

VOLUMEN 16. 1963

ABRIL - JUNIO. NUMERO 2

# *Microbiología Española*

*publicada por  
el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología  
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
MADRID

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 160 PTA; extranjero, 200 PTA

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

---

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»  
DEL C. S. I. C.

ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 PTA; extranjero, 240 PTA. Número: España, 20 PTA; extranjero, 30 PTA.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI» (Estación Experimental de «Aula Dei». Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 50 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 PTA; extranjero, 220 PTA. Número: España, 200 PTA; extranjero, 230 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 175 PTA. Número: España, 160 PTA; extranjero, 185 PTA.

ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 PTA; extranjero, 100 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.

ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 165 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 60 PTA.

CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 45 PTA.

COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 125 PTA. Número: España, 110 PTA; extranjero, 135 PTA.

CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO «LUCAS MALLADA» (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 PTA; extranjero, 80 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 70 PTA.

ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.

FARMACOGNOSIA (Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 35 PTA; extranjero, 45 PTA.

GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 80 PTA; países restantes, 120 PTA. Número: España y Portugal, 25 PTA; países restantes, 35 PTA.

PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.



## CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Eduardo Gallardo Martínez, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

---

## I N D I C E

Página

Contribución al estudio de la biosíntesis de los ácidos grasos. II. Fermentación de ácido láctico $^{14}\text{C}$ -2 por <i>Peptostreptococcus elsdenii</i> , por <i>D. Rodríguez</i> ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...	71
Influencia de las radiaciones ultravioletas y de la fotorreactivación en distintas fases del crecimiento del <i>Aerobacter aerogenes</i> , por <i>Teresa S. de Daurat, L. C. Verna y Liliana Segre</i> ...	81
Factores que afectan a la producción de toxohormona por microorganismos. I. Edad de las mutaciones, por <i>V. Callao, J. Olivares y E. Montoya</i> ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...	91
Propiedades antibacterianas <i>in vitro</i> de la nitrofurilidénisonicotinilhidrazona (NFI), por <i>R. Parés</i> ... ... ... ... ... ... ... ... ...	97
Interactions entre les microorganismes telluriques et les plantes, par <i>J. Pochon</i> ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...	117
La fertilité dans ses rapports avec l'humification et la conservation des sols, par <i>J. Pochon</i> ... ... ... ... ... ... ...	123
Aspect actuel du problème de la cellulolyse, par <i>J. Pochon</i> ... ...	131
Conferencias del Prof. Küster y del Dr. Nicholas ... ... ... ...	139
Conferencia sobre agentes antimicrobianos y quimioterapia ...	139
Simposio acerca de las contaminaciones de los medios marítimos. 139	

C. S. I. C.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

## CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS DE LOS ACIDOS GRASOS

### II. Fermentación de ácido láctico $^{14}\text{C}-2$ por *Peptostreptococcus elsdenii*

POR

D. RODRIGUEZ

Los trabajos realizados por Elsden y Lewis (3) con suspensiones de células lavadas de *Peptostreptococcus elsdenii* sugieren que los ácidos butírico, valeriánico y caprónico se sintetizan por un mecanismo análogo al encontrado por Barker y colaboradores en *Clostridium kluyveri*. Según Ladd y Walker (7), la síntesis de propiónico por *P. elsdenii* a partir de láctico se lleva a cabo por un mecanismo que supone la reducción directa del láctico, tal como ocurre en *Cl. propionicum*.

En el presente trabajo damos cuenta del mecanismo global de síntesis de los ácidos acético, propiónico, butírico y valeriánico por *Peptostreptococcus elsdenii* al metabolizar ácido láctico  $^{14}\text{C}-2$ . Nuestros resultados parecen confirmar las hipótesis establecidas por Elsden y colaboradores.

#### MATERIAL Y METODOS

Hemos realizado nuestros experimentos con la estirpe de *Peptostreptococcus elsdenii*, que empleamos en un trabajo previo (11).

##### *Medios de conservación*

Mantenemos los cultivos de *Peptostreptococcus elsdenii* en tubos conteniendo el medio semisólido que describen Elsden y cols. (4).

### *Preparación del inóculo*

Para preparar un inóculo, tomamos 0,5 ml de un cultivo de veinticuatro horas crecido en el medio de conservación y sembramos otro tubo contenido en el medio líquido de la composición siguiente:

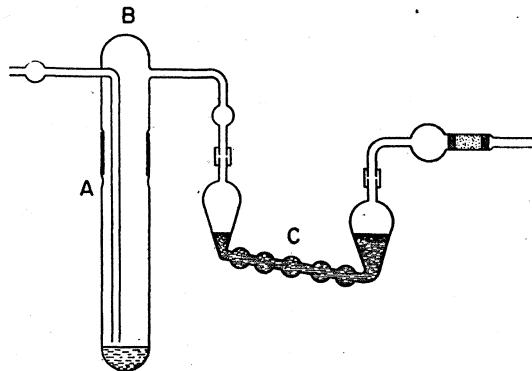
Lactato sódico ... ... ... ... ...	2,00 g
Extracto de levadura Difco ... ... ...	0,40 g
Fosfato monopotásico ... ... ... ...	0,05 g
Cloruro amónico ... ... ... ...	0,05 g
Cloruro magnésico ... ... ... ...	0,03 g
Ácido tioglicólico ... ... ... ...	0,03 ml
Aqua ... ... ... ...	100,00 ml

pH final, 7,4

Las condiciones anaerobias durante la incubación se consiguen colocando el tubo en un desecador de vacío por el que se pasa una corriente gaseosa de una mezcla de 95 por ciento de hidrógeno y 5 por ciento de anhídrido carbónico.

### *Cultivo en lactato radiactivo*

El medio de cultivo es igual al anterior, excepto que en un volumen final de 5 ml contiene unos 300 micromoles de lactato sódico y 0,1 ml de una disolución de ácido láctico  $^{14}\text{C}$ -2. El cultivo del microorganismo



*Figura 1*

se hace en un aparato (*figura 1*) que consta de las partes siguientes: un tubo (A) de boca esmerilada, donde se coloca el medio

de cultivo; un tapón (B) de dos salidas, de tal forma dispuestas que por una de ellas se puede pasar una corriente de hidrógeno, mientras la otra se conecta a un colector de anhídrido carbónico (C); y este último, a su vez, va conectado a un tubo de absorción conteniendo ascarita. El colector de anhídrido carbónico contiene una disolución aproximadamente 2N de hidróxido sódico. Antes de la inoculación se esterilizan por separado las partes A y B. Una vez inoculado el medio de cultivo, se acoplan las partes A, B y C, se pasa una corriente de hidrógeno durante unos tres minutos, se cierra mediante una pinza la salida libre y queda el cultivo bajo atmósfera inerte. La incubación se realiza durante tres días, a 38 °C.

#### Métodos analíticos

El ácido láctico se determinó por el método de Elsden y Gibson (2).

La cantidad total de ácidos grasos volátiles se determinó sometiendo el líquido metabólico a destilación por arrastre de vapor en el aparato

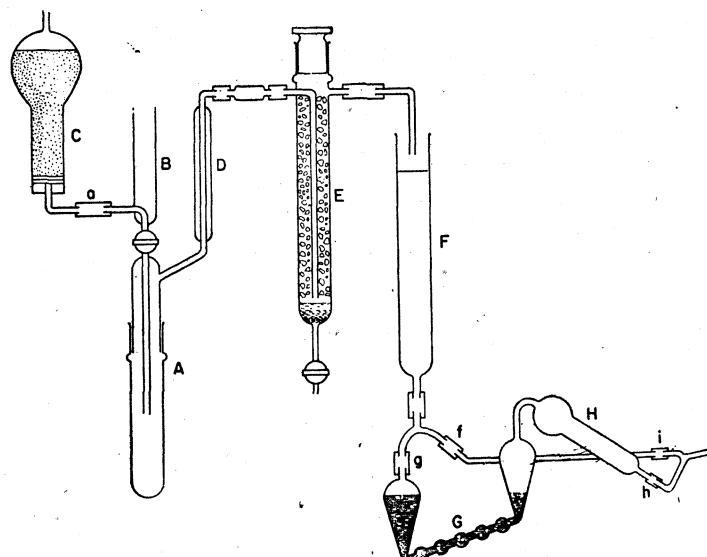


Figura 2

de Markham (8), usando la técnica de la doble destilación de Friedemann (5).

La identificación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía

sobre columna de celita, basándonos en las técnicas descritas por Moyle y cols. (10) y Bueding y Yale (1).

La radiactividad fue medida empleando un contador Geiger-Müller sin ventana, con flujo de gas metano, que trabaja en el grado proporcional; expresamos los resultados en impulsos/minuto y micromol, previa corrección de los valores encontrados, teniendo en cuenta la autoabsorción y el recuento de fondo. La radiactividad total de una muestra se determinó sometiendo ésta a una combustión completa, siguiendo fundamentalmente la técnica de Van Slyke y Folch (14). Esta determinación se llevó a cabo en un aparato (*figura 2*) que consta de las partes siguientes: un tubo de combustión (A), donde se coloca la muestra a oxidar; un embudo (B), que contiene el líquido de combustión; un tubo (C) lleno de ascarita; un refrigerante (D); una columna (E), con solución de hidroquinona al 5 por ciento; una columna (F), conteniente anhidrona; un colector (G) de anhídrido carbónico, y un tubo de absorción (H), lleno de ascarita. La columna F termina en un tubo de doble vía, que mediante dos pinzas (g y h) permite aislar el colector de anhídrido carbónico del resto del aparato.

Paralelamente a este método, medimos directamente la radiactividad de las muestras, extendiéndolas en un disco de acero inoxidable.

#### *Degradación de los ácidos grasos*

Conseguimos transformar un ácido graso en otro de un carbono menos mediante la degradación de Schmidt (13), teniendo en cuenta las modificaciones de Mosbach y cols. (9) y Sakami (12).

### RESULTADOS

Los resultados que exponemos a continuación fueron obtenidos al actuar *Peptostreptococcus elsdenii* sobre ácido láctico  $^{14}\text{C}$ -2 en 5 ml de medio de cultivo, incubado a 38 °C, durante tres días. Antes de iniciarse la fermentación, retiramos una pequeña muestra para determinar el ácido láctico presente y la radiactividad del mismo. Al final del período de incubación determinamos la cantidad de anhídrido carbónico desprendido en la fermentación y, asimismo, medimos su radiactividad. En otra porción del líquido metabólico determinamos la cantidad de ácido láctico residual. Finalmente, se destilaron los ácidos grasos volá-

tiles formados, se separaron por cromatografía de columna y se determinó la radiactividad de cada uno de ellos por los métodos directo y de combustión completa.

En el *cuadro 1* exponemos los resultados de este experimento, indicando los micromoles de ácido láctico inicial y final, su radiactividad en impulsos/minuto y micromol; los micromoles de anhídrido carbónico y de los ácidos grasos formados, así como la radiactividad de los mismos en impulsos/minuto y micromol.

*Cuadro 1*

Sustancias	Cantidad (micromoles)		Radiactividad	
	Inicial	Final	Directa	Por combustión
A. láctico	256,4	19,3	6.464	6.000
A. acético		37,0	5.767	5.729
A. propiónico		44,0	5.009	6.045
A. butírico		37,0	11.841	10.191
A. valerianico		47,0	9.471	13.978
Anhídrido carbónico		135,0		20

#### *Resultados de la degradación de los ácidos*

Con el fin de localizar los carbonos radiactivos dentro de la molécula de cada uno de los ácidos producidos en la fermentación del ácido láctico  $^{14}\text{C}$ -2 por *Peptostreptococcus elsdenii*, sometimos cada uno de ellos a la degradación de Schmidt. Antes de iniciar el proceso de degradación de cada ácido, agregamos una cantidad conocida de su sal sódica respectiva, no radiactiva, a fin de obtener cantidades apreciables de anhídrido carbónico.

#### *Degradoación del ácido acético*

El anhídrido carbónico recogido en la degradación del ácido acético presenta una radiactividad de 5.270 impulsos/minuto y micromol, valor que, comparado con el que se expresa en el *cuadro 1* para los dos carbonos del acético, indica que la radiactividad del ácido acético producido en la fermentación del láctico  $^{14}\text{C}$ -2 está localizada en el carbono del grupo carbóxilo.

*Degradación del ácido propiónico*

En el cuadro 2 exponemos los resultados obtenidos en la degradación del propiónico, indicando la radiactividad de los carbonos 1 y 2 resultantes, así como la del acético obtenido después de la primera degradación.

*Cuadro 2*

Degradación	Radiactividad	
	Directa	Por combustión
$\begin{array}{c} \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ 3 \quad 2 \quad 1 \end{array}$	5.009	6.045
$\begin{array}{c} \text{C} \\ 1 \end{array}$		60
$\begin{array}{c} \text{C} - \text{COOH} \\ 3 \quad 2 \end{array}$	4.386	4.478
$\begin{array}{c} \text{C} \\ 2 \end{array}$		3.128

Este resultado indica que el ácido propiónico originado en la fermentación del láctico  $^{14}\text{C}-2$  queda marcado en el carbono del grupo metileno.

*Cuadro 3*

Degradación	Radiactividad	
	Directa	Por combustión
$\begin{array}{c} \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ 4 \quad 3 \quad 2 \quad 1 \end{array}$	11.841	10.191
$\begin{array}{c} \text{C} \\ 1 \end{array}$		4.866
$\begin{array}{c} \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ 4 \quad 3 \quad 2 \end{array}$	4.352	4.428
$\begin{array}{c} \text{C} \\ 2 \end{array}$		146
$\begin{array}{c} \text{C} - \text{COOH} \\ 4 \end{array}$	3.978	4.228
$\begin{array}{c} \text{C} \\ 3 \end{array}$		3.984

*Degradación del ácido butírico*

En el cuadro 3 se exponen los resultados obtenidos en esta degradación, expresando en impulsos/minuto y micromol la radiactividad de los carbonos 1, 2 y 3, así como la del propiónico y acético obtenidos después de la primera y segunda degradación, respectivamente.

Estos resultados indican que el ácido butírico procedente de la fermentación del láctico  $^{14}\text{C}$ -2 queda marcado en dos carbonos: el del grupo carbóxilo (C-1) y el carbono beta (C-3).

*Degradación del ácido valeriánico*

En el cuadro 4 se exponen los resultados obtenidos en la degradación del ácido valeriánico, expresando en impulsos/minuto y micromol la radiactividad de los carbonos 1, 2, 3 y 4, así como la de los ácidos butírico, propiónico y acético, obtenidos en las sucesivas degradaciones.

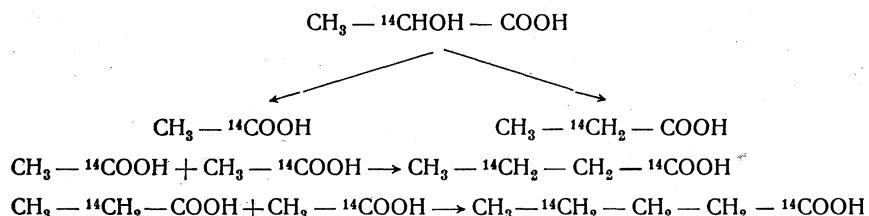
Cuadro 4

Degradación	Radiactividad	
	Directa	Por combustión
C — C — C — C — COOH 5      4      3      2      1	9.471	13.978
C 1		5.716
C — C — C — COOH 5      4      3      2	4.759	5.434
C 2		226
C — C — COOH 5      4      3	5.348	4.892
C 3		174
C — COOH 5      4	4.257	4.518
C 4		4.126

De estos resultados deducimos que el ácido valeriánico procedente de la fermentación del láctico  $^{14}\text{C}$ -2 queda marcado en dos carbonos: el del grupo carbóxilo (C-1) y el carbono gamma (C-4).

### DISCUSION

Los resultados encontrados en estos experimentos sobre cultivos en crecimiento sugieren que *Peptostreptococcus elsdenii* sintetiza, a partir del ácido láctico, los ácidos acético, propiónico, butírico y valeránico del modo siguiente: el acético, por descarboxilación y subsiguiente oxidación; el propiónico, por reducción directa; el butírico, por condensación de dos moléculas de acético, y el valeránico, por condensación del grupo metilo del ácido acético con el carbóxilo del propiónico. Podemos, pues, establecer las reacciones globales siguientes:



De estas reacciones globales podemos deducir que el mecanismo de la síntesis de acético, butírico y valeránico es análogo al observado por Barker y colaboradores en *Clostridium kluyveri*, con la probable participación en dichas reacciones de derivados de coenzima A, en lugar de los ácidos libres. En cuanto a la síntesis del propiónico, nuestros resultados aportan una prueba más a la presentada por Ladd (7) acerca de la reducción directa del lactato a propionato, reacción análoga a la propuesta por Johns (6) en *Cl. propionicum*.

### RESUMEN

Cultivos en crecimiento de *Peptostreptococcus elsdenii* sobre ácido láctico  ${}^{14}\text{C}-2$  dan lugar a la síntesis de ácidos grasos volátiles marcados. Los carbonos radiactivos dentro de cada molécula fueron localizados sometiendo cada uno de los ácidos a degradación sucesiva.

Según los resultados encontrados, *Peptostreptococcus elsdenii* sintetiza, a partir de ácido láctico  ${}^{14}\text{C}-2$ , acético  ${}^{14}\text{C}-1$ , propiónico  ${}^{14}\text{C}-2$ , butírico  ${}^{14}\text{C}-1,3$  y valeránico  ${}^{14}\text{C}-1,4$ .

## SUMMARY

Labeled volatile fatty acids were produced by *Peptostreptococcus elsdenii* in the presence of lactic acid 2-C<sup>14</sup>. The labeled volatile fatty acids were then degraded stepwise. The results of the degradation suggest that from lactic acid 2-C<sup>14</sup>, *P. elsdenii* produces acetic acid 1-C<sup>14</sup>, propionic acid 2-C<sup>14</sup>, butyric acid 1,3-C<sup>14</sup>, and valeric acid 1,4-C<sup>14</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

1. BUEDING, E., y YALE, H. W. 1951. Production of alfa methylbutyric acid by bacteria free *Ascaris lumbricoides*. J. Biol. Chem., 193, 411.
2. ELSDEN, S. R., y GIBSON, Q. H. 1954. The estimation of lactic acid using ceric sulphate. Biochem. J., 58, 154.
3. ELSDEN, S. R., y LEWIS, D. 1953. The production of fatty acids by a gram-negative coccus. Biochem J., 55, 183.
4. ELSDEN, S. R.; VOLCANI, B. E.; GILCHRIST, F. M. C., y LEWIS, D. 1956. Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. J. Bacteriol., 72, 681.
5. FRIEDEMAN, T. E. 1938. The identification and quantitative determination of volatile alcohols and acids. J. Biol. Chem., 123, 161.
6. JOHNS, A. T. 1952. The mechanism of propionic acid formation by *Clostridium propionicum*. J. Gen. Microbiol., 6, 123.
7. LADD, J. N., y WALKER, D. J. 1959. The fermentation of lactate and acrylate by the rumen microorganism L. C. Biochem. J., 71, 364.
8. MARKHAM, R. 1942. A steam distillation apparatus suitable for microkjeldahl analysis. Biochem J., 36, 740.
9. MOSBACH, E. H.; PHARES, E. F., y CARSON, S. F. 1951. Degradation of isotopically labeled citric, alfa-ketoglutaric and glutamic acids. Arch. Biochem. Biophys., 33, 179.
10. MOYLE, V.; SCARISBRICH, A., y BALDWIN, E. 1948. Separation and estimation of saturated C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> fatty acids by buffered partition columns. Biochem. J., 43, 308.
11. RODRÍGUEZ, D., y PÉREZ-SILVA, J. 1962. Estudios realizados con células lavadas de *Peptostreptococcus elsdenii*. Microbiol. Español., 15, 277.
12. SAKAMI, W. Handbook of isotope tracer methods. Western Reserve University, Cleveland, Ohio.
13. SCHMIDT, P. A. A. 1946. En ADAMS, R., y cols. Organic Reaction, III, 337.
14. VAN SLYKE, D. D., y FOLCH, J. 1940. J. Biol. Chem., 136, 509.

*UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA  
CATEDRAS DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA*

**INFLUENCIA DE LAS RADIACIONES  
ULTRAVIOLETAS Y DE LA FOTORREACTIVACION  
EN DISTINTAS FASES DEL CRECIMIENTO DEL  
*AEROBACTER AEROGENES***

**POR**

**TERESA S. de DAURAT, L. C. Verna y LILIANA SEGRE**

En un trabajo anterior (26) establecimos en las condiciones de nuestra experiencia que la fotorreactivación del *Aerobacter aerogenes* era ya apreciable a los dos minutos de iniciada; el máximo se alcanzaba entre los cinco-diez minutos, para descender luego, al aumentar el tiempo de exposición a la luz fotorreactivante.

Por recuento obtuvimos la curva de crecimiento del *Aerobacter aerogenes* en unidades cultivables y en condiciones normales; simultáneamente, la curva de crecimiento correspondiente a dicha especie fotorreactivada después de ser sometida a radiaciones ultravioletas.

El presente trabajo se desarrolló como se expone a continuación.

**MATERIALES Y METODOS**

El medio de cultivo utilizado fue el M 9 (1). En 200 ml sembramos 0,1 ml de cultivo de *Aerobacter aerogenes*, de doce horas, y efectuamos recuento en unidades cultivables.

Utilizamos para irradiar un tubo de la «General Electric», de 15 W y longitud de onda de 2.539 Å.

Para medir la cantidad de radiaciones ultravioletas utilizamos un aparato Westinghouse, con un fototubo WL 775.

Con 50.000 erg. cm<sup>2</sup>/1 s, conseguimos «matar» con regularidad más del 99 por ciento del *Aerobacter aerogenes* en suspensión; 10 ml de dilución apropiada del cultivo, colocados en cápsula petri (se agitó constantemente durante la experiencia) se sometieron a la acción de la luz ultravioleta, a 20 cm de distancia, operando en ambiente iluminado con luz amarilla. Previa siembra del líquido irradiado, efectuamos el recuento de las células sobrevivientes, contando las colonias desarrolladas. Esta suspensión microbiana fue sometida a la luz fotorreactivante, a temperatura de 37 °C y a una distancia de 12 cm de dicha fuente. Utilizamos una lámpara de mercurio de 125 W HPR (de Phillips), con el 50 por ciento de radiaciones entre 3.300 y 4.400 Å. Después de dos, cinco, diez y veinte minutos de fotorreactivación, se sembraron en cápsulas petri con caldo-agar muestras de la suspensión, y determinamos para esos distintos tiempos la cantidad de unidades cultivables/1 ml.

Para establecer el porcentaje de fotorreactivación utilizamos la fórmula de Kelner (16).

Las pruebas de recuento de las unidades cultivables a las cero horas, tanto del cultivo normal testigo como del cultivo irradiado, y las del fotorreactivado, fueron repetidas a las dos, cuatro, ocho, doce y veinticuatro, etc., horas de edad de dichos cultivos.

Nuestro propósito fue establecer:

- 1) Si había variación en el porcentaje de células recuperadas por fotorreactivación, en las diferentes etapas del desarrollo del cultivo.
- 2) Si había diferencias en el tiempo de máxima fotorreactivación, al variar la edad del cultivo.
- 3) Si los 50.000 erg. cm<sup>2</sup>/1 s emitidos por el tubo de luz ultravioleta actuaban de la misma o diferente manera en las sucesivas etapas del desarrollo.
- 4) La influencia ejercida en la evolución de los cultivos: el normal testigo y el irradiado y fotorreactivado, por diferencias en el pH del medio. Para esto verificamos periódicamente, durante un mes, el desarrollo de tres cultivos: en M 9 a pH 7,4; en M 9 a pH 6,3, y en M 9' a pH 6,35 (empleamos en este último tapón de goma en lugar de tapón de algodón, para evitar intercambio gaseoso).

Las experiencias realizadas y los resultados obtenidos se resumen en las figuras adjuntas.

## RESULTADOS

La figura 1 representa la curva de crecimiento de un cultivo de *Aerobacter aerogenes* en M 9 durante tres días y que inicialmente, a las cero horas, tenía una concentración de  $2 \times 10^5$  microorganismos/ml.

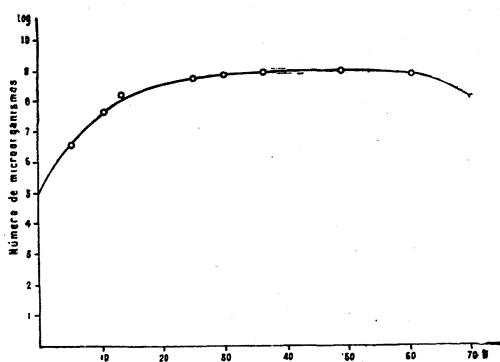


Figura 1

La figura 2 muestra los resultados obtenidos con cinco diferentes experiencias y los porcentajes de fotorreactivación en cultivos de distintas edades y en tiempos crecientes.

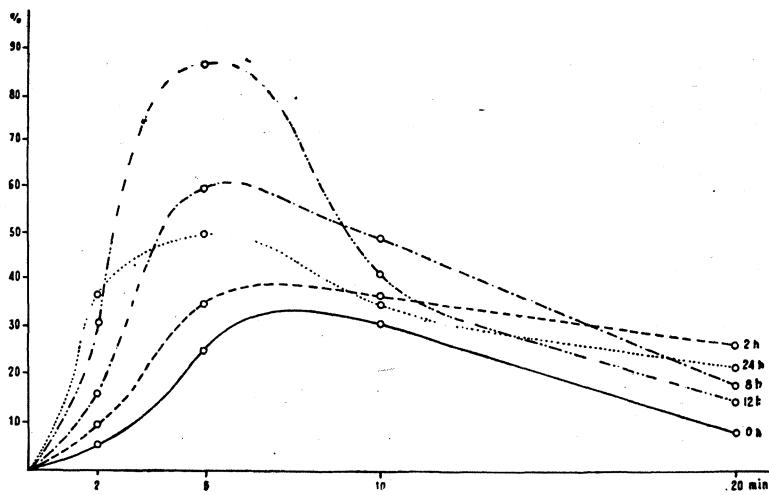


Figura 2

La figura 3 destaca los resultados notables de la figura 2; es decir, que la máxima recuperación se obtiene con los cultivos de ocho y doce horas, a los cinco minutos de fotorreactivación.

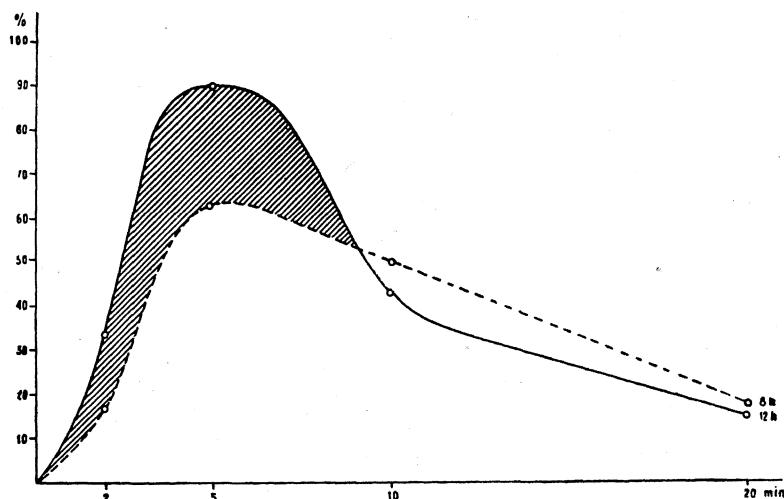


Figura 3

La figura 4 muestra las curvas de crecimiento obtenidas en M 9 del *Aerobacter aerogenes* testigo y del fotorreactivado.

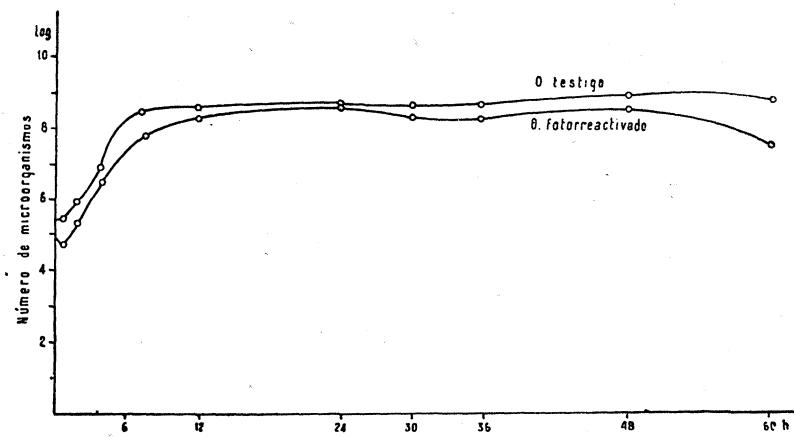


Figura 4

Se comprueba que entre las doce y veinticuatro horas el logaritmo del número de bacterias fotorreactivadas y el del cultivo testigo es prácticamente el mismo, para decrecer en el fotorreactivado al transcurrir el tiempo.

La influencia de los diferentes pH del medio y de la aireación de los cultivos puede verse en las *figuras 5-6*.

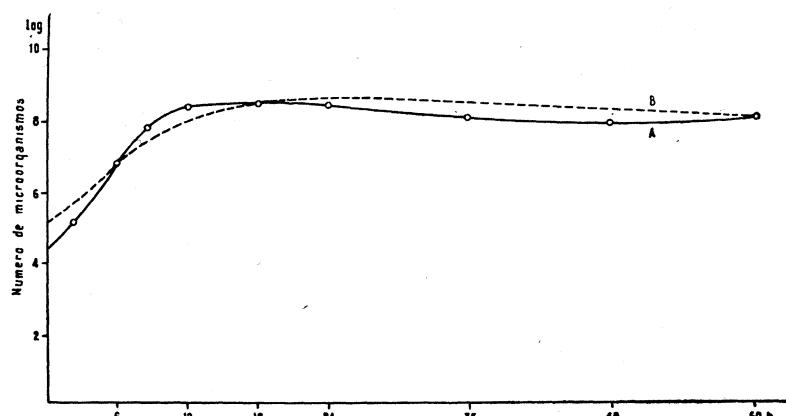


Figura 5

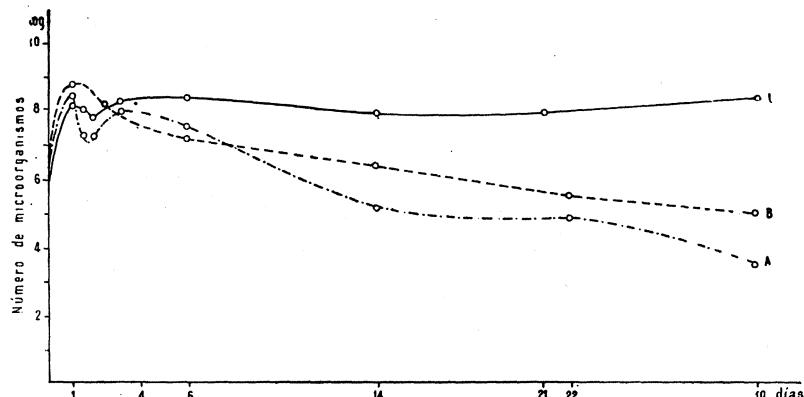


Figura 6

El crecimiento del *Aerobacter aerogenes* (véase figura 5) a pH 6,35 fue similar a las dieciocho horas en los cultivos A y B, a pesar de la diferencia del tapón (algodón o goma).

Después de ese tiempo y hasta cuarenta y ocho horas decrecen notablemente las «unidades cultivables» en el cultivo A.

La figura 6 reproduce las curvas de los cultivos A y B de la figura 5 y la del cultivo C a pH 7,4, obtenidas en el transcurso de un mes; demuestran que si bien el pH 6,35 no es el más propicio, la irradiación y la fotorreactivación mantienen su proporcionalidad.

### CONCLUSIONES

Con 50.000-60.000 erg. cm<sup>2</sup>/l s se obtiene la «muerte» de más del 99 por ciento de las células de *Aerobacter aerogenes*, con cultivos de hasta seis días.

En las condiciones de trabajo expuestas se obtiene la máxima fotorreactivación entre cinco-diez minutos, cualquiera que sea la edad del cultivo.

Los cultivos de ocho-doce horas de edad (en la fase logarítmica) dan el máximo porcentaje de fotorreactivación, que supera a veces el 80 por ciento de microorganismos.

Si bien el pH 6,35 no es el más conveniente para el desarrollo del *Aerobacter aerogenes*, la irradiación y la fotorreactivación mantienen su proporcionalidad.

### RESUMEN

Se ha estudiado la influencia de las radiaciones ultravioletas sobre el *Aerobacter aerogenes* en distintas condiciones y en distintas fases de crecimiento.

Se ha establecido que el 99 por ciento de las bacterias fueron «muer- tas» con 50.000-60.000 erg. cm<sup>2</sup>/l s.

Inmediatamente después de la irradiación, las suspensiones microbianas en sus distintas fases de desarrollo fueron fotorreactivadas con una lámpara de mercurio de 125 W HPR (Phillips), a temperatura de 37 °C.

La máxima fotorreactivación se obtiene entre los cinco-diez minutos, cualquiera que sea la edad del cultivo, pero los cultivos de ocho-doce horas (en la fase logarítmica) dan el máximo porcentaje, que supera a veces el 80 por ciento de células recuperadas.

Se establecieron las curvas de crecimiento del *Aerobacter aerogenes* en medio M 9 variando el pH y la aireación, y se obtienen diferencias al variar estos dos factores.

#### SUMMARY

The authors have studied the influence of ultraviolet radiations on the *Aerobacter aerogenes* under different conditions and in different faces of culture growth.

They have established that the 99 per cent of the bacteria, were killed with 50,000-60,000 erg./1 cm<sup>2</sup> in one second.

Immediately after the irradiation, the suspended microbes in their different faces of development were photoreactivated with a mercury lamp 125 W HPR (Phillips) at 37 °C temperature.

The utmost photoreactivation is obtained between five and ten minutes any would the age of the culture be; but the cultures eight-twelve hours (in logarithmic face) give the utmost percentage, which is superior, sometimes to the 80 per cent of recovered cells.

The curves of growth of the *Aerobacter aerogenes* in M 9 medium, have been established varying the pH and the airing and differences have been obtained in varying these two factors.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, E. H. 1946. Growth requirement of virus-resistant mutants of *Escherichia coli* strain B. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 32, 120-28.
2. BELLAMY, W. D., y GERMAIN, M. T. 1955. An attempt to photoreactivation ultraviolet inactivated streptococci. J. Bacteriol., 70, 351-52.
3. DEMEREZ, M., y LATARJET, R. 1946. Mutation in bacteria induced by radiations. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 11, 38, 76, 80, 158 y 160.
4. GODCALL, S. H.; RUPERT, C. S., y HERRIOT, R. M. 1957. Photoreactivation of *H. influenzae* transforming factors for streptomycin resistance by an extract of *E. coli* B. En McELROY y B. GLASS (Ed.). 1957. The chemical basis of heredity. John Hopkins Press, Baltimore.
5. GOUCHER, C. R.; KAMEL, J., y KOCHOLATY, W. 1956. Ultraviolet inactivation and photoreactivation of *Azotobacter*. J. Bacteriol., 72, 184-88.

6. HOPPENBROEK, A. 1943. Effects of long ultraviolet and short visible radiation (3,500-4,000 Å) on *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 46, 513-41.
7. HOPPENBROEK, A.; CONGDON, C. C.; DOHERTY, D. G.; MAKINODAN, T., y UPTON, A. C. 1959. New developments in radiation protection and recovery. *Progr. Nucl. Energy*, Ser. VII, 2, 139-50.
8. HOPPENBROEK, A., y DUGGAR, B. M. 1938. The effect of sublethal doses of monochromatic ultraviolet radiation on the growth properties of bacteria. *J. Bacteriol.*, 36, 17-37.
9. HOPPENBROEK, A., y STAPLETON, G. E. 1959. Fundamentals aspects of radiation protection from a microbiological point of view. *Physiol. Rev.*, 33, 77-84.
10. JAGGER, J. 1958. Photoreactivation. *Bacteriol. Rev.*, 22, 99-142.
11. JAGGER, J. 1960. Photoreactivation from ultraviolet killing in *Escherichia coli* B. *Radiation Res.*, 13, 521-39.
12. JAGGER, J., y STAPLETON, G. E. 1957. Compared effects on bacteria with special reference to protection and restoration. *Proc. Intern. Photobiol. Congr.*, 2nd, 133-45.
13. JOHNSON, F. H.; FLAGER, E. A., y BLUM, H. F. 1950. Relation of oxygen to photoreactivation of bacteria after ultraviolet radiation. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 74, 32-35.
14. KELNER, A. 1949. Photoreactivation of ultraviolet irradiated *E. coli* with special reference to the dose reduction principle and to ultraviolet induced mutation. *J. Bacteriol.*, 58, 511-22.
15. KELNER, A. 1950-51. Action spectra for photoreactivation of ultraviolet irradiated *E. coli* and *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Physiol.*, 34, 835-52.
16. KELNER, A. 1953. Growth, respiration, and nucleic acid synthesis in ultraviolet irradiated and in photoreactivated *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 65, 252-62.
17. KELNER, A.; BELLAMY, W. D.; STAPLETON, G. E., y ZELLE, M. R. 1955. Symposium on radiation effects on cells and bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 19, 22-44.
18. KELNER, A., y JACOBS, L. L. 1959. Ultraviolet-induced abnormal growth in *E. coli*. The influence of yeast extract and of photoreactivation. *J. Bacteriol.*, 77, 281-95.
19. LEA, D. E. 1956. Action of radiations on living cells. Macmillan Co., N. Y.
20. NOVICK, A., y SZILARD, L. 1949. Experiments on light-reactivation of ultraviolet inactivated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 35, 591-600.
21. ROBERTS, R. B., y ALDOUS, E. 1949. Recovery from ultraviolet irradiation in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 57, 363-75.
22. STUDY, J. H. 1955. Photoreactivation of ultraviolet inactivated bacilli. *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 206-11.
23. STUDY, J. H. 1956. Studies on mechanism of radiation inactivation of microorganisms. II. Photoreactivation of some bacilli and the spores of two *B. cereus* strain. *Biochim. Biophys. Acta*, 22, 238-40.

24. STUY, J. H. 1960. Studies on the radiation inactivation of microorganisms. *J. Bacteriol.*, 70, 707-15.
25. THIMANN, K. V. 1955. *The life of bacteria*. Macmillan Co., N. Y.
26. VERRA, L. C., y DAURAT, Teresa S. de. 1962. *Fotorreactivación bacteriana (Aerobacter aerogenes)*. *Microbiol. EspaÑol.*, 15, 125-38.
27. WELLS, P. H. 1950. The influence of visible light on recovery of cells from ultraviolet radiation injury. *Turtox News*, 28, núm. 7.
28. WELLS, P. H. 1956. Photoreactivation of ultraviolet inactivated diphosphopyridine nucleotide. *Science*, 124, 31-32.
29. ZELLE, M. R., y HOLLANDER, A. 1954. Monochromatic ultraviolet action spectra and quantum yields for inactivation of T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> *Escherichia coli* bacteriophages. *J. Bacteriol.*, 68, 210-15.
30. ZELLE, M. R.; OGG, J. E., y HOLLANDER, A. 1958. Photoreactivation of induced mutation and inactivation of *Escherichia coli* exposed to various wave lengths of monochromatic ultraviolet radiation. *J. Bacteriol.*, 75, 190-98.

C. S. I. C.  
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN  
SECCION DE MICROBIOLOGIA

## FACTORES QUE AFECTAN A LA PRODUCCION DE TOXOHORMONA POR MICROORGANISMOS

### I. Edad de las mutaciones

POR

V. CALLAO, J. OLIVARES y E. MONTOYA

En 1961 fue descubierto en nuestro laboratorio (2) que las mutaciones de microorganismos con deficiencia respiratoria (DR) producen una sustancia que ejerce sobre la catalasa hepática del ratón el mismo efecto que la toxohormona cancerosa de Nakahara y Fukuoka (6). Sin embargo, en el transcurso de experiencias posteriores comenzaron a observarse grandes irregularidades en la actividad de esta que llamaremos toxohormona microbiana (TH), hasta el punto de que muchas de las preparaciones obtenidas no tuvieron ningún efecto sobre la catalasa hepática del ratón, incluso a dosis dos veces mayores de las empleadas normalmente. Pudo apreciarse, no obstante, que todas las TH inactivas tenían de común el haber sido preparadas a partir de mutaciones DR obtenidas de la raza madre bastante tiempo atrás y mantenidas desde entonces por trasplantes en medios de cultivo apropiados, lo que hizo sospechar la existencia de una especie de degeneración de las citadas mutaciones DR en relación con su capacidad de producción de TH.

En el presente trabajo se recogen las experiencias realizadas para comprobar este extremo, así como los resultados obtenidos y las conclusiones que de ellos se derivan.

## MATERIAL Y METODOS

### *Microorganismos*

Se emplearon siete mutaciones DR de *Saccharomyces cerevisiae*, de las cuales cinco habían sido obtenidas mediante tratamiento de la raza madre con tripaflavina—razas T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>7</sub> y T<sub>8</sub>—, una por medio del violeta de metilo—raza VM<sub>5</sub>—y la última por acción de la luz ultravioleta—raza UV<sub>1</sub>—.

La edad de las citadas mutaciones, considerando como tal el tiempo transcurrido entre su obtención a partir de la raza madre y el momento de realizar las experiencias, fue la siguiente: T<sub>4</sub>, veinte meses; UV<sub>1</sub>, diez meses; VM<sub>5</sub>, cinco meses; T<sub>5</sub>, cuatro meses; T<sub>6</sub>, tres meses; T<sub>7</sub>, dos meses, y T<sub>8</sub>, quince días.

Todas ellas habían sido mantenidas mediante trasplantes cada quince días en un medio semisintético con peptona, extracto de levadura, glucosa y sales minerales (4) y demostraron conservar las características consideradas como típicas de las mutaciones DR (5): cociente de oxígeno ( $Q_{O_2}(N)$ ) entre 0 y 50; incapacidad de crecer en medios de cultivo con lactato como única fuente de carbono y de producir álcali en medios con acetato, y colonias no coloreadas en presencia de cloruro de trifeniltetrazolio. La única diferencia apreciable entre las mutaciones viejas y las obtenidas recientemente consistió en un mayor crecimiento de las primeras en los medios de cultivo.

### *Preparación de las TH*

Las TH correspondientes a cada una de las mutaciones antes citadas se obtuvieron mediante el procedimiento descrito en publicaciones anteriores (2).

### *Determinación de la actividad toxohormónica*

Las diferentes TH se inyectaron intraperitonealmente a ratones machos de cuatro meses de edad y a dosis de 25 y 50 mg/ratón. Los ratones, mantenidos en ayunas desde el momento de la inyección, fueron sacrificados a las veinticuatro horas de ser inyectados, y la actividad catalásica de sus hígados, determinada por el método de Bonnis-

chen y cols. (1), se expresó como Kat. f. (\*): velocidad de reacción/minuto, dividida por el peso seco de la preparación, en gramos.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se exponen los valores de catalasa hepática de los ratones inyectados con las distintas preparaciones de TH, en comparación con el correspondiente de los testigos.

*Cuadro 1. Valores de catalasa hepática en ratones inyectados con TH procedentes de mutaciones DR de Saccharomyces cerevisiae, mantenidas en medios de cultivo durante diferentes intervalos de tiempo*

TH inyectada	Edad de la mutación (*), meses	Dosis, miligramos	Número de ratones	Actividad catalásica del hígado (Kat. f.)
Procedente de	Ninguna		10	67,4 ± 3,17
	Mutación T <sub>4</sub>	20	10	62,7 ± 3,01
	Mutación UV <sub>1</sub>	10	10	66,0 ± 1,73
	Mutación VM <sub>5</sub>	5	10	75,3 ± 3,70
	Mutación T <sub>5</sub>	4	10	56,1 ± 2,67 (**)
		25	10	68,0 ± 2,04
	Mutación T <sub>6</sub>	3	10	55,8 ± 1,07 (**)
		25	10	60,2 ± 2,80
	Mutación T <sub>7</sub>	2	10	38,8 ± 1,98 (**)
	Mutación T <sub>8</sub>	0,5	10	40,3 ± 2,10 (**)

(\*) Tiempo transcurrido entre su obtención a partir de la raza madre y las experiencias.

(\*\*) Diferentes significativamente de los testigos ( $P < 0,01$ ).

Como puede observarse, todas las mutaciones conservadas en los medios de cultivo usados por un período mayor de cuatro meses, dieron lugar a preparaciones de TH carentes de efecto sobre la catalasa hepática del ratón, incluso a dosis de 50 mg/ratón. Las mutaciones de edad comprendida entre tres y cinco meses dieron lugar a TH, que a la

(\*) Actividad catalásica, según Euler y Josephson (3).

dosis de 50 mg/ratón deprimieron significativamente la catalasa hepática, pero no a la de 25 mg. Por último, las razas cuya edad era de dos meses o menor originaron TH de actividad normal, que a la dosis de 25 mg produjeron un descenso en los valores de catalasa hepática de los ratones inyectados, de aproximadamente un 40 por ciento.

A la vista de estos resultados es necesario admitir, tal como se había supuesto, la existencia de una degeneración de las mutaciones DR de *Saccharomyces cerevisiae* en relación con su capacidad de producir toxohormona, degeneración que no afecta a los demás caracteres propios de este tipo de mutaciones, y que al parecer está ocasionada por el cultivo continuado en los medios semisintéticos usados.

Es necesario, por tanto, siempre que se realicen con este tipo de mutaciones experiencias encaminadas a la obtención de TH o que tengan relación con dicho principio activo, usar mutaciones conservadas por liofilización desde el momento de su obtención o, mejor aún, tal como usamos en nuestro laboratorio, obtenidas muy recientemente.

#### RESUMEN

Se ha comprobado que las mutaciones de levadura con deficiencia respiratoria mantenidas por resiembras en medios de cultivo semisintéticos pierden gradualmente su capacidad de producción de toxohormona, aun cuando conservan sus restantes características bioquímicas.

#### SUMMARY

Ability for producing toxohormone of yeast mutants with impaired respiration was gradually lost, when maintained by passing in a semisynthetic culture medium; no other biochemical characteristics were lost.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BONNICHSEN, R. K.; CHANCE, B., y THEORELL, H. 1947. Catalase activity. *Acta Chem. Scand.*, 1, 685.
2. CALLAO, V., y MONTOYA, E. 1961. Toxohormone-like factor from microorganisms with impaired respiration. *Science*, 134, 2.041.

3. EULER, H. von., y JOSEPHSON, K. 1923. Chem. Ber., 56, 1.749. En. D. Glick (ed.) 1957. Methods of biochemical analysis, 1, 362. Interscience Publishers, Nueva York.
4. LINDEGREN, C. C.; NAGAI, S., y NAGAI, H. 1958. Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel. Nature, 182, 446.
5. LINDEGREN, C. C.; OGUR, M.; PITTMAN, D. D., y LINDEGREN, C. 1957. Respiratory competence in the diagnosis of gene controlled phenotypes in *Saccharomyces*. Science, 126, 398.
6. NAKAHARA, W., y FUKUOKA, F. 1948. A toxic cancer tissue constituent as evidenced by its effect on liver catalase activity. Japan. J. Med. Sci. Biol., 1, 271.

C. S. I. C.  
INSTITUTO ESPAÑOL DE FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA, DE BARCELONA

PROPIEDADES  
ANTIBACTERIANAS *IN VITRO* DE LA  
NITROFURFURILIDENISONICOTINILHIDRAZONA  
(NFI)

POR

R. PARÉS

INTRODUCCION

Dodd y Stillman (9) pusieron de manifiesto que el grupo nitro en posición 5 aumenta considerablemente la actividad bactericida y bacteriostática del furano y de sus derivados 2-sustituidos. De una gran serie de compuestos estudiados (6, 8-9) han sobresalido, desde el punto de vista de sus posibilidades como agentes quimioterápicos, la 5-nitro 2-furaldehidosemicbazona (5, 7), el 5-nitrofurfurilmetileter (8), la N-(5-nitro-2-furfuriliden)-2-amino-2-oxazolidona (11-12) y la N-(5-nitro-2-furfuriliden)-1-aminohidantoína (NFH) (15, 17, 22). Esta última posee una baja toxicidad y un efecto antibacteriano particularmente intenso sobre las enterobacteriáceas y estreptococáceas. La rápida absorción intestinal y elevada concentración a nivel del tracto renal han hecho de este compuesto un eficaz y selectivo desinfectante urinario.

De acuerdo con Dodd y cols. (8), el elevado grado de actividad de la NFH está específicamente ligado, no sólo al grupo nitro en posición 5, sino también a la cadena  $-C' = N - N' - C'' -$  en posición 2.

Amorosa y Davalli (2) y Fenech y cols. (10) han puesto de manifiesto que el grupo R terminal de la cadena  $-C' = N - N' - C'' - R$ , puede modificar considerablemente la potencia y selectividad de la acción

bacteriostática y bactericida del derivado nitrofuránico. Sin embargo, hasta el presente, la NFH parece constituir un óptimo de actividad y un mínimo de toxicidad para este tipo de compuestos.

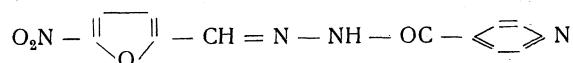
En el presente trabajo se estudian las propiedades bactericidas y bacteriostáticas *in vitro* de la 5-nitro-2-furfurilidenisonicotinilhidrazone (NFI) sobre un grupo relativamente extenso de bacterias patógenas para el hombre.

La NFI es un derivado nitrofuránico obtenido recientemente y todavía muy poco estudiado (13, 16, 18-19). Las únicas propiedades bacteriológicas descritas son los resultados obtenidos sobre placas, llevadas a cabo comparativamente con otros nitrofuranos sobre una cepa única de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y de *Streptococcus equi* (12). No se han realizado pruebas comparativas frente a los derivados más activos, como la NFH.

#### MATERIAL Y METODOS

##### *Estructura y propiedades fisicoquímicas*

La NFI tiene por fórmula:



Es un sólido amarillo grisáceo, inodoro e insípido. P. f.: 256°-259 °C. Es muy poco soluble: en agua hirviendo se pueden preparar soluciones sólo hasta la proporción de 1:2.000; con polietilenglicoles líquidos, de hasta 1:200.

La NFI en solución acuosa presenta un espectro de absorción con dos máximos a 275 y 360 m $\mu$  y dos mínimos a 250 y 305 m $\mu$  (13).

##### *Acción antibacteriana in vitro*

Inicialmente se ha ensayado la NFI sobre seis cepas de *Staphylococcus*, ocho cepas de *Escherichia coli*, diez cepas de *Streptococcus*, dos cepas de *Pseudomonas*, cuatro cepas de *Proteus* y dos cepas de *Klebsiella*. Para que los resultados fueran más comparables, los ensayos se han llevado a cabo simultáneamente con la NFH y, para situar mejor el nuevo compuesto sobre su eventual interés terapéutico, tam-

bién se han hecho pruebas paralelas con sulfoisoxazol, azul de metileno, sulfacetamida, yodometilato de hexametilentetramina y ácido mandélico.

Las concentraciones inhibidoras fueron determinadas por el método de las diluciones sucesivas en tubos con medio de caldo peptonado ordinario, al que se añade un 5 por ciento de sangre para los estreptococos. Los resultados se refieren a cuarenta y ocho horas de incubación a 38 °C.

#### *Sensibilidad a la NFI de cepas patógenas*

Los ensayos bacteriológicos precedentes se han llevado a cabo sobre cepas mantenidas durante varios años en el laboratorio, sin que se tenga un conocimiento preciso de su grado actual de virulencia ni de la naturaleza del terreno del que fueron primitivamente aisladas. Por este motivo, se consideró de particular interés completar el estudio de las propiedades bacteriostáticas de la NFI, determinando la sensibilidad de una serie de cepas patógenas recién aisladas. En atención a las posibilidades terapéuticas más inmediatas del producto y a la facilidad de obtener un número suficientemente elevado de gérmenes en un tiempo razonable, se decidió llevar a cabo la investigación sobre las bacterias halladas en orina reciente de enfermos con infecciones agudas y crónicas del tracto urinario.

Sistematicamente se procedió al aislamiento y determinación de la sensibilidad a la NFI de los gérmenes hallados en las muestras de orina que a este efecto nos fueron facilitadas por el Servicio del Prof. Gil Vernet del Hospital Clínico de Barcelona, por el Servicio del Dr. L. Batalla, del Hospital del Sagrado Corazón de Barcelona, por la Clínica particular del Dr. Serrallach y por el Dispensario Ambulatorio del S. O. E. de Hôpital de Llobregat (Dr. Bosch).

Al recibir las muestras de orina se obtuvo inmediatamente el sedimento, a partir del cual se hizo un recuento directo del número de gérmenes/mlilitro. Para eliminar lo flora banal, se desecharon las muestras que contenían menos de 1.000 gérmenes/1 ml. En este caso, de acuerdo con el criterio de Sanford (20), se ha considerado que no existía una verdadera infección urinaria.

El sedimento de 25 ml de las orinas seleccionadas se suspendió en 2 ml de agua destilada, y de esta suspensión se sembraron 0,5, 0,1 y

0,01 ml, respectivamente, en tres placas de agar ordinario y en otras tres de agar-sangre. El referido volumen se mezcla a 40°-45 °C con 10 ml de medio, que luego se extiende lo más uniformemente posible sobre una placa de 20 cm con 20 ml de medio de soporte previamente consolidado. A las veinticuatro horas se aislan los gérmenes en cultivo puro, procediéndose luego a su clasificación (3).

De este modo fueron obtenidas 51 cepas bacterianas distintas que, de acuerdo con la finalidad de la investigación, se clasificaron en los siguientes grupos:

- a) Gram-negativos
  - 1. *Proteus vulgaris*
  - 2. *Escherichia coli*
  - 3. *Pseudomonas aeruginosa*
  - 4. *Aerobacter*
  - 5. *Klebsiella*
  - 6. Bacilos no identificados
- b) Gram-positivos
  - 7. *Staphylococcus*
  - 8. *Streptococcus*
  - 9. Bacilos no identificados
  - 10. Cocos no identificados

Se siembra un asa del cultivo de veinticuatro horas en tubos a diluciones sucesivas de NFI desde 2 µg/1 ml a 250 µg/1 ml. A este efecto se utilizó una solución de NFI al 0,2 por ciento en polietilenoglicol 300.

## RESULTADOS

### *Acción antibacteriana in vitro*

En el cuadro 1 se encuentran las concentraciones que inhiben parcial y totalmente en cuarenta y ocho horas el crecimiento de cuatro cepas de *Staphylococcus pyogenes aureus* y dos de *Staphylococcus pyogenes albus*. Destaca inmediatamente la gran sensibilidad de estos gérmenes a la NFI.

*Cuadro 1. Inhibición parcial (p) y total (t) del crecimiento en cuarenta y ocho horas de varias cepas de Staphylococcus a 38 °C*

Producto	Inhibición	Concentraciones mínimas inhibidoras, microgramos/mlilitro					
		<i>S. aureus</i>		<i>S. albus</i>		<i>S. aureus</i>	
		I	II	III	IV	V	VI
NFI	p	0,50	0,25		3,20	6,25	6,75
	t	3,90	3,90	3,5	6,25	12,50	12,50
NFH	p	4,80				12,50	12,50
	t	9,75	39,00	12,5	12,00	25,00	25,00
Sulfoisoxazol	p	312,00					
	t	625,00	156,00				
Sulfacetamida	p						
	t	5.000,00	5.000,00				
Yodometilato de hexametilentetramina	p						
	t			625,00			
Acido mandélico	p						
	t	5.000,00	5.000,00				
Azul de metileno	p		78,00				
	t	156,00		19,50			

Cuadro 2. Inhibición parcial y total del crecimiento en cuarenta y ocho horas de varias cepas de *Streptococcus* a 38 °C

*Cuadro 3. Inhibición parcial y total del crecimiento en cuarenta y ocho horas de varias cepas de colibacilos a 38 °C*

Producto	Inhibición	Concentraciones mínimas inhibidoras, microgramos/mililitro							
		<i>Escherichia coli</i>							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
NFI	p	25,00	25	12,5	25	25	25,0		25
	t	31,20	50	25,0	50	50	50,0	50	50
NFH	p	9,75					12,5	25	
	t	25,00	25	25,0	25	25	25,0	50	25
Sulfoisoxazol	p	39,00							
	t	625,00							
Sulfacetamida	p								
	t	1.250,00							
Yodometilato de hexametilentetramina	p								
	t	5.000,00							
Ácido mandélico	p								
	t	5.000,00							
Azul de metíleno	p								
	t	625,00							

Cuadro 4. Inhibición parcial y total del crecimiento en cuarenta y ocho horas de varias cepas de *Pseudomonas*, *Proteus* y *Klebsiella* a 38 °C

Producto	Inhibición	Concentraciones mínimas inhibidoras, microgramos/mililitro									
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Proteus</i>				<i>Klebsiella</i>	
		I	II	I	II	III	IV	I	II		
NFI	p	125	62	62	50	62,5	62,5	62,5	62,5		
	t	250	125		50	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0	125,0
NFH	p	312	250	62		62,5		62,5	62,5		
	t	625	500			125,0	156,0	125,0	62,5		
Sulfoisoxazol	p										
	t	625						1.250,0		1.250,0	
Sulfacetamida	p										
	t	5.000						5.000,0		5.000,0	
Yodometilato de hexametilentetramina	p							312,0			
	t	5.000						625,0		625,0	
Acido mandélico	p										
	t	5.000						5.000,0			

En el cuadro 2 se hallan los resultados obtenidos sobre ocho cepas de *Streptococcus pyogenes* v dos de enterococo. La sensibilidad resulta bastante variable y la NFH parece más activa.

Resultados parecidos se encuentran frente a las ocho cepas de *Escherichia coli*, si bien en este caso la sensibilidad presenta una menor dispersión y los dos nitrofuranos dan valores semejantes (cuadro 3).

De acuerdo con los resultados del cuadro 4, *Proteus* sería ligeramente más sensible a la NFI que a la NFH, mientras que con *Klebsiella* se presentaría el caso contrario. Como en las otras experiencias, los demás compuestos ensayados son mucho menos activos. Frente a las dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, la NFI es el producto más activo de los ensayados, aun cuando se precisan dosis relativamente más altas que las necesarias para inhibir el crecimiento de los otros organismos. En este caso, la NFH requiere dosis próximas al sulfoisoxazol.

A partir de los datos de los cuadros anteriores, en la figura 1 se expresa el porcentaje de los gérmenes ensayados que han resultado sensibles hasta 5.000 µg/1 ml y el intervalo de concentraciones mínimas

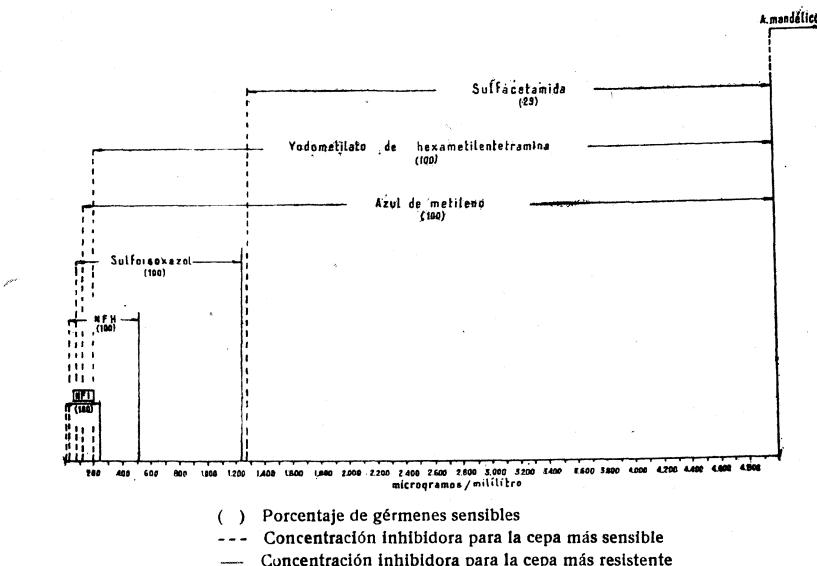


Figura 1. Intervalo de concentraciones mínimas efectivas sobre 32 cepas bacterianas

efectivas para inhibir el crecimiento desde los gérmenes más sensibles a los más resistentes. La NFI es el producto que actúa por término medio a dosis más pequeñas y con mayor regularidad.

Se ha comprobado en una cepa de *Staphylococcus* y otra de *Escherichia coli* que la concentración germicida y la germiestática se encuentran muy próximas, a diferencia de lo que sucede con algunos antibióticos y sulfamidas.

Un 10 por ciento de orina añadida al medio de cultivo no afecta a la actividad inhibidora de la NFI.

#### *Sensibilidad a la NFI de cepas patógenas*

En el cuadro 5 se refieren las concentraciones mínimas de NFI que no han permitido el crecimiento del organismo correspondientes. Los resultados consignados ponen de manifiesto que las 51 cepas encontradas son sensibles a la NFI a una concentración de 250 µg/1 ml, o inferior. Las cepas de *Proteus*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* presentan una sensibilidad muy uniforme y relativamente menor. Los demás gérmenes muestran una resistencia variable, siendo el estafilococo el organismo más sensible por término medio.

En las órinas estudiadas se hallaron, unas veces, un solo germen, y otras, varios. Cada germen, en particular, se repite con una frecuencia variable, pero resulta evidente que de los diez tipos adoptados, los organismos no identificados representan una proporción muy pequeña.

En el cuadro 6 se reúnen los distintos gérmenes hallados en las orinas estudiadas, en seis grupos: *Staphylococcus* (I), *Coli-aerogenes* (II), *Strepto-enterococcus* (III), *Proteus* (IV), *Pseudomonas* (V) y Otros gérmenes (VI). De este modo, la frecuencia de cada germen aislado por nosotros puede compararse fácilmente con las estadísticas de otros autores (4, 14, 20-21, 23). Resulta así que de un total de 588 casos de infecciones urinarias, los cinco grupos determinados son responsables del 99 por ciento.

El cuadro 6 señala que en todos los casos el tipo *Coli-aerogenes* predomina claramente. En cambio, existen considerables discrepancias con respecto a la frecuencia de los demás gérmenes. Si tenemos en cuenta que *Staphylococcus* casi siempre se presenta asociado a otros microorganismos, el grupo *Strepto-enterococcus* es sin duda el que sigue en importancia. *Proteus* y *Pseudomonas* tienen una incidencia

Cuadro 5. Concentraciones mínimas de NFI necesarias para inhibir completamente el desarrollo de gérmenes aislados de la orina de enfermos

Microorganismos	Número total de cepas	Concentraciones mínimas inhibidoras, microgramos/mililitro							
		2 o menor	4	8	16	31	62	123	250
<i>Proteus vulgaris</i>	5	0	0	0	0	0	4	1	0
<i>Escherichia coli</i>	18	0	0	1	1	5	5	1	0
<i>Aerobacter</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	0	0	0	0	0	1	4	2
<i>Klebsiella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	12	0	0	0	1	3	3	4	1
<i>Staphylococcus</i>	10	1	4	2	1	2	0	0	0
Bacilos gram-negativos no identificados	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Bacilos gram-positivos no identificados	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Cocos gram-positivos no identificados	1	0	0	0	0	0	0	1	0

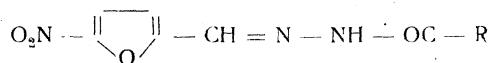
Cuadro 6. Gérmenes hallados en infecciones urinarias y su frecuencia

	Autores y número de casos							Frecuencia	
	Alcalá y cols. 178	Bogash y cols. 21	Parés 25	Sanford y cols. 212	Spittel y cols. 81	Woback y cols. 76	Total 588	Parés	Total
								Porcentaje	
<i>Staphylococcus</i>	9	2	10	27	26		74	40	11
<i>Coli-aerogenes</i>	129	12	14	108	54	62	379	56	55
<i>Strepto-enterococcus</i>	5	5	12	53	51		126	48	18
<i>Proteus</i>	21	2	5	24	7	8	67	20	10
<i>Pseudomonas</i>					10	6	31	28	5
Otros gérmenes	1		8		1		5	12	1

más variable de una a otra estadística, pero siempre relativamente pequeña.

### DISCUSION

Las diferencias de selectividad entre los dos nitrofuranos se encuentran representadas gráficamente en la figura 2. Estas dos sustancias difieren por la naturaleza del grupo R de



En las NFH, R es el resto aminohidantoína, y en la NFI, el isonicotinilo. Su actividad es relativamente muy parecida, pero presenta singulares diferencias de uno a otro germen, y en conjunto el intervalo de concentraciones mínimas inhibidoras es más estrecho y se halla a un nivel más bajo en la NFI.

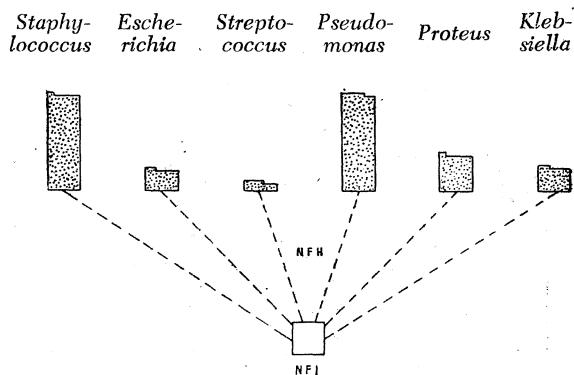


Figura 2. Dosis equivalentes de NFI y NFH para varias cepas bacterianas.

Con las concentraciones inhibidoras medias y las frecuencias de cada germen, señaladas en el cuadro 6, podemos obtener una estimación de la efectividad potencial media de cada uno de los productos ensayados. En efecto, siendo la concentración mayor ensayada de

5.000  $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$ , la actividad antimicrobiana de un compuesto frente a cada germen puede expresarse por la relación

$$A = \frac{5.000}{\text{Concentración (microgramos/mlilitro) inhibidora media}}$$

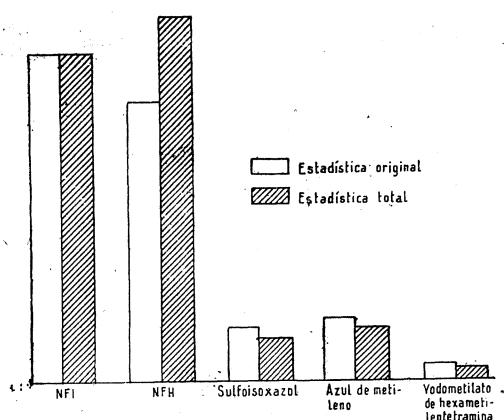
Si  $F$  es la frecuencia de cada germen, la efectividad potencial media de cada producto puede representarse por:

$$EP = A_1F_1 + A_2F_2 + A_3F_3 + A_4F_4 + A_5F_5$$

y dando a la EP de la NFI el valor 100, el coeficiente correspondiente a cualquiera de los otros productos será:

$$\frac{EP_{\text{Producto}}^{\text{NFI} = 100}}{EP_{\text{Producto}}} = \frac{EP_{\text{producto}} \times 100}{EP_{\text{NFI}}}$$

En la *figura 3* se hallan representados los resultados obtenidos para los productos más activos y para las frecuencias correspondientes a



*Figura 3. Efectividad media potencial de la NFI como antiséptico urinario en relación con otros productos*

nuestra estadística y a la del promedio de las reunidas en el *cuadro 6*. Destaca inmediatamente la superioridad de los compuestos nitrofuránicos, entre los cuales no existen diferencias mayores que las que pue-

den obtenerse al pasar con el mismo producto de la frecuencia de gérmenes obtenida por un autor a la del otro.

La NFI es un compuesto de escasa toxicidad que, al parecer, se absorbe rápidamente por el intestino. La orina aparece coloreada después de menos de media hora de su administración oral en el ratón. Sin embargo, la coloración de la orina no se debe a la NFI, sino a los productos de su degradación metabólica. La considerable labilidad de la NFI a las enzimas de la célula animal, hace pensar que no podrán obtenerse concentraciones suficientemente altas de dicha sustancia dentro del organismo y que, en consecuencia, el interés de este antibacteriano como quimioterápico sea limitado. Sin embargo, la elevada actividad que presenta *in vitro* constituye un estímulo para estudiar nuevas sustancias relacionadas, con la esperanza de hallar algún nuevo quimioterápico más potente o más específico que los ya conocidos.

#### RESUMEN Y CONCLUSIONES

Entre 7 y 188  $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$ , la 5-nitro-2-furfurilidenisonicotinilhidrazona (NFI) se ha mostrado activa para inhibir *in vitro* el crecimiento de un total de 32 cepas bacterianas, comprendiendo 6 de *Staphylococcus*, 8 de *Escherichia*, 10 de *Streptococcus*, 2 de *Pseudomonas*, 4 de *Proteus* y 2 de *Klebsiella*. Sobresale la singular sensibilidad de los estafilococos a la NFI.

Sobre las mismas cepas, la N-(5-nitro-2-furfuriliden)-1-aminohidantoína (NFH), presenta una actividad del mismo orden, si bien con singulares diferencias de un microorganismo a otro.

De acuerdo con trabajos precedentes de otros autores, el grupo nitro en posición 5 y la cadena —C' = N—N'—R en posición 2 determinan fundamentalmente el grado de actividad de los furanoderivados. Sin embargo, la naturaleza del grupo R puede inducir significativos cambios en el espectro antimicrobiano.

Otros compuestos, como el sulfoisoxazol, la sulfacetamida, el yodometilato de hexametilentetramina, el ácido mandélico y el azul de metileno poseen una actividad bacteriostática muy inferior a la correspondiente a los nitrofuranos referidos.

La NFI parece presentar un tipo de acción fundamentalmente bactericida.

La orina no modifica la actividad de la NFI.

De 51 cepas bacterianas distintas aisladas de 25 casos de infecciones urinarias, 5 corresponden a *Proteus vulgaris*, 13 a *Escherichia coli*, 1 a *Aerobacter*, 7 a *Pseudomonas aeruginosa*, 12 a *Streptococcus*, 10 a *Staphylococcus*, 1 bacilo gram-negativo no identificado, 1 bacilo gram-positivo no identificado y 1 coco gram-positivo no identificado. La totalidad de estas cepas se muestra sensible a la NFI para concentraciones inferiores a 250 µg/1 ml.

Las cepas patógenas menos sensibles a la NFI son las correspondientes a *Pseudomonas* y *Proteus*. Sin embargo, la NFI es el producto más activo de los ensayados sobre estos gérmenes. Las demás especies microbianas presentan una resistencia menor y más variable, siendo el estafilococo el organismo más sensible por término medio.

La NFI es poco tóxica para el organismo animal, pero también parece ser muy poco estable. Sus posibilidades como quimioterápico pueden estar limitadas por este último motivo. La gran actividad *in vitro* es un estímulo para proseguir con el estudio de otras sustancias relacionadas.

#### RESUME

La nitro-5-furfurylidène-2-isonicotinylhydrazone (NFI) s'est montrée active *in vitro* pour inhiber la croissance d'un ensemble de 32 souches bactériennes pour concentrations minima comprises entre 7 et 188 µg/1 ml. De ces souches, on en trouve 6 de *Staphylococcus*, 8 de *Escherichia*, 10 de *Streptococcus*, 2 de *Pseudomonas*, 4 de *Proteus* et 2 de *Klebsiella*. On remarque la singulière sensibilité des staphylocoques en face de la NFI.

Sur les mêmes souches, la N-(5-nitro-5-furfurylidène-2)-amine-1-hydantoïne (NFH) présente une activité du même degré, malgré certaines différences existentes entre les microorganismes essayés.

D'après les travaux précédents d'autres auteurs, le groupement nitro en position 5 et la chaîne — C' = N' — C'' — R en position 2 détermine fondamentalement le degré d'activité des furannes-dérivés. Pourtant, la nature du groupement R peut donner lieu à des changements significatifs dans le spectre antimicrobien.

Quelques autres composés, tels que le sulfoisoxazole, la sulfacétamide, le iodométhylate de hexaméthylène-tétramine, l'acide mandélic

et le bleu de méthylène, montrent une activité bactéristatique très inférieure à celle des composés nitrofurannes sus-mentionnés.

La NFI semble agir sur les bactériens d'une façon fondamentalement bactéricide.

L'urine ne modifie pas l'activité de la NFI.

D'un ensemble de 51 souches bactériennes différentes isolées de 25 cas d'infection urinaire, 5 ont résulté de *Proteus vulgaris*; 13 de *Escherichia coli*; 1 du genre *Aerobacter*; 7 de *Pseudomonas aeruginosa*; 12 du genre *Streptococcus*; et 3 germes non identifiés, 1 bacille gram-négatif, 1 bacille gram-positif et 1 coccus gram-positif. Tout l'ensemble de ces souches se montre sensible à la NFI pour des concentrations non supérieures à 250 µg/1 ml.

Les souches les plus résistantes appartiennent à des germes *Pseudomonas* et *Proteus*, malgré le fait d'être ce produit le plus actif même dans cette sorte de germes.

Les autres espèces bactériennes montrent une majeure sensibilité, si bien plus variable aussi.

La NFI est bien peu toxique pour l'organisme supérieur, mais parallèlement elle montre une basse stabilité dans celui-ci. On pense par ce dernier fait que les possibilités de ce produit comme futur chimio-thérapie peuvent être réduites. La grande activité *in vitro* est encourageante pour poursuivre avec l'étude d'autres substances relationnées.

#### SUMMARY

5-Nitro-2-furfurylidene-isonicotinylhydrazone (NFI), in concentrations between 7 and 188 µg/1 ml, inhibits *in vitro* the growth of 32 bacteria strains, 6 strains of *Staphylococcus*, 8 of *Escherichia*, 10 of *Streptococcus*, 2 of *Pseudomonas*, 4 of *Proteus*, and 2 of *Klebsiella*. The great sensitivity of *Staphylococcus* towards NFI is remarkable.

N-(5-Nitro-2-furfurylidene)-1-amino-hydantoin (NFH) shows similar activity upon the same strains, although there are slight differences from one microorganism to another.

According to previous work of other authors, the nitro group in position 5 and the —C' = N — N'—R chain in position 2 determine fundamentally the degree of activity of a furane derivative. However,

the nature of group R may give rise to remarkable changes in the anti-microbial spectrum.

Other compounds such as sulfaisoxazol, sulfacetamide, hexamethylenetetramine methoiodide, mandelic acid, and methylene blue possess a bacteriostatic activity much smaller than that of the nitrofurane derivatives mentioned.

NFI seems to show a fundamentally bactericide type of action.

Urine does not modify the activity of NFI.

From 25 cases of urinary infections, 51 different bacteria strains were isolated: 5 of *Proteus vulgaris*, 13 of *Escherichia coli*, 1 of *Aerobacter*, 7 of *Pseudomonas aeruginosa*, 12 of *Streptococcus*, 10 *Staphylococcus*, 1 not identified gram-negative bacillus, 1 not identified gram-positive bacillus and 1 not identified gram-positive coccus. All of these strains are sensitive to NFI in concentrations lower than 250 µg/1 ml.

The patogenous strains less sensitive to NFI are those corresponding to *Pseudomonas* and *Proteus*. However, NFI is the most active product among those tested on these germs. The remaining microbial kinds present a lesser and more variable resistance; as an average, the *Staphylococcus* are the most sensitive organisms.

NFI has a low toxicity for animal organisms but its stability *in vitro* seems to be poor. Its possibilities as chemotherapeutic may become hampered for this reason, but its great activity *in vitro* suggest the convenience of further study with related substances.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ALCALÁ, F. y R. 1956. Rev. Clín. EspaÑ., LXII, 99-107.
2. AMOROSA, M., y DAVALLI, S. 1956. Farmaco, Ed. Sci., 11, 21-26.
3. Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 1957. 7.<sup>a</sup> edición.
4. BOGASH, M.; ELLIS, H., y MURPHI, J. J. 1956. J. Am. Med. Assoc., 161, 1.564-65.
5. CRAMER, D. L. 1947. J. Bacteriol., 54, 119-25.
6. CRAMER, D. L., y DODD, M. C. 1946. J. Bacteriol., 51, 293-303.
7. DODD, M. C. 1946. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 86, 311-23.
8. DODD, M. C.; CRAMER, D. L., y WARD, W. C. 1950. J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., XXXIX, 313-18.
9. DODD, M. C., y STILLMAN, W. B. 1944. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 83, 11-18.

10. FENECH, G.; TOMMASINI, A., y LA ROSA, C. 1955. Farmaco, Ed. Sci., 10, 399-412.
11. GEVER, G.; O'KEEFE, C.; DRAKE, G.; EBETINO, F.; MICHELS, J., y HAYES, K. 1955. J. Am. Chem. Soc., 77, 22-77.
12. HAYES, K.; EBETINO, F., y GEVER, G. 1955. J. Am. Chem. Soc., 77, 2.282.
13. MARTÍ, M.; BULTÓ, I.; VILLARROZA, T., y PARÉS, J. 1957. Galénica Acta, 10, 111-18.
14. McGEOWN, G. 1956. Brit. Med. J., 4.987, 274-76.
16. MIYATAKE, K.; ICHIMURA, S.; NAGASAKI, S., y HOJI, J. 1955. J. Pharm. Soc. Japan, 75, 1.068.
17. RICHARDS, W. A.; RISS, E.; KASS, E. H., y FINLAND, M. 1955. Arch. Internal. Med., 96, 437-50.
18. Roche Products Ltd., patente británica 724.699, 23-3-55.
19. SAH, P. P. T., y PEOPLES, S. A. 1954. J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., XLIII, 514.
20. SANFORD, P.; CUTTING, B. F.; FRANCES, H. M., y HARTWELL, J. 1956. Am. J. Med., 20, 88-104.
21. SPITTEL, J. A.; MARTIN, W. J., y NICHOLS, D. R. 1956. Ann. Internal. Med., 44, 302.
22. WAISBREN, W. A., y CROWLEY, W. 1955. Arch. Internal. Med., 95, 653-61.
23. WOBACK, C. I.; JACKSON, C. G.; GOCK, T. M.; KASS, E. H.; HAIGHT, T. H., y FINDLAND, M. 1952. Arch. Internal. Med., 89, 240.

**INSTITUT «PASTEUR»  
SERVICE DE MICROBIOLOGIE DU SOL**

## **INTERACTIONS ENTRE LES MICROORGANISMES TELLURIQUES ET LES PLANTES**

**PAR**

**J. POCHON (\*)**

On ne saurait plus considérer les plantes comme faisant leurs synthèses tissulaires uniquement à partir du carbone du gaz carbonique atmosphérique, d'une part, des sels et de l'eau puisés dans le sol, d'autre part, ces sels n'étant eux-mêmes que la fraction soluble des minéraux telluriques.

On sait maintenant, en effet, que le sol est un véritable organisme vivant, ayant son propre métabolisme, qu'en réalité les plantes vivent des produits de ce métabolisme et que, de leur côté, elles agissent sur les modalités de la vie du sol. Ainsi est constituée une biocénose étroite entre les microorganismes telluriques et la végétation; elle conditionne le «sol», au sens des pédologues et des agronomes, formé à partir de la roche mère originelle.

L'étude de cette biocénose ne peut être qu'écologique et le fait dominant mis en évidence est qu'il existe un double gradient d'intensité et de spécificité des interactions plantes-microorganismes: l'un *topographique* fonction de la distance de la plante, l'autre *phylogénétique*, fonction du degré d'adaptation spécifique réciproque des microorganismes et de la plante. Cette distinction est d'ailleurs plus théorique que réelle car les deux types de processus interfèrent souvent.

Loin des racines, et même en dehors de toute végétation (tout au

---

(\*) Conferencia pronunciada en el Centro de Investigaciones Biológicas, del C. S. I. C. (Madrid, 20-III-1963).

moins dans un passé récent et pour autant qu'antérieurement des plantes aient permis la constitution du complexe organominéral tellurique), le sol a sa vie propre. Elle assure la pérennité de la Vie à l'échelle planétaire puisque, par ses produits de métabolisme, directement et indirectement, elle assume la nutrition des végétaux, mettant continuellement à la disposition de ceux-ci les éléments minéraux essentiels.

Il ne faut pas oublier en effet que le stoc de matière organique du sol, partiellement humifiée, est bien supérieur à la quantité de matière organique vivante de la biosphère, à tout moment. Inutilisable directement par la plante, il doit être, de façon constante et progressive, minéralisé, cette minéralisation est d'ailleurs elle-même couplée à des réactions de synthèse qui assurent, dans un sol en équilibre climacique, le maintien du stoc humique à un niveau constant. Il n'est pas question d'envisager ici l'ensemble de ces phénomènes classiques de minéralisation, mais quelques points méritent cependant d'être brièvement mentionnés car les phénomènes d'équilibre microbien y jouent un rôle majeur.

En ce qui concerne la minéralisation de l'azote, il convient d'insister sur le fait que l'ammonification de la matière organique ne doit pas être considérée, du point de vue qui nous occupe ici, séparée de son contexte économique car la dynamique de ce phénomène est fonction à la fois de la nature du substrat organique et de la teneur du sol en humus; de façon plus précise, des rapports C/N de ce substrat et de cet humus.

Comme toutes les réactions biologiques du sol se font en chaîne, l'ammonification, ainsi considérée dans sa complexité écologique, conditionne partiellement la nitrification; le niveau en «azote valable» d'un sol ne doit jamais être considéré, d'ailleurs, de la façon statique mais, lui aussi, dans sa dynamique écologique, fonction de l'ammonification préalable, des conditions telluriques (favorisant ou non les *Nitrosomonas* et les *Nitrobacter*) et de la végétation (en particulier de ses prélèvements en nitrates).

Le fait essentiel est que cette vie du sol met constamment à la disposition des végétaux, dans les conditions naturelles normales et favorables, les quantités de nitrates nécessaires à leur nutrition azotée (il n'est pas question ici des sols de «culture»).

La libération des éléments minéraux de leurs complexes organiques

(et par conséquent leur mise à la disposition des plantes) est également le fait de cette vie du sol: Suivant le potentiel d'oxydoréduction de celui-ci, la minéralisation se fait en aérobiose ou en anaérobiose pour aboutir à la forme minérale oxydée ou réduite de l'élément considéré; le plus souvent l'une des deux seulement est soluble (et donc utilisable par la plante); mais presque toujours un équilibre s'établit, variable dans le temps et les horizons, entre les germes oxydants et réducteurs si bien que, sauf dans des cas particuliers défavorables, la plante trouve toujours les éléments minéraux qui lui sont indispensables, pour autant qu'ils soient présents dans la roche-mère.

Pour en terminer avec cette «vie propre du sol», il faut évidemment rappeler que les pertes constantes en azote sont compensées, à l'échelle planétaire, par la fixation biologique de l'azote atmosphérique et que l'énergie est fournie (carbone organique à la disposition des hétérotrophes) par les processus biologiques de décomposition des substances organiques carbonées, en particulier de la cellulose.

Méconnaître cette Vie propre du sol serait une lacune grave, à la base des interactions entre les microorganismes et les plantes.

Un des deux aspects de ces interactions est l'influence de la plante sur la Vie du sol, l'autre étant, inversement, celle des microorganismes sur la physiologie de la plante.

C'est dès la phase d'imbibition et de germination de la graine que le végétal retentit sur la microflore tellurique (Spermophère) par l'intermédiaire de sa propre microflore, de ses constituants de surface et des exsudats. Au fur et à mesure de la croissance de la plante, par ses sécrétions radicellaires surtout, celle-ci accentue cette perturbation (Rhizosphère), faible à distance des racines, d'autant plus intense que l'on considère un locus proche (gradient topographique).

Il ne saurait être question, évidemment, de traiter de la rhizosphère, notion maintenant classique, avec ses perturbations de l'équilibre tellurique, portant sur la répartition morphologique, physiologique et nutritionnelle des germes; notons seulement deux points.

Tout d'abord le mécanisme de cette perturbation: il n'est pas seulement le fait des sécrétions radicellaires, mais aussi des excréptions des microorganismes eux-mêmes (ceux de la graine, du sol et de la spermophère); dans cet ensemble l'on peut dissocier des facteurs stimulants et inhibiteurs plus ou moins spécifiques, aboutissant à une sélec-

tion des espèces par l'intermédiaire de leurs taux de croissance et de leur pouvoir de synthèse.

En second lieu il faut insister sur le fait que, dans l'ensemble, cette perturbation se traduit par une augmentation du nombre des bactéries et de leur activité physiologique, avec accélération de la rotation des cycles biologiques (carbone, azote, éléments minéraux).

Ceci nous amène à envisager l'aspect symétrique des interactions: influence des microorganismes sur la plante.

Cette accélération de la rotation des cycles va, tout d'abord, mettre à tout moment davantage d'éléments nutritifs à la disposition de la plante, d'où effet bénéfique pour celle-ci (sauf dans le cas où il y a concurrence avec le végétal pour certains corps, en particulier l'azote—voir 3<sup>e</sup> conférence).

Mais, outre cette action classique, les microorganismes telluriques, au sein de la rhizosphère, on le sait maintenant, agissent aussi directement par leur propre métabolisme: excréptions de produits du type des hétérauxines; l'acide  $\beta$ -indol-acétique, en particulier, est synthétisé par de nombreux organismes et l'on a pu démontrer, au laboratoire, l'action de ces bactéries sur les premiers stades de la croissance. Mais excréptions, aussi de molécules beaucoup plus volumineuses dont on sait maintenant, qu'elles peuvent être absorbées par les racines: acides aminés, sucres, acides organiques, facteurs de croissance, stimulines diverses; la comparaison de la composition des tissus de plantes qui proviennent de graines désinfectées, cultivées stérilement, et de plantes cultivées en présence de certaines souches bactériennes, pures ou en association, a montré des différences notables, presque toujours en faveurs de ces dernières. C'est ainsi que l'on peut parler d'une véritable «nutrition complémentaire organique» des végétaux.

Il est enfin un point important à connaître: ce sont les interactions des microorganismes entre eux au sein de la rhizosphère; les phénomènes de satellitisme (synergie) ou d'inhibition y sont intenses et jouent un rôle majeur dans l'équilibre des phytopathogènes; une meilleure connaissance de ces phénomènes pourra vraisemblablement les faire utiliser pour le contrôle biologique des infections végétales bactériennes et fongiques.

Il reste à envisager maintenant un aspect tout à fait récent des interactions plantes-microorganismes; pendant longtemps on a con-

sidéré, à part, les germes saprophytes, pathogènes et symbiotiques, qu'ils soient bactériens ou fongiques.

C'est cependant en ce qui concerne les champignons que l'on a reconnu en premier lieu tous les cas de transition entre ces trois groupes et tout particulièrement l'adaptation phylogénétique à la mycorhization.

Mais c'est surtout le cas des bactéries qui sera évoqué ici et, laissant de côté les phytopathogènes, uniquement celui de l'adaptation à la symbiose. Des travaux, qui ne remontent pas à plus de quelques années, ont mis en évidence deux ordres de faits, dont l'interprétation présente encore une large part d'hypothèse, mais cependant très suggestifs.

Tout d'abord, chez les *Azotobacter*, considérés comme des saprophytes typiques, on a pu montrer que le plus souvent les souches isolées de la rhizosphère d'une plante définie étaient plus actives sur cette espèce végétale, lors de la bactérisation des graines (non pas tant par l'azote fixé que par les produits synthétisés); bien plus, dans quelques cas et pour certaines plantes, les passages répétés, de la souche ainsi isolée, sur de jeunes plantules (ou sur des millieux additionnés de sécrétions radicellaires de celles-ci), permettent d'obtenir des souches encore plus actives, à tel point qu'il est permis de se demander si l'on n'assiste pas là à l'ébauche d'une adaptation spécifique (sans préjuger du mécanisme: adaptation, mutation, sélection).

En ce qui concerne les *Rhizobium*, considérés, eux comme des symbiotiques typiques, il n'est évidemment pas de notre propos de traiter, ni même d'évoquer, les caractères classiques de la symbiose parfaite et effective, mais de remarquer seulement que, si l'on se place au point de vue de la biologie pure (et non de l'agronomie), il existe tous les intermédiaires entre les saprophytes (souches non infectantes), les parasites (souches infectantes inefficaces) et les symbiotiques (souches infectantes et effectives).

Des travaux récents permettent d'aller plus loin et, tout au moins à titre d'hypothèse de travail, d'évoquer une phylogénie des souches et même des espèces: L'analyse plus attentive de la spécificité d'hôte (inoculation croisée) d'une part, l'observation de nodules stériles chez les légumineuses et leur infestation secondaire (naturelle ou artificielle) par des souches non spécifiques permettant ultérieurement d'obtenir des races infectives plus ou moins spécifiques et plus ou moins efficaces, suggèrent l'hypothèse d'une phylogénie qui, partant de germes

telluriques indifférenciés saprophytes, couvriraient toute la gamme des relations plante-*Rhizobium* évoquée plus haut et même, de façon plus hardie, des rapprochements avec *Agrobacterium*.

Il apparaît donc de plus en plus, à titre de conclusion, que la physiologie de la nutrition est très directement commandée par la microflore tellurique, que, inversement, les plantes conditionnent pour une large part la vie du sol et surtout, en fin de compte, que cette interaction assure en fait la pérennité de la vie à la surface des terres.

**INSTITUT «PASTEUR»  
SERVICE DE MICROBIOLOGIE DU SOL**

**LA FERTILITE DANS SES RAPPORTS  
AVEC L'HUMIFICATION ET LA CONSERVATION  
DES SOLS**

**PAR**

**J. POCHON (\*)**

Organisme vivant le sol prend naissance, à partir de la roche-mère originelle, au cours des processus d'érosion physiques et chimiques, et par prolifération de microorganismes: bactéries, champignons, algues surtout. Il se développe ensuite (pédogénèse) plus ou moins rapidement selon les conditions locales pour parvenir enfin à l'état de maturité, de sol adulte, pourrait-on dire; l'équilibre de ce sol adulte est fonction essentiellement de la nature de la roche-mère, du climat et de la végétation.

Il a acquis une structure où les colloïdes minéraux et organiques, complexés, jouent un rôle majeur puisque c'est à leur contact que prolifèrent surtout les microorganismes, et puisqu'ils règlent l'état et la circulation de l'eau, elle-même déterminant le potentiel d'oxydo-réduction (conditionnant l'équilibre des processus biologiques aérobies et anaérobies, avec tout ce que cela implique au point de vue biochimique). Ce sol adulte respire, absorbant de l'oxygène et rejetant du gaz carbonique. Il assimile (faisant la synthèse de matières organiques) et désassimile (minéralisant les composés organiques). Il élabore des substances humiques de réserve, agissant comme un véritable volant régulateur de l'équilibre minéralisation-synthèse.

---

(\*) Conferencia pronunciada en el Centro de Investigaciones Biológicas, del C. S. I. C. (Madrid, 21-III-1963).

Mais l'évolution peut se poursuivre: des phénomènes de vieillissement apparaissent; les réactions de minéralisation l'emportent sur celles de synthèses organiques; les réserves humiques s'épuisent et peu à peu le sol, perdant toute activité biologique, aboutit à un état de dégradation que l'on peut comparer à la mort. Trop souvent, d'ailleurs, c'est l'ingérence humaine dans les processus naturels, ce sont des pratiques culturelles mal conduites qui aboutissent à ce résultat lamentable.

Le sol a vu diminuer, ou même disparaître sa fertilité, il a perdu sa structure et les phénomènes d'érosion hydrique et éolienne, auxquels il est devenu très sensible, peuvent entraîner sa disparition totale.

Dans cet exposé nous verrons tout d'abord ce qui caractérise, maintient et perturbe l'équilibre biologique d'un sol parvenu à maturité, en équilibre climacique; c'est le *problème de la fertilité biologique*. Nous verrons ensuite les moyens de lutter contre la sénescence et la mort du sol; c'est le *problème de la conservation biologique*.

Mais il faut auparavant insister sur un fait capital: Il n'y a pas de relation simple et directe, pour un sol donné, entre la notion de fertilité actuelle, que l'agriculteur évalue en «rendement de culture» et celle de conservation de ce même sol; bien plus, assez fréquemment, il y a une certaine incomptabilité entre les facteurs qui déterminent la fertilité maximum et ceux qui assurent la conservation. C'est d'ailleurs ce qui fait le drame de ce dernier problème car il n'est pas seulement scientifique, mais aussi économique et social.

Quoi qu'il en soit, il s'agit là de questions extrêmement vastes dont il ne peut être donné qu'un exposé synthétique qui consistera surtout à penser en *biologiste* des notions agronomiques souvent assez banales.

### I) LA FERTILITE BIOLOGIQUE

Dans le sol adulte, cette fertilité biologique est fonction de l'harmonie entre les réactions de minéralisation et de synthèse; il s'établit un équilibre, non pas statique, mais dynamique. Il faut donc envisager d'abord les facteurs perturbants de cet équilibre, puis nous verrons ses relations avec la végétation spontanée, climacique, et enfin avec les végétations artificielles que constituent les cultures agronomiques.

*A) Facteurs perturbants de l'équilibre biologique du sol*

Il ne saurait être question de traiter des facteurs naturels que sont les saisons et les climats sinon pour insister sur le fait qu'ils conditionnent dans une large mesure la résistance ou, au contraire, la fragilité des sols; issu de la même roche-mère un type de sol pourra être d'une très grande fragilité sous un climat et beaucoup plus résistant sous un autre.

Ce sont les facteurs humains, en d'autre terme les façons culturelles, qui nous intéressent ici au premier chef et, en particulier, ce qu'ils peuvent avoir de néfaste pour l'équilibre du sol.

Les traitements physiques (labours sous toutes ses formes et variété) influent grandement sur la vie du sol: modifiant la répartition des matières énergétiques, aérant les parties profondes ils stimulent la microflore, surtout les germes aérobies, dans tous les groupements fonctionnels; il y a donc une accélération plus ou moins durable de la rotation de tous les cycles, mettant davantage d'éléments nutritifs à la disposition de la plante, d'où son aspect bénéfique pour la culture; mais il ne faut pas oublier que cela signifie aussi une augmentation de la minéralisation des matières organiques avec les dangers impliqués pour certains sols fragiles sous nos climats et surtout en climat tropical (en particulier après dénudation de la surface par un procédé quelconque).

Ces effets, et ces dangers, on les retrouve avec un autre type de traitement, le chaulage des sols acides pour relever le pH; la stimulation de la microflore, comme ci-dessus (mais évidemment par un autre mécanisme) est extrême. Si le danger est faible pour des sols riches en matières organiques (morts tourbeux par exemple) il est grand pour certains sols acides minéraux sableux dont les dernières réserves organiques se trouvent finalement minéralisées si la remontée du pH est très accentuée (d'autant plus que ces sols ont un pouvoir tampon très faible). Signalons d'ailleurs qu'ils ont souvent été artificiellement acidifiés par incorporation de soufre (sols de vignobles; traitement anticryptogamique; le soufre stimule la prolifération des thiobacilles générateurs d'acide sulfurique); secondairement certains éléments minéraux, comme Cu, associé au soufre, manifestent toute leur toxicité.

Mais ce sont évidemment les engrains, minéraux et organiques, qui

sont les agents perturbateurs les plus puissants de l'équilibre biologique du sol.

Les engrains minéraux (surtout azotés), à côté de leur action favorable aux cultures, ont une incidence, trop souvent oubliée, sur la vie du sol. Ils stimulent énergiquement les microorganismes; directement, en fournissant l'azote nécessaire pour minéraliser le carbone organique tellurique; indirectement, par l'effet rhizosphère accru des plantes à prolifération plus vigoureuse. Par ce double mécanisme ils accélèrent la minéralisation des réserves organiques, surtout des matériaux à rapport C/N élevé et ils abaissent celui-ci: deux facteurs essentiels du vieillissement des sols; le danger est surtout grand pour les sols «minéraux» qui peuvent encore s'appauvrir; leur évolution périlleuse est masquée par une sorte de «survie artificielle» jusqu'au jour de l'effondrement de la fertilité, les plantes ne réagissant même plus aux engrains minéraux.

L'analyse de l'action perturbatrice des engrains organiques est beaucoup plus complexe car très variable suivant le degré de compostage de ceux-ci, selon le rapport C/N du substrat enfoui et selon ce même rapport du sol traité. Nous ne pouvons donner ici que les principes généraux.

Si le degré de compostage est élevé (fumiers naturels ou artificiels), les matières aisément fermentescibles ont déjà été métabolisées; l'action sur la microflore tellurique sera tardive et prolongée; s'il est bas, au contraire, ces mêmes substances se trouvent encore en quantité appréciable lors d'enfouissement; la stimulation de la microflore du sol sera précoce et énergique; comme il s'agit le plus souvent de substances glucidiques, il pourra y avoir carence temporaire en azote.

La question du rapport C/N est beaucoup plus difficile. En schématisant à l'extrême on peut dire que si le substrat incorporé à un C/N bas (certains fumiers, des engrains verts très jeunes) les processus d'ammonification vont aboutir à une libération brutale de NH<sub>3</sub>, surtout dans les sols peu humifères (voir conférence I) dont une partie (jusqu'à 50 pour cent) peut se dégager dans l'atmosphère, d'où véritable gaspillage en azote. Inversement si le rapport C/N est élevé (certains fumiers, végétaux âgés et surtout les pailles), la quantité d'azote nécessaire pour métaboliser le carbone sera prise dans le sol, d'où abaissement du niveau nécessaire à la nutrition des végétaux; cependant, à longue échéance, le phénomène sera biologiquement et naturellement corrigé

par fixation d'azote moléculaire (germes fixateurs) secondairement ammonifié puis nitrifié. De tels engrains sont initialement dépressifs sur les cultures mais fortement humigènes. Enfin, c'est avec un enfouissement de *substrat de C/N bien équilibré pour un type de sol donné* que l'on aura l'effet optimum sans gaspillage et sans carence en azote.

#### B) Equilibre biologique et végétation spontanée

Il s'agit ici d'une étude élargie de la «Rhizosphère» (voir conférence I.) non plus à l'échelle d'une plante mais d'une «population».

L'équilibre biologique climacique (sol, climat, végétation) se traduit-il également par un équilibre défini de la microflore?

L'étude statique du problème a montré (Ecole russe) que la loi de zonalité mettait en évidence un rapport dans les diverses zones entre les associations végétales et la répartition de certaines espèces microbiennes, en particulier des *Bacillus*.

Plus intéressants (encore que très partiels à ce jour) sont les résultats des études dynamiques: il s'agit de suivre l'évolution de la microflore sur des catena de sols bien définis par leurs associations phytosociologiques. (qu'il s'agisse de catena évolutives—recherches allemandes; ou topographiques—recherches françaises).

Dans les deux cas il est possible d'aboutir à la conclusion qu'il existe bien un rapport entre microflore et végétation spontanée, l'évolution des deux étant associée; il semble que, assez souvent, l'équilibre climacique parfait se traduit par un palier d'activité minimum de la microflore.

#### C) Equilibre biologique et culture

Existe-t-il un rapport, également, entre la microflore et la fertilité des sols, au sens agronomique du terme? Question d'intérêt majeur pour la prospection des terres. Elle ne peut être résolue qu'en tenant compte de la «vocation» propre du sol; il serait absurde de comparer biologiquement la fertilité d'un sol de vignoble et d'une terre à blé.

D'une manière très générale, cependant, on peut admettre que la fertilité va de paire avec l'activité biologique (rotation des cycles), donc avec la présence d'un grand nombre de microorganismes. Si l'on cherche à préciser cette action on pense que certains groupements, ou espèces seraient des témoins, des tests, particulièrement fidèles et sensibles;

ce rôle a été dévolu aux *Azotobacter*, aux nitrificateurs; il semble bien que les bactéries cellulolytiques aérobies soient surtout valables, traduisant une rotation satisfaisante à la fois des cycles de N et de C ainsi qu'une bonne humification.

## II) LA CONSERVATION BIOLOGIQUE DES SOLS

Il est possible d'être maintenant assez bref car il ne s'agit que de tirer des conclusions de ce qui vient d'être exposé.

En effet le problème majeur est celui de la conservation, ou de l'augmentation, du stock humique puisque l'humus assure à la fois la fertilité, la santé des plantes, la structure du sol et sa résistance aux agents de dégradation, enfin est un volant régulateur de son équilibre biologique.

Tout phénomène de senescence se traduit par une diminution du taux d'humus et une baisse de son rapport C/N.

Or il est des facteurs normaux, inéluctables, de minéralisation: la vie même des microorganismes telluriques. Dans un sol non cultivé, en équilibre climacique (jachère—prairie naturelle) cette minéralisation lente est évidemment fonction du climat. En France on admet 2 pour cent de la masse totale d'humus, par an; pour une teneur moyenne en humus de 3 pour cent (90 tonnes/ha) cela représente à peu près 2 tonnes/ha/an. Dans les sols qui viennent d'être évoqués ces pertes sont équilibrées par les gains (résidus des végétaux non récoltés, fixation biologique de N) et le stock humique se maintient.

Il en va tout autrement dans les sols cultivés, avec récolte: la même minéralisation lente se produit, encore accélérée par l'action des engrains minéraux (voir ci-dessus). Il s'y ajoute l'action des plantes et leur exploitation. Les gains (résidus des racines) ne compensent jamais les pertes et le déficit de la balance s'accentue au contraire d'autant plus que la culture est plus intensive. Les enfouissement artificiels d'une fraction des parties aériennes ne suffit pas pour rétablir l'équilibre (au mieux 70 pour cent des pertes seulement), même avec les meilleures rotations, sauf en cas d'une nnée de légumineuses totalement enfouies.

Comment donc rétablir la balance organo-humique, comment donc assurer la conservation du sol?

L'augmentation des doses d'engrais minéraux va à l'encontre du

but recherché puisqu'ils hâtent la minéralisation de l'humus et l'augmentation des récoltes ne fait qu'accentuer le déficit de la balance.

Les meilleures rotations sont insuffisantes, sauf si l'enfouissement total d'une légumineuse revient assez souvent, ou encore avec la pratique des cultures alternées ou dérobées, ce qui n'est pas toujours agronomiquement ou économiquement favorable.

L'enfouissement des engrains organiques seuls est souvent trop couteux; la conservation du sol est assurée mais le gaspillage en azote n'est pas toujours facile à éviter; non plus, à l'opposé, que la faim en azote du sol, dépressive sur les cultures, donc sur la fertilité immédiate et les rendements.

En fin de compte la seule solution satisfaisante, dans la majorité des cas, est l'association des engrains minéraux et organiques; on a trop tendance à les opposer alors que leur action synergique est au contraire remarquable.

En effet, les organiques assurent une meilleure utilisation des minéraux par la plante, apportent à celle-ci la nutrition complémentaire favorable (voir conférence I), accroissent la tolérance des sols aux minéraux, permettent la reconstitution du stock humique. Les minéraux, de leur côté, sont immédiatement valables pour la plante et assurent un métabolisme correct des organiques dans le sol.

Mais tout ceci, à condition que soient parfaitement équilibrées, c'est l'essentiel, les quantités respectives des deux types d'engrais en fonction du rapport C/N de l'organique, du type de sol, de la culture à venir et du but recherché, insistant sur le rendement ou sur la reconstitution du stock humique. C'est à dire qu'il faudra toujours réfléchir en biologiste et envisager les phénomènes sous leur aspect dynamique.

En effet, et ce peut être notre conclusion, c'est bien l'activité harmonieuse des microorganismes telluriques qui assurent, en fin de compte, d'une part la nutrition de la plante, d'autre part la pérennité de la vie du sol, c'est à dire la fertilité et la conservation de ce sol.

**INSTITUT «PASTEUR»  
SERVICE DE MICROBIOLOGIE DU SOL**

## **ASPECT ACTUEL DU PROBLEME DE LA CELLULOLYSE**

**PAR**

**J. POCHON (\*)**

Il est peu de problème, en Microbiologie, qui soit lié à des questions aussi diverses que celui de la dégradation biologique de la cellulose.

Cette dégradation intéresse en effet à la fois le pédologue (et l'agronome), l'industriel et le physiologiste.

Le pédologue et l'agronome trouvent là, en effet, le processus biologique probablement le plus important, quantitativement, à la surface du globe et la microbiologie du sol un de ses chapitres les plus vastes. La cellulose n'est elle pas la substance organique la plus abondamment incorporée au sol? Incorporation naturelle et spontanée, par les résidus végétaux et les chutes foliaires; artificielle, par enfouissement de pailles, d'engrais verts et de fumiers naturels ou artificiels. Sa décomposition dans le sol est liée au problème de l'humification (voir conférence II).

L'industriel, lui, voit surtout dans ce problème l'aspect fermentation au cours de la fabrication des composts; les souches thermophiles sont pour lui d'un intérêt majeur.

Enfin le physiologiste ne peut ignorer cette partie de la bactériologie, s'il s'occupe de dégradation et de nutrition puisque l'immense majorité des animaux et l'homme, dépourvus de cellulase, ne digèrent la cellulose que par l'intermédiaire des bactéries hébergées dans leur tube digestif.

---

(\*) Conferencia pronunciada en el Centro de Investigaciones Biológicas, del C. S. I. C. (Madrid, 22-III-1963).

Pourtant, et malgré le nombre considérable de travaux qui lui ont été consacrés, la dégradation biologique de la cellulose est encore imparfaitement connue, même dans certain de ses aspects majeurs. Il ne saurait être question de la traiter dans son ensemble et nous envisagerons seulement deux aspects: Quels sont les germes effectivement responsables de la cellulolyse, d'une part? Quel en est le mécanisme enzymatique, d'autre part? Débordant le cadre de la microbiologie du sol proprement dite, nous tenterons de répondre à ces questions à la fois pour les bactéries telluriques (aérobies et anaérobies), laissant de côté les champignons, et pour celles du tube digestif. Cette vue d'ensemble est en effet préférable pour la compréhension du phénomène.

Mais avant d'entreprendre cette étude il faut insister sur le fait que les techniques ont ici une importance primordiale: la cellulose étant un substrat insoluble l'expérimentateur n'a à sa disposition que la fibre de cellulose purifiée; on a tenté de la remplacer par les produits de dégradation de celle-ci, partiellement dépolymérisés, plus ou moins solubles et susceptibles d'être mis en suspension; ce sont les «celluloses régénérées» des classiques et les différents dérivés (carboxyméthylcellulose, Blanose...) des modernes.

Les techniques d'isolement de souches diffèrent profondément selon le type de substrat utilisé:

Avec la cellulose fibreuse (pratiquement le papier filtre ou le coton) l'obtention de colonies uniques est impossible; par passages successifs sur les milieux, on assiste à un enrichissement progressif en bactéries cellulolytiques, jusqu'au stade de culture présentant des caractères (que nous verrons plus loin) permettant de les considérer comme pures.

Avec les celluloses partiellement dépolymérisées, des colonies isolées peuvent être obtenues sur gélose où ce substrat a été incorporé, suivies d'isolement avec les techniques classiques de la bactériologie.

### LES BACTERIES AEROBIES TELLURIQUES

Les recherches fondamentales des premiers chercheurs, et en particulier de Winogradsky, ont été réalisées sur papier (silico-gel-papier) et ont permis l'individualisation de deux grands groupes: celui des *Cytophaga* et celui des *Cellvibrio*.

Rappelons que les premiers, appartenant aux Myxobactéries aspo-

rangiales, ont souvent un cycle évolutif complexe (microcystes chez les *Sporocytophaga*) et donnent sur papier des colonies colorées, riches en humus (ancienne «gelée» cytophagienne), peu extensives et attaquant profondément le substrat.

Les seconds sont des vibrions typiques, avec un cil polaire, dont les colonies sur papier sont colorées, extensives et ne l'attaquant que très superficiellement.

Dans les deux cas il s'agit de germes vivant directement au contact de la fibre, cellulolytiques presque obligatoires, puisqu'ils n'utilisent guère comme source carbonée, outre la cellulose, que le glucose et le cellobiose à faible concentration.

Si l'on emploie pour l'isolement des cellulolytiques aérobies la cellulose partiellement dégradée (deuxième technique), il est tout à fait exceptionnel que l'on retrouve ces deux types de germes, mais, au contraire, une très grande variété d'espèces réparties parmi les *Bacillus*, les Coryn'bactéries, les *Cellulomonas*, les *Pseudomonas* et enfin des germes que l'on fait rentrer dans les *Cellvibrio*, à tort car ils sont lophotriches ou même périthriches. Ces germes sont très rarement pigmentés, le plus souvent polyphages et un bon nombre d'entre eux inactifs sur la cellulose fibreuse.

Nous trouvons donc ici, pour la première fois, une opposition radicale dans les résultats suivant la technique utilisée.

### LES BACTERIES ANAEROBIES TELLURIQUES

Ici, la presque totalité des recherches ont été effectuées sur la cellulose du papier: des tubes, contenant un milieu liquide salin et une feuille de papier filtre comme seule source de carbone, sont ensemencés avec de la terre, désaérés, scellés sous vide et portés à l'étuve. Après attaque du papier (coloration variant du jaune au brun), des passages successifs sont effectués sur le même milieu; cette méthode d'enrichissement progressif aboutit, après une dizaine de passages le plus souvent, à l'obtention de souches optiquement pures au microscope, anaérobies strictes, ne cultivant pas sur les milieux usuels et presque toujours cellulolytiques obligatoires. Il s'agit toujours de bâtonnets sporulés, à spore déformante, classable dans les familles des *Clostridium*, *Plectridium* ou *Terminosporus*. Comme produits de métabolisme on trouve des gaz ( $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$ ), des acides organiques fixes et volatils

(le plus souvent formique et acétique, ou acétique et butyrique, plus des traces d'un troisième), de petites quantités d'alcools, parfois de sucre réducteur.

Sept à huit espèces ont été ainsi individualisées, mais presque toujours, conservées au laboratoire, avec repiquages réguliers, ces espèces voient leurs caractères se modifier: diminution de l'anaérobiose stricte (allant jusqu'à l'apparition de colonies en aérobiose), perte progressive de l'activité cellulolytique (toujours pour les germes des colonies aérobies), apparition d'une polyphagie.

Les auteurs ne sont pas d'accord sur l'interprétation de ces faits: réapparition de contaminants (germes associés dès le début des cultures mais ayant passé inaperçus), mutation et sélection au sein d'une souche initialement pure (en pourrait alors parler d'espèces secondairement contaminées par leurs propres mutants). La tendance actuelle est plutôt de nier la validité des espèces décrites à la suite d'isolements réalisés avec cette méthode.

Cependant il faut bien dire que les quelques essais réalisés avec la deuxième méthodologie et ayant abouti à l'isolement d'une espèce, après passage par colonie unique sur gélose à la cellulose précipitée, n'entraînent pas plus la conviction de l'obtention d'une souche pure.

La question des anaérobies cellulolytiques telluriques reste donc non résolue définitivement.

Elle se pose de façon identique pour les souches thermophiles (celles qui intéressent surtout les industriels) aussi n'est-il pas besoin d'y insister.

#### LES ANAEROBIES DU TUBE DIGESTIF

Dès les premières études consacrées à ces germes on s'aperçut de leur faible pouvoir de synthèse: ils ne peuvent être cultivés sur milieu minéral, comme les telluriques, et l'addition d'un filtrat stérile du contenu digestif de l'animal hôte fut pendant longtemps la meilleure méthode; des recherches plus récentes ont permis d'analyser les besoins plus précis en acides aminés et en facteurs de croissance; on s'aperçut également qu'ils exigeaient une anaérobiose très stricte et qu'il y avait intérêt à ajouter des réducteurs pour abaisser le potentiel d'oxydo-réduction.

Compte tenu de ces faits, les premières souches isolées le furent

selon la technique des enrichissements progressifs sur milieu liquide avec feuille de papier filtre; c'est ainsi qu'une demi-douzaine d'espèces furent décrites, isolées de la panse des ruminants, de nombreux herbivores, de l'intestin humain, de larves xylophages...

Ce sont tout des bâtonnets sporulés, morphologiquement identiques aux anaérobies cellulolytiques telluriques; leurs caractères biochimiques sont également très voisins, ainsi que les modalités de l'évolution des souches conservées au laboratoire. Par conséquent les mêmes problèmes se posent que pour les souches du sol; nous n'y reviendrons pas; on peut, en fait, les considérer comme des telluriques adaptés à la vie dans le tube digestif et ayant, de ce fait, perdu une partie de leur pouvoir de synthèse.

Pour le cas des anaérobies du tube digestif, de très nombreuses recherches ont été, par contre, effectuées sur milieu à la cellulose régénérée et partiellement dépolymérisée: les résultats sont totalement différents; à partir de la panse des Ruminants, surtout, furent isolées des souches non sporulées, dont les unes sont de très petits bâtonnets, le sautres des coques et pour lesquelles furent créés les genres *Ruminobacter* et *Ruminococcus*; en réalité l'individualisation des espèces au sein de ces genres est assez délicate.

L'entretien des souches et même l'obtention de cultures vraiment pures sont encore aléatoires mais il ressort cependant de ces travaux qu'il s'agit de germes à métabolisme assez lent au laboratoire, relativement peu actifs sur la cellulose fibreuse et donnant essentiellement des acides organiques fixes et volatils, ainsi que des sucres réducteurs comme produits de dégradation.

L'origine de ces espèces, dont aucun homologue «libre» n'a jamais été trouvé dans le sol, est complètement inconnue.

Nous retrouvons donc, ici encore, la dualité des types de micro-organismes isolés selon que cet isolement a été réalisé avec l'une ou l'autre des deux méthodologies.

#### ACTIVITE ECOLOGIQUE DES BACTERIES CELLULOLYTIQUES

La question se pose évidemment de savoir quels sont les germes affectivement actifs dans leur milieu écologique propre, sol ou tube digestif.

En ce qui concerne le sol elle fut surtout discutée pour les aérobies et deux positions nettement séparées ont été prises.

Pour les uns, à la suite de Winogradsky, les *Cytophaga* et *Cellvibrio* authentiques jouent un rôle majeur: ce sont toujours ceux isolés en condition écologique (grain de terre sur silico-gel papier), ce sont ceux les plus spécialisés (cellulolytiques obligatoires), ceux enfin dont l'attaque du papier est la plus énergique.

Pour les autres, au contraire, les espèces isolées sur gélose à la cellulose précipitée sont plus importantes: ce sont les germes les plus nombreux dans le sol lorsque l'on fait des numérations par cette technique; du fait de leur polyphagie ils peuvent se développer dans toutes les conditions nutritionnelles.

En ce qui concerne le tube digestif, on retrouve sensiblement les mêmes positions quant à l'activité, en conditions écologiques, des bactéries sporulées isolées sur cellulose fibreuse et des non sporulées isolées sur cellulose précipitée; en faveur de ces dernières il est apporté un argument supplémentaire, c'est que l'examen direct, sur frottis du contenu de panse, ne montre qu'un pourcentage très minime de bâtonnets sporulés et un très grand nombre de cocci; il ne faut cependant pas oublier qu'à côté des cellulolytiques, on trouve dans cet organe une microflore associée extrêmement abondante.

Il semblerait donc bien difficile de trancher ces opinions contradictoires si des recherches plus récentes sur l'enzymologie de la cellulolyse n'étaient venues éclairer le problème.

#### ENZYMOLOGIE DE LA CELLULOLYSE

En effet, depuis une quinzaine d'années, des notions plus précises, encore que non définitives, sont venues se substituer à celle d'une «cellulase» dont l'existence devait être admise plus qu'elle n'avait été effectivement démontrée et analysée.

L'expérimentation a été surtout effectuée avec les champignons car l'obtention des enzymes y est relativement facile par filtration des cultures. De plus, l'étude du mécanisme d'action de ces filtrats et de leur fractionnement suivi de purification, a pu être poussée le jour où l'expérimentateur a eu à sa disposition, outre la cellulose fibreuse, des celluloses, dont le degré de dépolymérisation, ou de substitution, était parfaitement connu, et réparties sur une gamme assez étendue.

La théorie la plus courante substitue à l'ancienne «cellulase» un complexe enzymatique dont les éléments majeurs sont:

Le facteur  $C_1$  qui agirait sur les très longues chaînes de la cellulose fibreuse pour les rompre en chaînes, encore très longues, de  $\beta$  1-4 glucoside. Ce serait une enzyme de contact.

Intervient ensuite le facteur  $C_x$ , rompant ces chaînes en fragments plus courts de  $(C_6H_{10}O_5)_n$  où  $n$  est compris entre 2 (cellobiose) et 6. Par chromatographie et électrophorèse  $C_x$  a d'ailleurs pu être fractionné en au moins 3 facteurs agissant différemment (aux extrémités ou sur toute la longueur de la chaîne) sur des chaînes elles-mêmes plus ou moins longues.

Le cellobiose apparaît comme le terme final de l'action de  $C_x$ . Il est ensuite hydrolysé, par une troisième enzyme, en glucose.

Des expériences en cours dans notre laboratoire avec *Sporocytophaga* montrent que ces réactions d'hydrolyse sont couplées, chez les bactéries, avec des réactions de transfert aboutissant à la synthèse d'autres bioses que le cellobiose et à des trioses. C'est là l'ébauche de la formation des polyuronides constitutifs de la gomme des *Cytophaga*.

Cette analyse enzymatique va nous permettre de trancher le différent quant aux germes réellement actifs dans le sol et dans le tube digestif, en fonction de la technique et du milieu d'isolement.

En effet, sont seuls actifs sur la cellulose fibreuse (papier de la technique classique) les germes hautement spécialisés possédant à la fois  $C_1$  et  $C_x$ .

Au contraire, sur les celluloses partiellement dégradées de la technique moderne, sont actifs des germes ne possédant que  $C_x$ , beaucoup plus nombreux, évidemment, moins spécialisés et plus polyphages.

Tout se ramène donc à une question de définition de ce que l'on doit admettre pour étiqueter un germe comme «cellulolytique».

Nous pensons d'ailleurs qu'il faut aller plus loin et envisager le phénomène dans sa complexité écologique où ce ne sont pas des cultures pures qui agissent, mais des associations, des populations. Interviennent tout d'abord les germes possédant  $C_1$  et  $C_x$ , puis leurs produits de métabolisme, les chaînes déjà partiellement dépolymérisées, deviennent un substrat valable pour les germes ne possédant que  $C_x$ .

La cellulolyse apporte donc un exemple de plus du rôle majeur des associations synergiques dans tous les milieux naturels.

## CONFERENCIAS DEL PROF. KUSTER Y DEL DR. NICHOLAS

En el Centro de Investigaciones Biológicas del C. S. I. C., y organizadas por el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, tuvieron lugar dos conferencias a cargo del Prof. E. Küster, del Departamento de Microbiología Industrial del «University College», de Dublín, en los días 29 y 30 de abril. Los títulos de las conferencias fueron: «Aspectos morfológicos y fisiológicos de la taxonomía de los *Streptomyces*» y «Estudio sobre las turberas irlandesas y su microbiología».

En los días 31 de mayo y 3 de junio, el Dr. J. D. Nicholas, Jefe del Departamento de Química Microbiana de la Estación Investigadora de Long Ashton, de Bristol, pronunció dos conferencias, con los temas: «El metabolismo del nitrógeno de los nitratos por microorganismos y plantas» y «La bioquímica de la fijación del nitrógeno por microorganismos».

## CONFERENCIA SOBRE AGENTES ANTIMICROBIANOS Y QUIMIOTERAPIA

La Sociedad Americana de Microbiología organiza la III Conferencia Intercientífica sobre Agentes antimicrobianos y Quimioterapia, que se celebrará durante los días 28-30 del próximo mes de octubre, en Washington. Las personas interesadas pueden solicitar información a: American Society for Microbiology, 115 Huron View Boulevard, Ann Arbor, Michigan (Estados Unidos de América del Norte).

## SIMPOSIO ACERCA DE LAS CONTAMINACIONES DE LOS MEDIOS MARITIMOS

La Comisión Internacional para la Exploración científica del Mar Mediterráneo, ha decidido convocar un simposio internacional para estudiar el grave problema de las contaminaciones marítimas producidas por bacterias y productos petroleros. Esta reunión se celebrará dentro del año actual o a principios del próximo, en Marsella, Sète o Mónaco.

El organizador es el Prof. L. Devèze; Laboratoire de Microbiologie Ecologique, Faculté de Sciences, Place Victor Hugo, Marseille 3<sup>e</sup> (Francia).

## CONFERENCIAS DEL PROF. KUSTER Y DEL DR. NICHOLAS

En el Centro de Investigaciones Biológicas del C. S. I. C., y organizadas por el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, tuvieron lugar dos conferencias a cargo del Prof. E. Küster, del Departamento de Microbiología Industrial del «University College», de Dublín, en los días 29 y 30 de abril. Los títulos de las conferencias fueron: «Aspectos morfológicos y fisiológicos de la taxonomía de los *Streptomyces*» y «Estudio sobre las turberas irlandesas y su microbiología».

En los días 31 de mayo y 3 de junio, el Dr. J. D. Nicholas, Jefe del Departamento de Química Microbiana de la Estación Investigadora de Long Ashton, de Bristol, pronunció dos conferencias, con los temas: «El metabolismo del nitrógeno de los nitratos por microorganismos y plantas» y «La bioquímica de la fijación del nitrógeno por microorganismos».

## CONFERENCIA SOBRE AGENTES ANTIMICROBIANOS Y QUIMIOTERAPIA

La Sociedad Americana de Microbiología organiza la III Conferencia Intercientífica sobre Agentes antimicrobianos y Quimioterapia, que se celebrará durante los días 28-30 del próximo mes de octubre, en Washington. Las personas interesadas pueden solicitar información a: American Society for Microbiology, 115 Huron View Boulevard, Ann Arbor, Michigan (Estados Unidos de América del Norte).

## SIMPOSIO ACERCA DE LAS CONTAMINACIONES DE LOS MEDIOS MARITIMOS

La Comisión Internacional para la Exploración científica del Mar Mediterráneo, ha decidido convocar un simposio internacional para estudiar el grave problema de las contaminaciones marítimas producidas por bacterias y productos petroleros. Esta reunión se celebrará dentro del año actual o a principios del próximo, en Marsella, Sète o Mónaco.

El organizador es el Prof. L. Devèze; Laboratoire de Microbiologie Ecologique, Faculté de Sciences, Place Victor Hugo, Marseille 3<sup>e</sup> (Francia).

## CONFERENCIAS DEL PROF. KUSTER Y DEL DR. NICHOLAS

En el Centro de Investigaciones Biológicas del C. S. I. C., y organizadas por el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, tuvieron lugar dos conferencias a cargo del Prof. E. Küster, del Departamento de Microbiología Industrial del «University College», de Dublín, en los días 29 y 30 de abril. Los títulos de las conferencias fueron: «Aspectos morfológicos y fisiológicos de la taxonomía de los *Streptomyces*» y «Estudio sobre las turberas irlandesas y su microbiología».

En los días 31 de mayo y 3 de junio, el Dr. J. D. Nicholas, Jefe del Departamento de Química Microbiana de la Estación Investigadora de Long Ashton, de Bristol, pronunció dos conferencias, con los temas: «El metabolismo del nitrógeno de los nitratos por microorganismos y plantas» y «La bioquímica de la fijación del nitrógeno por microorganismos».

## CONFERENCIA SOBRE AGENTES ANTIMICROBIANOS Y QUIMIOTERAPIA

La Sociedad Americana de Microbiología organiza la III Conferencia Intercientífica sobre Agentes antimicrobianos y Quimioterapia, que se celebrará durante los días 28-30 del próximo mes de octubre, en Washington. Las personas interesadas pueden solicitar información a: American Society for Microbiology, 115 Huron View Boulevard, Ann Arbor, Michigan (Estados Unidos de América del Norte).

## SIMPOSIO ACERCA DE LAS CONTAMINACIONES DE LOS MEDIOS MARITIMOS

La Comisión Internacional para la Exploración científica del Mar Mediterráneo, ha decidido convocar un simposio internacional para estudiar el grave problema de las contaminaciones marítimas producidas por bacterias y productos petroleros. Esta reunión se celebrará dentro del año actual o a principios del próximo, en Marsella, Sète o Mónaco.

El organizador es el Prof. L. Devèze; Laboratoire de Microbiologie Ecologique, Faculté de Sciences, Place Victor Hugo, Marseille 3<sup>e</sup> (Francia).

**Depósito Legal: M. 702.-1958.**

---

**ARTES GRÁF. REYES · Jerónima Llorente, 15 · Madrid**