio.

Es el mismo Elrod (10) quien hace un estudio comparativo detallado entre diversos representantes del género *Erwinia,* con cincuenta representativos de los coliformes. La técnica por él seguida fué comparar el comportamiento de estos cultivos frente a la lactosa, producción de indol, rojo de metilo, acetil-metil-carbinol (Voges-Proskauer), citrato (Kosser) y celobiosa; encontrando que todos producían ácido y gas, con la lactosa, ninguno daba indol, mientras que en los restantes ensayos aparecían las reacciones con cierta inconstancia, afirmando Stanley (ob. cit.)

que estos cultivos son extremadamente variables en sus reacciones bioquímicas, especialmente si se realizan a distintas edades de un mismo cultivo.

También realizó experimentos de licuefacción de la gelatina, así como hidrolización de la pectina *in vitro,* acompañando estas experiencias con pruebas de pudrición de zanahorias y remolachas. El resultado que obtuvo y que llama mucho la atención fué que de las 50 especies representativas del grupo coliforme, 22 hidrolizaban la pectina *in vitro,* mientras que ni una reblandecía las zanahorias ni las remolachas.

Bonde (5) fué capaz de demostrar producción de pequeñas cantidades de indol en varias especies causantes de pudrición blanda.

El mismo Elrod (11) ha hecho un estudio de la reacción de Eijkman y la reducción de óxido de trimetilamina en varias especies del género *Erwinia,* recogiendo de otros autores que entre las mencionadas pruebas existe cierta correlación. En su trabajo da una tabla, en la que aparece *Erwinia carotovora* como Eijkman-negativa.

Erwin F. Smith (23) cita al *Bacillum carotovorus,* Jones y *B. aroideae,* Towsend, como dos ejemplos clásicos de bacterias que entran por heridas en el interior de los tejidos vegetales; en otras palabras, que si no hay herida no hay invasión. Señala que la rapidez de ataque y destrucción del tejido están en razón directa con el grado de jugosidad del vegetal atacado. También estudia el tiempo transcurrido entre inoculación y enfermedad, que es asimismo variable según la naturaleza del vegetal.

En el mismo trabajo de Smith se dedica un largo capítulo a las enzimas disolventes de la lámina media (8), detallando interesantes experimentos sobre el poder disolvente del microorganismo.

L. R. Jones (16 y 17) presentan interesantísimos estudios sobre las enzimas y sus efectos, precipitándolas de los cultivos por medio de alcohol. Dice que la precipitación es completa cuando se llega a los 80 grados alcohólicos, y también se ocupa de la influencia del medio de cultivo utilizado, así como la edad del cultivo y la disminución de fuerza de la pectinasa separada, ocasionada por antigüedad del cultivo, calor, filtros porosos germicidas y su difusión a través del agar.

Los trabajos más modernos que he podido consultar dan contadas ideas nuevas sobre este particular.

ESTUDIOS DEL MEDIO NATURAL EN QUE SE DESARROLLA NUESTRO MICROORGANISMO

Se ha procedido a un conocimiento completo de las circunstancias tanto climatológicas como particulares del terreno en los momentos de mayor gravedad del ataque bacteriano en unas de las parcelas estudiadas.

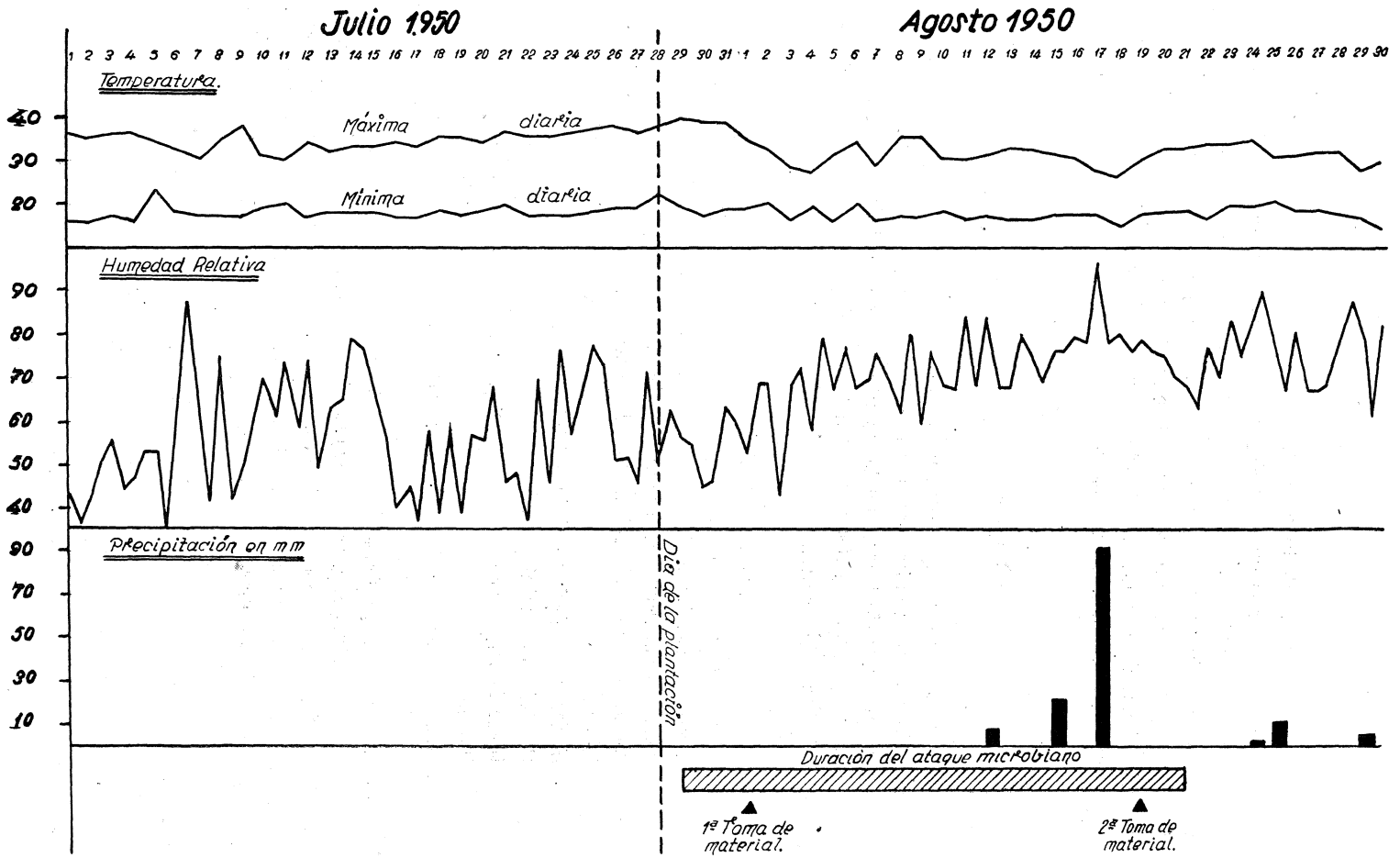
Los siguientes estado y gráfica darán idea de las circunstancias climáticas hace poco aludidas. La proximidad del observatorio meteorológico a los campos de donde procede nuestro material, es suficiente para que estos datos sean bastante representativos.

En la gráfica puede verse en primer lugar la máxima y mínima diarias durante los meses de julio y agosto, también la humedad relativa deducidas de dos observaciones diarias y la precipitación que durante el mes de julio es nula; y luego se señala la época de ataque de la *Erwinia* con dos indicaciones del día en que se tomaron las muestras de plantas enfermas, de las cuales se aislaron nuestros cultivos. Examinando detalladamente la gráfica, veremos cierta regularidad en la curva de temperaturas mínimas diarias, mientras que en la curva de temperaturas máximas se observa menos regularidad. El punto más alto se observa precisamente el día siguiente de efectuada la plantación, que fué realizada con plantas sanas y bien desarrolladas, expresamente seleccionadas de una parcela vivero situada en la misma finca. A partir del día 31 de julio se señala una marcada suavización de dichas temperaturas máximas.

En la gráfica de la humedad relativa vemos que presenta gran irregularidad durante todo el mes de julio, empezando a regularizarse a partir del 3 de agosto, aumentando los mínimos y muy gradualmente los máximos.

En cuanto a la precipitación, tuvo lugar una de 8,8 milímetros el día 12 de agosto, otra de 26,3 el día 15, culminando con un fuerte chubasco el día 17 del mismo mes, que alcanzó los 92,3 milímetros. A partir del día 21 desaparecieron los síntomas de la enfermedad de la parcela y las plantas supervivientes adquirieron rápidamente gran lozanía.

A mi entender, las plantas fueron atacadas fuertemente por el microorganismo, debido a las condiciones adversas climáticas que tuvieron que atravesar, debidas al fuerte estiaje, al que puso fin la fuerte precipitación del día 17 de agosto.


Julio 1950
Agosto 1950
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Temperatura.
Máxima diaria
Mínima diaria
40
30
20
Humedad Relativa
90
80
70
60
50
40
Precipitación en mm
90
70
50
30
10
Día de la plantación
Duración del ataque microbiano
1ª Toma de material.
2ª Toma de material.

los efectos destructores; pero no fué así: no había diferencia entre las inoculaciones con E. S. y con los dos juntos.

También inoculé otras raíces con suspensiones bacterianas en agua estéril, procedente de tubos de agar corriente y en un principio el reblandecimiento era más lento.

Lo que pudo muy bien observarse fué que la rapidez del reblandecimiento estaba en razón directa con la jugosidad del tejido infectado; así, se infectaba mucho más fácilmente una zanahoria fresca, recién arrancada, que una conservada varios días en el laboratorio. Lo que se licuó con sorprendente rapidez fué la pulpa de un fruto maduro de *Cucurbita máxima* (fig. 1), quedando, como puede verse, pocos centímetros junto al pericarpio y aun traslúcido.

También se notó una fuerte disminución de la capacidad reblandeciente a medida que los cultivos se hacían viejos.

Las inoculaciones sobre plantas vivas de tomate también fueron comprobadas, observándose que eran más fácilmente atacadas cuando estaban abonadas con exceso de nitrógeno, disminuyendo su vulnerabilidad con abonos fosfatados y potásicos y con riegos adecuados.

Para llegar a estas conclusiones nos servimos de macetas con plantas de tomate y de plantas de la misma especie colocadas en vasos con solución de Knop, en la que pudimos dosificar exactamente las sales de modo que se hacían series con cantidades crecientes de fosfatos, o de compuestos nitrogenados, y también de sales potásicas, y demostrando poca influencia sobre la vulnerabilidad de la planta. En general, la pérdida de resistencia era máxima cuando se duplicaban los compuestos nitrogenados o se omitían los fosfatos.

También se ensayó la tolerancia en estas plantas a los antisépticos $CuSO_4$ y $FeSO_4$. $7H_2O$ incorporados en dosis graduales a la solución nutritiva.

Es de notar la poca tolerancia de estas plantas al sulfato de cobre, dando resultados no muy prácticos en cuanto a resistencia de la planta a nuestros microorganismos.

El sulfato ferroso no era posible usarlo en presencia de fosfatos, pues precipitaba; a pesar de que modificamos la fórmula de Knop para evitar esto, no se logró ningún resultado significativo por este procedimiento. (Véanse las figs. 2 y 3.)

También se infectó tierra de las macetas con abonado racional apenas se infectaban las plantas, y si la tierra contenía $FeSO_4$. $7H_2O$, no

había infección, lo que atribuímos al contacto directo del germen con la sal ferrosa.

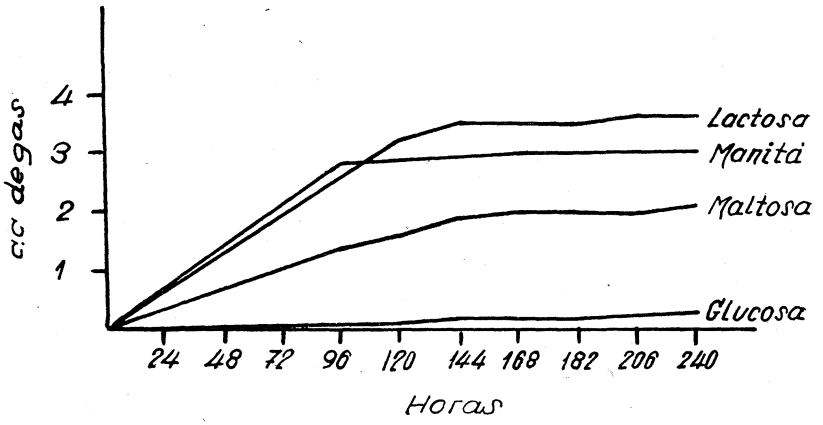
Todas estas sales eran químicamente puras para análisis.

La figura 6 representa el corte transversal (parte) sin teñir, montado en glicerina gelatinizada; es al principio del ataque, determinando un ennegrecimiento, que yo atribuyo a la acción oxidáxica del microorganismo, comprobada después *in vitro*. Obsérvese también que los vasos no están llenos de bacterias, demostrando éstas gran predilección por los tejidos blandos (radios medulares, leptoma, etc.).

CULTIVOS *IN VITRO*

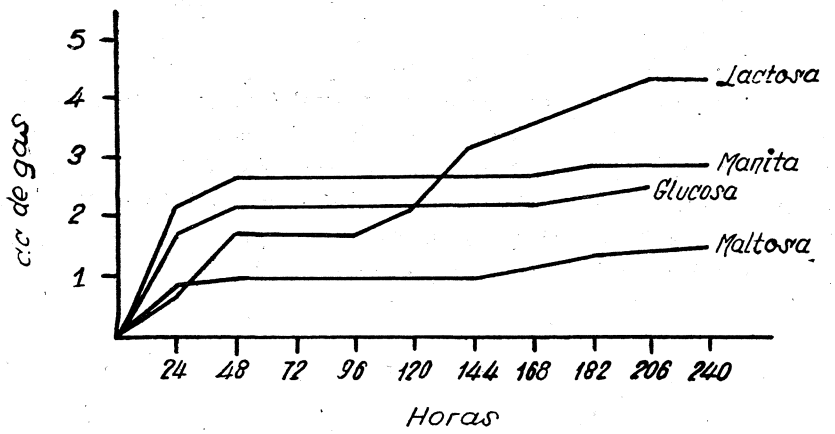
Fermentación de los hidratos de carbono.

Fueron ensayados cultivos E. S. en lactosa, glucosa, manita y maltosa al 2 por 100 en agua de peptona, colocado todo en sacarímetros de



GRÁFICA 2.
Volumen de gas desprendido, en sacarímetros de Einhorn, cultivando bacterias E. S. recién aisladas de una planta enferma.

Einhorn practicándose lectura, en su campana de gases, cada doce horas (ocho mañana y ocho noche), anotando cada una de las lecturas y llevando el cultivo unas gotas de indicador de Andrade, dando una acidez los primeros días, que luego regresaba. Fué probado con cultivos jóve-

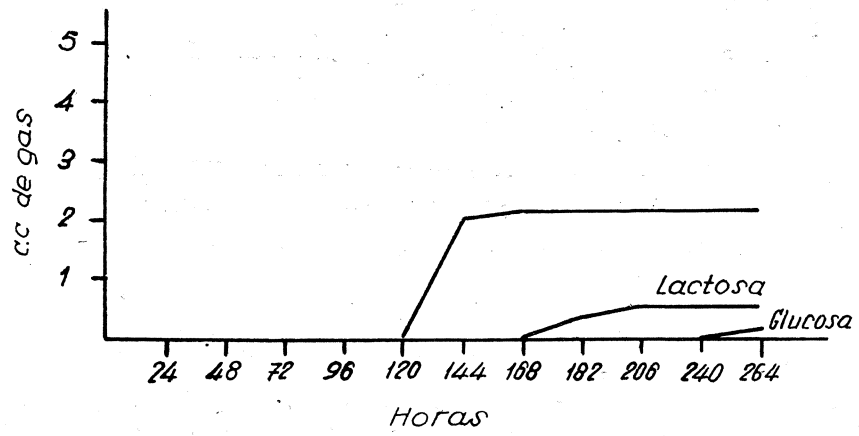


GRÁFICA 3.
Volumen dado por una resiembra de los microorganismos de la gráfica anterior después de pasar quince días en agua de peptona sin azúcares.

nes y cultivos viejos, notándose una gran disminución en la producción de gas.

Los cultivos E. C. nunca produjeron gas de ninguno de los azúcares, pero sí acidez.

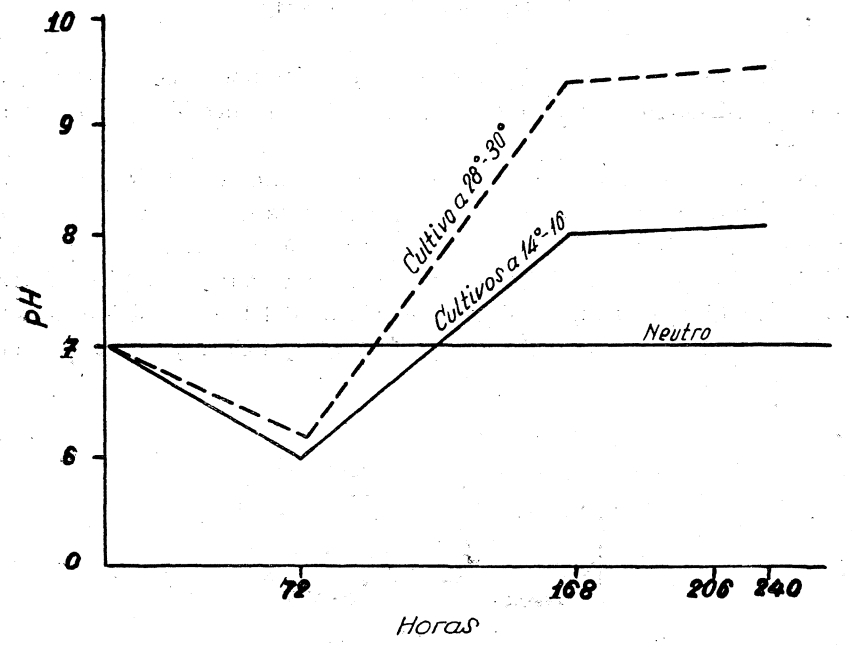
Las gráficas 2, 3 y 4 corresponden a la producción de gas, media, de los cultivos E. S.



GRÁFICA 4.
Volumen de gas después de otra resiembra en agua de peptona sin azúcares y pasar este cultivo cincuenta días.

pH de los cultivos.

En agua de peptona fueron cultivadas bacterias E. S. a temperatura de 28° a 30° C., midiendo el pH con potenciómetro, cuatro veces, repi-



GRÁFICA 5.
Variaciones de la reacción en cultivos E. S.

tiéndose el ensayo a temperatura más baja (14° a 16° C.), dando la gráfica 5.

Como se ve, a menor temperatura dió más acidez, y el regreso a la basicidad es menor.

Como hemos dicho, paralelamente a estas investigaciones sobre cultivos E. S. se seguían otras acerca de los cultivos E. C.; de esto no formamos gráfica de producción de gas porque no lo produjo, y en cuanto a la variación del pH tampoco obtuvimos datos numéricos, ya que la acidez adquirida por el medio no regresaba al cabo de un tiempo, como ocurría con el otro microorganismo; lo que sí se observaba era que en algunos hidratos de carbono, como la lactosa y la manita, sobre todo

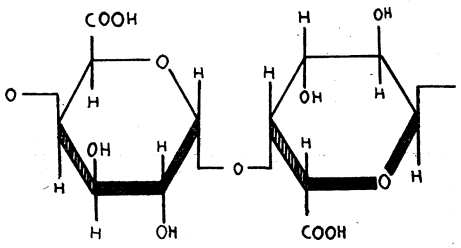
este último, el enrojecimiento del cultivo se presentaba muy tardío y como de repente, mientras que en los sacarímetros que contenían glucosa y maltosa presentaban el enrojecimiento de la acidez desde el primer día.

ESTUDIO DE LA ENZIMA

Smith (23) resume muy bien los trabajos efectuados por él y por Jones (17), así como contribuciones a esta misma cuestión por diversos autores.

Nosotros repetimos muchos de los experimentos descritos por Smith con el ánimo de encontrar nuevos datos capaces de servir como corroboradores a la clasificación de la *Erwinia* que atacaba nuestras plantas.

Sabido es que la laminilla de las células vegetales, según se cree en la actualidad, se trata de ésteres metílicos del llamado ácido péctico (ácido × — 1:4 galacturónico), cuya fórmula puede representarse así:



La pectinasa producida por algunos microorganismos es capaz de disolver la pectina. Las bacterias del género *Erwinia* se caracterizan por producir gran cantidad de pectinasa y son la causa del reblandecimiento de los tejidos vegetales.

Según Jones (op cit.), la eficacia de esta enzima disminuye al pasar por una bujía de Chamberlan; en cambio, si en cultivo joven se matan las bacterias con un 0,1 por 100 de formol, la enzima no disminuye tanto su «fuerza disolvente» como en el caso anterior. Lo hemos querido comprobar repetidas veces y nunca hemos observado gran diferencia, por lo que en nuestra táctica hemos preferido utilizar jugos de cultivos siempre limpiados de bacterias por medio de la bujía porosa. Lo que sí hemos observado es que siempre se producía más cantidad de enzima en los

jugos naturales que en los caldos de cultivo preparados de la manera corriente. De unos y otros precipitábamos la enzima con alcohol, la purificábamos y la disolvíamos en agua. (Véase el manual operatorio.)

Agua de peptona colocada en matraces a la temperatura de 15°; cuando el cultivo en estas condiciones tenía diez días de antigüedad, se pasaba por la bujía y se tomaban 40 c. c., que se trataban con alcohol de 98°, hasta que el conjunto tenía 80°; de momento no daba precipitado, pero al cabo de unas dos horas aparecía una turbulencia uniforme, que a las cuarenta y ocho horas se había sedimentado, y el líquido sobrenadante quedaba aún algo turbio. El conjunto fué centrifugado a 1.200 vueltas por minuto, cronometrando el tiempo necesario para que el líquido quedara limpio, para lo cual se necesitaron treinta minutos. Se procedió a la purificación del precipitado, redisolviéndose en agua y precipitándolo de nuevo por el alcohol.

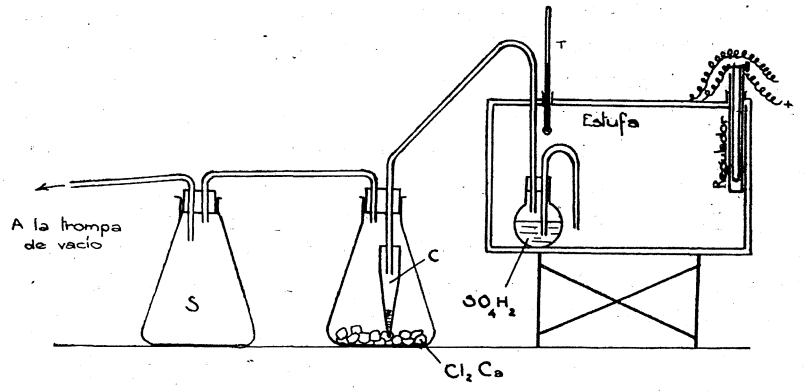
Teniendo en cuenta que se había partido de 40 c. c. de cultivo, se pensó en determinar gravimétricamente la cantidad de precipitado, procediéndose del modo siguiente:

Permaneció el tubo de la centrífuga vacío, en un desecador, con ácido sulfúrico, cuarenta y ocho horas después de haber estado dos horas en una estufa de 105°, y se pesó. La segunda precipitación antes aludida fué llevada a cabo dentro del citado tubo, centrifugándose y decantando el líquido; se lavó varias veces el precipitado con alcohol absoluto, centrifugándose y decantando cada vez; se pasó una corriente de aire caliente para desear el precipitado, según el esquema adjunto, que es un aparato ideado por nosotros:

Debía ponerse especial cuidado que el termómetro T no sobrepase los 55° por no destruir el precipitado (Jones), el matraz S es de seguridad, a fin de que no entre agua mojando el precipitado; en caso de fallar o romperse la bomba de vacío. Una vez seco el precipitado, se conserva veinticuatro horas en el desecador y se pesa; la diferencia de peso entre tubo vacío y tubo con precipitado da el peso de éste, que después de cuatro ensayos el promedio fué de 0,011 grs. en 40 c. c. de cultivo.

Preparamos diversas soluciones de precipitado, al 1 por 100, 1 por 1.000, 1 por 100.000, y realizamos varias pruebas de destrucción de cortes vegetales. La solución de título 1 por 100.000 apenas si mostró poder destructor de la laminilla media, mientras que en la solución 1 por 1.000 y 1 por 100 en dos horas destruían un corte (efectuado en navaja, como para ver al microscopio) de zanahoria. También se hizo prueba con cor-

te de tallo de planta sana de *L. esculentum,* y comparando las figs. 4 y 5 se apreciará una verdadera disección de los vasos y traqueidas, que no son atacados, mientras que los elementos parenquimatosos aparecen desorganizados; no fué muy distinto el resultado alcanzado con una concentración de 1 por 100 o por 1.000, por lo que la concentración no influyó mucho hasta un mínimo de presencia de enzima para hidrolizar la pectina de la laminilla media.



La solución al 1 por 100 es de consistencia viscosa, de color gris perla tirando a rosado, y de pH = 5,8, o sea de reacción ácida; el precipitado se conserva seco mucho tiempo, pero estas soluciones aparecían inútiles al día siguiente. Nos pareció útil separar, por los procedimientos ya indicados, la enzima del jugo de un fruto de *Cucurbita máxima,* cuyo mesocarpo había sido completamente licuado por el microorganismo, y de 40 c. c. obtuvimos 0,0245 grs. de precipitado de iguales características que el separado de los cultivos artificiales, pero como se ve, en más de doble cantidad.

Finalmente, observamos al microscopio una pequeña porción de precipitado, y se presentaba como una sustancia amorfa y terrosa.

OTROS ENSAYOS

En la leche tornasolada los cultivos E. S. coagularon la leche rápidamente con separación de suero, olor a queso, y en cuanto a la reacción del medio, presentó la misma característica que en agua de peptona, primero ácido y luego alcalino.

En cambio, los cultivos E. C. coagularon la leche mucho más lentamente, apenas sin separación de suero, acidez persistente y olor poco perceptible.

La producción del indol era muy manifiesta en todos los cultivos E. S., y siempre resultó negativa en los E. C. Cosa parecida a los que hace referencia a la transformación de nitratos a nitritos, también los E. S. lo hacían, mientras que los E. C. no.

Lo más peculiar fué lo que ocurría en la producción de SH_2 de 20 siembras de E. S., todas procedentes de un trazo, en agar corriente; una sola dió SH_2 capaz de ennegrecer un papel de filtro impregnado de subacetato de plomo; de los cultivos E. C. ninguno de ellos dió jamás muestras de producir SH_2.

Las dos clases de cultivos dieron prueba positiva en la hidrólisis del almidón, así como en la prueba de la producción de oxidasas y en la prueba de Eijkman.

En el examen microscópico de los microorganismos pudimos comprobar que eran Gram-negativos, afectaban la forma de bastoncitos, que algunas veces parecían formar cadenas cortas, sobre todo si se trataba de frotis hechos con aguja de platino que había tocado la película formada en la superficie del caldo. Examinados en gota pendiente, estaban dotados de motilidad activa.

Las colonias sobre el agar eran circulares, convexas, de bordes enteros, con superficie lisa blando grisácea, y de aspecto grasiento. La gelatina era fundida muy lentamente en forma de embudo y a baja temperatura ni siquiera la fundían, a pesar de desarrollarse.

Con todos estos datos, siguiendo la clasificación de Bergey et al., se deben considerar nuestros cultivos como *Erwinia carotovorus*, Jones; los cultivos E. S. y los E. C. podrían pasar por *Erwinia rhapontici*.

Nos pareció útil hacer una detallada comparación con otras Enterobacteriáceas frecuentes en aguas residuales, y volvimos a empezar una investigación paralela de las siguientes cuatro especies: cultivo E. S.

(Erwinia carotovora), cultivos E. C. *(Erwinia rhapontici* (?)*)*, una cepa de *Escherichia coli* y otra de *Aerobacter aerógenes.*

A continuación exponemos los resultados en el siguiente cuadro:

	Cultivos E. S.	Cultivos E. C.	Escherichia Coli	Aerobacter aerógenes
Licuación gelatina	P	P	—	—
Película sobre el caldo	P	P	—	P
Leche tornasolada (coagulación)	P	P	P	P
Indol	P	—	P	—
Indol-nitroso	P	—	—	P
Nitrito de nitratos	P	—	P	P
Voges-Proskauer	—	P	—	P
Kosser	P	O	—	P
Oxidasas	P	P	—	—
SH_2	O	—	P	—
Eijkman	P	P	P	—
Fermentación de azúcares:				
Lactosa. ácido	P	P	P	P
Lactosa. gas	P	—	P	P
Manita. ácido	P	P	P	P
Manita. gas	P	—	P	P
Maltosa. ácido	P	P	P	P
Maltosa. gas	P	—	P	P
Glucosa. ácido	P	P	P	P
Glucosa. gas	P	—	P	P
Hidrolización pectina	P	P	—	—

— = negativo P = positivo O = con poca claridad

De todos los trabajos que anteceden pueden deducirse las siguientes

CONCLUSIONES

1.ª Las plantas jóvenes de *Lycopersicum esculentum,* Mill, eran atacadas en su pie por una bacteria capaz de destruir la laminilla media

del tejido parenquimatoso de varias especies vegetales, no penetrando en los vasos, atacando de preferencia en terrenos ricos en nitrógenos en los que ha existido en años anteriores una plantación de zanahorias.

2.ª De las lesiones se separan dos microorganismos, cuya diferenciación se reconoce:

a) Por la reacción que provoca en el medio.

b) Por la forma de la coagulación de la leche.

c) Por la reducción de nitratos a nitritos.

d) Por la producción de gas en la fermentación de lactosas, manita, maltosa y glucosa.

e) Por la reacción de Voges-Proskauer.

3.ª Nuestros cultivos E. S. corresponden a la *Erwinia carotovora* W., y los cultivos E. C. se parecen mucho a la *Erwinia rhapontici.*

4.ª Con la edad de los cultivos disminuye la virulencia, así como con diferentes resiembras la fermentación de los azúcares se retrasa y disminuye de intensidad.

5.ª Con exceso de nitrógeno en el terreno o falta de abonos fosfatados las plantas son más vulnerables.

6.ª La presencia de sulfato ferroso en el suelo actúa como germicida y puede disminuir el ataque.

7.ª Igual que afirmó Elrod, la principal diferencia entre nuestros microorganismos y las especies *Escherichia coli* y *Aerobacter aerógenes* estriba en el poder de aquéllos de hidrolizar la protopectina que forma la laminilla media de los tejidos vegetales.

8.ª Con alcohol se obtiene un precipitado que, redisuelto en agua, tiene la propiedad de hidrolizar la pectina, según había ya conseguido Jones; pero nosotros siempre obtuvimos más cantidad de los jugos naturales que de cultivos en medios sintéticos u ordinarios, sin notar disminución de poder hidrolizante por paso en el filtro de porcelana porosa.

9.ª Para reblandecer un tejido vegetal basta un mínimo de pectinasa; con una solución mucho más concentrada no se consiguen efectos distintos.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la destrucción de una parte del tejido parenquimatoso en varias especies vegetales de *Lycopersicum esculentum.*

El autor examina la influencia de los agentes (humedad, temperatura, edad de la planta, composición del suelo, etc.) en los daños experimentados, y estudia la hidrolización de la protopectina de la laminilla media.

Aísla dos microorganismos: *Erwinia carotovora* y *Erwinia rhapontici*, y hace un diagnóstico de los mismos, verificando sus reacciones biológicas.

SUMMARY

The destruction of a part of parenchymatous tissue in a few *Lycopersicum esculentum* species is studied.

The author describes the influence of certain agents (humidity, temperature, plant age, composition of the soil, etc.) in the injuries and he studies the hydrolisation in the protopectin of the little half lamina.

He makes an isolation of two microorganisms: *Erwinia carotovora* and *Erwinia rhapontici* showing its different biological reactions.

BIBLIOGRAFIA

(1) BEHRENS, J. 1905. Die Pektingärung. Handbuch der Technischen Mycologie. 2 Auflage, Bd. 3. Jena S., 206-286.

(2) BERGEY (et al.). 1923. *(Bacillus cypripediit*. Hori. Cent. F. Bakt. II Abt. 31-1911, 85). Manual of determinative Bacteriology Ist. ed. p. 171. Baltimore.

(3) BERGEY (et. al.). 1930 (Potter Proc. Univ. Durham Philos. Soc. 1899-165 *(Bacterium destructans*, Nakata, Nakajima and Takimoto. Tech. Rept. Korea ind. Farm. 1922). Manual of determinative Bacteriology. 3rd. p. 264. Baltimore.

(4) BERGEY et al.). 1939. Manual of determinative Bacteriology 5th. ed. Baltimore.

(5) BONDE, R. 1939. Comparative Studies of Bacteria Associated with Potato blackiegand Seed pieze decay. Phytopathology, 29-831-851.

(6) DAVISON, F. R., and WILLAMAN, J. J. 1937. Biochemistry of plant disease. IX Pecti-enzimes. Botan. Gazet. 83; 329-361.

(7) DAWSON, W. J. 1939. On the systematic position and generic names of the Gram-negative bacterial plant pathogens. Zentr. Bant. Parasite. II, 100-193.

(8) DAWSON, W. J. 1941. The identification of the Bacteria commonly causing sof-trot in plants. Ann. aplied Biol. 28; 102-106.

(9) ELROD, R. P. 1941. Serological studies of the *Erwinie*. Soft.-rot group with some biochemical considerations. Botan. gazet. 103; 206-279.

(10) ELROD, R. P. 1942. The *Erwinia*. Coliform relationship. Jour. of Bact. vol. 44. 433-434.

(11) ELROD, R. P. 1946. Trimetylamine oxide-reduction and the Eijkman reaction in the genus *Erwinia*. Jour. of Bact., vol. 52; 144-145.

(12) Mc. Fadden, D. R. 1941. A chemical method for the sterilization of pectin (Alst.). Jour. of Bact. 42; 289-290.

(13) Van Hall. 1903 (Inan. Diss., Univ. Amsterdam, 1902; 198). Ztschr. f. Planzenkh. v. 13, pág. 129.

(14) Harding, H. A., and Morse, W. J. 1909. The bacteriological soft-rot of certains vegetable and the mutual relationship of the organisms. N. Y. Agr. Exp. Sta.-Tech. Bull. II.

(15) Johnson. 1912. U. S. Dept. Agr., Bur. Plant Ind. 228.

(16) Jones, L. R. 1905. Cytolytic enzime produced by *B. carotovorus* and certain others soft-rot bacterium. Zentr. Bakt. Parasitenk. II-14; 910-940.

(17) Jones, L. R. 1910. Pectinase, the cytolytic enzym produced by *B. Carotovorus* and certain other soft-rot organisms. Bull. n.º 147 part II; Vermont Agr. Exp. Station Burlington, pág. 281-360.

(18) Magrou. 1937 *(Bacillus dahliae,* Hori and Bokura. Agr. Exp. Sta. Nishigahara. 38; 1911-69). Magrou in Hauduroy. Dict. d. Bact. Path. 205.

(19) Magrou. 1937 *(Bacillus Hyacinthi septicus,* Heinz-Centr. f. Bakt. 5; 1889-535), op. cit., 208.

(20) Omelianski, W. 1904. Die Histologischen und chemischen Wärenderungen der Leinstengel unter Einwirkung der Microben der Pektin- und Cellulosegärung. Zentralb. f. Bakt. 2 Abt. Bd. XII S. 33-43. Jena.

(21) Par-Leland, W. 1939. Coliform bacteria. Bact. Revs. 3; 1-47.

(22) Rsen. 1922. Phytopothologie. 12-497.

(23) Smith, E. F. 1911. Bacteria in relation to plant disease. Vol. II, pág. 51-89. Carnegie Institution. Washington.

(24) Stanley, A. R. 1939. Physiologic and serologic studies of the soft-rot and colon group of bacteria. W. Va. Agr. Exp. Sta. Bull. 287.

(25) Stuart, C. A.; Griffin, A. M., and Baker, Muriel. 1938. Relahionship of coliform organisms Jour. of Bact. 36; 391-410.

(26) Stuart, C. A.; Mickee, F. L., and Borman, E. K. 1940. Sugested grouping of slow lactose fermenting coliform organisms. Am. J. Pub. Healt. 30; 499-508.

(27) Tauber, Henry, 1949. The chemistry and technology of enzyms. Pág. 458-475. John Wiley & Sons Ins. N. York.

(28) Wormald. 1917 (Jour. Agr. Sci. 6; 1914. 203). Jour. Agr. Sci. Vol. 8. pág. 216.

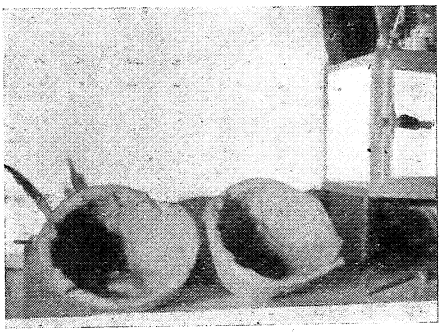


FIG. 1.

Fruto de *Cucurbita máxima* cuya pulpa fué rápida y totalmente licuada por la *Erwinia* «E S», aislada de las plantas enfermas de *L. esculentum.*

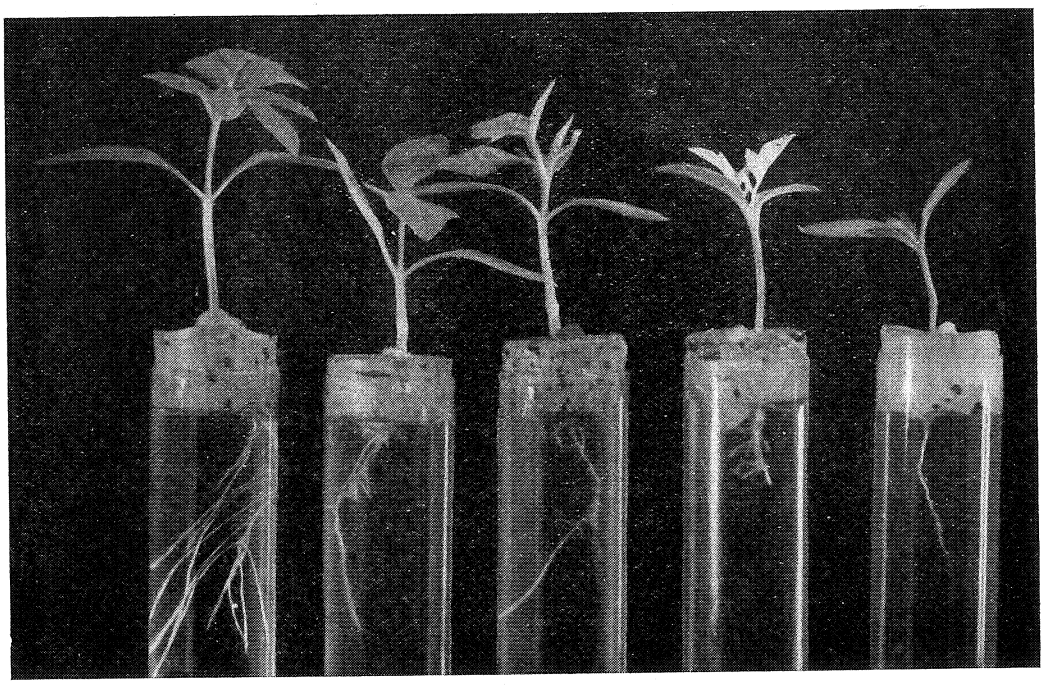


FIG. 2.

Serie de plantas de *L. esculentum* en solución de Knop, para estudiar la influencia de abonos y desinfectantes sobre la invasión de las *Erwinia* E. S. y E. C.

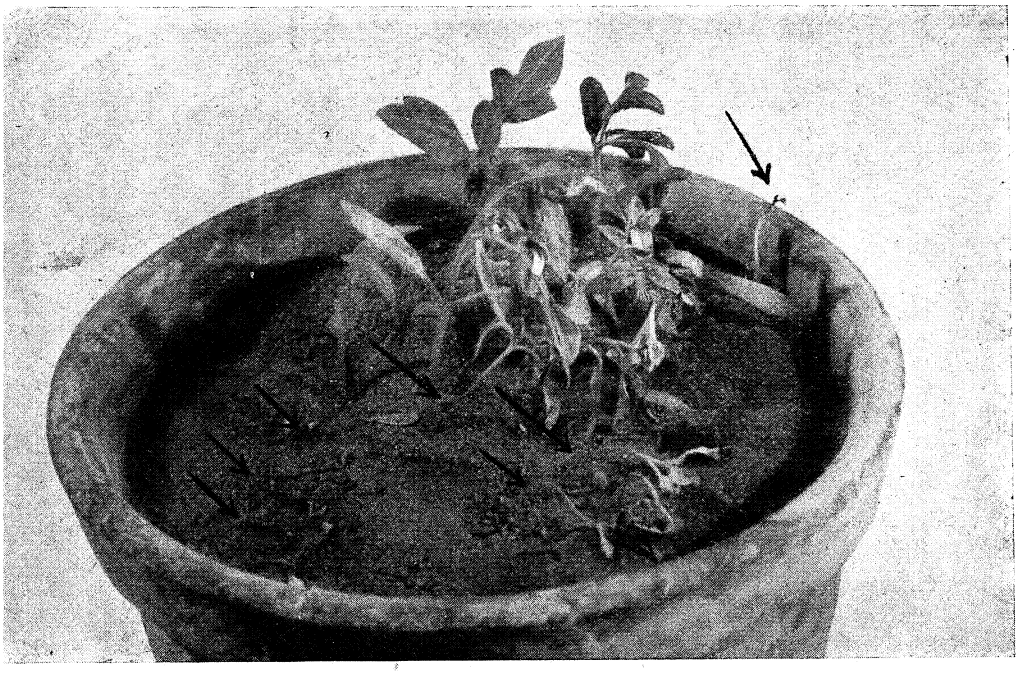


FIG. 3.

Infección provocada de las plantas de una maceta; en primer término, plantas muertas. (Las flechas indican lesiones típicas.)

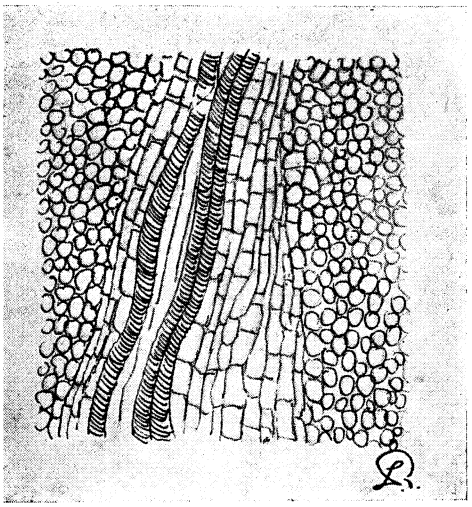


FIG. 4.

orte tangencial de tallo de *L. esculentum* teñido con picrofucsina de Van Giesson.

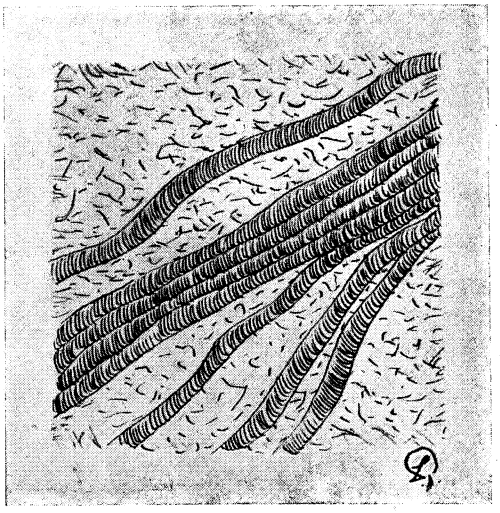


FIG. 5.

Corte igual al anterior tratado, antes de la tinción, con solución de enzima separada de un cultivo.

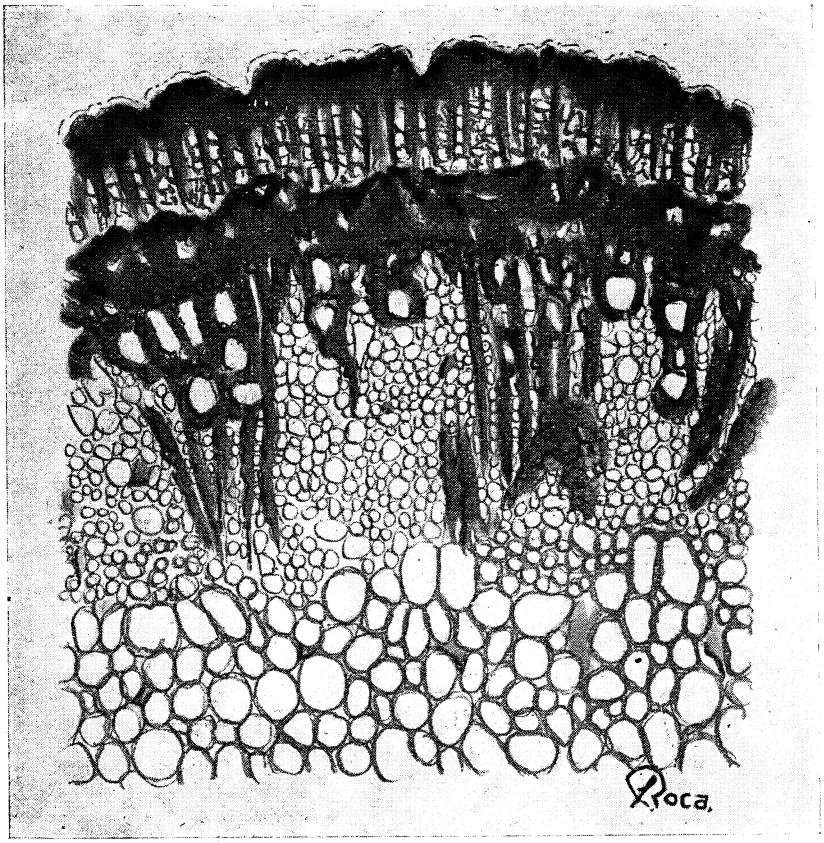


FIG. 6.

Corte transversal de un tallo de *L. esculentum*, sin tinción de ninguna clase, y montado en glicerina gelatinizada. (Véase texto.)

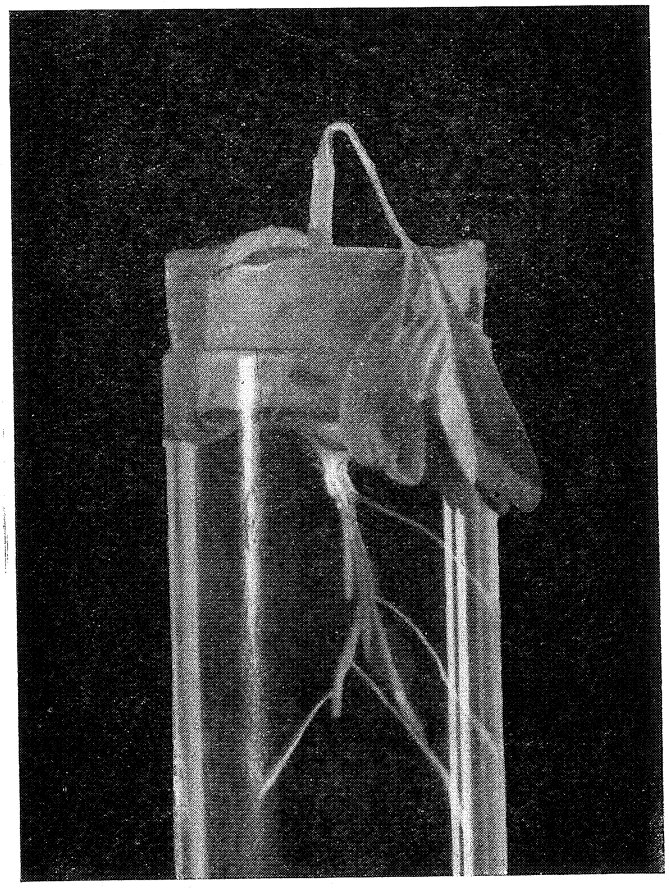
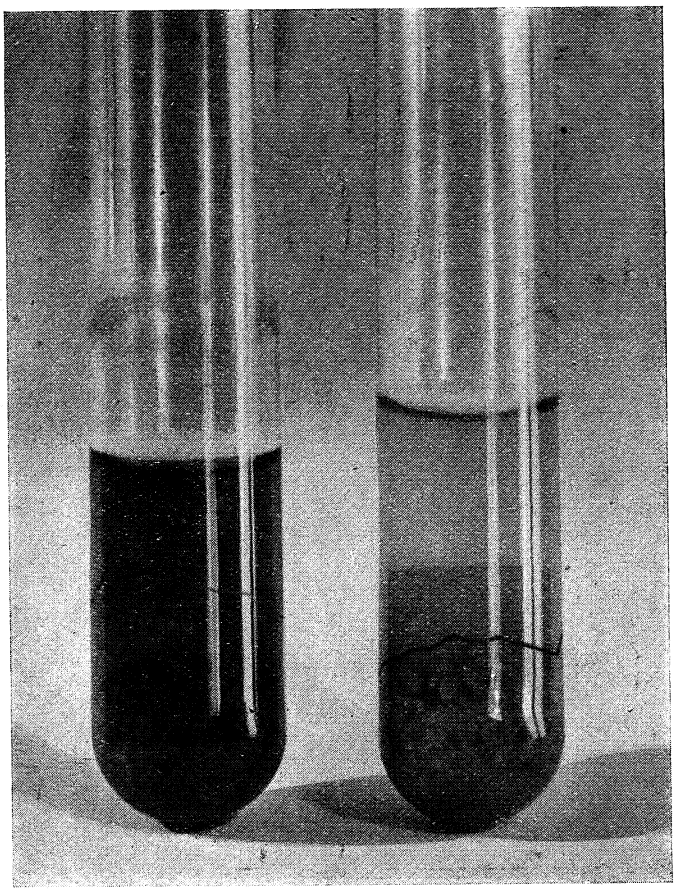


FIG. 7.
Plantita de *L. esculentum* inoculada por punción con aguja. Había sido reducida la proporción de fosfato en el líquido nutritivo de Knop.



a b

FIG. 8.

a. Cultivo de *A. aerogenes*, que ha digerido parcialmente la carne.—*b*. Cultivo de *Erwinia* «E. S.», que no ha digerido la carne.

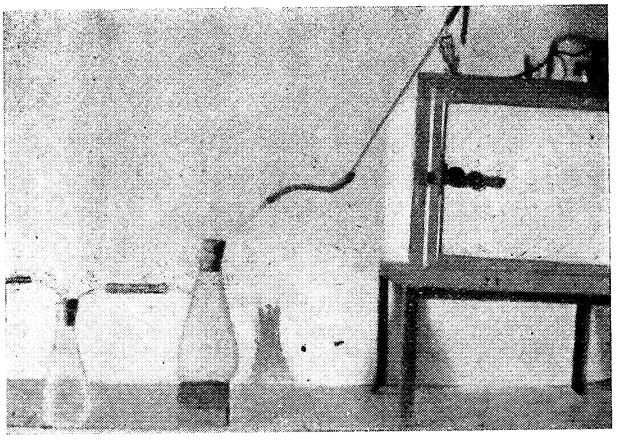


FIG. 9.

Aparato que hemos usado para la desecación del precipitado de enzima separado de los cultivos. (Véase texto.)

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

ESTUDIO DE UNA VARIANTE NO PROTEOLITICA DE *INFLABILIS MANGENOTI*

POR

C. GONZÁLEZ.

Dentro de la familia *Clostridiaceae* se admiten tres géneros: *Inflabilis* (Prévot, 1938), *Welchia* (Pribram, 1927), *Clostridium* (Prazmowski, 1880), siguiendo la escuela francesa.

El primero de ellos está integrado por 14 especies, cuyos caracteres generales son los siguientes:

Bastones con esporas centrales o subterminales, clostridianas, Gram-positivo, inmóviles y sin cápsula. Las especies se distribuyen en dos grupos, según produzcan o no gas, y aun cada uno de ellos en otros dos, según sean o no proteolíticas.

Al grupo de las productoras de gas y no proteolíticas pertenecen cuatro especies: *Inflabilis satélitis, Inflabilis talis, Inflabilis indólicus* e *Inflabilis mangenoti.* Para la especie *mangenoti* Prévot y Zimmes- Chaverou, que la han estudiado en 1947, dan como *habitat* los suelos de los bosques pantanosos de la Costa de Marfil. Nosotros, estudiando la flora anaerobia del alpechín, muestra procedente de Ocaña (Toledo), hemos aislado algunas especies, y entre ellas una perteneciente al género *Inflabilis*, que consideramos como una variante de la especie *mangenoti.*

Los caracteres de esta variante son los siguientes:

Habitat: Aislada del alpechín.

Morfología: Bastones de extremos redondeados, aislados, y en ocasiones formando cadenas de tres a cuatro elementos. Formas esféricas en cultivos viejos. Bacilos de 5-10 por 1,5 micras. Inmóviles. No hemos visto la presencia de cilios. Esporas clostridianas centrales y subterminales de 2,6 por 1 micras. Gram-positivo.

Fisiología: Anaerobio escricto. Resiste cinco minutos a 100° C.

Reductor: Reduce la safranina y el rojo neutro.

Cultivos: Gasógenos y de olor fétido.

Agar profundo: Colonias algodonosas irregulares, gas, ligera licuación del agar.

Agua de peptona: Crecimiento débil.

Caldo VF glucosado: Opalescencia uniforme, depósito viscoso después de algunos días de cultivo, gas, olor fétido.

Gelatina: Licuación en veinticuatro horas.

Leche: Coagulada y digerida después de algunos días.

Caldo VF con hígado: Principio de ataque, ennegrecimiento.

Caldo VF con cerebro: No atacado.

Caldo VF con fibrina: No atacada.

Caldo VF con suero coagulado: No atacado.

Caldo VF con clara de huevo: No atacada.

Glúcidos: Ligera fermentación de la glucosa y de la maltosa.

Nitratos: No reducidos en nitritos.

Bioquímica: Produce NH_3 y SH_2; indol. Acido acético y valeriánico. Aminas volátiles, aldehidos, alcohol etílico, cetonas e indicios de metacresol.

Poder patógeno: Nulo; ni toxina ni hemolisina.

Se diferencia, pues, de la especie tipo por no ser proteolítico; no produce ácido láctico y sí ligeros indicios de metacresol. Los demás caracteres son idénticos a los de la especie *mangenoti*. Por todo ello, consideramos a este germen como perteneciente al género *Inflabilis*, especie *mangenoti*, variante no proteolítica.

Nos queda por decir en cuanto al *habitat* del organismo que por el momento no podemos precisar si se trata del mismo fruto del olivo, o bien de las tierras de olivares o del agua utilizada para el prensado de las acetinuas. Esperamos el envío de nuevas muestras de alpechín, así como el envío de tierras procedentes de Ocaña. Un estudio microbiológico de unas y otras nos permitirá probablemente encontrar la especie típica y establecer el *hábitat* en España de un germen que hasta ahora parece ser se ha limitado a las costas del norte del golfo de Guinea, o bien de una variante de la especie que no ha sido descrita hasta ahora, según creemos.

La cepa con el número 3 b figura en la Colección del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología, del C. S. I. C., Sección de Biología Microbiana (Anaerobios).

RESUMEN

Estudiamos una bacteria anaerobia aislada del alpechín. Por ser esporulada, Gram-positiva, inmóvil y sin cápsula, corresponde al género *Inflabilis* de Prévot (1938).

Su fisiología y bioquímica la asemeja a la especie *mangenoti;* se distingue de ella por no ser proteolítico ni elaborar ácido láctico.

La consideramos, pues, como una variante que llamamos *Inflabilis mangenoti, variante no proteolítica.*

SUMMARY

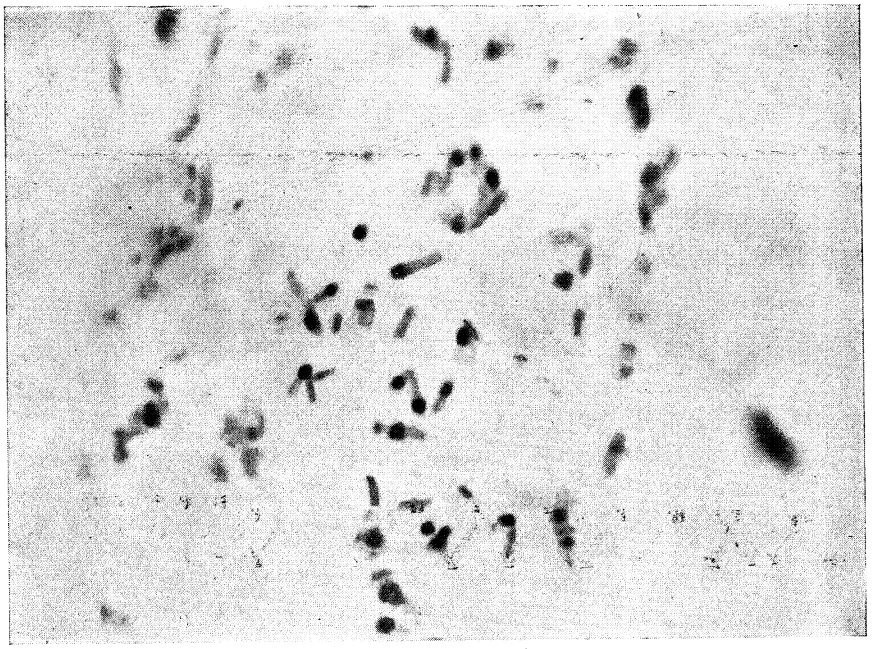
An anaerobic bacterium, isolated from «alpechín» (juice which eozes from a heap of olives) has been studied. Since this bacterium is sporulated, Gram-positive, non-motile and non-capsulated, it is included into the Prévot's *Inflabilis* genera (1938). It is closely related to the *mangenoti* species. This strain is distinguished because it does not produce lactic acid and it is non proteolytic.

We considerer, this bacterium, as being *Inflabilis mangenoti var. non proteolytic.*

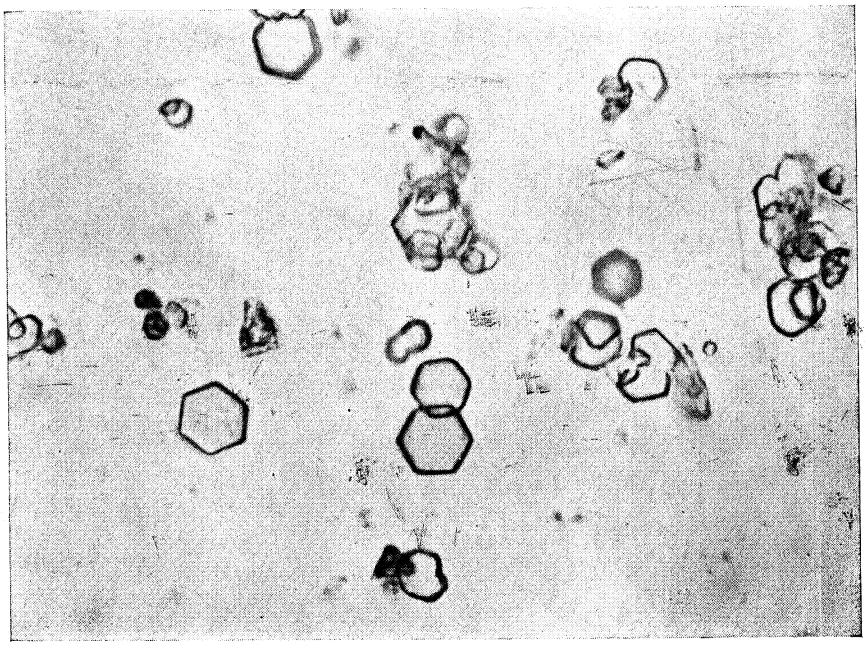
BIBLIOGRAFIA

LEBER, F.; TARDIEUX, P. Tecnique d'isolement et détermination des bactéries anaérobies. Paris, 1952.

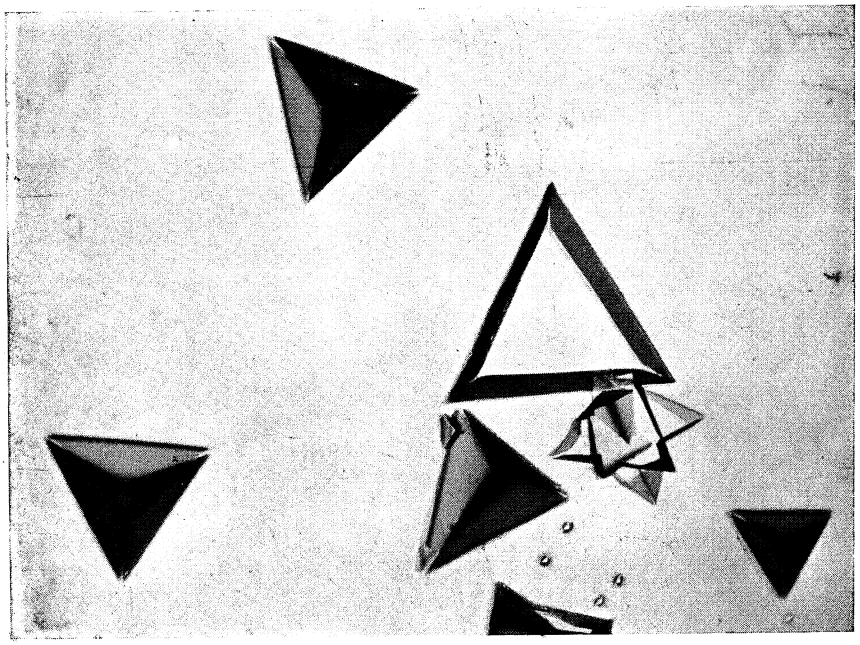
PREVOT, A. R. Manuel de classification et détermination des bactéries anaérobies. Paris, 1948.



MICROFOTO 1.
Inflábilis mangenoti, v. no proteolítica. Tinción de esporos según el método de Alesssandrini.



MICROFOTO 2.
Cristales de iodoformo formados por la reacción del alcohol etílico elaborado por el germen en su metabolismo, con el reactivo iodo-iodurado y sosa. Método de reconocimiento del alcohol etílico en el medio de cultivo.



MICROFOTO 3.

Cristales de acetato de uranio y de sodio formados a expensas del ácido acético producido por la bacteria en el medio de cultivo. Método para el reconocimiento del ácido acético en el medio de cultivo, según la técnica de Behrem y Kley modificado por Prévot y Loth.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE MICOLOGIA

NUEVA ESPECIE DE LEVADURA, AISLADA DE CONCENTRADO DE TANINO, *CANDIDA MAJORICENSIS* NOV. SP.

POR

RAFAEL GENESTAR SERRA.

Este microorganismo fué aislado el 16 de febrero de 1955, a partir de un concentrado de tanino, formado a base del 50 por 100 de corteza de encina y 50 por 100 de corteza de pino de 15° Bé., preparado en una fábrica de líquidos curtientes de Palma de Mallorca.

Sus características morfológicas, como son las de poseer seudomicelio muy bien desarrollado y micelio verdadero, abundantes blastosporas, y no producir esporas, permiten incluirle en el género *Berkhout*.

Pero sus características fisiológicas, distintas de las propiedades de las especies descritas hasta ahora, nos inducen a incluir esta levadura en una nueva especie, para la que proponemos el nombre de *Candida majoricencis*.

DESCRIPCION

A las cuarenta y ocho horas, en extracto de malta, a 25° C., las células son redondas a ovales: (3-4) por (3-4) micras las redondas y (2,5-4) por (4,5-7,5) micras las ovales, aisladas o en parejas (fig. 1).

Forma depósito, anillo muy fino e islotes.

Al cabo de un mes, a 17° C., abundante velo mucoso, grueso y caedizo, que va depositándose en el fondo.

Estría en agar malta, al cabo de un mes y a temperatura ambiente. blanca, aplanada, de bordes desflecados.

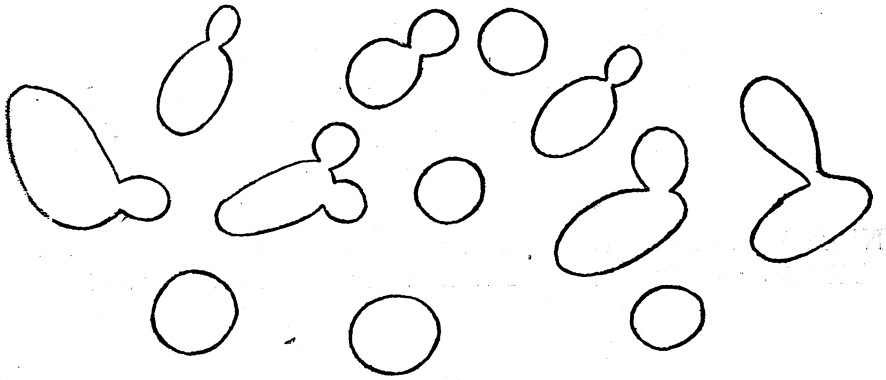


FIG. 1.
Candida majoricensis, nov. sp. en extracto de malta a las 48 horas, a 25º C. (3.000 X).

Fermentación:

Glucosa + (débil, 30 por 100 del tubo con gas).
Galactosa + (muy débil, 10 por 100 del tubo con gas).
Sacarosa + (débil, 30 por 100 del tubo con gas).
Maltosa + (muy débil, 8 por 100 del tubo con gas).
Lactosa —
Rafinosa —

Asimilación de azúcares:

Glucosa +
Galactosa +
Sacarosa +
Maltosa +
Lactosa —

Asimilación de fuentes de nitrógeno:

Peptona +
Nitrato potásico —

Asimilación de etanol: débilmente positiva.

Cultivo sobre porta con agar-patata:

Seudomicilio muy bien desarrollado, tipo Mycotoruloides, y micelio verdadero predominante (figs. 2 y 3).

Esporulación: negativa.

Hidrólisis de la arbutina: positiva.

DISCUSION

Esta levadura tiene propiedades distintas de las especies de *Candida* hasta ahora descritas. Con la que tiene más afinidad es con *Candida malicola* Clark and Wallace, pero se diferencia de ella en la forma de las

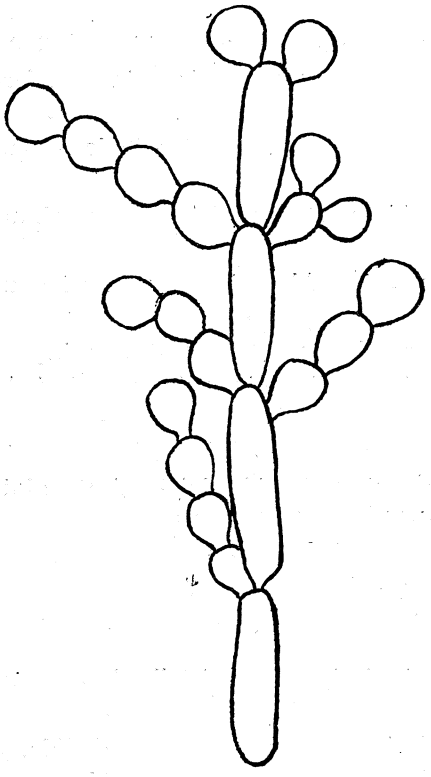


FIG. 2.
C. majoricensis en agar-patata a los 4 días. (700 X).

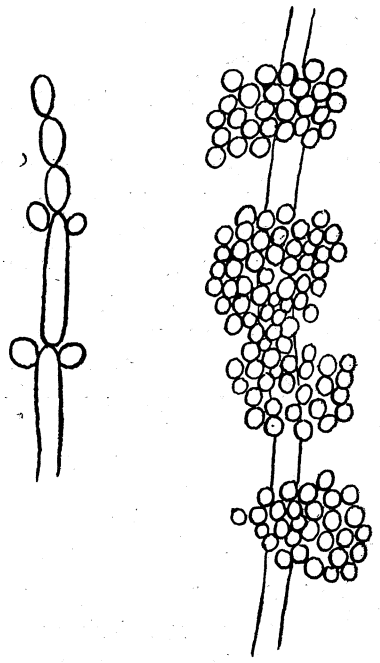


FIG. 3.
C. majoricensis, en agar-patata a los 12 días. (452 X).

células, que son citriformes en *C. malicola;* en el velo, que es fino, y en la fermentación de los azúcares, pues *C. malicola* no fermenta ningún azúcar; además, asimila el nitrato potásico, y *C. majoricensis* no. La asimilación de azúcares es idéntica en las dos especies, y las dos forman el micelio verdadero.

Por no coincidir, pues, esta levadura con ninguna de las especies de *Candida* hasta ahora descritas, es por lo que proponemos para ella el nombre de *Candida majoricensis* nov. sp. en recuerdo de Mallorca, donde se aisló por primera vez.

DIAGNOSIS LATINA

In musto maltato cellulae rotundae (3-4) . (3-4) aut ovoideae (2,5-4) . (4,5-7,5), singulae aut binae. Sedimentum, annulus tenuis et insulae formantur.

Cultura in agaro maltato, post unum mensem, 17° C., albida, prope plana, margine piloso.

Pseudomycelium «tipo Mycotoruloides», et mycelium verum abundant.

Fermentatio glucosi (exigua), valactosi (valde exigua), sacchari (exigua), et maltosi (valde exigua).

In medio cum glucoso, galactoso, saccharoso et maltoso crescit.

Nitras kamicus non assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico parum crescit.

Arbutinum findifur.

NOTA.—Esta levadura se conserva en la Colección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, de Madrid, con el núm. 346.

RESUMEN

El autor describe una nueva especie de levadura aislada de un concentrado de tanino.

Por las características que acusa la incluye en el género *Cándida*, y en este trabajo presenta sus diferencias con las especies conocidas, proponiendo para ella la denominación de *Candida majoricensis*.

Se incluye al final la diagnosis latina.

SUMMARY

Te author describes a new species of yeast which have been isolated from a tanning liquid.

After its characteristics it is included in the genus *Candida* showing in this paper its differences with all the species in this genus and the author proposes the name *Candida majoricensis* for it.

The latin diagnosis of this yeast is included.

BIBLIOGRAFIA

CLARK, S. D., and WALLACE, 1955. Canad. J. Microbiol. Vol. 1, núm. 4, 275.

DIETRICHSON, E. 1954. Annales de Parasitologie Hum. et Comparée. T. XXIX, n.º 3. 271-498.

HEDRICK and BURKE. 1951. Mycopathologia applicata. Vol. VI. fasc. 2, 92.

LODDER, J., and N. J. W. GREGER-VAN RIJ. 1952. The Yeasts North-Holland Publishing Company. Amsterdam.

RAMÍREZ GÓMEZ, C. 1953. Microbiología Española. Vol. 6, núm. 3, pág. 251.

VAN UDEN. und L. ASSIS-LOPES. 1953. Archiv. fur Mikrobiologie. Band 18, Heft., 4.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

FIJACION DEL NITROGENO ATMOSFERICO POR MICROORGANISMOS DISTINTOS DE LOS *AZOTOBACTER*, *RHIZOBIUM* Y *CLOSTRIDIUM*

POR

J. MORALES.

Han sido muchos los autores que se han preocupado de buscar microorganismos distintos de estas bacterias, que fueran capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, bien de una manera simbiótica o no simbiótica. Los trabajos referentes a la fijación del nitrógeno por microorganismos distintos a dichas bacterias han sido objeto de severas críticas en diversos sentidos, incluso en lo que se refiere a los procedimientos químicos para la determinación del nitrógeno; por este motivo Burris y Wilson (4) hacen un estudio crítico del método de Kjeldahl en el sentido de que no determina el nitrógeno de muchos grupos químicos, pasando éste inadvertido. En el caso de que haya habido aumento de la cantidad de nitrógeno, queda por averiguar si el nitrógeno procede del molecular o de compuestos químicos nitrogenados exisfentes en la atmósfera, como amoníaco, nicotina, etc., que los mohos, por ejemplo, pueden captar de esas pequeñísimas concentraciones. Para demostrar que realmente procede del nitrógeno molecular, han recurrido al nitrógeno pesado Tove y colaboradores (19), a recipientes perfectamente confinados con atmósfera conocida, etc. Los resultados han sido distintos, según las estirpes estudiadas, y también según los investigadores de que se trate.

Entre las bacterias posibles fijadoras citan diversos autores el *Aerobacter,* Skinner (17), Hamilton y colaboradores (6); las bacterias fotosintéticas Lindstron y colaboradores (10) y (11), etc. Recientemente Andersen y Guy (3) describen una bacteria que no pueden incluir en ninguna

de las especies del «Manual de Bergey», que presenta unas características parecidas a las pseudomonadáceas, y que fija el nitrógeno en cantidades relativamente grandes. En las Actinomicetales, Akshaibar y Achari (1) estudian la simbiosis de *Azotobacter* y *Actinomyces* en relación con las épocas del año y pH del suelo, así como ciertos *Actinomyces* capaces de utilizar la celulosa y fijar el nitrógeno atmosférico.

En el grupo de las algas, Heuriksson (7) cita ciertas especies de *Nostoc* como fijadoras.

Son los mohos probablemente donde más se han buscado estos fijadores, y podemos distinguir dos grupos entre estos microorganismos. Mohos que fijan el nitrógeno en simbiosis con plantas superiores y mohos que llevan vida libre capaces de fijar el nitrógeno.

Entre los mohos que viven en simbiosis ha sido demostrada la fijación de una manera categórica, según diversos autores. Saida (13), estudiando *Phoma betae,* obtiene 10,5 mgrs. en dos meses y medio por cada 100 c. c. de medio de cultivo; Ternetz (18) lo confirma en distintas variedades de *Phoma radiciis,* y ulteriormente Tove (19) vuelve a confirmarlo en *Phoma casuarinae* utilizando nitrógeno pesado. Son también interesantes los trabajos de Wolff (22), confirmados posteriormente por Senn (14) sobre el género *Orcheomyces,* simbiontes de orquídeas. En estos hongos simbiontes el porcentaje de netrógeno fijado con respecto a la cantidad de glucosa consumida resulta a veces superior al porcentaje del *Azotobacter.*

Entre los mohos posibles fijadores que no viven en simbiosis ha sido estudiado el *Aspergillus niger* por Schober (15), con resultados positivos, y la misma especie por Allison y Hoover (2), con resultados negativos. También se han citado otros *Aspergillus, Penicillum* y *Rhizopus.* Duggar y Davis (5) estudian diversas levaduras, que aprovechan el nitrógeno atmosférico, y Vartiovaara (20) describe un crecimiento en simbiosis de hongos y bacterias fijadoras de nitrógeno.

Nosotros, en el curso de unos estudios sobre *Azotobacter,* en los cuales hemos realizado numerosos aislamientos en medios selectivos sin nitrógeno, sobre 350 muestras de suelos y aguas, además del *Azotobocter* hemos procurado a la vez aislar otros organismos que crecían bien en estos medios, y que considerábamos como posibles fijadores de nitrógeno. Hemos observado con cierta frecuencia *Actinomyces,* en especial de dos tipos, uno con pigmento azul y otro con pigmento violeta, pero su crecimiento era lento, poco abundante, no sólo en los medios sin

nitrógeno, sino en los medios propios para *Actinomyces,* y por ello decidimos no estudiarlos con detalle. Entre los mohos hemos encontrado numerosas colonias, pero éstas, por lo general, se desarrollan muy poco en estos medios, y en la mayoría de los casos no llegan a producir conidias; por el contrario, de cuando en cuando surgían colonias de mohos que crecían perfectamente en estos medios y producían conidias de una manera normal: es de notar que estos mohos eran más frecuentes en suelos de tipo ácido. Estos mohos los aislamos para un ulterior estudio y ver si fijaban o no el nitrógeno. Entre ellos nosotros encontramos diversos *Aspergillus,* especialmente el *niger, Penicillium, Rhizopus* y *Mucor* (fotografías 1 y 2). Desechamos para este estudio, como es lógico, aquellas colonias de mohos que crecían bien junto con colonias de *Azotobacter,* o que crecían después de haberse desarrollado éste, pues entonces éstos suministran nitrógeno combinado que favorece el crecimiento de dichos mohos.

Para aislar, nosotros usábamos el medio basal de Winogradsky (21), al que adicionábamos etanol, benzoato sódico y acetato sódico a las concentraciones de 8 por 1.000, 2 por 1.000 y 1 por 1.000, respectivamente.

Para comprobar si crecían o no en medios sin nitrógeno diez estirpes de las que habíamos aislado, fueron sembradas y cultivadas según describo a continuación. Matraces de 250 c. c., que contenían 100 c. c. de medio líquido, eran sembrados con una pequeña porción de moho esporulado, paran o llevar cantidad apreciable de nitrógeno en el inóculo. Se incubaron a 27° C. durante un mes; después separamos el micelio, lo desecamos y pesamos.

Se hicieron los siguientes cultivos:

Cultivo 1.—Medio de Czapek, sin nitrógeno combinado y con 2 por 100 de glucosa.

Cultivo 2.—Medio de Czapek normal, con 2 por 100 de glucosa,

Después de un mes volvimos a resembrar en:

Cultivo 3.—Medio de Czapek sin nitrógeno combinado, con 2 por 100 de glucosa, que sembramos del cultivo 1.

Cultivo 4.—Medio de Czapek sin nitrógeno combinado, con 2 por 100 de glucosa, que sembramos del cultivo 2.

El cultivo 1, aunque tuvo un desarrollo menor que el 2, su crecimiento fué abundante en todos los mohos, sus hifas se mostraban de dos tipos: unas gruesas, parecidas a las del cultivo 2, y otras finas, parecidas a las del cultivo 3. La producción de conidias fué abundante y de

aspecto normal. En algunas hifas parece observarse determinados engrosamientos, como puede verse en la microfotografía núm. 4 de *Aspergillus niger*.

El cultivo 2, que utilizamos como control, presenta un micelio con el protoplasma llenando completamente la hifa, como puede verse en la microfotografía núm. 3 de *Aspergillus niger*.

El cultivo 3 presenta un crecimiento algo menor que el cultivo 1; se produjeron conidias en todos los mohos, pero en número escaso, y estas conidias eran capaces de dar lugar a los mohos en los medios normales. El micelio tomó un aspecto gelatinoso, que al final del mes de incubación llegó a coagular el medio de cultivo en una masa gelatinosa. Las hifas eran generalmente finas, con el protoplasma lleno de gránulos de aspecto de cocos o bacilos, como puede verse en las microfotografías números 5 y 6 del *A. niger*.

Finalmente, el cultivo 4, en medio sin nitrógeno, sembrado con mohos procedentes de un cultivo nitrogenado, como hemos dicho, tuvieron un crecimiento muy escaso, y esto se debe, como observó Kasselbach (9), a la pérdida de enzimas especiales, cuyas enzimas son las responsables de captar el nitrógeno.

De las diez muestras ensayadas hemos elegido una de *Aspergillus niger*, precisamente la misma de los fotografías; para hacer el análisis químico del nitrógeno total, desecamos el micelio en estufa a 37° durante veinticuatro horas, y después sobre anhídrido fosfórico y vacío, durante cuarenta y ocho horas, pesamos el micelio seco y determinamos el nitrógeno, cuya determinación nos la realizaron, por cortesía, en el Instituto «Alonso Barba», del C. S. I. C.

Los resultados fueron los siguientes:

CULTIVOS	Micelio en gr. por 100 c. c. de medio	Nitrógeno en % del micelio desecado	Nitrógeno fijado por gr. de glucosa
Cultivo 1	2,46	1,47	18 mgr,
Cultivo 2	3,39	4,21	———
Cultivo 3	1,73	indicios	indicios

DISCUSION

En el estudio de estas 35 muestras de suelos y aguas para aislar gérmenes aerobios fijadores del nitrógeno atmosférico, sólo hemos encontrado, además del *Azotobacter,* como posibles fijadores algunos *Actinomyces* y mohos y, por el contrario, no hemos encontrado ningún otro microorganismo citado por algunos investigadores. Los *Actinomyces* tenían, como dijimos anteriormente, un crecimiento muy pequeño, y desistimos de su ulterior estudio. Los mohos, sólo en un pequeño porcentaje con respecto a las colonias que surgían, tenían un crecimiento apreciable. Entre los mohos hay que reconocer, pues, que existen unas determinadas estirpes que crecen bien en medios sin nitrógeno o muy pobres en nitrógeno, y que, por el contrario, existen otras pertenecientes a la misma especie o a la misma cepa incluso, cuyo crecimiento en estos medios es muy escaso.

En la estirpe que se ha determinado el contenido en nitrógeno vemos que en el primer cultivo, en medio líquido sin nitrógeno, el contenido total de éste es de 30 mgrs. para el micelio de 100 c. c. de medio, o sea 18 mgrs. por gramo de glucosa consumida. En el inóculo hay que suponer que iba muy poca cantidad de nitrógeno, pues sembramos con la menor cantidad posible; las impurezas deben ser también pequeñas, pues utilizamos sales de las más puras, de donde sólo cabe imaginar que fué tomado de la atmósfera, aunque no podamos asegurar que fuese precisamente del nitrógeno molecular, pues no disponemos de medios para ello, pero ha sido demostrado por otros autores con nitrógeno pesado, y en general tampoco es corriente exigir técnicas tan rigurosas. Debemos tener en cuenta que la cifra media para el *Azobacter* es de 10 a 12 mgrs. de nitrógeno por gramo de glucosa consumida, según Winogradsky (21), y en esta experiencia el moho analizado fija una cantidad superior.

En el tercer cultivo, sembrado del anterior, el crecimiento fué abundante, pero de distinto aspecto morfológico y microscrópico. El contenido en nitrógeno descendió enormemente, ha perdido la capacidad de fijación.

En el primer cultivo la fijación es evidente; en el tercero ha degenerado y perdido la capacidad de fijación. Pero hay que tener en cuenta que el propio *Azotobacter,* que es considerado como un microorganismo

genuino en la fijación del nitrógeno, cuando se cultiva varias veces seguidas en medios del laboratorio sin nitrógeno, degenera e incluso puede desaparecer, como describe, entre otros, Petschenco (12) y hemos comprobado nosotros; y también, según Wyss y Wyss (23), surgen mutantes de éste en el laboratorio que son incapaces de fijar el nitrógeno atmosférico, aunque conserven la mayoría de sus características morfológicas y fisiológicas de la especie.

Agradecemos al Instituto Alonso Barba, del C. S. I. C., sección de Microanálisis, las determinaciones que nos han efectuado. También agradecemos al señor Moneró su valiosa ayuda en la parte fotográfica de este trabajo.

RESUMEN

Durante unos trabajos en medios sin nitrógeno aislamos, además del *Azotobacter*, ciertos *Actinomyces* y mohos, que crecían bien en estos medios. Fué estudiada la fijación del nitrógeno en los mohos, resultando positiva en algunos casos.

SUMMARY

In the course of our experiments on media without nitrogen we have isolated different strains of the genera *Azotobacter* along with certain *Actinomyces* and moulds. The nitrogen fixation by moulds have been investigated. In some cases positive results were obtained.

REFERENCIAS

(1) AKSHAIBAR, J., and ACHARI, T. K. T. 1935. Proc. Natl. Acad. India. 23 (4/6): 137-149.

(2) ALLISON, F. E.; HOOVER, S. R. and MORRIS, H. J. 1934. J. Agr. Research, 49. 1115-1123.

(3) ANDERSON, GUY, R. J. Bacteriol. 70, 129-133 (1955).

(4) BURRIS, R. H., and WILSON, P. W. Ann. Rev. Biochem. 14, 685-708, 1947.

(5) DUGGAR, B. M.; DAVIS, A. L. 1916. Ann. Missouri Botan. Garden. 3, 413-437.

(6) HAMILTON, P. B.; MAGEE, K. E., and MORTENSON, L. E. 1953. Bacteriol Proc. 82, 123-131.

(7) HEURIKSSON, E. 1951. Physiol. Plant. 4, 542.

(8) JONES, W. N., and SMITH, M. L. 1928. Brit. J. Exptl. Biol. 6, 167-189.

(9) KASSELBACH, E. 1931. Jahrb. wiss. Botan. 75, 377-397.

(10) LINDSTROM, E. S.; BURRIS, R. H., and WILSON, P. V. 1949. J. Bacteriol. 58, 313-316.

(11) LINDSTROM, E. S.; LEWIS, S. M., and PINSKY, M. J. 1951. J. Bacteriol, 61, 481-487.

(12) PETSCHENCO, B. V. 1930. Zentralblatt für Bakt. Albt. Bol. 80, N 8/14; pág. 161.

(13) SAIDA, K. 1901. Ber. deut. Botan. Ges. 19, 107-115.

(14) SENN, G. 1928. Biol. Revs. Biol. Proc. Cambridge Phil. Sos. 3, 77-91.

(15) SCHOBER, R. 1930. Jahrb. wiss. Botan. 72, 1-105.

(16) SCHRODER, M., and WILSON, P. W. 1948. Jahrb. wiss. Botan. 75, 377-398.

(17) SKINNER, C. E. 1928. J. Bacteriol. Abstr. 15, 9.

(18) TERNETZ, C. 1907. Jahrb. wiss. Botan. 44, 353-408.

(19) TOVE, S. R.; NISS, H. F., and WILSON, P. W. 1949. Abstracts of papers 49 th. General Meeting, Sos. am. Bact., pág. 59.

(20) VARTIOVAARA, U. 1938. J. Sci. Agr. Soc. Finland. 10, 241-264.

(21) WINOGRADSKY, S. Obras completas.

(22) WOLFF, H. 1926. Jahrb. wiss. Botan. 66, 1-34.

(23) WYSS, O., and WYSS, M. B. 1950. J. Bacteriol. 59, 287-291.

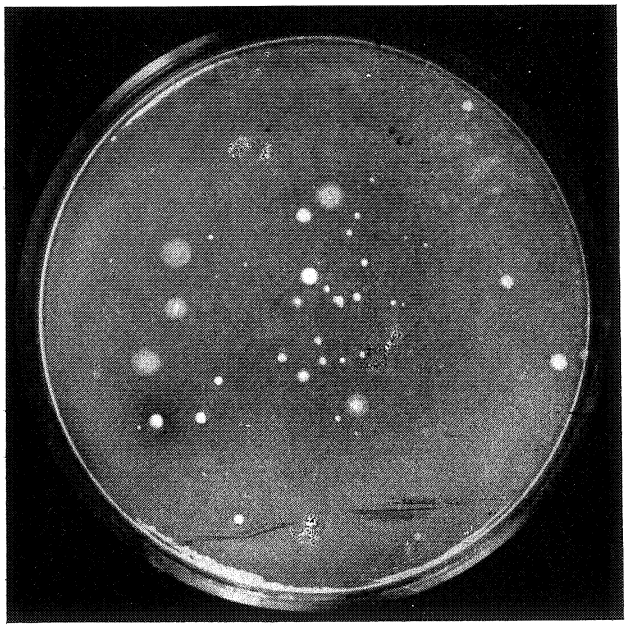


FOTO 1.

Placa de medio sin nitrógeno. Mohos poco desarrollados. 10 días incubación. 2/3 del natural.

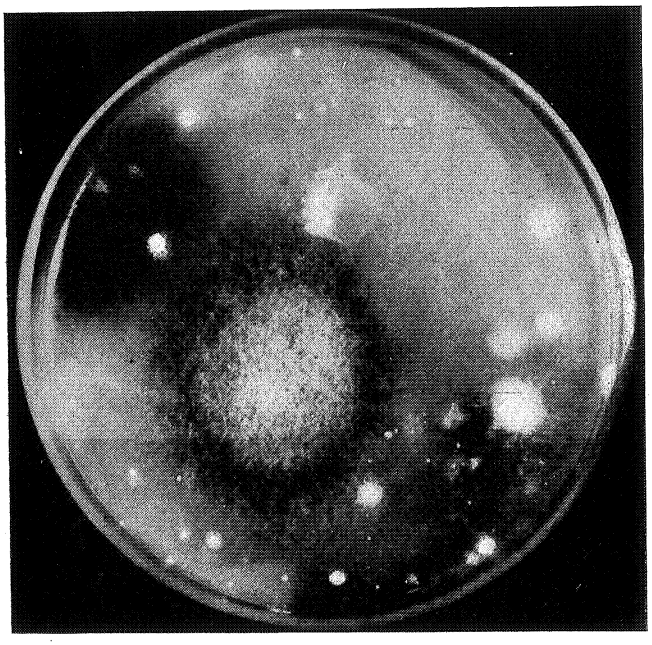


FOTO 2.

Placa de medio sin nitrógeno. Mohos bien desarrollados. 10 días de incubación. 2/3 del natural.

FOTO 3.
Hifas de *A. niger*. Cultivo 2. En Czapek. Aumento 1.500.

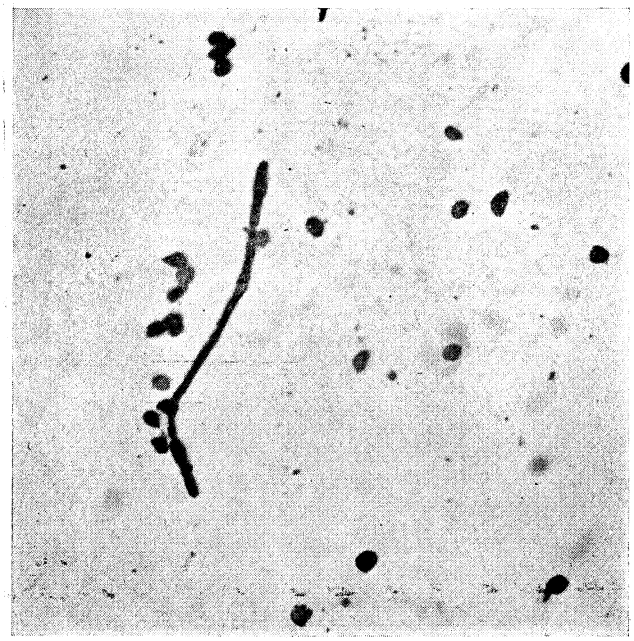


FOTO. 4.
Hifas ne *A. niger*. Cultivo 1. En Czapek sin nitrógeno. Aumento: 1.500.

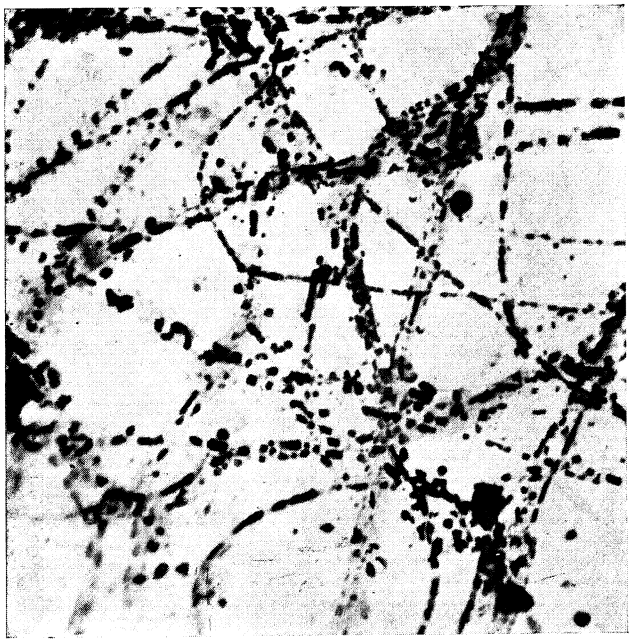


FOTO 5.
Hifas de *A. niger*. Cultivo 3. En Czapek sin nitrógeno.
Aumento: 1.500.

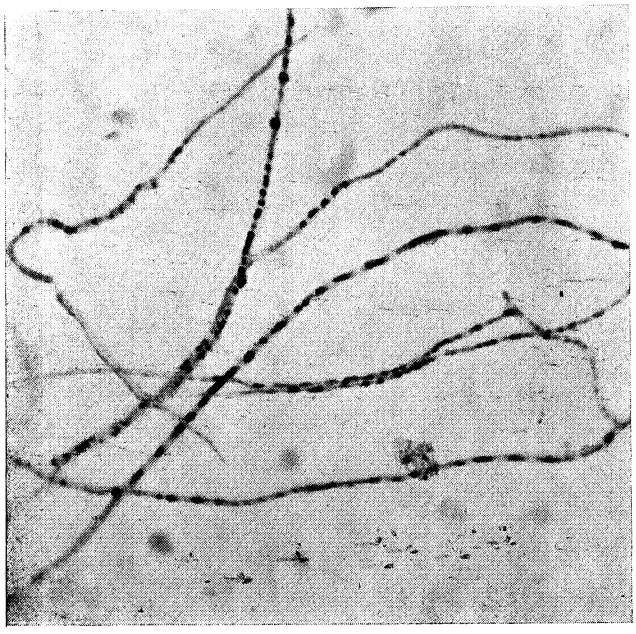


FOTO 6.
Hifas de *A. niger*. Cultivo 3. En Czapek sin nitrógeno.
Aumento: 1.500.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA, DE MADRID

NUEVA TECNICA PARA LA IDENTIFICACION DEL *PSEUDOMONAS SAVASTANOI*

POR

R. BELTRÁ

TUBERCULOSIS DEL OLIVO

1. *Agente causal.*

Esta enfermedad es producida por el *Pseudomonas savastanoi,* perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae.* Tribu: *Pseudomonadae.* Género: *Pseudomonas* (Bergey, 1948).

Sinónimos: *Bacterium oleae,* Arcangeli, 1886; *Bacillus oleae tuberculosis, Savastano,* 1889; *Bacillus oleae* (Arcángeli), Trevisan, 1889; *Bacterium savastanoi,* E. F., Smith, 1908; *Pseudomonas savastanoi* (E. F. Smith), Stevens, 1913.

Los viejos sistemas de clasificación de bacterias fitopatógenas, aún en uso, se fundan en caracteres morfológicos, tales como forma y disposición de los flagelos, pero tienen el inconveniente de que el mismo nombre genérico se da a diferentes tipos de bacterias.

Migula (1895-1900) denomina *Bacterium* a formas no móviles con forma de bastón; *Pseudomonas* a las que tienen flagelos polares y *Bacillus* a aquellas que tienen los flagelos perítricos.

E. F. Smith (1905) denomina *Bacterium* a las formas móviles con forma de bastón y flagelos polares *(Pseudomonas* de Migula); *Bacillus* a las de flagelos perítricos *(Bacillus* de Migula), y crea un nuevo grupo al que da el nombre genérico de *Aplanobacter,* incluyendo en él las formas no móviles.

Bergey (1923-1939) separa las plantas patógenas como tales y crea

una tribu especial que llama *Erwiniae*. Posteriormente Erwin F. compuso dos nuevos géneros: *Erwinia* con flagelos perítricos y *Phytomonas* con flagelo polar o sin flagelo.

La simple exposición de las diferentes nomenclaturas de las bacterias fitopatógenas pone de manifiesto que todos los géneros tienen un carácter distintivo: la posición de los flagelos o la ausencia de ellos.

Lehmann y Neumann (1897-1927) clasifican las bacterias atendiendo a la formación de esporas, y así, las que poseen esporas las sitúan en el género *Bacillus*, y las que no las poseen constituyen el género *Bacterium;* en ambas hay formas móviles y no móviles.

El género *Bacterium*, por lo anteriormente expuesto, tiene tres denominaciones diferentes: Mígula, Smith, Lehmann y Neumann, siendo válidos los tres y usando cada autor la que es de su preferencia.

Dicho género, tal como lo definió Lehmann y Neumann, consta de un gran número de bacterias, las cuales se diferencian por los flagelos y por su actividad bioquímica. Lo dividen en muchos subgéneros, siendo dos de ellos de interés en Patología Vegetal: *Bacterium* propiamente dicho, con flagelos perítricos, y *Pseudomonas*, con flagelos polares. El género *Pseudomonas* guarda el carácter original en todos los sistemas.

Dowson (1939), viendo los caracteres de crecimiento, flagelos y actividad bioquímica de las bacterias fitopatógenas, las clasificó en tres grupos principales, según se expone en el cuadro núm. 1.

En él se ve claramente que el género *Pseudomonas* tiene una actividad bioquímica diferencial que le separa fácilmente de los otros dos grupos de bacterias fitopatógenas, *Bacterium* y *Xanthomonas*. Dicha actividad diferencial es que las bacterias del género *Pseudomonas*, en medios que contengan nitrógeno inorgánico, no fermentan la lactosa y el glucósido salicina.

Si a esto se une que rarísimas veces produce ácido en medios con maltosa, tendremos tres puntos importantes para la diferenciación del género *Pseudomonas:* no producir la fermentación de la salicina, de la lactosa y de la maltosa.

Cuando estudiamos con detalle en la bibliografía el comportamiento de los *Pseudomonas* frente a la leche tornasolada, observamos que el *Pseudomonas savastanoi* alcalinizaba la leche tornasolada, así como la mayoría de los *Pseudomonas*.

En nuestros trabajos, de acuerdo con lo expuesto, hemos tomado como datos para diferenciar los *Pseudomonas* de otras bacterias fitopa-

tógenas, su comportamiento bioquímico frente a salicina, lactosa y maltosa y frente a la leche tornasolada, aparte de otros datos deducidos del estudio microscópico, etc., de estas bacterias.

Sobre la identidad del micoorganismo de la tuberculosis del olivo se han hecho estudios por E .F. Smith (1905) y por L. Petré (1907), los cuales han probado de modo evidente que las bacterias aisladas y estudiadas por diversos autores no son idénticas.

La forma descrita por Savastano corresponde en gran parte el *Ascobacterium luteum* Babés, que no es el organismo productor de la hiperplasia, pero que se encuentra a veces asociado a la verdadera bacteria patógena, a la cual se debe la producción de las alteraciones, ya obtenidas por Savastano mediante inoculaciones con cultivos de la bacteria por él observada, cultivos que eran evidentemente impuros.

El *Ascobacterium luteum* produce colonias blancas que posteriormente se vuelven amarillas; funde lentamente la gelatina y no forma esporas; es móvil por medio de flagelos perítricos. Dicha bacteria ha sido encontrada también por Peglión en la tuberculosis de las adelfas, de la cual tampoco es la causa.

Tampoco el *Bacillus oleae,* descrito por Schiff, es el verdadero agente patógeno. Produce colonias con lóbulos recortados, funde la gelatina y es esporulado.

La verdadera especie productora de tubérculos, según Petré, es la aislada por E. Smith, que está formada por bastoncillos móviles, con varios flagelos en las extremidades, no reunidos en un haz, y que no funden la gelatina ni producen esporas.

Petré, experimentando con estas bacterias, que aisló cuidadosamente, sólo pudo obtener la reproducción de la enfermedad al inocular la forma Smith, siendo este último autor quien ha designado a la bacteria patógena con el nombre de *Bacterium savastanoi.*

Según Schiff-Georgini, la bacteria por ellos aislada sería capaz de secretar amilasa, la cual actuaría sobre el almidón contenido en los tallos de la planta, resultando su acción muy perjudicial.

Los *Pseudomonas savastanoi* son bacterias Gram-negativas, aerobias, de forma de bastón, siendo su tamaño de 0,4-05, × 1,2-1,5 micras. Su temperatura óptima es de 25 a 26° centígrados; la mámixa, de 34 a 35° centígrados, y la mínima de 12° centígrados, siendo la temperatura mortal de 43-46° centígrados. Son bacterias móviles, provistas de 2 a 7 flagelos polares. Rarísimas veces, según algunos autores, en pre-

paraciones teñidas pueden verse flagelos en ambos polos, como si fuesen organismos lofótricos, pero que en el caso de los *Pseudomonas* in-

CUADRO NUM. 1

MEDIO	*Bacterium*	*Pseudomonas*	*Xanthomonas*
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Agar - caldo en tubo inclinado.	Flagelos perítricos. Crecimiento blanco sucio.	Flagelo polar. Crecimiento blanco con fluorescencia verdosa.	Un flagelo polar. Crecimiento amarillo.
Agar-caldo-glucosa en tubo inclinado.	Crecimiento blanco a gris, brillante.	Crecimiento blanco (nunca gris) brillante.	Crecimiento abundante viscoso.
Patata estéril.	Crecimiento crema a blanco sucio, más tarde amarillento.	Crecimiento crema, más tarde pasa a color pardo.	Crecimiento amarillo abundante, viscoso; digiere la patata.
Salicina en un medio con N. inorgánico y con bromocresol púrpura de indicador.	Producción rápida de ácido, o ácido y gas.	No ácido.	No ácido.
Lactosa en un medio con N. inorgánico y con bromocresol púrpura de indicador.	Acido, o ácido y gas o no ácido.	No ácido.	Solamente ácido.

dica que la célula bacteriana está próxima a dividirse, y así, cada célula hija estaría provista de uno o más flagelos polares procedentes de la célula madre antes de la separación.

Schiff ha podido obtener en cultivos a 37° la formación de esporas, que parece ser no se forman en la naturaleza, en los tubérculos; tales esporas medían 1,5 × 1 μ.

En diversos medios de cultivo (agar-caldo y agar-caldo-glucosa) producen en cantidad variable un pigmento fluorescente, el cual se difunde por el medio para producir ligera fluorescencia verde amarillenta. Se

extrae con cloroformo como un pigmento verde amarillento, que se decolora por los ácidos, y que recobra su color al neutralizar dicho ácido (Walter y Tobie, 1945),

En medios de cultivo, tales como agar-caldo, produce colonias blancas, redondas, lisas, planas, brillantes y de bordes enteros.

En gelatina, en placas, produce colonias con borde ondulado, lobulado o inciso, y en caldo, velo en el segundo día y película incompleta.

En los meses de verano, la bacteria es capaz de fundir la gelatina, mientras que en primavera y en el invierno esto no sucede.

En la patata da coloración parda, que a menudo es oscura.

En el suero coagulado no hay licuefacción.

En solución de Cohn tiene buen desarrollo sin fluorescencia, y en la solución de Uschinsky produce ligero enturbiamiento con crecimiento blanco, ligera película y no produce fluorescencia.

Hidroliza el almidón. Produce ácido y no gas de sacarosa, glucosa y galactosa.

Como hemos dicho anteriormente, Dowson (1939) dice que estas bacterias fermentan, con producción de ácido, los azúcares xilosa, dextrosa, manosa, sacarosa y el polialcohol glicerina, mientras que no son fermentadoras de la salicina, lactosa y maltosa.

Sobre la leche tornasolada produce fuerte alcalinidad, y en la leche sola aclaramiento sin coagulación.

No reduce los nitratos y produce escaso indol y no hidrógeno sulfurado.

No descompone el aceite de algodón. No es lipolítica.

Puede ser huésped de los siguientes árboles: *Olea* sp., *O. Chrysophilla. O. europea* var: *oleaster. O. europea* var: *sativa. Chionantus virginica, Forestiera acuminata, F. neomexicana, Fraxinus floribunda, F. velutina, F. angustifolia, Jasminum primulinum,* etc.

La enfermedad es conocida con diferentes nombres, tales como el ya citado de tuberculosis del olivo, roña, verrugas, y en el extranjero se la conoce por: Rogna, tuberculosi, maladie de la loupe, gale; Bakterienknoten des Oelbaumes, krebsknoten, etc.

2. *Difusión de la enfermedad.*

Las bacterias que producen esta enfermedad no atacan a los olivos cuando éstos tienen sus ramas sanas y son, por tanto, unas bacterias pa-

rásitas de heridas, siendo las lesiones y picaduras producidas por los insectos la principal vía de entrada de la infección, que también puede penetrar por las heridas producidas en la poda, fríos, granizos, lluvias y en la recolección (principalmente si es por el procedimiento del vareado).

Autores como Vuillemin piensan que un hongo, *Choetophoma oleacina* (Vuill), abre también el camino al *Pseudomonas savastanoi,* aunque otros autores creen que no es necesaria la presencia de este hongo para que se produzca la infección del olivo.

Una de las formas más comunes de infectar esta bacteria es penetrar en la corteza de las ramas del olivo por medio de las pequeñas heridas que causa en ellas la llamada mosca del olivo, *Dacus oleae* Rossi, en la puesta de huevos.

Ello ha sido demostrado por Petri en Italia (1910, citado por Leach, 1940). Estos insectos albergan la bacteria y luego ponen huevos contaminados.

No todos los olivos son atacados igualmente, y así, el llamado «Redondillo o Carrasqueño» no es propenso a tener agallas, mientras que el llamado «Lechin» *(Olea ovalis,* Clem) es atacado fácilmente.

Se ha visto que la variedad denominada «Cornezuelo» *(Olea europea ceraticarpa* de Clemente; *O. odorata* de Ros), que se cultiva muy bien en el centro de España, produce las agallas fácilmente y en abundancia.

3. *Distribución geográfica.*

Esta enfermedad existe en toda España, y además en Portugal, Francia, Italia, Norte de Africa, Asia Menor, América (California), Méjico y Argentina. En este país la enfermedad se ha transmitido por los viveros de olivos, ya que al principio desconocían la enfermedad, tanto los viveristas como los agricultores. Es una enfermedad que está extendida principalmente en zonas de clima seco, donde no parece producir disminución en el rendimiento de las cosechas y en el desarrollo normal de los árboles. En general, puede decirse que es una enfermedad típica de los olivos de la zona mediterránea.

4. *Características de la enfermedad.*

Esta enfermedad ha sido bien estudiada en América por Erwin Smith (1920) y en Portugal por D'Oliveira (1939), aparte de otros investigadores.

En general, los microorganismos causan sus efectos patógenos por medio de las toxinas que producen. En el campo de la Medicina han sido muy estudiadas dichas toxinas, pero en el campo de la Patología Vegetal sólo hace poco tiempo que empiezan a ser estudiadas.

Exponemos a continuación una de las recientes teorías sobre la formación de tumores vegetales (E. Gäumann, 1954).

Los parásitos productores de toxinas se pueden clasificar en dos grupos: parásitos toxigénicos con acción de corto alcance, y parásitos toxigénicos con acción de largo alcance. A nosotros nos interesa solamente el primer grupo, pues las toxinas incluídas en él actúan directamente sobre los tejidos que circundan el foco de infección y en los que el lugar de la enfermedad coincide más o menos con el de la infección, de manera análoga a lo que sucede en la formación de los tumores del olivo, por el *Ps. savastanoi.*

La formación de agallas o tumores bien podría ser debida a la acción conjunta de diferentes toxinas segregadas por la bacteria infectante.

Se sabe en el caso del *Bacterium tumefaciens* (agente productor de agallas en diversas plantas) que la formación de tumores se lleva a cabo en dos formas: una fase alterativa y un período de proliferación neoplástica.

Durante la fase alterativa las células del huésped atacadas por el factor irritante rompen las conexiones interiores y se convierten en células tumorales en potencia, las cuales son incapaces por sí solas de desarrollarse y dar las verdaderas células tumorales. Esta segunda fase no tiene lugar hasta que aumenta debidamente la concentración de sustancias promotoras del crecimiento.

El parásito por sí mismo no aumenta la cantidad de sustancia promotora del crecimiento, sino que lo que hace es excitar al huésped a la producción de ella.

En este caso concreto intervienen dos toxinas durante la formación de los tumores por *Bacterium tumefacienes,* una toxina alterativa que obliga a las células vegetales normales a convertirse en células tumo-

rales en potencia, y una toxina estimulante del factor de crecimiento que induce en el huésped la producción anormal de dicho factor, y, en consecuencia, la proliferación neoplástica.

Hasta ahora no han sido identificadas estas toxinas, pero en el caso del *Pseudomonas tabaci,* productora en el tabaco de una especie de «sarpullido» que algunos países llaman «rayo del tabaco», han aislado una sustancia tóxica llamada tabtoxinina, que la produce el parásito en el foco central de infección, y de donde se difunde por todos los tejidos de su alrededor.

En la formación de tumores, según diversos autores, también intervienen las hormonas vegetales.

Entre las hormonas vegetales tienen especial interés las auxinas, descubiertas por F. W. Went en 1928, y cuya composición química, según Kögl y Haagen-Smit (1936), corresponde con la del ácido indolacético.

Entre las numerosas actividades fisiológicas de las auxinas están las que ejercen sobre los meristemos, habiéndose comprobado que concentraciones elevadas de ácido indolacético en forma de pasta, aplicadas sobre diversos tallos vegetales cortados, provocan la formación de hinchazones o callosidades en el lugar de aplicación o sus cercanías. Por estudios histológicos se ha comprobado que tales hinchazones no son solamente el resultado del alargamiento de las células preexistentes, sino de la formación de células nuevas, habiéndose alterado el proceso normal de diferenciación.

Si una parte de estas callosidades que no tenga microorganismos se traslada asépticamente a un medio nutritivo estéril con azúcares, sales minerales, etc., la callosidad sigue creciendo con tal que se la suministre auxina, y la velocidad y naturaleza del crecimiento producido depende de la concentración de auxina suministrada.

En la naturaleza los tumores que se producen por la acción de diversos microorganismos tienen un metabolismo en sus tejidos diferente al de las callosidades antes mencionadas. Así, si una porción de tumor de origen bacteriano (aunque no contenga bacterias) se traslada a un medio de cultivo que contenga azúcar y sales minerales, su crecimiento continúa, aun en ausencia de las bacterias y sin añadir auxina alguna.

En cambio, el tejido calloso, como hemos dicho, exige la adición de auxina para poder continuar creciendo, habiéndose demostrado mediante análisis que los tejidos de la agalla son capaces de producir auxina por sí mismos y aun de transferirla a un cultivo «in vitro».

De aquí parece deducirse que una diferencia entre las células de los tumores malignos y las de las callosidades es la posibilidad o no de producir auxina.

Por no necesitar los tumores las auxinas, ni otros factores de crecimiento procedentes de la planta huésped, se los puede considerar como relativamente autónomos y separadamente del control hormónico que integra el crecimiento, y así pueden crecer tan rápidamente como les permitan el agua, sales minerales, azúcares, etc., que puedan obtener de la planta madre. El agente fisiológico relativamente autónomo de los tumores puede repartirse por toda la planta, produciendo nuevos centros de actividad tumorígena.

Por lo que hemos expuesto, vemos que diversos autores consideran la formación de tejido tumoral como una forma de diferenciación química que se puede resumir en: 1.° La facultad para originar sustancias del crecimiento. 2.° Para provocar actividad meristemática.

La diferenciación en los tejidos normales puede ser inducida por la influencia del tejido tumoral. El agente que interviene en la inducción del proceso diferencial puede ser una bacteria o un virus.

La investigación del mecanismo de formación de los tumores vegetales y su relación con el cáncer animal está siendo ampliamente estudiado por De Ropp, R.; White, P. R.; Gautheret, R. S.; Nobecourt, P.; Morel, G., y otros.

En cuanto a la morfología externa del tumor, al principio de la infección son ligeros abultamientos, que al crecer, generalmente a los tres o cuatro meses, se hacen voluminosos y se redondean irregularmente.

Estos abultamientos se conocen con el nombre de excrecencias, agalla o tumores. Este tipo de enfermedad que origina la formación de agallas son propias de plantas que se propagan por injerto.

Son de naturaleza esponjosa o caseosa y no persistentes, presentando en la superficie fisuras irregulares.

Estos tumores se asientan generalmente en las ramas jóvenes, heridas de poda, yemas, pecíolos, y raramente en los frutos. Wilson, en 1933, los reprodujo experimentalmente en los frutos. A veces se encuentran grandes tumores en la parte baja de los troncos, y aun en las mismas raíces.

La infección, al residir principalmente en las ramas jóvenes, hace que éstas sean poco desarrolladas y se quiebren fácilmente, con la consiguiente pérdida en la producción de fruto.

Diversos autores clasifican los tumores en primarios y secundarios, formándose estos últimos por emigración vascular del agente patógeno que penetró por una herida.

La bacteria, al llegar al parénquima cortical, produce una hiperplasia primero, y luego una destrucción de los tejidos, dando lugar a las cavidades que excavan el tumor poco a poco. En dichas cavidades se alojan las bacterias. Esta enfermedad recibe diversos nombres, según la zona de ataque en el olivo, y así tenemos la tuberculosis cortical, liberoleñosa, etc.

D'Oliveira (1939) encuentra que la intervención de los hongos como agentes secundarios puede, hasta cierto punto, modificar el aspecto general y cuadro de la enfermedad, y también por estudios que ha realizado dice que este parásito del olivo, fuera del huésped y en el huésped natural, lleva consigo el poder de imprimir a cualquier planta que infecte el tipo de lesiones que le es peculiar.

5. *Distribución del microorganismo en los tumores.*

Como hemos dicho anteriormente, las bacterias productoras de esta enfermedad se encuentran localizadas principalmente en las cavidades que ellas mismas producen en los tumores.

D'Oliveira, al observar los tumores producidos por la tuberculosis del olivo, mediante cortes histológicos, hace notar que la infección no acarrea la muerte de las células; antes bien, ejerce un efecto estimulante sobre la división, observándose pocos o ningunos casos de degeneración en las células vecinas a las cavernas.

Las cavernas formadas están limitadas por una pared muy delgada, estando rodeadas por células de aspecto normal. Las células que rodean las cavernas tienen apariencia y dimensiones normales, y las bacterias se encuentran uniformemente distribuídas por todo el tumor, sin que la actividad de la división celular cese.

En estos tumores parece ser que hay un equilibrio entre la actividad del huésped y el parásito, y que se mantiene por un tiempo relativamente largo.

Parece ser que el agente de la tuberculosis produce un estímulo en la multiplicación celular que se difunde por las células de alrededor del

punto de infección, produciendo una desordenada división celular que lleva consigo la producción de una hiperplasia.

Los tumores continúan el crecimiento de un año para otro, y a no ser en las lesiones muy viejas en que posiblemente intervienen agentes secundarios, no se encuentran tejidos necrosados o destruídos. Lo más frecuente es que intervengan insectos que ataquen los tejidos tiernos o esponjosos de los tubérculos y a la vez hongos que actúan como parásitos o se instalan como saprofitos.

Algunos autores, tales como Edwin J. Butler y S. G. Jones (1949), dicen que hay bacterias que producen enzimas que disuelven los polisacáridos de la pared celular de los vegetales en donde se alojan, después de haber penetrado por una herida, etc., o bien atacan el almidón, penetrando así en el interior de las plantas, produciendo cavidades o cavernas. Este podría ser, aunque con variaciones, el origen de las cavernas de los tumores producidos por el *Pseudomonas savastanoi.*

Las bacterias se encuentran en el interior de las células del tumor en el agua de imbibición.

6. *Medios de lucha utilizados.*

Actualmente hay muy poco información publicada acerca del valor del uso de los antibióticos en la protección de las plantas y parte de las investigaciones que se dedican a ello, están dirigidas a estudiar los antibióticos que dan buenos resultados en la terapéutica humana.

El problema del uso de antibióticos puede enfocarse de dos maneras: mediante el uso de ellos en estado puro y concentrado, en forma de pulverizaciones, polvos y desinfectante de las semillas o del suelo, o bien se puede indirectamente explotar su acción controlándolos biológicamente por antagonismo microbiano.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las bacterias patógenas de plantas son Gram-negativas, y que la estreptomicina es activa sobre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, los ensayos experimentales que se han hecho con este antibiótico han tenido buen éxito, y los dos grandes grupos de bacterias patógenas, *Xanthomonas* y *Pseudomonas,* han resultado ser extraordinariamente sensibles a la estreptomicina.

La estreptomicina, y también la penicilina, se han usado como control eficaz de los tumores. Para ello se colocan alrededor de la agalla aérea

compresas de algodón que están empapadas en la preparación en bruto o de segundo grado del antibiótico, o se sumergen las raíces y copas de las plantas en la solución, o también inyectando el material en el tallo, y se puede comprobar después de pasado cierto tiempo que no sólo se detiene la enfermedad, sino que se destruyen los tumores ya desarrollados, los cuales terminan secándose.

Hay diferentes opiniones sobre los efectos de los antibióticos en los tejidos de las agallas. Diversos investigadores ven que cuando emplean preparaciones puras de los antibióticos corrientes, en los estudios sobre cultivos de tejidos, no se produce regresión alguna del tejido del tumor.

La frecuencia de la disparidad en los resultados que se obtienen en estas investigaciones las explican muchos autores diciendo que los materiales usados no son de producción uniforme (Erna Grossbard, 1951).

En los medios agrícolas la lucha contra la difusión de la enfermedad se puede resumir en tres puntos principales: 1.º Poda hábil. 2.º Desinfección de la superficie del corte. 3.º Desinfección de los utensilios usados en la poda.

Un buen método consiste en cortar los tumores cuando aparecen y después desinfectar las heridas producidas por el corte y las herramientas usadas con sublimado corrosivo al 1 por 1.000. En el caso de que los tumores sean de gran tamaño, es muy difícil eliminar la enfermedad por simples cortes del tumor.

Si la infección empieza por las ramas jóvenes, aconsejan como práctica curativa cortarlas por entero y luego quemar los restos.

Las heridas producidas al extirpar el tumor se deben tratar con sublimado corrosivo y después cubrirlas con caldo bordelés o con ácido fénico al 5-6 por 100.

Algunos autores recomiendan cubrir las heridas con un mastique cualquiera como cera, pez, alquitrán, etc., para protegerlas de las influencias externas.

Un método preventivo de nuevas infecciones consiste en rociar los olivos con caldo bordelés, y si los tumores son abundantes, recomiendan que esta práctica sea repetida en diferentes meses del año, tales como noviembre, diciembre y marzo (Smith, 1941).

Es también recomendado que las estacas que se destinan a la multiplicación sean perfectamente sanas, y que se usen preferentemente las plantas que procedan de semillas, olivos o acebuches obtenidos en viveros y que no presenten ninguna agalla. Suprimir las ramas muy ata-

cadas y si es posible evitar la humedad excesiva del terreno y las fuertes estercoladuras, pues estos dos factores favorecen considerablemente el desarrollo de la enfermedad.

Aconsejan también suprimir el vareado, por ser un procedimiento brutal de recolección del fruto, pues destruye los brotes jóvenes que deben llevar el fruto al año siguiente, favoreciendo el vecerío natural, a la vez que las heridas que origina son la puerta de entrada de las bacterias productoras de la enfermedad. Actualmente se trata colectivamente esta enfermedad en determinados lugares, cuando así es aconsejable, mediante la acción del Estado, declarándose obligatorios los tratamientos que se consideren necesarios.

Los primeros períodos del tratamiento se hacen por los servicios del Estado o paraestatales, bajo la vigilancia de aquél.

Después se reduce la acción del Estado solamente a la inspección, cuando los tratamientos se verifican de una manera espontánea por los particulares por haber apreciado el agricultor las ventajas del tratamiento.

MATERIAL Y METODOS

Primeramente en nuestro trabajo hemos procedido a la recogida de muestras de olivos infectados por *Pseudomonas savastanoi.*

Para poder realizar un estudio más amplio de estas bacterias, se recogieron muestras de distintos puntos de España, pues nuesto plan de trabajo era en un principio intentar clasificar las distintas estirpes de *Pseudomonas* que infectan los olivares españoles.

Así, se ha trabajado con muestras procedentes de Aragón, Cataluña, León, Castilla la Nueva y Andalucía, y se ha procedido a realizar las técnicas de aislamiento e identificación, logrando al final de la experiencia contar con un total de 20 estirpes de *Pseudomonas* diferentes.

Se ha trabajado también con *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis,* que han intervenido parcialmente en estas experiencias.

Entre los *Pseudomonas* con los que hemos trabajado figuran alguno de la colección de W. J. Dowson.

Como hemos expuesto al hablar en general del *Pseudomonas savastanoi* como agente causal de la tuberculosis del olivo, nosotros nos hemos fijado para el aislamiento e identificación en el comportamiento de las bacterias aisladas del tumor en los medios con nitrógeno inorgánico

que llevasen salicina, lactosa y maltosa, y también viendo su comportamiento en leche tornasolada.

Se observó que en esta última algunas bacterias que procedían de los aislamientos hechos a partir del tumor producían una alcalinidad fuerte que coincidía con la descripción que se hace en las bibliografías de los *Pseudomonas* patógenos de plantas y que siempre que se procedía a la identificación de cultivos bacterianos en leche tornasolada, eran los *Pseudomonas* los que producían dicha alcalinidad, la cual, en presencia de lactosa y ausencia de otros azúcares, podía ser un dato no sólo de interés, sino de indudable valor práctico, pudiendo también utilizarse como punto de partida para preparar un medio selectivo aprovechando otros materiales de cultivo.

En el caso que nos ocupa, hemos comenzado por estudiar la alcalinidad producida por estas bacterias en leche tornasolada, y para ello se ha medido en un potenciómetro durante quince días la alcalinidad progresiva producida en los cultivos en leche tornasolada por 17 estirpes bacterianas (15 estirpes de *Pseudomonas, Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis),* y se trazaron las curvas representativas de la variación de pH.

Del estudio de estas curvas se comprobó nuestra primera observación y se pudo ver que de una manera constante todas las estirpes de *Pseudomonas savastanoi* utilizadas y otros *Pseudomonas* también patógenos de plantas, iniciaban la alcalinización del medio, alcanzando a los cinco o seis días un pH aproximado de 8,5, que después viene a mantenerse casi igual, aunque con ligeras variaciones.

Tras estas experiencias se ha pensado en la realización de un medio que llevase un indicador que virase al pH mencionado y nos diera con claridad ese punto. De aquí el medio ortocresol-lactosa.

Para este medio se han hecho varias pruebas con diversos indicadores, tales como azul-timol y ortocresolftaleína, usando como medio base la leche; con el azul timol los resultados no fueron buenos, pues el cambio de color al producirse el viraje no fué al color azul (viraje alcalino), sino a verde sucio. Por esta razón se desechó el indicador azul de timol.

Pensando que el resultado no satisfactorio proviniera de haber usado leche, se sustituyó ésta por un medio sólido bastante sencillo que llevaba caseína y lactosa, las cuales eran adicionadas en cantidad variable a la solución base que se usa corrientemente para preparar los medios con azúcares, y a la que se agregaba también agar-agar.

Con este medio se intentó hacer una leche artificial para ver si en ella lográbamos observar el viraje alcalino claramente.

Tras de solucionar los problemas que presentaba la insolubilidad de la caseína en el medio base, vimos que las esterilizaciones que se llevaban a cabo con el medio ya preparado le daban a éste un color chocolate claro que hacía imposible cualquier observación.

Por estas razones se pensó sustituir la leche por un caldo, que llevaba lactosa en determinada proporción, y al cual agregamos el indicador ortocresolftaleína que usamos en esta experiencia.

Tras varias pruebas preliminares, en las que se ha variado la proporción de lactosa, pH, etc., aceptamos como bueno por los resultados obtenidos el medio que lleva 2 por 100 de lactosa, el indicador en la proporción de 0,4 gram. de ortocresolftaleína para 1.000 c. c. de caldo de carne y el pH ajustado a 7. El indicador se agrega solubilizado en sosa normal en la proporción del 2 por 100.

Los resultados observados al sembrar en el medio ortocresol-lactosa las distintas estirpes de *Pseudomonas,* han sido la obtención de un viraje del color del caldo natural que posee el medio preparado, al color rojo, en un principio débil y después más acentuado (aproximadamente hasta rojo sangre).

Este cambio se produjo entre los seis y ocho días de incubación a 25° C.

Creemos por los resultados que hemos obtenido, que el medio ortocresol-lactosa es interesante para el aislamiento e identificación no sólo del *Pseudomonas savastanoi,* sino también de otras estirpes del género *Pseudomonas,* patógenas de plantas.

El uso de este medio tiene la ventaja, como nosotros hemos comprobado experimentalmente, de acortar el tiempo de aislamiento e identificación de las bacterias del género *Pseudomonas,* patógenas de plantas, que cuando se hace por los métodos usuales en Microbiología, en el caso del *Pseudomonas savastanoi* requiere como mínimo veintiocho días.

Se ha visto también que este medio puede servir para aislar e identificar directamente el *Pseudomonas savastanoi* a partir del tumor con el consiguiente ahorro de trabajo.

Otro resultado que se ha observado con este medio es que el indicador ortocresolftaleína no es bactericida, sino que, más bien, es un estimulante del desarrollo bacteriano.

También se ha estudiado en este trabajo la influencia de la proporción de indicador y del pH con que se prepara dicho medio, observándose que pueden influir retrasando el viraje, pues cuando es de 0,1 gramos de ortocresolftaleína por 1.000 c. c. de caldo la proporción del indicador y el pH es inferior a 7, los cambios de color se retrasan notablemente.

A) *Muestras.*

Para el aislamiento de las diferentes estirpes de *Pseudomonas savastanoi* se ha trabajado con material procedente de los lugares que se citan a continuación:

Muestra núm. 1.—Se recogió el día 9 de enero de 1952 de un olivar situado en la prolongación del Paseo de la Castellana de Madrid, en el sitio conocido por Hotel del Negro. Se trata de una plantación antigua con escaso número de árboles, bastante separados entre sí, y que presentan escasos síntomas de infección.

Los tumores en general eran viejos y la infección se manifestaba en las partes altas de los tallos superiores de los olivos. Estos tumores presentan la superficie resquebrajada.

Muestra núm. 2.—Recogida el 18 de febrero de 1952 en un olivar que se encuentra junto al depósito del Este del Canal de Isabel II.

Los olivos son poco numerosos y están separados. Es de notar que de donde se tomaron las muestras eran árboles muy infectados y que a pocos metros se encontraban árboles completamente sanos.

De esta muestra se sacaron dos estirpes de *Pseudomonas savastanoi,* que se consideran diferentes por su distinto comportamiento en los medios de cultivo.

Muestra núm. 3.—Recolectada por el doctor Lucas Guillén Briones el día 9 de febrero de 1952. La variedad del olivo es «Correal» para aderezo, y está cogida en el lugar llamado «Sevilleja» de Bailén (Jaén). Terreno de sierra.

Muestra núm. 4.—Idem íd. «Variedad para aceite». Localidad, Bailén (Jaén). Lugar, «Sevilleja». Terreno de sierra.

Muestra núm. 5.—Idem íd. Localidad, Bailén (Jaén). Lugar, «Loma de Soriano». Terreno de campiña. Variedad llamada «Aceite».

Muestra núm. 6.—Recolectada por el señor Blanco Morales, director del Centro de Enseñanza Media y Profesional de Ecija, el día 7 de

febrero de 1952. La variedad del olivo es «Lechin». Terreno arcilloso-silíceo. Localidad, Ecija (Sevilla). Lugar, «Finca Arrecife». Edad de los tumores, de ocho a diez meses.

Muestra núm. 7.—Recolectada por el señor Lagos el día 12 de febrero de 1952. Localidad, Toledo, Lugar, kilómetro 45.

Muestra núm. 8.—Enviada por la «Estación olivarera de Tortosa» el día 18 de febrero de 1952, y recibida al 23 del mismo mes.

Muestra núm. 9.—Se recogió en Pradera Alta de Gurrea de Gállego (Huesca), al borde del camino; las ramas jóvenes y tallos apenas presentan síntomas de infección. El tronco y ramas inferiores tenían tubérculos.

Las muestras utilizadas para el aislamiento corresponden a estos últimos, y su recogida se hizo el 17 de octubre de 1952.

Muestra núm. 10.—Recogida por la señorita María Suárez, profesora del Instituto Laboral de Almendralejo. Localidad, Almendralejo. Lugar, «Los Escobedos». Variedad del olivo, «Basta».

Muestra núm. 11.—Recogida por el doctor Miguel Rubio en Fregeneda (Salamanca) el 15 de febrero de 1953, y recibida el 16 del mismo mes.

Muestra núm. 12.—Esta muestra de tumores se tomó de un olivar pequeño, de árboles poco desarrollados y muy contaminados que presentaban tumores, en su mayoría abiertos y viejos. Este olivar está situado entre los kilómetros 23 y 24 de la carretera de Madrid a Toledo, en la margen izquierda.

Para estudiar la conservación de los microorganismos en el interior del tumor, se realizaron en esta muestra de olivo dos aislamientos: uno, en el mismo día de la recogida, y otro, siete meses después. En este intervalo las muestras de olivo fueron conservadas a la temperatura ambiente y en nevera de 4° C. Esta muestra se recogió el 19 de febrero de 1953.

Muestra núm. 13.—Tomada el día 7 de junio de 1953 en el kilómetro 24 de la carretera de Madrid a Guadalajara. El olivar está situado al lado izquierdo de la carretera y hay algunos almendros entremezclados; algunos de los olivos están muy contaminados y otros están bastante sanos. Los olivos no son muy viejos.

Muestra núm. 14.—Se recogió el 13 de septiembre de 1954 en un olivar situado en la carretera de Torrelaguna-El Escorial (Central Eléc-

trica de Torrelaguna del Canal de Isabel II). Es un olivar que está muy infectado y es poco numeroso; a pocos metros de este olivar se encuentra otro que no presenta síntomas de contaminación.

B) *Toma de muestras.*

Los tumores que escogimos para el aislamiento eran, en general, tumores jóvenes que mostraban la superficie entera o poco resquebrajada y de color castaño claro. A pesar de ser consistentes, no eran de naturaleza coriácea, como los tumores viejos.

En esta elección para el aislamiento, seguimos y luego comprobamos experimentalmente, la certeza de lo recomendado por Smith y Erwin F. (1905), los que recomiendan la elección de tumores jóvenes, ya que cuando se realiza el aislamiento a partir de los tumores viejos, se saca gran variedad de organismos saprofitos que, como es lógico, complican y alargan las técnicas de aislamiento.

Los tubérculos recogidos se guardaron siempre en condiciones de humedad relativa, hasta el momento de proceder a su examen.

C) *Técnica de aislamiento.*

Escogido el tumor, se somete durante diez minutos a la acción de una solución clorhídrica de cloruro mercúrico de fórmula:

Cl. H	1,75	c. c.
Cl_2. Hg.	0,5	gr.
H_2O destilada	250,0	c. c.

Pasado el tiempo de contacto la superficie del tumor queda aseptizada, con lo que se evita gran número de contaminaciones. Se lava repetidas veces con agua estéril para eliminar los vestigios de solución mercúrica.

Así preparado el tumor, se desmenuza en agua estéril con ayuda de un punzón y escalpelo, también estériles, con el fin de hacer una suspensión de las bacterias incluídas en él.

De esta suspesión se siembra con asa de platino en placas de agar-glucosa-levadura, siguiendo la técnica de aislamiento en espiral para la obtención de colonias. Los resultados se observaron a los cuatro días de incubación a 25° C.

De las colonias características se realizaron siembras en tubos de agar inclinado, para la obtención de cultivos puros. De todos los cultivos se estudiaron sus características morfológicas, tintoriales, bioquímicas, etc., y se controló periódicamente su estado de pureza.

D) *Microscopia óptica.*

Teniendo en cuenta que las reacciones tintoriales son de marcado interés para la identificación, se ha realizado con las estirpes bacterianas aisladas las siguientes pruebas, según las técnicos corrientes en Microbiología: tinción de Gram, tinción de esporas por el método de Wirtz, tinción de cápsulas por el método de Antony y tinción de flagelos por los métodos de Gray, Loeffler y Casares Gil.

Estas técnicas se han utilizado con todas las estirpes de *Pseudomonas* aisladas e identificadas por los diversos medios que hemos citado, aun cuando en las primeras muestras se hicieron con todas las bacterias saprofitas que acompañan a los *Pseudomonas,* con el fin de estudiar perfectamente su diferenciación con estas últimas.

En las tinciones de flagelos, como no obteníamos resultados satisfactorios por las técnicas generalmente recomendadas, pues estas bacterias que estudiamos crecen generalmente embebidas en una sustancia viscosa y también por la especial labilidad de estos elementos bacterianos, se recurrió a llenar de agua estéril el tubo que contiene el cultivo de la bacteria en agar inclinado y dejarlo en reposo durante diez minutos, tiempo en el cual las bacterias sin deteriorar sus flagelos quedan en suspensión; esta ligera suspensión se trasvasa o no a otro tubo, y de aquí, con una pipeta Pasteur, se depositan unas gotas sobre un portaobjetos muy limpio.

El portaobjetos se inclina y se deja escurrir la gota suavemente, esperando para hacer la tinción a que la preparación se haya secado.

Como es sabido, estas preparaciones no se fijan al calor.

El dato que proporcionan los flagelos, tales como el número y disposición de ellos, es importante para la identificación de los *Pseudomo-*

nas, ya que estas bacterias fitopatógenas se caracterizan por tener dos o más flagelos polares. Con ayuda del microscopio electrónico hemos logrado ver bacterias con diferente número de flagelos.

Es curioso señalar que el grupo *Pseudomonas* y otros pocos, como los que comprenden *Thiobacillus* y *Nitrosomonas,* tienen el flagelo terminal, pues, en general, las bacterias de forma de bastón y que nadan libremente lo llevan lateral. G. Knaysi (1951).

E) *Medios de cultivo.*

Los medios de cultivo se han seleccionado entre los más corrientes, señalados por diversos autores como de valor selectivo y de enriquecimiento para las bacterias patógenas de plantas.

Se ha empleado caldo, agar-caldo y agar-caldo-glucosa, y se ha podido apreciar que el crecimiento de los *Pseudomonas* es muy superior cuando se cultivan en medios glucosados.

También se han empleado azúcares (xilosa, sacarosa, galactosa, glucosa, lactosa y maltosa), glucósidos (salicina), polialcoholes (glicerina), gelatina, leche tornasolada, así como producción de hidrógeno sulfurado, nitratos, amoníaco e indol, y el medio ortocresol-lactosa, que más adelante se describirá como selectivo para las bacterias alcalinizantes fitopatógenas.

F) *Estirpes bacterianas.*

Las estirpes bacterianas que se han utilizado en este trabajo corresponden a las aisladas de las muestras de olivo que más arriba hemos mencionado, incluyendo el estudio de las saprofitas para llegar a las conclusiones de identificación en que basamos estos ensayos.

Las estirpes bacterianas aisladas por nosotros y procedentes de las muestras de olivo son las siguientes:

Muestra n.º 1.—*Pseudomonas savastanoi* 1 (2).
» n.º 2.—*Pseudomonas savastanoi* 2 (2) y 2 (4) de diferente comportamiento bioquímico en los medios azucarados y en leche tornasolada.
» n.º 3.—*Pseudomonas savastanoi* 3 (3).

» n.° 4.—*Pseudomonas savastanoi* 4 (2) y 4 (4). Diferentes por su distinto comportamiento en medios azucarados.
» n.° 5.—*Pseudomonas savastanoi* 5 (1) y 5 (3), con acción diferente en azúcares y leche tornasolada.
» n.° 6.—*Pseudomonas savastanoi* 6 (5).
» n.° 7.—*Pseudomonas savastanoi* 7 (4) y 7 (5), diferentes en su comportamiento en leche tornasolada.
» n.° 8.—*Pseudomonas savastanoi* 8 (2).
» n.° 9.—*Pseudomonas savastanoi* 9 (11).
» n.° 10.—*Pseudomonas savastanoi* 10 (7).
» n.° 11.—*Pseudomonas savastanoi* 11 (4) y 11 (6), diferentes por su distinto comportamiento en medios azucarados.
» n.° 12.—*Pseudomonas savastanoi* 12 (3) y 12 (14), de diferente comportamiento bioquímico en azúcares y leche tornasolada.
» n.° 13.—*Pseudomonas savastanoi* 13 (2).
» n.° 14.—*Pseudomonas savastanoi* 14 (4).

La numeración que adoptamos de 1 (2), etc., para denominar las diferentes estirpes de *Pseudomonas,* es completamente arbitraria, significando en el caso mencionado, el 1, el número de la muestra de donde procede, y el (2), al número de la colonia del primer aislamiento que hicimos a partir del tumor.

También hemos trabajado con los siguientes *Pseudomonas:*

Pseudomonas savastanoi núm. 64, procedente de la colección del doctor W. J. Dowson de la «National Collection of Plant Pathogen. Botany School. University of Cambridge».

Pseudomonas savastanoi núms. 206, 207 y 208, procedentes de Portugal, y aisladas por la doctora María Lourdes D'Oliveira.

Pseudomonas pisi núm. 123, traída también de Portugal, y procedente de la colección del doctor W. J. Dowson (King (N. S. W.), Q. W. Wilson).

Pseudomonas medicaginis. var. *phaseolícola* núm. 52. Aislada por el doctor W. J. Dowson de «Canadian Wonder Beans» (Oldex Taylor).

Pseudomonas marginalis 289. Procedente de la colección del doctor W. J. Dowson de la «National Collection of Plant Pathogen. Botany School. University of Cambridge».

Pseudomonas syringae 294. Idem.

(Continuará.)

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

ESTUDIO BACTERIOLOGICO DEL PROCESO DE CURTICION DE PIELES MEDIANTE TANINOS

POR

J. MORALES.

Para el presente estudio hemos tenido en cuenta las principales fases por las que pasan las pieles en el proceso de curtición hasta llegar a los taninos, como también en los taninos mismos, haciendo un estudio bacteriológico de cada una de estas fases. Para la clasificación de los gérmenes aislados tuvimos en cuenta principalmente los trabajos (2), (3) y (6) de las referencias que incluímos al final de este estudio.

En primer lugar, debemos considerar los gérmenes que pueden ir con las pieles, y éstas, que son unos tejidos animales y, por consiguiente, un medio muy propio para el desarrollo de multitud de bacterias, pueden contener gérmenes muy distintos, según los tratamientos y cuidados a que hayan sido sometidas después de quitadas del animal. Cuando la piel es inmediatamente salada después de quitada del animal, el número de bacterias es muy pequeño y la conservación de la piel ofrece entonces las mayores garantías. Es corriente, en otros casos, que las pieles sean secadas a temperaturas no muy elevadas después de quitadas del animal, y de esta forma el número de gérmenos no es muy grande, pero algo mayor que cuando es salada. Finalmente, si las pieles son abandonadas durante un cierto tiempo a la temperatura ambiente, comienzan a desarrollarse innumerables gérmenes, en especial de la putrefacción, y si esta circunstancia se prolonga terminan haciendo inservibles dichas pieles, tanto más rápidamente, como es lógico, cuanto más alta sea la temperatura ambiente.

Las pieles son adquiridas para su curtición saladas, secas y más ra-

ramente tal como se quitan del animal; en todos los casos, como primera fase, las pieles son sumergidas en agua durante un tiempo de veinticuatro a setenta y dos horas, según la temperatura ambiente y el grado de sequedad de las mismas, hasta que se consigue un perfecto empapado: esta operación se llama vulgarmente «rendido», y en ella hay un gran desarrollo de bacterias de las que traían las pieles y de los agentes contaminantes. Nosotros, para esta fase y las sucesivas, hemos tomado muestras de una fábrica de curtidos de Ocaña (Toledo) y, además, hemos repetido esta operación en el laboratorio. Hemos aislado de estas aguas de «rendido» como bacterias más frecuentes las siguientes:

Micrococcus caseolyticus	40.000	millones	por	c. c.
Bacillus subtilis, var. *niger*	7.000	»	»	»
Proteus vulgaris	20.000	»	»	»
Aerobacter aerogenes	100	»	»	»

Estas cifras son las más frecuentes en las distintas muestras.

Si la acción de esta flora microbiana se prolonga mucho tiempo sobre la piel, pueden ser atacadas de tal forma que la hagan inservible, y es aconsejable, en el caso que sea necesario prolongar el tiempo de rendido, adicionar un antiséptico, o al menos renovar el agua, para disminuir el número de gérmenes existentes.

Después del «rendido», por lo general, las pieles son depiladas con sulfuro sódico o lechada de cal, con lo cual, además del depilado, se consigue una fuerte alcalinización, y la putrefacción, que siempre se inicia más o menos en la fase anterior, es detenida por esta alcalinidad. Después del depilado, las pieles permanecen de ocho a quince días en una suspensión de hidróxido cálcico aproximadamente al 20 por 100, donde se realiza una hidrólisis de los tejidos, muy conveniente para la flexibilidad y otras propiedades de las pieles curtidas. En esta operación las pieles quedan completamente asépticas de los microorganismos que contenían y no hemos podido aislar ningún germen de las muestras tomadas en esta fase; además, hemos puesto diversas bacterias, entre ellas varias esporuladas, en contacto con una suspensión de hidróxido cálcico semejante a la que se emplea en la industria, comprobando posteriormente que no sobrevivía ninguna de ellas, si bien el *Bacillus megatherium*, por ejemplo, perdura hasta cuarenta y ocho horas en esta suspensión. Esto tiene interés en la transmisión de enfermedades por las pieles; así, pie-

les de aimales tuberculosos, que contengan brucelas o que haya muerto de carbunco incluso, quedarán estériles en el curso de esta operación y no habrá peligro en utilizar posteriormente esta pieles curtidas, aunque, por otras razones, como peligro de usar estas pieles en la fase anterior, riesgo que supone la circulación de las mismas, etc., aconseja su destrucción si se conoce su procedencia. Hay que hacer notar que las pieles de peletería no depiladas no sufren este proceso, sino que pasan directamente del «rendido» a las sustancias curtientes y no le son aplicables las consideraciones anteriores.

La fase siguiente recibe el nombre de labrado o desencalado y consiste en privar a las pieles de la alcalinidad y del catión calcio que han adquirido anteriormente; se comienza con unos lavados en agua abundante, y posteriormente se acidifican y desencalan con diversos productos, que pueden ser obtenidos artificialmente con excrementos de animales u otras materias, siendo la palomina uno de los más corrientes, y la cual puede emplearse también directamente. Nosotros hemos estudiado la palomina, que sabemos su origen perfectamente. El examen microscópico directo revela que la palomina está formada, en su mayor parte, por bacterias (microfot. 2); en ella se aprecian cocos, bacilos y formas de tipo levadura. Los excrementos de aves han sido muy estudiados por diversos autores (1), (4), (5), (7) y (8), y todos estos autores aíslan numerosos gérmenes que no nos interesan grandemente desde nuestro punto de vista. Nosotros hemos tenido la palomina veinticuatro horas en maceración a la temperatura ambiente; de esta forma el número de microorganismos varía, pues unas especies no se desarrollan en la competencia que se establece; en otras, por el contrario, aumenta el número de individuos considerablemente. Sin embargo, también hicimos siembras de palomina, sin previa maceración, en medios de agar-común, agar-malta y Czapek, con el fin de comparar los resultados con los obtenidos por el procedimiento anterior; en estas últimas siembras, además de las bacterias que aislamos de las anteriores, aislamos algunas levaduras, mohos y como cosa de especial interés una colonia de consistencia gelatinosa, que crecía sobre las placas de agar-malta en proporción relativamente pequeña, unas 200 colonias por gramo de palomina, y, aunque no conozcamos tenga relación con la curtición, resulta interesante desde otros puntos de vista. La preparación microscópica de una colonia recién aislada presenta un aspecto como se muestra en la microfotografía número 4, con unos gránulos gruesos que terminan originando levaduras y

bacterias; resembradas nuevamente estas colonias en agar-malta, no se obtienen colonias separadas de levaduras y bacterias, sino colonias de bacterias y la colonia gelatinosa antes mencionada, que ahora muestra el aspecto microscópico que puede observarse en la microfotografía número 5, con formas de levaduras, de bacterias y, lo que es más interesante, una serie de formas intermedias entre levaduras y bacterias; esta fotografía puede también apreciarse al mucílago ,que aparece formando como unas sombras alrededor de los microorganismos. En una tercera resiembra sobre agar-malta, estos microorganismos tomaron el aspecto que puede apreciarse en la microfotografía núm. 6, y a partir de este momento el proceso no varía sensiblemente en sucesivas resiembras. Este hecho solamente podemos explicarlo por la transformación levadura-bacteria de A. Socias y A. Socias y colaboradores (11), (12) y (6).

En la palomina, tal como se emplea en la fabricación de curtidos, se presentan como más corrientes los gérmenes siguientes:

Micrococcus freudenreichii	1.900	millones	por	c. c.
Escherichia coli	517	»	»	»
Bacillus pumilus...	30	»	»	»
Paracolobactrum coli	96	»	»	»

Las cantidades que aquí se consignan son las medias de varias muestras. De lo expuesto anteriormente se deduce que las pieles que habían quedado asépticas en el período de encalado, vuelven a contaminarse intensamente en esta operación de «labrado». En esta última operación pierden, como hemos dicho, todo el ion calcio, se acidifican y aumentan su flexibilidad y elasticidad, condiciones necesarias para que éstas pasen a las disoluciones de taninos. Después de unos lavados en agua, las pieles ingresan en los taninos.

De los taninos se aíslan con gran frecuencia levaduras, especialmente cuando estas soluciones de tanino han sido agotadas por la curtición (9), (10), 13) y (14), y aun con más facilidad posiblemente ciertos mixomicetos, *Penicillium*, etc., pero no son corrientes los estudios bacteriológicos. Nosotros hemos hecho nuestros estudios sobre suspensiones de corteza de encina, que es un material muy utilizado como curtiente en España, y hemos utilizado corteza procedente de las ramas de encina y de las raíces. Se tomaron muestras en fábrica que llevaban tiempos distintos curtiendo, y también se prepararon suspensiones de corteza en el labo-

ratorio con agua estéril, aproximadamente en un 30 por 100, cantidad parecida a la que suele usarse en la industria, esto último con el fin de averiguar las bacterias que pueden llevar estas cortezas.

Entre las especies bacterianas aisladas figuran el *Bacillus megatherium, Bacillus subtilis, Bacillus polymyxa, Bacillus alvei, Bacillus circulans, Azotobacter chroococcum* y *Aerobacter aerogenes.*

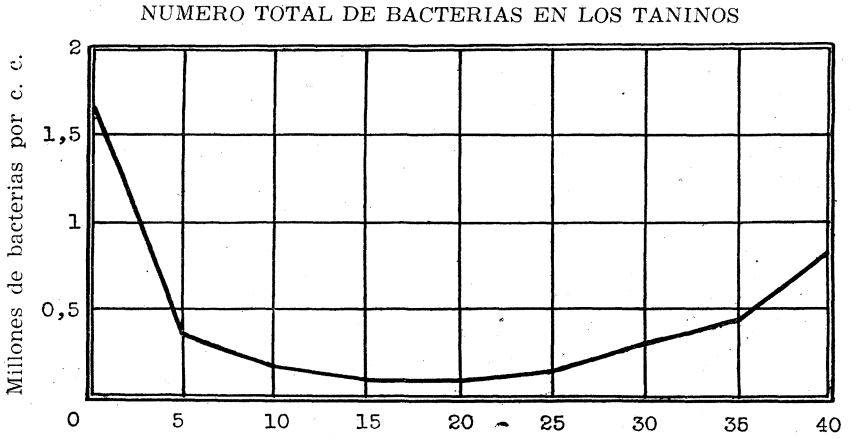


FIG. 1.

Las cantidades totales vienen consignadas en el gráfico de la figura número 1, y que, como puede apreciarse, es máxima en el primer momento, pues contiene todos los microorganismos que llevaba como contaminantes y los que tenía el vegetal y se conservan con la desecación.

Los *Azotobacter* los aislamos tan sólo en los primeros momentos de la suspensión de corteza, y su existencia es fácil de explicar, pues las cortezas, especialmente las de raíz, contienen tierras y, además, estos microorganismos, mediante sus quistes, resisten perfectamente la desecación a que son sometidas las cortezas. Los *Aerobacter* igualmente se observan tan sólo en los primeros momentos. Son los esporulados los más corrientes, por resistir la desecación y resistir también sus esporas los efectos del tanino, aunque hemos comprobado que el número de esporas viables va disminuyendo a partir de los primeros momentos. Los tani-

nos se van agotando por efecto de la curtición, quedando libres las moléculas de glucosa que se encontraban esterificando los ácidos gálicos, digálicos, etc., como puede irse comprobando simplemente con el reactivo de Fehling, y en estas circunstancias el número de bacterias aumenta, como puede apreciarse en el gráfico; si estas circunstancias se prolongasen, es posible que el número de bacterias aumentase grandemente; pero esto no ocurre en la práctica, pues un líquido que no tiene ya propiedades curtientes y que puede permitir el desarrollo de microorganismos que estropearían las pieles, no interesa en la industria y es desechado.

Nosotros hemos intentado en el laboratorto comprobar la actividad antibiótica o antiséptica de los taninos frente a diversas bacterias, y probamos con el procedimiento del papel impregnado en tanino, que colocamos sobre una placa de agar común sembrada; pero tuvimos la sorpresa de que no inhibía el crecimiento, sino que, por el contrario, en algunos casos, sobre todo en los taninos antiguos, muy hidrolizados, favorecía dicho crecimiento, microfotografía núm. 1, y comprobamos que era debido a la glucosa que contenían estos taninos muy hidrolizados. También comprobamos que la falta de actividad antibacteriana de los taninos determinados por este procedimiento era debida a una precipitación que se originaba entre el tanino y el agar común. Cambiamos el procedimiento, y utilizamos tubos que contenían 5 c. c. de tanino estéril al autoclave; en dichos tubos poníamos en el fondo un asa bien cargada de distintas bacterias, y posteriormente resembramos de estos tubos a las seis, doce, veinticuatro horas y en días sucesivos en caldo común. Con este procedimiento determinamos que las bacterias terminan desapareciendo, pero no de una manera instantánea, dependiendo del tipo de bacteria, concentración de tanino, etc. En el laboratorio, sin que la concentración de tanino disminuya por la curtición y en concentraciones y temperaturas relativamente elevadas, se pueden hacer no viables hasta las esporas.

CONSIDERACIONES

En el proceso de curtición hay unas fases en que las pieles se encuentran asépticas o casi asépticas, como son el depilado, encalado y curtición con taninos propiamente dicha; por el contrario, existen otras en que el

número de gérmenes puede ser muy grande, como el rendido y labrado que hemos descrito. En las fases en que el número de bacterias puede alcanzar gran proporción, hay que tener cuidado, pues las pieles pueden estropearse; en cambio, no hay ningún peligro en las otras, salvo en el encallado, que pueden destruirse también por una acción puramente química.

En cuanto a la transmisión de enfermedades por las pieles curtidas, tales como las procedentes de animales tuberculosos, las que proceden de animales que estuvieran padeciendo alguna enfermedad por brucelas, carbunco, entre otras; si las pieles han sido depiladas y encaladas, no existe ningún peligro, aunque procedan de animales carbuncosos; por el contrario, las pieles curtidas en la modalidad peletera es posible que lleven esporas viables después de la curtición si procedían de animales enfermos. En cuanto a otras bacterias menos resistentes, es muy probable que la acción exclusiva de los taninos sea suficiente para exterminarlas.

Agradecemos al señor Monero la valiosa ayuda que nos ha prestado en la parte fotográfica de este trabajo.

RESUMEN

En el presente trabajo se hace un estudio bacteriológico de los taninos y de las distintas fases del proceso de curtición con los mismos. En la palomina, material empleado en una de las fases de la curtición, estudiamos una colonia de aspecto gelatinoso, que muestra unas formas especiales, intermedias entre bacterias y levaduras.

SUMMARY

In the present communication a bacteriological study of tannins has been made. The different stages of the tanning procedure has been examined. From a sample of pigeon-dung, used in one of the stages of tanning a gelatinous colony was isolated and studied. This gelatinous colony show special intermediate forms between bacteria and yeast.

REFERENCIAS

(1) ARTHUR P. HARRISON, JR. ARNE HANSEN P. 1950. The Bacterial Flora of the Cocal Feces of Healthy Turkeys. J. Bacteriol. 59, 197-210.

(2) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 6.ª ed., 1948. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.

(3) Department of Agriculture, U. S. 1946. Aerobic Mesophilic Sporoforming Bacteria. Miscellaneus Publication, núm. 559.

(4) EMMEL, M. W. 1930. Bacterial flora in feces of the normal fowl. J. Infec tions Diseases, 46, 293-297.

(5) GAGE, G. E. 1911. A study chowing bacteria and animal organisms determined in the feces and intestinal mucosa of healthy chickens. Maryland Agr. Exp. Sta. Bull., 153, 201-226.

(6) GONZÁLEZ VÁZQUEZ, M.ª DEL CARMEN C. 1953. Transformación levadura-bacteria y estudio de los bacilos que resultan de la transformación hongo-bacteria. Microbiología Española, vol. 6, núm. 4, 311-392.

(7) JOHANSSON, K. R., SARLES, W. B. and SHAPIRO, S. K. 1948. The intestinal microflora of hens as influenced by varius carbohydrates in a biotin- deficient ration. J. Bacteriol., 56, 619-634.

(8) KING, W. E. 1905. The bacterial flora of the intestinal mucosa and conjuntiva of the normal chicken. Am. Med., 10, 400-404.

(9) RAMÍREZ GÓMEZ, C., y JACQUES BOIDIN. 1955. Nueva especie de levadura aislada de líquido curtiente: *Saccharomyces Chambardi,* nov. sp. Microbiología Española, vol 8, núm. 2, 225-228.

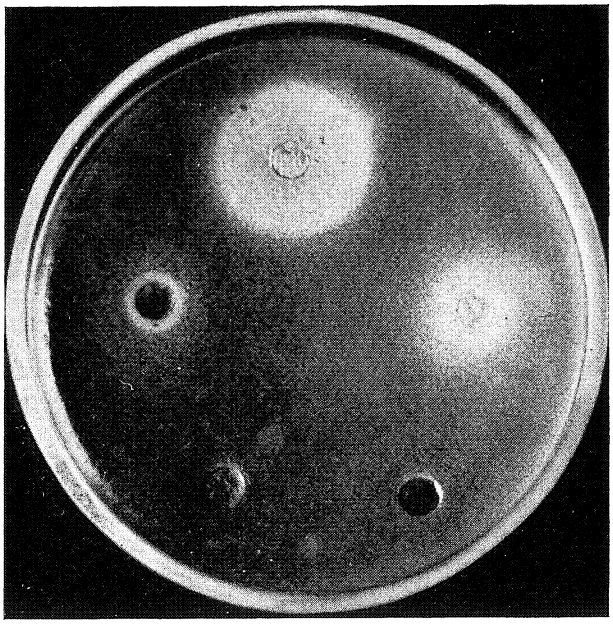
(10) RAMÍREZ GÓMEZ. C., y JACQUES BOIDIN. 1953. Nuevas especies de levaduras aisladas de líquidos curtientes. Microbiología Española, vol. 6, núm. 4, 405-414.

(11) SOCIAS, A. 1946. Posible ciclo levadura-bacteria de un *Geotrichoides.* Arch. Minis. Educación Nacional.

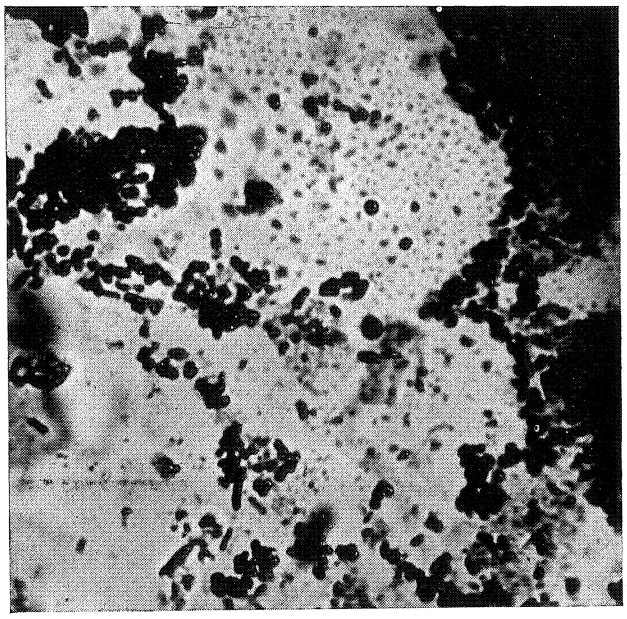
(12) SOCIAS, A., y GONZÁLEZ, M. C. 1952. Ciclo vital levadura-bacteria. Microbiología Española, vol. 5, núm. 3-4, 169-176.

(13) SOCIAS, A., RAMÍREZ GÓMEZ, C., y GENESTAR SERRA, R. 1954. Una nueva especie de *Endomycopsis: E. balearica* nov. sp. aislada de concentrado de tanino de encina. Microbiología Española, vol. 7, núm. 2, 107-110.

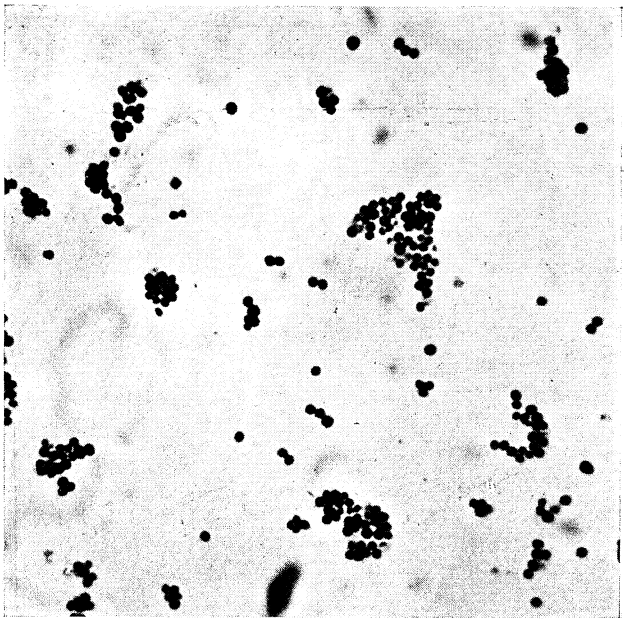
(14) SOCIAS, A., RAMÍREZ GÓMEZ, C., y PELÁEZ CAMPOMANES, F. 1954. Una nueva especie de *Debaryomices: D. Toletanus* nov sp. Microbiología Española, vol. 7. núm. 2, 111-114.



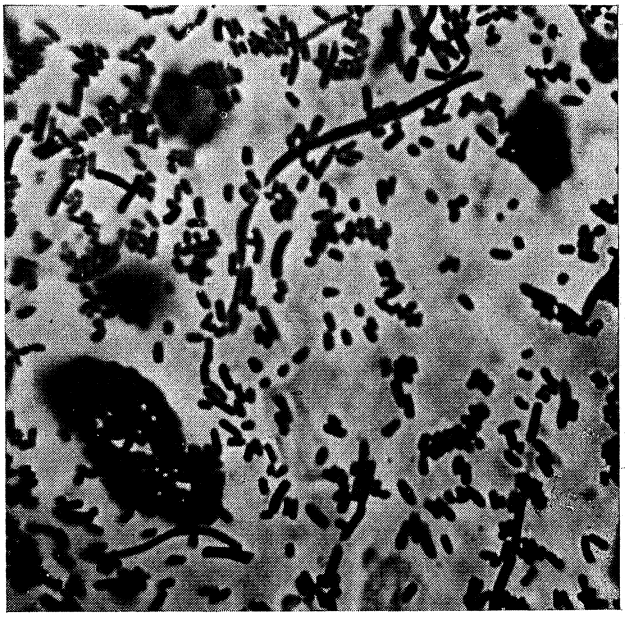
MICROFOTO 1.
Placa de *Escherichia coli* con muestras de taninos.
2/3 del natural.



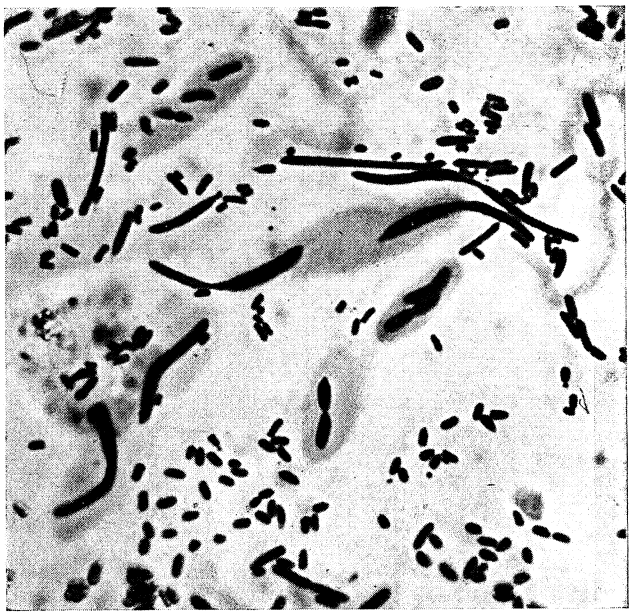
MICROFOTO 2.
Preparación de palomina. Coloración de Gram.
Aumento: 1.200.



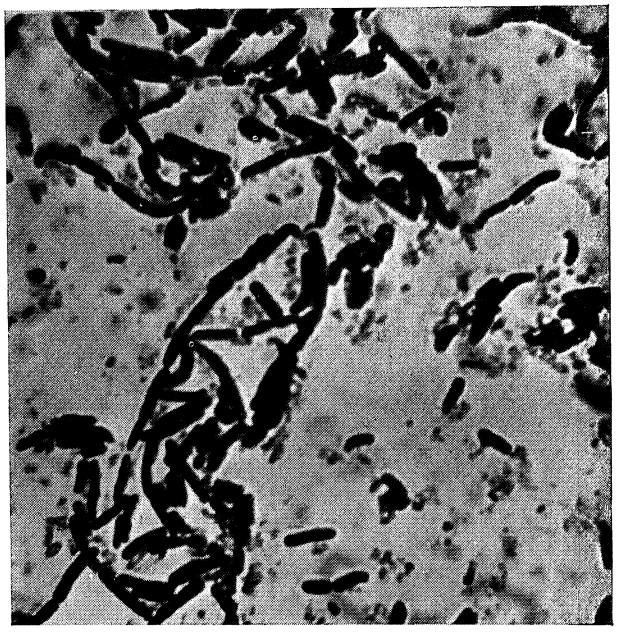
MICROFOTO 3.
Micrococcus freudenreichii aislado de palomina.
Aumento: 1.200.



MICROFOTO 4.
Preparación de la colonia gelatinosa de palomina en agar-malta. Primera resiembra. Aumento: 1.200.



MICROFOTO 5.
Preparación de la colonia gelatinosa de palomina en agar-malta. Segunda resiembra. Aumento: 1.200.



MICROFOTO 6.
Preparación de la colonia gelatinosa de palomina en agar-malta. Después de varias resiembras. Aumento: 1.200.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

ESTUDIO MORFOLOGICO, FISIOLOGICO Y BIOQUIMICO DE UNA ESPECIE NUEVA DE *CLOSTRIDIUM*: *CL. ALBUMINO LYTICUM* NOV. SP.

POR

C. GONZÁLEZ.

Estudiando la flora anaerobia de una tierra procedente de Villafranca de los Barros, provincia de Badajoz, guardada en el laboratorio durante dos años a la temperatura ambiente, hemos conseguido aislar un germen cuyos caracteres son los siguientes:

Habitat: Aislado de la tierra. No han podido proporcionarnos ningún otro dato.

Morfología: Bastones de extremos redondeados; 3,9-7 × 1 micras. Móvil, con flagelos perítricos; aparece primero un flagelo en uno de los extremos, más tarde pasa a ser lofotrico y, por último, rodean a toda la bacteria. Esporas clostridianas subterminales y centrales; tamaño de la espora: 2,3 × 1,3 micras. Gram-positivo.

Fisiología: Anaerobio estricto. Temperatura óptima: 37° C. Resiste cinco minutos a 100° y muere a los diez minutos a la misma temperatura. Reductor: reduce la safranina a las diecinueve horas de cultivo y el rojo neutro a las cuarenta y ocho horas.

Cultivos: Gasógenos y de olor pútrido.

Agar profundo: Conolias algodonosas, blancas, de 3 a 4 micras de diámetro; gas.

Gelatina: Licuación a las veinticuatro horas de la siembra.

Leche: Coagulación y digestión a los cuatro días.

Caldo VF. con hígado: Ennegrecimiento a las cuarenta y ocho horas; digestión total a los cinco días de cultivo.

Caldo VF. con clara de huevo coagulada: Digestión total.

Caldo VF. con cerebro: No atacado.

Caldo VF. con fibrina° Digestión total, diez días después de la siembra.

Caldo VF. con suero coagulado: Digestión total, a los diez días de cultivo.

Glúcidos: Fermenta la glucosa, la maltosa y la levulosa.

Bioquímica: Reduce los nitratos a nitritos, los sulfitos a sulfuros. Produce NH_3, SH_2, aminas volátiles, aldehidos, cetonas y metacresol; ácidos isovaleriánico y propiónico en la proporción 1/5.

Poder patógeno: Nulo, ni toxina ni hemolisina.

El género *Clostridium,* tercero de la familia *Clostridiaceae,* está integrado actualmente por 74 especies distribuídas en ocho subgrupos naturales, que presenta, cada uno entre ellos, caracteres fisiológicos y patógenos bien definidos. Estos grupos Prévot los considera como subgéneros.

La bacteria que nosotros estudiamos se diferencia de las que forman el subgénero I, *Clostridium butíricum,* fundamentalmente por no producir ácidos butírico ni acético, carácter fundamental del subgénero y, además, por ser un proteolítico activo.

Del subgénero II, *Cl. navículum,* por ser todas las especies incluídas en él celulolíticas, amilolíticas y no proteolíticas, como caracteres generales.

Del subgénero III, *Cl. felsineum,* bacterias del enriado, con caracteres fisiológicos y bioquímicos totalmente distintos a los del germen que nos ocupa.

Del subgénero IV, *C. sépticum;* del V, *Cl. novii,* y del VI, *Cl. botulinum,* esencialmente por no ser patógeno.

Del subgénero VII, *Cl. esporógenes,* variantes A y B de Mechnikoff, no patógenas y proteolíticas, por su morfología y fisiología. La bioquímica no se ha estudiado en estas variantes, pero de la correspondiente a la especie tipo se diferencia por no producir ni acético, ni butírico, ni láctico, carácter de *Cl. esporógenes,* y, además, la bacteria que estudiamos elabora aminas volátiles, aldehidos, cetonas y metacresol.

Se distingue de los organismos del subgénero VIII, *Cl. fallax,* por no ser patógeno y sí proteolítico.

Como consecuencia, creemos oportuno incluirlo en el grupo residual de Prévot, Grupo IX, *Clostridium,* que no entran en los subgéneros precedentes, y en el que incluyen 13 especies distintas repartidas en dos subgrupos, según sean o no cromógenas.

Las especies no cromógenas, entre las cuales puede colocarse la bacteria que estudiamos, son cuatro, cuyos caracteres, como resumimos posteriormente, son bien distintos a los que presenta el germen que nosotros aislamos.

Se diferencia del *Cl. lactopropilbutílicum* porque éste no ataca la gelatina ni la leche y produce ácido láctico, alcohol propílico y butílico.

Del *Cl. innominatum,* bacteria no proteolítica ni gelatinolítica, no reductora de nitratos, y dando como productos metabólicos acetoína, ácido acético, butírico y láctico.

Del *Cl. hastiforme,* no proteolítico, no glucidolítico ni reductor de nitratos; con fermentación fórmica-butírica-láctica.

Del *Cl. tonkinensis,* por su fisiología y morfología, bacteria no proteolítica; glucidolítica y hemolítica activa; no reductora de nitratos y dando como productos de fermentación ácidos acético, butírico y láctico.

Por cuanto llevamos dicho, y teniendo en cuenta los caracteres de la bacteria aislada, expuestos en un principio, nos parece correcto incluirle en el grupo IX de los *Clostridium,* con las especies no cromógenas y gasógenas, para el cual proponemos el nombre de *Clostridium albuminolyticum* nov. sp.

El germen figura con el número 1 en la colección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología del C. S. I. C., Sección de Biología Microbiana (Anaerobios).

RESUMEN

Se aísla de una tierra una bacteria que pertenece al género *Clostridium.* Estudiados sus caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, nos parece debe incluirse en el grupo IX de Prévot entre las especies no cromógenas.

Se distingue de todas estas especies por ser un proteolítico activo y por los productos de su metabolismo.

Por todo ello la consideramos como una especie nueva no estudiada para la que proponemos el nombre de *Clostridium albuminolyticum.*

SUMMARY

A bacterium belonging to the genera *Clostridium* has been isolated from a sample of soil. Its cultural, morphological, physiological and biochemical characteristics were studied.

We believe it should be included into Prévot's IX group amid the non chromogenic.

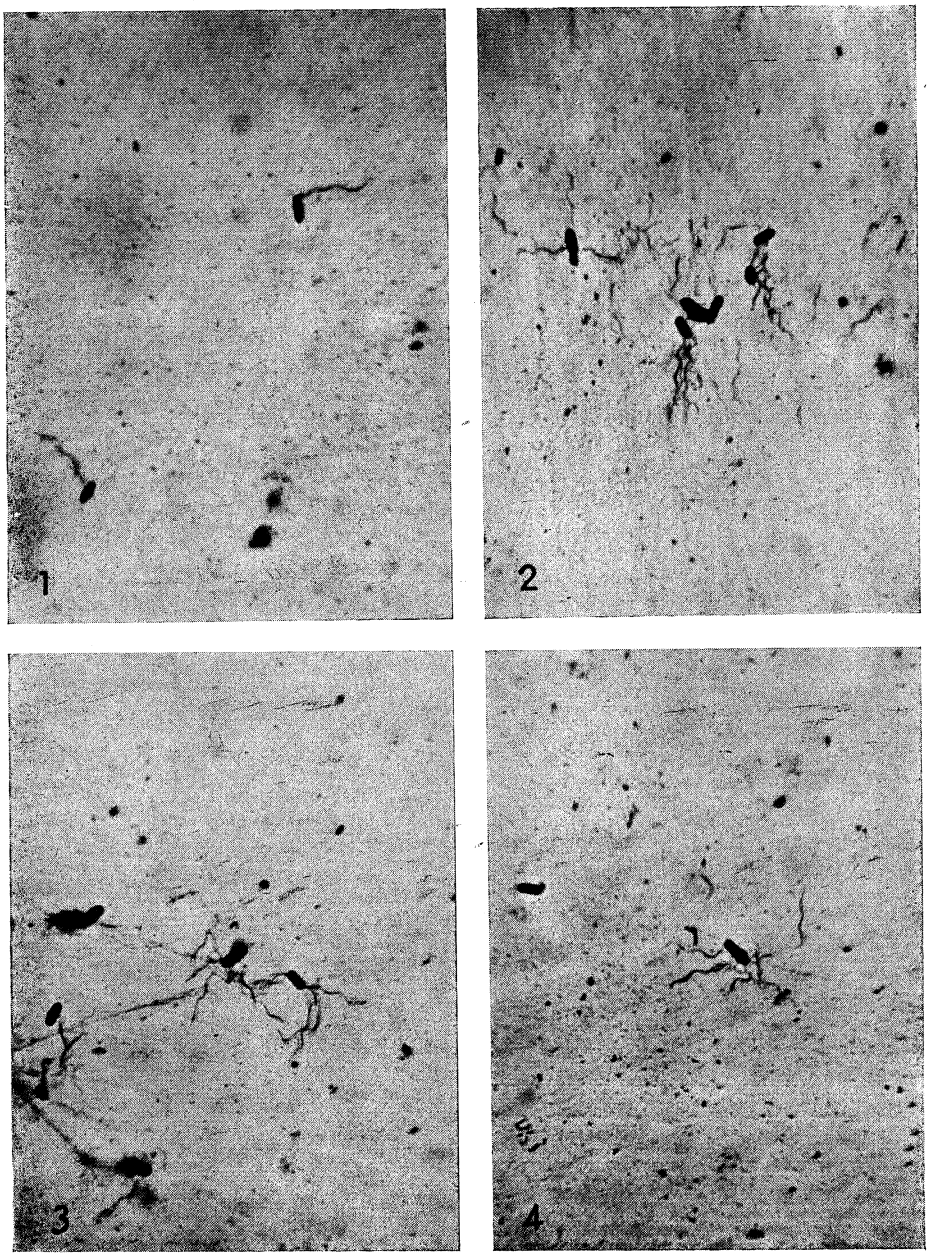
This species is distinguished by its great proteolitical activity and the products of its metabolism.

We consider this bacterium as a new strain for which we propose the name *Clostridium albuminolyticum*.

BIBLIOGRAFIA

LEBERT, F.; TARDIEUX, P. Tecnique d'isolement et de détermination des bactéries anaérobies. Paris, 1952.

PREVOT. A. R. Manuel de classification et détermination des bactéries anaérobies. Paris, 1948.



MICROFOTOS 1, 2, 3, y 4.

Clostridium albuminolyticum. Tinción de flagelos según el método de Casares-Gil, modificación de S. Levenson. En las primeras horas de cultivo el germen presenta un solo flagelo; a las veinticuatro horas pasa a ser lofotrico, y a partir de entonces predominan las formas perítricas con flagelos difíciles de teñir.

MICROFOTO 5.

Clostridium albuminolyticum. Tinción de esporas según el método de Alessandrini.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE FERMENTACIONES, DE BARCELONA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA ACCION DE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LOS NEUMOCOCOS

POR

A. GUERRA SABATER

La acción de la luz ultravioleta como agente mutagénico ha sido estudiada en los más diversos aspectos. Así, entre otros, se ha empleado en la producción de pigmentos en bacterias, en la obtención de cepas bacterianas bioquímicamente deficientes, para lograr cepas resistentes a los bacteriófagos. Se ha investigado también su acción a través de los caldos de cultivo, y recientemente se emplean para la obtención de las formas L.

El tema de estudio del presente trabajo ha versado sobre la acción que la luz ultravioleta ejerce en el neumococo, pero no solamente desde un punto de vista del efecto letal, sino principalmente del mutagénico, para estudiar si alguna de las cualidades mutantes, y en caso de que se presenten, se aproximan a las propiedades de un tipo distinto dentro de la misma especie o a las características de especies afines.

Para ello hemos trabajado primero con neumococos liofilizados (tipos 3 y 36) y después con neumococos aislados de esputos (tipos 14 y 42), empleando siempre el mismo método de irradiación y comparando los resultados obtenidos.

METODOS DE IRRADIACION

Preparamos una emulsión con suero fisiológico de un cultivo de neumococos de veinticuatro horas y la agitamos durante cuatro horas a quinientas sacudidas por minuto. Esta agitación tiene por objeto dis-

gregar los gérmenes para separar cadenas y diplos a fin de obtener una suspensión uniforme y que los rayos ultravioletas actúen sobre cocos aislados, y para que los supervivientes nos den colonias procedentes de un solo germen.

A partir de esta emulsión preparamos una suspensión de concentración inferior a 1.000 gérmenes por centímetro cúbico. Trabajamos con emulsiones tan diluídas para evitar que los gérmenes sirvan de pantalla los unos a los otros, y así puedan recibir todos ellos los efectos de los rayos ultravioleta a las mismas dosis.

Irradiamos 5 c. c. de esta suspensión durante sesenta segundos, sembrando después 0,5 c. c. de la misma en placa agar Truche.

El resto lo irradiamos veinte segundos más, separando también 0,5 c. c. para siembra.

Por tercera y última vez repetimos las mismas operaciones para obtener los neumococos irradiados a 110 segundos.

Mientras dura la irradiación damos a la placa un movimiento suave de vaivén, para evitar que se superpongan los gérmenos y conseguir que la acción de la luz ultravioleta sea uniforme en toda la masa. Por la misma causa procuramos que quede una capa uniformemente extendida, por lo que la placa debe estar completamente desengrasada para evitar fenómenos de tensión superficial que impedirían que la emulsión ocupara toda la superficie de la cápsula.

Al mismo tiempo preparamos una placa control con la suspensión sin irradiar, que nos servirá para establecer el porcentaje de mortalidad o efecto letal de la luz ultravioleta sobre las bacterias.

Una vez incubadas las placas observamos las características morfológicas de las colonias y picamos una de cada uno de los diversos tipos que se presentan, sembrando en caldo Truche, suero. De estos cultivos hacemos la tinción de Gram para observar las características morfológicas del germen y controlar la pureza del cultivo.

Después de las resiembras correspondientes se hacen las pruebas típicas del neumococo: Neufeld, bilis y optoquina; las pruebas complementarias o de metabolismo con la fermentación de los siguientes azúcares: glucosa, maltosa, lactosa, inulina, glicerol, sorbitol y manitol, incluyendo también en este grupo la fermentación de la leche tornasol. Además, hacemos las pruebas típicas de clasificación de estreptococos: hemolisis, azul de metileno, pH 9,6, temperatura a 10° y cloruro sódico 6,5 por 100, y por último la prueba de virulencia.

La lámpara de la casa Wander, de Suiza, usada en las irradiaciones, es tipo Belmag, y tiene una zona espectral que va desde los 2.400 hasta los 4.800 Amstrongs. Por consiguiente, comprende las radiaciones más bactericidas de longitud de onda de 2.600 a 2.700 Amstrong, y parte de la zona de radiaciones más mutagénicas de longitud de onda 1.900 a 2.500 Amstrong. La intensidad relativa de las radiaciones mutagénicas y de las bactericidas alcanza sólo un 23 por 100. Por esta razón todas las irradiaciones se efectuaron a la pequeña distancia de 25 cms. del tubo de vapores de mercurio fuente de los rayos ultravioleta.

RESUMEN DEL TRABAJO REALIZADO Y RESULTADOS OBTENIDOS

Después de la primera irradiación de tanteo, se irradiaron todas las cepas en tres tiempos distintos de 70, 90 y 110 segundos, para obtener siempre una mortalidad superior a 90 por 100, a menos que las cepas adquirieran gran resistencia a las irradiaciones, y al mismo tiempo controlar esta resistencia.

Tipo 3.

Irradiando una cepa del tipo 3 con 92,7 por 100 de mortalidad, y estudiando seis de las colonias supervivientes más representativas, en dos de ellas se reveló la reacción de Neufeld mucho más intensa, en una casi igual y en las otras más débil. La sensibilidad a la bilis es muy débil en dos, una de Neufeld más positivo y otra de Neufeld menos positivo, y en las otras cuatro es totalmente nula. Es también nula en todas la sensibilidad a la optoquina. Las reacciones típicas de los neumococos no se conservan, pierden o exaltan paralelamente, sino que mientras en la colonia primera la reacción de Neufeld se hace más positiva, se pierde totalmente la sensibilidad a la bilis y a la optoquina y se adquiere resistencia a ambos agentes. Probada la virulencia para el ratón, *Mus musculus,* lo mata a las veinticuatro horas. En cambio, la colonia segunda, también más positiva al Neufeld, algo positiva a la bilis y negativa a la optoquina, no es virulenta para el ratón al primer pase, pero recupera su virulencia en el segundo, cuando ya había perdido totalmente su sensibilidad a la bilis.

Los gérmenes de la colonia cuarta, después de su pase por ratón, se muestran débilmente positivos a la bilis. Se los pasó por segunda vez por ratón y se comprobó la pérdida total de la sensibilidad a la bilis.

Tenemos aquí gérmenes perfectamente virulentos para el ratón, que son totalmente insensibles a la bilis y a la optoquina, contra lo que afirmaron Neufeld y Hendel.

Paralelamente a estas pruebas típicas, perdieron la capacidad de fermentar la inulina y la leche tornasol, a pesar de los pases por ratón. En la maltosa, sacarosa y lactosa no se vió variación.

Tiempo irradia.	Col.	Neufeld	Bilis	Opto.	VIRULENCIA PARA EL RATON		
					1er. pase	2.° pase	3.° pase
0″		+	+	+			
110″	1.ª	±	±	—			
	2.ª	+ +	±	—	Sacrif. Bilis 48 h. Opto.	Muere Bilis 24 h. Opto.	
	3.ª	±	±	—			
	4.ª	+ +	—	—	Muere Bilis 24 h. Opto.	Muere Bilis 24 h. Opto.	Muere Bilis 48 h. Opto.
	5.ª	±	±	±			
	6.ª	+	—	—			

Tipo 36.

En la irradiación del tipo 36 de tres colonias estudiadas, que presentan todas reacción de Neufeld muy débil, dos conservan la sensibilidad a la bilis y una la pierde, la tercera, y a la optoquina dos son totalmente

Tiempo irradia.	Col.	Neufeld	Bilis	Opto.	
0″		+	+	+	
110″	1.ª	±	+	—	
	2.ª	±	+	±	
	3.ª	±	—	—	Inocul. ratón. Sacrif. 48 h. Bilis Opto.

insensibles y una muy débilmente sensible. Un pase por ratón no altera la negatividad a la bilis de la colonia 3. La fermentación de la inulina y lactosa se hacen negativas.

Tipo 14.

Las dos cepas anteriores se conservaban liofilizadas. La del tipo 14 se aisló para la irradiación y las seis colonias estudiadas se mostraron negativas al Neufeld, tres insensibles a la bilis y tres muy ligeramente sensibles, cinco insensibles a la optoquina y una muy ligeramente sensible. La pérdida de las cualidades típicas de neumococos a la primera irradiación no dependía de que las cepas hubieran sido conservadas largo tiempo liofilizadas.

Tiempo irradia.	Col.	Tipo colonias			Neufeld	Bilis	Opto.
		Forma	Bordes	Superficie			
0″		huso	lisos	lisa	+	+	+
110″	1.ª	huso	lisos	lisa	—	—	—
	2.ª	redon	lisos	rugosa	—	—	—
	3.ª	oval.	lisos	lisa	—	—	—
	4.ª	bivalva	lisos	lisa	—	±	±
	5.ª	huso	lisos	lisa	—	±	—
	6.ª	riñón	lisos	lisa	—	±	—

Tipo 42.

Se aisló otra cepa, tipo 42, para irradiarla en serie (seis irradiaciones sucesivas), realizando en conjunto unas 5.000 pruebas y con los resultados siguientes: Tras la primera irradiación, observamos la pérdida de positividad en las pruebas de Neufeld, bilis, optoquina,, inulina y leche tornasol. Resultado paralelo a los anteriores.

En la segunda irradiación aparecen ya colonias rugosas e irregula-

res. Las reacciones de Neufeld, bilis y optoquina son negativas, como las de virulencia para ocho de las colonias estudiadas, mientras para dos, una lisa y una rugosa, es positiva. Es de notar la virulencia de esta colonia rugosa; hecho que veremos confirmado regularmente en las posteriores experiencias.

En cambio, la fermentación de la inulina y de la lactosa, negativas después de la primera, son positivas después de la segunda irradiación.

Tiempo irradia.	Col.	Neufeld	Bilis	Opto.	Inul.	Gluc.	Lact.	Malt.	Leche
0″		+	+	+	+	+	±	±	+
110″	1.ª	±	—	—	—	+	—	+	±
	2.ª	—	—	—	—	+	±	+	±

		Azul met. 0,1 %	Temp. 10°	pH 9,6	ClNa	Hemolisis
0″		—	—	—	—	—
110″	1.ª	+	+	+	+	+
	2.ª	+	+	+	+	+

Pruebas de clasificación de estreptococos

Otra novedad de estas primeras irradiaciones es que las pruebas de clasificación de grupos de estreptococos verificadas desde el comienzo de la irradiación en serie de este tipo por sospechar una evolución posible hacia los estreptococos, y que antes de la primera irradiación eran totalmente negativas, se hacen totalmente positivas después de aquélla, conservándose en esta segunda, como si caminaran hacia el grupo de enterococos; incluso la hemolisis, que era negativa, se hace claramente positiva.

En la tercera irradiación siguen apareciendo colonias rugosas, que en sus reacciones se comportan como las lisas. De las 32 colonias estudiadas, 27 son totalmente negativas al Neufeld y cinco muy débilmente positivas. Una sola es ligeramente sensible a la bilis; en cambio, 24 son claramente positivas a la optoquina, tres débilmente positivas y cinco claramente negativas. Se ha recuperado en la mayor parte la positividad de la optoquina. La fermentación de la inulina en todas las colonias vuelve a ser negativa como antes de la segunda irradiación, mientras que

en todas se vuelve negativa la glicerina. Las pruebas de grupos de estreptococos siguen positivas, señalando hacia el grupo enterococo.

En esta irradiación aparecen además los gérmenes mucho más resistentes a las irradiaciones con una mortalidad baja a 90″ de irradiación, muchas con mortalidad inferior a 90 por 100 a 110″. En uno es sólo de 77,8 por 100.

Tras esta irradiación empiezan a aparecer las cadenas largas al modo de los estreptococos.

En la cuarta irradiación, ocho de las 32 colonias estudiadas presentan una reacción positiva débil al Neufeld; las restantes, negativas; las 32 son totalmente resistentes a la bilis; en cambio, 18 son sensibles a la optoquina y 13 insensibles (la recuperación de la sensibilidad a la optoquina persiste en su mayor parte); 15 son virulentas para el ratón y 17 avirulenas; de las 15 virulentas para el ratón, nueve son insensibles a la optoquina, seis son negativas al Neufeld y todas insensibles a la bilis.

La fermentación de la inulina vuelve a ser positiva con dos únicas excepciones, mientras la leche, la lactosa y la glicerina permanecen negativas.

Las pruebas de grupo de estreptococos siguen positivas como en enterococos.

En esta cuarta irradiación, de propósito, se picaron solamente colonias lisas y típicas, para poder observar si aparecían de nuevo las rugosas en las irradiaciones siguientes.

En la quinta irradiación se picaron de cada placa las colonias de distinto tipo, en total 52, y con ellas se hizo la prueba de Neufeld, primero con los sueros de grupo (por si se hubieran alterado en las cinco irradiaciones en serie los factores capsulares), y luego las específicas, o sea una clasificación completa de tipo de todas ellas, para excluir que la negatividad dominante de la prueba de Neufeld se debiera a cambios semejantes de tipo. Las reacciones de grupo fueron sólo débilmente positivas en nueve cepas y sólo en el grupo que incluye el tipo 42; las restantes fueron totalmente negativas. Las reacciones con el suero específico del tipo 42 y los demás sueros específicos de su grupo, fueron totalmente negativas en todas las cepas. Se habían perdido ya definitivamente los factores capsulares de especificidad de tipo.

Este dato concuerda con la evolución de las otras pruebas típicas de neumococos, ya que en todas se afianza rápidamente una resistencia e

insensibilidad a los agentes que antes obraban enérgicamente sobre ellos: bilis, optoquina, sueros aglutitinantes y de hinchamiento capsular. La sensibilidad a la bilis fué nula en todas, y también a la optoquina. Desapareció de nuevo la sensibilidad a este agente, que se había recuperado en gran parte tras las irradiaciones tercera y cuarta.

La capacidad para fermentar la inulina se conserva en todas, excepto en nueve, mientras permanece negativa la fermentación de la leche tornasol, de la lactosa y de la glicerina. Sólo cuatro cepas llegan a fermentar esta última.

Las pruebas de grupo de estreptococos siguen invariablemente positivas.

Aparecen de nuevo las colonias rugosas en casi todas las placas irradiadas.

En la sexta y última irradiación se estudiaron 158 colonias, 39 de ellas eran rugosas y otras seis o siete irregulares. La reacción de Neufeld fué negativa en 147 colonias y débilmente positiva en 11, dos de ellas rugosas. La insensibilidad en la bilis fué total en todas. La sensibilidad a la optoquina reapareció en 11 colonias, tres de ellas rugosas, todas con reacción de Neufeld negativa. Con ocho colonias rugosas se hizo la prueba de virulencia, siendo positiva a las veinticuatro horas en dos casos; a las cuarenta y ocho, en uno; a los cinco días, en dos, y totalmente negativa en tres.

La fermentación de la inulina, que se hizo negativa tras la primera irradiación, positiva en la segunda, negativa de nuevo en la tercera, positiva en la cuarta, y se conservó positiva en la quinta, excepto en nueve de las 52 colonias estudiadas, vuelve a hacerse negativa total en 145 colonias, positiva muy débil en 11 y positiva clara en dos.

La lactosa, leche tornasol y glicerina son totalmente negativas desde la tercera irradiación, salvo la glicerina, que es positiva en pocas colonias de la quinta irradiación.

La fermentación de la glucosa y de la sorbita que fué positiva en las irradiaciones primera y segunda, se hizo negativa en un tercio de las colonias en la irradiación tercera, volvió a ser casi totalmente positiva en la cuarta, se hizo negativa en un 10 por 100 en la quinta y en un 17 por 100 en la sexta. La maltosa se conservó positiva a través de todas las irradiaciones y la manita negativa hasta la cuarta irradiación; se hace positiva en la quinta en un 10 por 100 y en la sexta las colonias positivas llegan a un 36 por 100. Teniendo en cuenta la variación espon-

tánea de la fermentación de azúcares en los neumococos, llama la atención el paso súbito y casi total en una irradiación de positivo a negativo. y viceversa, precisamente en la inulina, que de ordinario es fermentada por estos gérmenes, la constancia con que fermentó la maltosa a través de todas las irradiaciones y la progresiva fermentación de la manita, que ordinariamente no es fermentada.

Las pruebas de grupo de estreptococos han sido en todas las colonias invariablemente positivas, acercándose a los enterococos.

En la serie de irradiaciones del tipo 42 se ha ido desarrollando cierta resistencia a la acción de las radiaciones ultravioleta. En la primera y segunda irradiaciones con 90″ se consiguió una mortalidad superior a 90 por 100, menos en una colonia, que fué sólo de 74,1 por 100. En la tercera las ocho colonias dan el porcentaje deseado sólo a los 110″. En la cuarta irradiación hay una baja de resistencia en un 25 por 100 de colonias. En la quinta recuperan la resistencia un 99 por 100, y en la sexta el 100 por 100.

Irradiando tipos de neumococos una sola vez en cuatro cepas de cuatro tipos distintos, no se observó cambio apreciable en la morfología de las colonias, siendo todas, salvo rara excepción, normales. En cambio, en las irradiaciones en serie del tipo 42, a partir de la segunda irradiación, se observaron gran número de colonias de su superficie granulada o rugosa, llegando a un 40 por 100 en la sexta irradiación.

Paralelamente se fueron observando otras colonias, aunque menos numerosas, que, aunque conservaban la superficie lisa, tenían formas algo irregulares y eran de tamaño mayor, incluso siéndolo también en muchos casos las de superficie granulada y rugosa.

Vemos, pues, aumentada casi siempre la vitalidad de las colonias formadas por los gérmenes que sobreviven a la acción de los rayos ultravioleta, aun en los de colonias rugosas.

En la morfología individual de los gérmenes que las componen tampoco se observan cambios apreciables en los diversos tipos con una sola irradiación. En cambio, en las irradiaciones en serie vemos una tendencia progresiva a la formación de cadenas muy largas (véase microfotografía final), a partir de la tercera irradiación. En esta tercera forman cadenas largas un 18,75 por 100 de las colonias estudiadas; en la cuarta, un 25 por 100; en la quinta, un 13,46, y en la sexta, un 29,68 por 100. Una cuarta parte de las de la sexta irradiación forman cadenas muy largas, como las más largas de los estreptococos. Estas cadenas están

formadas por diplos bastante típicos y envueltas con cápsula bien formada común, como pueden verse en las microfotografías núms. 2 y 5. En algunas de estas cadenas los diplos están formados por cocos más redondeados al estilo de los estreptococos.

Además, se han observado en las últimas irradiaciones de la serie algunas colonias en que abundan los cocos redondos agrupados al estilo de los estafilococos. En la sexta irradiación alcanzan a un 21,7 por 100 de los colonias rugosas.

En el conjunto de las pruebas, las colonias rugosas conservan su virulencia en un 50 por 100, casi igual que las lisas.

CONCLUSIONES

1. Con una sola irradiación, apenas cambia la morfología de los tipos de neumococos; ni en la de la colonia, ni en la de los gérmenes que la componen observamos cambios apreciables.

2. En irradiaciones seriadas aparecen colonias rugosas y granuladas que se parecen mucho a las de estreptococos, y ello en proporción creciente.

3. En irradiaciones seriadas los neumococos adoptan progresivamente la agrupación en cadenas largas al estilo de los estreptococos más típicos. Estas cadenas, sin embargo, están formadas por diplococos típicos, envueltos en cápsula común o toda la cadena. En algunas se redondean notablemente los cocos que las componen.

4. Las colonias rugosas, tras repetidas irradiaciones, forman con relativa frecuencia cocos redondos agrupados en masas irregulares de tipo de estafilococo. Pero, aun entonces, forman cápsula bien desarrollada de ley ordinaria.

5. La respuesta de los neumococos irradiados a las reacciones características y típicas de los mismos, no siempre es paralela en todas ellas. Se pueden volver totalmente negativas unas, siguiendo positivas otras.

6. En particular, hemos comprobado que, contra lo afirmado por Neufeld y Hendel, neumococos totalmente resistentes a la bilis, e incluso a la optoquina, pueden ser muy virulentos.

7. Desde la primera irradiación se observa la pérdida constante de la sensibilidad a la bilis, que no se recupera en irradiaciones seriadas.

8. También se pierde rápidamente la sensibilidad a la optoquina; pero ésta se puede recuperar a través de nuevas irradiaciones y perderse de nuevo, al igual que la fermentación de la inulina, volverse a perder y volverse a recuperar así sucesivamente.

9. La virulencia para el ratón, *Mus musculus,* puede perderse y recuperarse en sucesivas irradiaciones, independientemente de la sensibilidad a la bilis y a la optoquina, y de la variación de colonias de lisas a rugosas, y viceversa. El mayor grado de conservación y recuperación de esta virulencia dependerá, naturalmente, también del tipo de neumococo de que se trate.

10. La reacción capsular de Neufeld puede exaltarse a través de irradiaciones, especialmente en el tipo 3; pero, de ordinario, se hace muy pronto débil y se pierde.

11. Los neumococos que sobreviven a las irradiaciones adquieren rápidamente resistencia a los agentes a los que antes eran especialmente sensibles, como los sueros capsulares, la bilis y la optoquina. Esto explica por qué las reacciones típicas de los neumococos se hacen negativas. También desarrollan lentamente resistencia a los mismos rayos ultravioleta, siendo necesario mayores dosis de irradiación para el mismo porcentaje de mortalidad en las mismas condiciones.

12. La progresiva variación morfológica de colonias y gérmenes a través de irradiaciones seriadas camina hacia el tipo morfológico de los estreptococos, y las pruebas bioquímicas de grupo de éstos son como las del grupo enterococo. En estas pruebas bioquímicas observamos una mutación permanente a través de cinco irradiaciones y decenas de resiembras.

13. En irradiaciones en serie de neumococos hasta seis, no cambia el poder de fermentar la maltosa; en cambio aparece lentamente la capacidad de fermentar la manita. En la fermentación de la inulina se dan cambios bruscos de positivo a negativo, y viceversa. En otros azúcares se observa la variabilidad propia de los neumococos.

14. La eficiencia de las irradiaciones no es proporcional a la dilución de las suspensiones. Hay una concentración óptima de gérmenes en las emulsiones, en la que las dosis de irradiación obtienen la máxima eficiencia.

RESUMEN

Sometiendo suspensiones de neumococos, de concentración inferior a 1.000 gérmenes por centímetro cúbico, a la acción de la luz ultravioleta durante setenta, noventa y ciento diez segundos, se observa que: Con una sola irradiación apenas cambia la morfología de los tipos de neumococos; se pierde, en cambio, la sensibilidad a la bilis, no presentando una variación fija las reacciones de hinchamiento capsular y de aglutinación y la sensibilidad a la optoquina.

En irradiaciones seriadas se presentan cada vez más colonias rugosas y granuladas parecidas a las de estreptococos, y tanto en las lisas como en las rugosas los neumococos adoptan progresivamente la agrupación en cadenas largas al estilo de aquéllos. Otras colonias rugosas, tras repetidas irradiaciones, forman cocos redondos agrupados en masas irregulares de tipo de estafilococos, aunque las pruebas de grupo de estreptococos parecen señalar al grupo enterococo.

Las reacciones típicas de los neumococos en irradiaciones seriadas van perdiendo sucesivamente la posibilidad, pero no paralelamente. Mientras se pierde definitivamente la sensibilidad a la bilis a partir de la segunda irradiación, la sensibilidad a la optoquina se pierde para recuperarse y perderse de nuevo.

Tampoco sigue una evolución fija la virulencia, ya que colonias lisas son avirulentas y rugosas virulentas, independientemente de la sensibilidad a la bilis y a la optoquina.

SUMMARY

In this paper is realized a study of pneumococcus suspensions—in a lower concentration as 1.000 germs/c. c.—using ultraviolet lamp during 60, 90 and 110 seconds of time.

The author uses in this work microorganisms isolated from pathological products and lyophilized pneumococcus and describes the modifications examined in morphology, virulence and characteristic reactions of these germs.

BIBLIOGRAFIA

(1) ANDERSON, E. H. J. Bact. 61, 389, 1951.
(2) ANDERSON, E. H. Am. J. Botany. 36, 807, 1949.
(3) ANDERSON, T. F., y DUGGAR, B. M. Proc. Amer. Phil. Soc. 84, 661, 1941.
(4) AVERY, O. T.; MAC LEOD, C. M., y MC CARTY, M. J. Exp. Med. 79. 137, 1944.
(5) BARTHOLOMEW, J. W., y MITTWER, T. J. Bact. 63, 779, 1952.
(6) BARTHOLOMEW, J. W., y MITTWER, T. J. Bact. 64, 1, 1952.
(7) BEEKTORN, E. J. J. Bact. 63, 687, 1952.
(8) BOIVIN, A.; DELANNAY, A.; VENDRELY, R., y SEHOULT, J. Experientia. 1, 334, 1945.
(9) BORNSIDE, G. H.; CLEVERDON, R. C., y KULP, W. L. J. Bact. 64, 63, 1952.
(10) BUNTING, M. I. Cold. Spring Harbor Symposium on quantita Biol. XI, 25, 1946.
(11) CALLAO. Rev. Sanidad e Hig. Pub. XVII, 4, 1943.
(12) CERNOVEANU, Compt. rend. Acad. Sci. (Paris), 150, 729, 1910.
(13) COBLENTZ, W. W., y FULTON, H. R. Sci. Pap. Bur. Stand n.º 495. 19, 641, 1944.
(14) COBLENTZ, W. W. J. Op. Soc. Amer. 36, 72, 1946.
(15) CROLAND, R.-C. R. Acad. Sci. 216, 616, 1943.
(16) DAWSON, M. H., y SIA, R. H. P. J. Exp. Med. 54, 681, 1931.
(17) DELBRÜCH, M. Ann. Missouri Bot. Garden. 32, 223, 1945.
(18) DEMEREC, M., y LATARJET, R. Cold. Spring. Harbor Symposium. Vol, XI, 38, 1946.
(19) DEMEREC, M. Proc. Nat. Acad. Sci. 32, 36, 1946.
(20) DUBOS, R. J. Cold. Spring. Harbor Symposium. Vol. XI, 60, 1946.
(21) DULBECCO, R. J. Bact. 59. 329. 1949.
(22) DULBECCO, R. Nature. 163, 949, 1949.
(23) DUNN, C. J. J. Appli. Prisics. Vol. 19, n.º 7, 605, 1948.
(24) DUNN, C. J. American Brewer. 1951.
(25) ELLIES, C., y WELLS, A. A. Reinhold Publishing Co. New York. 1941.
(26) FRAM, H.; PROCTOR, B. E., y DUNN, C. J. J. Bact. 60, 1950.
(27) GATES, F. L. J. Gen. Physiol. 13, 231, 1929.
(28) COODGAL, F. H. Genetics. 35, 667, 1950.
(29) GRAY, C. H., y TATUM, E. L. Proc. Nat. Acad. Sci. 30, 404, 1944.
(30) GRIFFITH, F. I. Hyg. 27, 113, 1928.
(31) GUELIN, A. Ann. Inst. Pasteur. 68, 245, 1942.
(32) HOLLAENDER, A., y EMMONS, C. W. Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. 9, 179, 1941.
(33) HOLLAENDER, A. J. Bact. 46, 531, 1943.
(34) HOLLAENDER, A.; SAMSOME, E. R.; ZIMMER, E., y DEMEREC, M. Amer. J. Bot. 32, 222, 1945.
(35) HOLLAENDER, A., y EMMONS, C. W. Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. XI, 78, 1946.
(36) KELNER, A. J. Bact. 58, 511, 1949.

(37) LANGVAD, NIELSEN. Com. Institut Serotherapique Etat Danois. XXXIV. 1944.
(38) LATARJET, A., y WAHL, R. Ann. Inst. Pasteur. 71, 336, 1945.
(39) LATARJET, R. Rev. Canad. Biol. 5, 9, 1946.
(40) LATARJET, R., y MILÉTIC, B. Ann. Inst. Pasteur. 84, 205, 1953.
(41) LEA, D. E. Press. Cambridge Eng. 1946.
(42) LOOFBOUROW, J. R. Nature. 148, 113, 1941.
(43) LURIA, S. E. Symposium XI, 130, 1946.
(44) LWOFF, A. Ann. Inst. Pasteur. 61, 580, 1938.
(45) LWOFF, A. Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. XI, 139, 1946.
(46) MC CARTY, M.; TAYLOR, H. E., y AVERY, O. E. Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. XI, 177, 1946.
(47) MOERCH. Acta path. et microbiol. Scandinavica. 24, 1947.
(48) MOERCH. Acta path. et microbiol. Scandinavica. 26, 1949.
(49) NEWCOMBE, H. B., y WHITEHEAD, H. A. J. Bact. 61, 243, 1951.
(50) ROBERTS, R. B., y ALDOUS, E. J. Bact. 51, 373, 1949.
(51) ROEPKE, R. R.; LILBY, R. L., y SMALL, M. H. J. Bact. 48, 401, 1944.
(52) SAS, A. K.; EASLE, H., y TOAL, J. N. J. Bact. 63, 513, 1952.
(53) STADLER, L. J., y UBER, F. M. Genetics. 27, 84, 1942.
(54) TATUM, E. L. Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. XI, 278, 1946.
(55) TATUM, E. L. Proc. Nat. Acad. Sci. 31, 215, 1946.
(56) TATUM, E., y PERKINS, D. D. Ann. Review of Microbiology. Vol. IV, 129. 1950.
(57) WALTER. Amer. Jour. Publ. Health. 28, 54, 1938.
(58) WYSS, O.; HAAS, F.; CLARK, J. B., y STONE, W. S. J. Cell. Comp. Physiol. 35, 133, 1950.
(59) WITKIN, E. M. Proc. Nat. Acad. Sci. 32, 59, 1946.

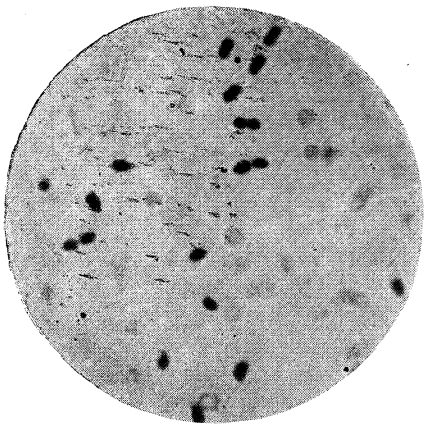


FOTO 1.
Aumento 3000. Cepa original. Diplococos aislados característicos.

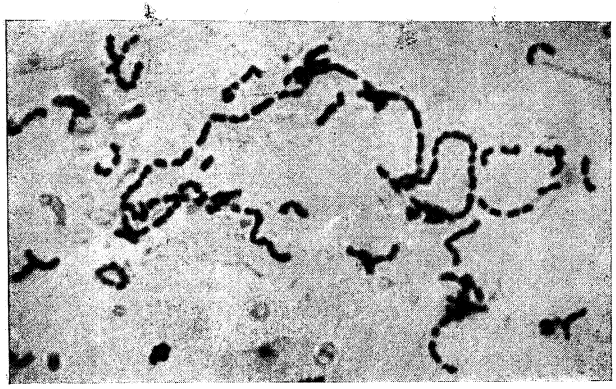


FOTO 2.
Aumento 3000. 4.ª irradiación. Colonia fusiforme. Cadenas largas de diplococos redondeados.

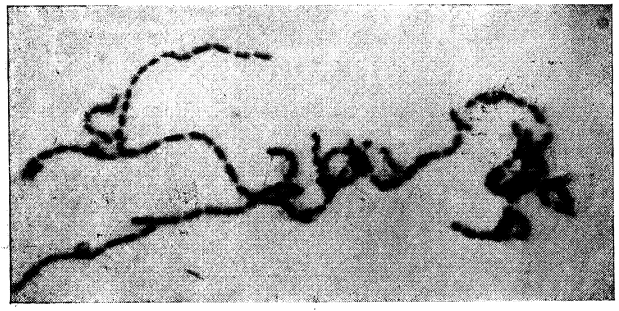


FOTO 3.
Aumento 3000. 5.ª irradiación. Colonia redonda. Cadenas muy largas de diplococos redondos.

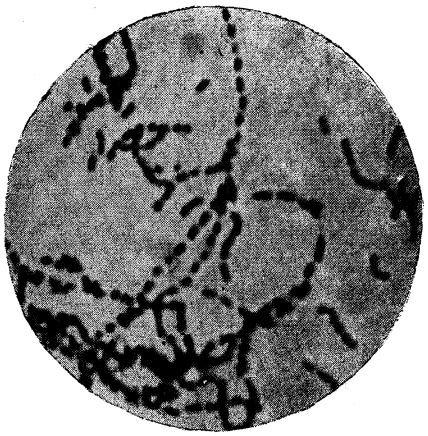


FOTO 4.
Aumento 2500. 6.ª irradiación. Colonia fusiforme. Cadenas largas de diplococos.

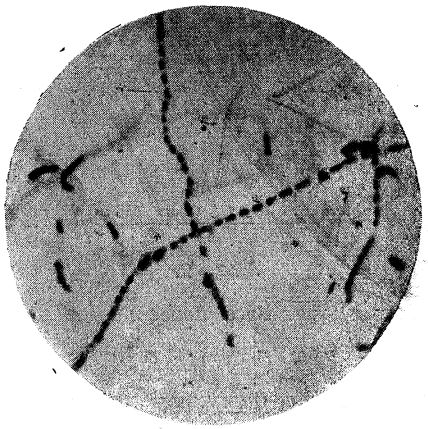


FOTO 5.
Aumento 3.000. 6.ª irradiación. Colonia ovalada. Cadenas largas de diplococos redondos.