VOLUMEN 16. 1963 JULIO - SEPTIEMBRE. NUMERO 3

Microbiología Española

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

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
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·SVPERIOR·DE·INVESTIGACIONES·CIENTIFICAS·
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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.

INDICE

Página

Obtención de protoplastos de esporas de *Trichothecium roseum*, por *Isabel García-Acha, M.ª José Rodríguez-Aguirre* y *J. R. Villanueva* ... 141

Estudio de la actividad lipolítica de los líquidos metabólicos de una estirpe de *Aeromonas hydrophila* y determinación de tributirinasa, por *D. Rodríguez, Cándida González* e *Isabel Gil* ... 149

Acetatocinasa en extractos libres de células de *Peptostreptococcus elsdenii*, por *D. Rodríguez* ... 157

Sobre la posición sistemática de *Peptostreptococcus elsdenii*, por *J. Pérez-Silva* y *D. Rodríguez* ... 175

Actividad viricida y virostática del cloruro de cetildimetilbencilamonio y del cloruro de cetiltrimetilamonio frente a los virus de la peste aviar clásica y de la pseudopeste aviar, por *E. Ronda* ... 179

Morphological and physiological aspects of the taxonomy of Streptomycetes, by *E. Kuster* ... 193

Studies on Irish peat bogs and their microbiology, by *E. Kuster*. 203

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DEL SUELO

OBTENCION DE PROTOPLASTOS DE ESPORAS DE *TRICHOTHECIUM ROSEUM*

POR

ISABEL GARCIA-ACHA, M.ª JOSE RODRIGUEZ-AGUIRRE y J. R. VILLANUEVA

INTRODUCCION

Desde que Weibull demostró en 1953 que, por tratamiento con lisozima, era posible obtener protoplastos intactos a partir de células de *Bacillus megaterium* y que aquellas estructuras presentaban las propiedades fisiológicas de las células de que procedían, se ha acumulado una gran cantidad de trabajo relativo a este problema, no sólo en el campo de las bacterias, sino también en el de los hongos y levaduras. Se ha visto que los protoplastos, una vez liberados de sus envolturas externas, son de gran valor para los estudios morfológicos, bioquímicos y genéticos en bacterias. Es de esperar que estructuras equivalentes en el campo de las levaduras y hongos puedan ser de idéntica utilidad.

Algunos autores han descrito la obtención de «protoplastos» a partir del micelio de hongos filamentosos. Pueden citarse, entre otras, las investigaciones llevadas a cabo por Emerson y Emerson (3) y Bachman y Bonner (1) sobre *Neurospora crassa*, y los resultados, un tanto oscuros, de Meinecke (1) trabajando con *Penicillium glaucum*. Nosotros hemos descrito recientemente la obtención de entidades semejantes a protoplastos, de *Fusarium culmorum y Aspergillus nidulans*, bien por medio del uso del preparado enzimático del *Helix pomatia* (10), bien utilizando el preparado denominado «Strepzima» producido por el *Streptomyces* GM (6, 9).

Aparte del interés despertado por las investigaciones realizadas con micelio de algunos hongos, nosotros estimamos que sería conveniente

concentrarnos en el aspecto de formación de «protoplastos», utilizando como material inicial las esporas de varios hongos. En este trabajo describiremos los resultados obtenidos en nuestras investigaciones sobre las esporas de *Trichothecium roseum*, aspecto sobre el que ya hemos descrito algunos resultados preliminares (4, 5).

MATERIAL Y METODOS

Organismo y medios de cultivo

En estas investigaciones hemos utilizado el *Trichothecium roseum* núm. 2.364 de la Colección Española de Cultivos Tipo. Los cultivos se mantenían en tubos de medio Czapeck con 2 por ciento de agar. Los conidios se obtenían de cultivos del hongo sobre 100 ml del medio GAE (glucosa, 10 g; asparagina, 1 g; extracto de levadura, 0,5 g; PO_4HK, 0,5 g; $SO_4Mg.7H_2O$, 0,5 g; $(SO_4)_3Fe_2$, 0,01 g; agua, 100 cm^3, y agua destilada, 900 cm^3) en botellas Roux que habían sido sembradas con una suspensión densa de esporas tomadas de un tubo inclinado. La incubación se efectuaba generalmente durante tres o cuatro días, a 28 °C. Las esporas se recogían por arrastre, después de suave agitación con agua destilada, y se liberaban del micelio contaminante por medio de repetidas centrifugaciones a 500 g. Generalmente se empleaban suspensiones conteniendo aproximadamente 10.000 esporas/1 cm^3.

Preparados enzimáticos y otros materiales

La preparación enzimática utilizada era el jugo digestivo de *Helix pomatia*, obtenida de «L'Industrie Biologique Française» (*), conservándose las ampollas en frigorífico hasta que se utilizaban. El preparado era previamente centrifugado, utilizando el sobrenadante exento de precipitado. Los azúcares utilizados eran Difco y las sales, de grado reactivo.

Técnicas microscópicas

En todas nuestras observaciones para seguir el proceso de digestión de las diferentes envolturas de las esporas, se utilizaba un microscopio Zeiss de contraste de fases. A este dispositivo se acoplaba el sistema foto-

(*) 35, Quai du Moulin de Cage, Gennevilliers, Seine (Francia).

gráfico adecuado. Las observaciones microscópicas sobre el material viviente se efectuaban sobre preparaciones montadas en cámara húmeda.

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSION

Formación de protoplastos de conidios

Las esporas bicelulares del *Trichothecium roseum* se suspendían en una solución de manitol 1M en tampón de fosfato-citrato 0,1M, a pH 5,8, a la que se adicionaba un 10 por ciento del preparado enzimático de *Helix pomatia.* Después de incubación con agitación suave, a 28 °C durante ocho horas, las paredes celulares de los conidios comenzaban a ser más refringentes, dando lugar a la formación de los primeros «protoplastos». Estos comienzan a emerger en general por el extremo apical de las esporas, liberándose en primer lugar uno de los protoplastos correspondientes a la célula apical y posteriormente el correspondiente a la otra.

Importancia de la edad de las esporas en relación con su susceptibilidad al preparado enzimático

En nuestras previas investigaciones decribíamos la falta de susceptibilidad de un gran número de esporas a la preparación enzimática (4). En posteriores investigaciones observamos que en esta clase de experimentos la edad de las esporas era un factor de la máxima importancia; de aquí el que en nuestros posteriores ensayos las esporas utilizadas fuesen obtenidas a partir de cultivos jóvenes, de tres-diez días. Cuando en lugar de estas esporas utilizábamos cultivos más viejos (veinte días), una proporción elevada de esporas se hacía resistente a la acción enzimática, dato que estaba siempre en relación directa con la edad del cultivo.

La edad de la espora determina el lugar de ataque más sensible, en presencia de la enzima. Cuanto más joven es la espora mayor es el área de ataque, si bien en general éste se inicia, como antes decíamos, por la célula cónica o apical de la espora, que es la que se une directamente al conidióforo. Esporas de dos-cinco días, recogidas del medio sólido GAE, lavadas y puestas en incubación en el sistema enzimático,

son rápidamente atacadas. A las cinco horas aparece la pared del conidio bastante afectada y a las veinte horas el 100 por ciento están totalmente atacadas. En esporas más viejas, el ataque no se inicia hasta las diez y a veces, veinte horas de incubación. Se ve que la pared conidial se va modificando, aunque no en toda su superficie por igual, ya que son diferentes los resultados encontrados, no sólo en la intensidad, sino en la localización del ataque, dependiendo de la edad.

Las esporas jóvenes se rompen por la célula apical cónica, luego desaparece el tabique central que separa las dos células y finalmente queda el resto de la pared celular muy afectado y hueco *(figura 1)*.

En células más viejas, el ataque es marcado también por la célula cónica, si bien luego no se afecta el tabique central. Por el contrario, se inicia un ataque por el otro extremo de la espora y queda la pared de la espora en forma más o menos parecida a una H, después de liberarse los posibles «protoplastos» (5).

La presencia de estabilizadores osmóticos en el medio afecta también al modo de ataque de la enzima y sobre todo la configuración de las células emergentes o posibles protoplastos. Tomando como tipos diferentes de estabilizadores un polialcohol (el manitol) y una sal (el SO_4Mg) los resultados son bien distintos, si bien la molaridad de ambos en el medio inicial era idéntica. Queda claro que el hecho de que estos estabilizadores sean metabolizables o no por la espora, influye notablemente. El resultado es que los conidios de *Trichothecium roseum*, tratados con *Helix pomatia* y en presencia de manitol 1M liberan el contenido celular un tanto plasmolizado, mientras que en presencia de SO_4Mg el contenido celular de la espora está turgente y así se libera en el medio, dando formas esféricas.

Estas formas, relativamente abundantes, no son sensibles al choque osmótico al diluir el medio, si bien tanto en uno como en otro caso, cuando se mantienen en incubación por más tiempo en presencia de la enzima, algunas de ellas posiblemente sufren posterior ataque enzimático y dan verdaderos «protoplastos», que estallan al añadir agua destilada, liberando una membrana con un contenido que va desapareciendo disperso por el medio, junto con otras estructuras no identificadas más resistentes, aunque de aspecto de protoplasto, y formadas por una esfera, o formas piriformes y pequeños gránulos unidos por finos filamentos. Está en estudio un método para aislar estas estructuras y caracterizarlas.

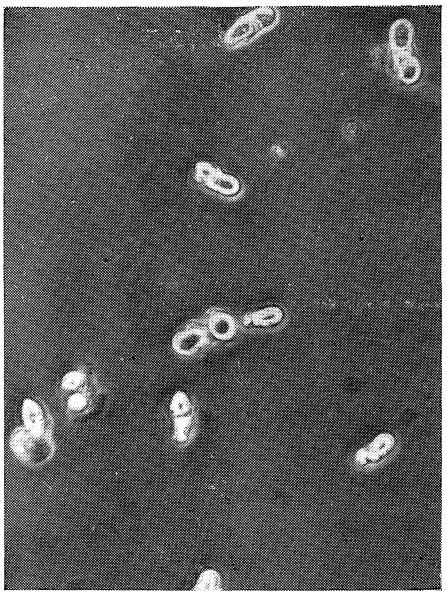


Figura 1. Conidios de Trichothecium roseum *después de dieciocho horas de incubación en presencia del preparado enzimático de* Helix pomatia

El hecho de que el rendimiento de verdaderos protoplastos sea muy inferior al rendimiento de formas libres de pared conidial nos ha llevado a realizar estudios acerca de la acción enzimática precisada para que se pase de estas formas a verdaderos protoplastos. Estamos tratando de ver si lo que se libera inicialmente va todavía recubierto de una pared celular o si sólo le quedan restos del mismo. Tal vez la cubierta de la espora no es un engrosamiento de la pared de las células que forman la espora, sino algo independiente que se rompe por la acción enzimática, liberando células intactas, si bien débiles, que en un posterior ataque por el complejo enzimático de *Helix pomatia* dan origen a los verdaderos protoplastos que describimos.

Por todas las razones expresadas, las esporas de *Trichothecium roseum* y de otros hongos representan el material más satisfactorio para obtener suspensiones de protoplastos en estado libre.

Sin embargo, es preciso tener en cuenta que los criterios establecidos para una verdadera definición de protoplastos (2) no pueden aún ser aplicados para estas preparaciones, aunque las estructuras obtenidas de los conidios sean esféricas, en contraste con la forma de la célula original, y sean sensibles al choque osmótico. Se ha de llevar a cabo una extensa investigación en direcciones como las de un riguroso examen de la naturaleza química de las envolturas externas de los conidios después de su aislamiento, así como los correspondientes ensayos inmunológicos de este material de las cubiertas. Actualmente procedemos a una mejor caracterización de las actividades enzimáticas del preparado de caracol utilizado, del que hasta el momento sólo se conocen algunas actividades muy aisladas (7). Aunque este preparado disuelve alguna(s) estructura de las cubiertas externas de las esporas, aún no sabemos la proporción de material digerido. Estudios encaminados a averiguar los productos de lisis de la acción enzimática están en marcha y serán objeto de otras próximas publicaciones.

El hecho de que, una vez que ha actuado la enzima y los protoplastos son liberados, se observen restos de unas estructuras correspondientes a las paredes celulares externas de las esporas, hace pensar en la posibilidad de que las estructuras liberadas sean realmente protoplastos. Lo cierto es que estas estructuras pueden ser manejadas en el laboratorio como entidades independientes con propiedades semejantes a los de los microorganismos unicelulares, y que en un futuro próximo

pueden llegar a ser los materiales ideales para un gran número de experiencias encaminadas a explicar un buen número de aspectos fisiológicos y bioquímicos hoy difíciles de atacar con las esporas como tales o con preparaciones de micelio de estos organismos.

RESUMEN

Se ha estudiado el modo de acción del preparado enzimático de *Helix pomatia* sobre conidios del hongo *Trichothecium roseum.* Se describen los métodos de preparación de estructuras semejantes a protoplastos a partir de esporas. Estas estructuras son estables cuando se mantienen bajo ciertas condiciones. Se han definido algunos factores, como la edad de las esporas y los estabilizadores usados para la obtención de los protoplastos.

SUMMARY

The mode of action of the enzymic preparation of the *Helix pomatia* on the conidia of the mould *Trichothecium roseum* has been studied. Methods of preparation of like-protoplasts structures from spores have been described. These structures are stable when maintained under certain conditions. Factors as the age of the spores and the stabilizers used for the obtention of the protoplasts have been defined.

BIBLIOGRAFIA

1. Bachman, B. J., y Bonner, D. M. 1959. J. Bacteriol, 78, 550.
2. Brenner, S., y cols. 1958. Nature, 181, 1.713.
3. Emerson, S., y Emerson, M. R. 1958. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 44, 6.684.
4. García-Acha, I., y Villanueva, J. R. 1963. Can. J. Microbiol., 9, 139.
5. García-Acha, I., y Villanueva, J. R. 1963. Nature (en prensa).
6. García-Acha, I., y Villanueva, J. R. 1963. Experientia (en prensa).
7. Meinecke, G. 1960. Nature, 188, 426.
8. Myer, F. L., y Northcote, D. H. 1958. J. Exptl. Biol., 35, 639.
9. Rodríguez-Aguirre, M. J.; García-Acha, I., y Villanueva, J. R. 1963. Experientia, 19, 82.
10. Rodríguez-Aguirre, M. J., y Villanueva, J. R. 1962. Nature, 196, 693.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA DE LOS LIQUIDOS METABOLICOS DE UNA ESTIRPE DE *AEROMONAS HYDROPHILA* Y DETERMINACION DE TRIBUTIRINASA

POR

D. RODRIGUEZ, CÁNDIDA GONZALEZ e ISABEL GIL

INTRODUCCION

En estudios realizados con varias estirpes de *Aeromonas hydrophila* se ha observado que dichos microorganismos vierten lipasa al medio de cultivo, detectable según la técnica de Sierra (7). La lipasa precipitada del medio de cultivo con acetona o alcohol etílico, inoculada en conejos, dio lugar a la formación de precipitinas y anticuerpos neutralizantes de la enzima (3). Con el fin de saber si el carácter antigénico del material inoculado se debía a la enzima o era consecuencia de la acción conjunta «enzima + proteína no enzima», procedimos a su purificación. Al mismo tiempo se estudió en el líquido metabólico de cultivo la actividad tributirinásica.

CULTIVO Y METODOS

Todos nuestros experimentos han sido realizados con una estirpe de *Aeromonas hydrophila* procedente del Instituto de Barcteriología del Hospital General de Altona, Hamburgo.

El microorganismo se conservó en tubo inclinado de agar común y en medio de infusión de cerebro y corazón.

Medios

Los medios de cultivo empleados en nuestros experimentos han sido B. H. I. Difco, agua de peptona y un medio más simple, cuya composición es la siguiente:

	Porcentaje
$ClNH_4$	0,50
ClNa	0,50
PO_4H_2K	0,10
SO_4Mg	0,10
Extracto de levadura	0,40
Cl_2Ca	0,01

pH, 7,2

Condiciones de cultivo

Cultivamos el microorganismo a 37 °C durante veinte-veinticinco días y separamos las células por centrifugación y filtración a través de filtros Eka. En los líquidos metabólicos determinamos la actividad de la lipasa y la tributirinasa.

Determinación de las actividades lipásica y tributirinásica

La determinación cualitativa de la actividad lipásica se realizó en placa de Tween 60, según el método de Sierra (7).

La determinación cualitativa de la tributirinasa se realizó con tributirina emulsionada y púrpura de bromocresol o rojo de cresol, como indicador (1). La presencia de tributirinasa se manifiesta por la aparición de un halo transparente y viraje del indicador.

La determinación cuantitativa de lipasa y tributirinasa se realizó manométricamente en el aparato de Warburg, midiendo los microlitos de anhídrido carbónico desprendidos durante la primera media hora, al realizar la hidrólisis en presencia de tampón de bicarbonato.

Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron según el método de Gornall y colaboradores (4).

Purificación

El método de purificación seguido comprende las etapas siguientes:

a) Diálisis

El líquido metabólico, libre de células, se somete a diálisis durante dieciséis horas frente a tampón de fosfatos 0,001 M a pH 7,5 y a temperatura ambiente.

b) Fraccionamiento con sulfato amónico

El dializado anterior se trata con sulfato amónico sólido, recogiendo la fracción precipitada entre 40 y 60 por ciento de saturación. El precipitado obtenido se redisuelve en tampón de fosfatos 0,01 M y se dializa durante dieciséis horas.

c) Fraccionamiento con acetona

La solución anterior se trata con acetona enfriada a —10 °C, recogiendo la fracción precipitada entre 50 y 75 por ciento de acetona. El precipitado obtenido se redisuelve en tampón de fosfatos 0,01 M y se somete a diálisis durante dieciséis horas.

d) Fraccionamiento con alcohol etílico

El dializado anterior se trata con alcohol etílico, enfriado a —10 °C. Se recoge la fracción precipitada entre 50 y 70 por ciento.

Inmunización de conejos

La inmunización de conejos se ha realizado por vía subcutánea con 3 ml de solución de enzima/conejo, repartidos en tres inyecciones de 1 ml cada una y a dos días de intervalo. Después de un descanso de cuatro-cinco días se investiga en el suero la presencia de anticuerpos antilipásicos.

Determinación de anticuerpos

La determinación de anticuerpos neutralizantes se ha realizado según la técnica habitual: neutralización de la enzima durante media hora por su suero a 37 °C previa inactivación de la lipasa propia del suero por

calentamiento a 56 °C durante media hora. Las mezclas enzima-antisuero se depositan sobre placa de agar-Tween 60 y la lectura se hace a las veinticuatro horas (2).

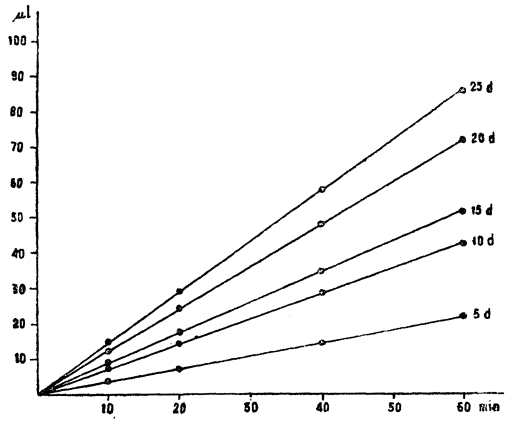


Figura 1. Tributirina

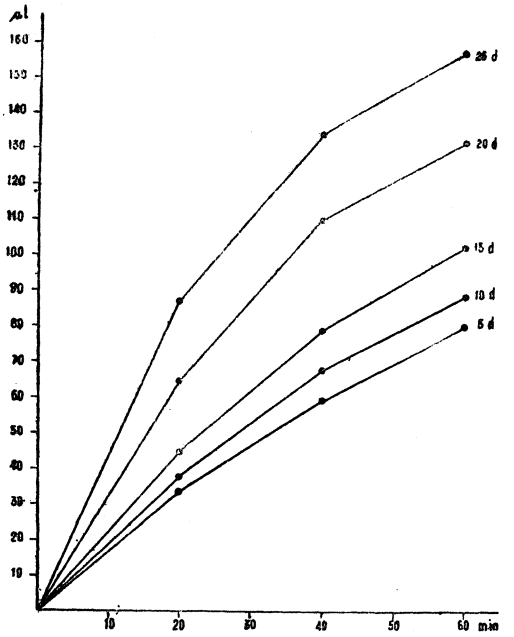


Figura 2. Tween 60

RESULTADOS

Se ensayaron los líquidos metabólicos a diferentes edades para determinar la producción máxima de lipasa y tributirinasa. En las *figuras 1-2* se expresan los microlitros de anhídrido carbónico desprendidos por 1 ml de líquido metabólico al ponerlo frente a Tween 60 y tributirina, respectivamente, en las condiciones de ensayo arriba indicadas.

Influencia del Tween

Con los líquidos metabólicos de veinte días ensayamos la actividad lipásica, empleando como substratos los Tween 20, 40, 60 y 80. El Tween 60 es el mejor hidrolizado.

Estabilidad frente al calor

La actividad lipásica se destruye totalmente por calentamiento del líquido metabólico a 100 °C durante media hora, mientras que la tributirinásica se destruye sometiéndolo a 70 °C durante diez minutos.

Diálisis

Los líquidos metabólicos sometidos a diálisis prolongada frente a tampón de fosfatos 0,1 M a pH 7,5 no pierden actividad.

Efecto de la glucosa en la formación de lipasa y tributirinasa

Varios autores señalan que la síntesis de lipasa es inhibida por concentraciones determinadas de glusosa. En cultivos de cuarenta y ocho horas, crecidos en medio de sales con concentraciones variables de glucosa (1, 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01 por ciento) se observa que la producción de lipasa en concentraciones superiores a 0,05 por ciento es inferior a la obtenida en ausencia de azúcar. Resultados análogos se obtienen para la producción de tributirinasa.

Influencia del calcio

La producción de lipasa es activada por la presencia de iones calcio. Probamos concentraciones entre 0 y 1 por ciento. La producción máxima corresponde a concentraciones de 0,01 por ciento de calcio.

Purificación

Los resultados obtenidos en la purificación de lipasa y tributirinasa, siguiendo las etapas antes descritas, se representan en las *figuras 3-4.*

La *figura 3* representa los microlitos de anhídrido carbónico des-

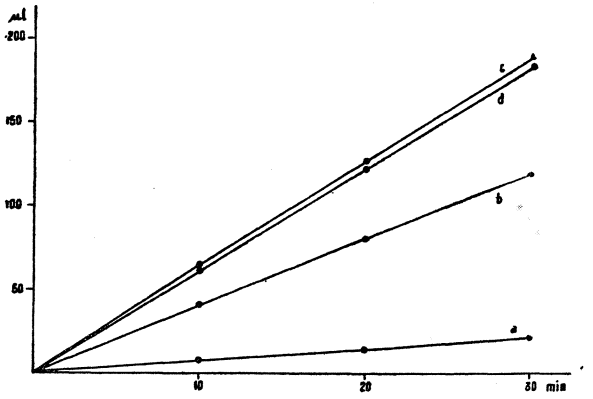


Figura 3. Tween 60

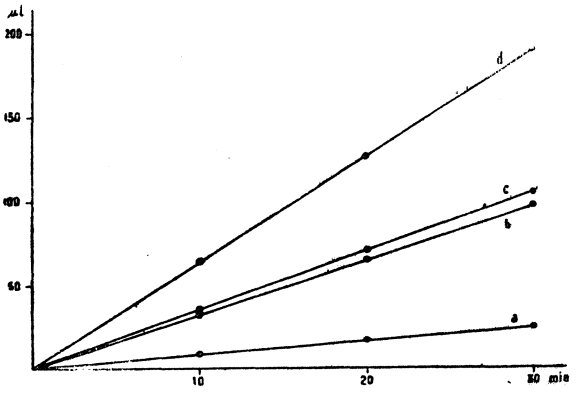


Figura 4. Tributirina

prendidos por 1 mg de proteína durante la primera media hora al actuar sobre Tween 60: a) un extracto crudo dializado; b) la fracción precipitada con sulfato amónico; c) la fracción obtenida al precipitar con acetona la anterior, y d) el extracto obtenido al fraccionar la anterior con alcohol etílico.

En la *figura 4* se representan los microlitos de anhídrido carbónico desprendidos por 1 mg de proteína, durante la primera hora, al actuar sobre tributirina: a) extracto crudo dializado; b) fracción precipitada con sulfato amónico; c) fracción precipitada con acetona, y d) fracción precipitada con alcohol etílico.

La presencia de anticuerpos neutralizantes de la actividad específica de la enzima se observó en todos los conejos inoculados después de la tercera inyección y después de diez o doce días de la primera.

DISCUSION

Según los resultados, no hay duda de que el extracto purificado es responsable de la formación de anticuerpos antienzima; sin embargo, no podemos concluir que la lipasa o tributirinasa por sí mismas den origen a estos anticuerpos en tanto no hayamos conseguido su cristalización o, al menos, un grado más alto de purificación.

En efecto, en trabajos que estamos realizando con extractos purificados según este método, si realizamos una reacción de precipitación enzima-antienzima en medio sólido, según la técnica de Oakley y Fulthorpe (5) o de Ouchterlony (6), en la zona de interferencia antígeno-anticuerpo aparecen dos líneas de precipitación que corresponden, una, a la lipasa y, otra, a otro antígeno que hasta el momento no hemos podido identificar ni eliminar sin destruir la enzima. En definitiva, el extracto purificado da lugar a la formación de anticuerpos, pero no sabemos si son las enzimas por sí mismas verdaderos antígenos.

RESUMEN

En cultivos de *Aeromonas hydrophila* se observa la presencia de actividad lipolítica frente a Tween y tributirina. Se describe un mtodo de purificación de ambas y se discute su posible carácter antigénico.

SUMMARY

In cultures of *Aeromonas hydrophila* it has been detected lipolytic activity against Tween and tributyrin. A purification procedure of both enzymes is described and their possible antigenic properties is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, A. 1937. J .Bacteriol., 27, 69.
2. GONZÁLEZ, C. 1963. Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt. I. Orig., 117, 663.
3. GONZÁLEZ, C. 1963. Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt. I. Orig. (en prensa).
4. GORNALL, A. G.; BARDAWILL Y DAVID, M. M. 1949. J. Biol. Chem., 177, 751.
5. OAKLEY Y FULTHORPE, L. 1953. J. Pathol. Bacteriol., 65, 49.
6. OUCHTERLONY, A. 1949. Arkiv Kemi, 7, 43.
7. SIERRA, G. 1957. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol., 83, 15.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

ACETATOCINASA EN EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS DE *PEPTOSTREPTOCOCCUS ELSDENII*

POR

D. RODRIGUEZ

INTRODUCCION

En los procesos de síntesis de ácidos grasos participa siempre el acetato, previamente activado, tras su conversión en Ac ~ CoA (*). Según Ochoa (13), la activación del acetato en tejidos animales, levaduras y algunas bacterias, se lleva a cabo mediante una enzima llamada activadora de acetato, que cataliza la rección reversible siguiente:

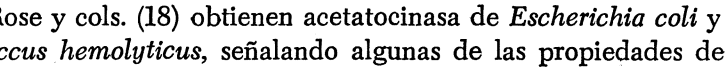
$$Ac + ATP + CoA \rightleftarrows Ac \sim CoA + AMP + PP$$

La mayoría de las bacterias, sin embargo, activan el acetato a través de las enzimas, acetatocinasa (14, 29) y fosfotransacetilasa (22). La acetatocinasa cataliza una reacción reversible entre el acetato y ATP y fue descrita por primera vez en 1944 por Lipmann (9) en extractos de *Lactobacillus delbruckii.* En 1948, Kaplan y Lipmann (6) señalan su presencia en extractos de *Escherichia coli.* En 1952, Stadtman y Barker observan la presencia de acetatocinasa en extractos de *Clostridium kluyveri* (19).

(*) Abreviaturas empleadas en el texto: CoA = coenzima A; Ac^- = acetato; Ac ~ CoA = acetilcoenzima A; Ac ~ P = acetilfosfato; ATP = adenosintrifosfato; ADP = adenosindifosfato; AMP = ácido adenílico; DPN = difosfopiridín-nucleótido; PP = pirofosfato; P = fosfato inorgánico.

La fosfotransacetilasa cataliza una reacción reversible entre Ac ~ P y CoA y ha sido estudiada por Stadtman (22).

Por la acción conjunta de ambas enzimas, el acetato queda activado según la reacción global siguiente:



$$Ac^- + ATP + CoA \rightleftarrows Ac \sim CoA + ADP + P$$

Rose y cols. (18) obtienen acetatocinasa de *Escherichia coli* y *Streptococcus hemolyticus*, señalando algunas de las propiedades de dicha enzima.

En el presente trabajo se expone la purificación y propiedades de la acetatocinasa de *Peptostreptoccus elsdenii.*

MATERIAL Y METODOS

Microorganismo

Se utiliza la estirpe de *Peptostreptococcus elsdenii* descrita en un trabajo previo (16). El medio de conservación empleado es el que describen Elsden y cols. (4).

Obtención de extractos libres de células

Se cultivó el *Peptostreptococus elsdenii* en fermetnadores de 40 l de capacidad, siguiendo el método descrito por Walker (27). El medio de cultivo empleado tiene la composición siguiente:

Lactato sódico	2 %
«Corn-steep»	1 %
Agua	?

pH final, 7,4

Como inóculo se empleó un cultivo de disciséis horas crecido en un matraz de 2 l que se agregó al fermentador e incubó a 38 °C durante dieciséis horas.

Las células se recogen por centrifugación en una supercentrífuga, modelo Sharples, y se lavan a continuación en agua destilada y, después de centrifugar la suspensión obtenida, se extienden las células

en una placa de Petri, que se coloca luego en un desecador a vacío, durante veinticuatro horas.

De las células secas se obtienen extractos enzimáticos suspendiéndolas en tampón de fosfatos 0,01 M a pH 7,4 (10 ml de tampón por 1 g de células). Esta operación se realizó en tubo de Thumberg conectado a una trompa de vacío, colocando las células en el compartimiento lateral. Una vez agregadas las células al tampón de fosfatos, se incuba a 38 °C con agitación, durante una hora, y luego se centrifuga durante quince minutos a 24.000 g, a temperatura de 0 °C.

Determinación de proteínas

La cantidad de proteínas contenidas en los extractos enzimáticos se determinó por el método de Stadtman y cols. (21).

Acetilfosfato

El acetilfosfato empleado en nuestros experimentos fue preparado según el método descrito por Stadtman y Lipmann (20). El análisis del acetilfosfato se llevó a cabo según la técnica de Lipmann y Tuttle (10), midiendo la intensidad del complejo férrico-hidroxámico a 540 mμ.

Determinación de fósforo

El fósforo total (libre + hidrolizable con ClH 2N a 100 °C durante diez minutos) se determinó por el método de Fiske y Subbarow, según se describe en el libro «Manometric techniques», de Umbreit y Burris (26). El fósforo libre se determinó por el método de Lowry y López (11), teniendo en cuenta la modificación de Peel (15).

Compuestos adenílicos

La separación de compuestos adenílicos de otros compuestos de fósforo se llevó a cabo por adsorción de aquéllos con carbón activo, según el método descrito por Crane y Lipmann (1).

La identificación de los compuestos adenílicos se realizó siguiendo las técnicas cromatográficas de Eggleston y Hems (3) y Krebs y Hems (7), observando los cromatogramas obtenidos bajo una lámpara de rayos ultravioletas, según recomiendan Markham y Smith (12).

Adsorción de CoA

Separamos la coenzima A de los extractos enzimáticos por adsorción sobre resina cambiadora de aniones, Dowes 1 × 10, según la técnica de Stadtman y cols. (21).

Obtención de gel de fosfato

La preparación de gel de fosfato se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Swingle y Tiselius (25).

RESULTADOS

Purificación de la acetatocinasa

El método adoptado para la purificación de la acetatocinasa comprende las seis etapas siguientes:

a) *Preparación del extracto crudo*

Se partió de 5 g de células secas que se suspendieron en 50 ml de tampón de fosfatos de 0,1 M a pH 7,4, conteniendo L-cisteína en concentración de 0,005 M. Se mantuvo la suspensión a 38 °C en agitación durante una hora y se centrifugó a 24.000 g durante quince minutos, a 0 °C; el sobrenadante obtenido se trató con 3 g de resina Dowes 1 × 10, durante diez minutos, y a continuación se separó la resina por centrifugación seguida de filtración. Esta operación se realizó a 5 °C.

El extracto crudo libre de CoA, así obtenido, presenta una actividad específica de 4,1.

b) *Tratamiento con sulfato de protamina*

Al extracto anterior se agregan 13 ml de una solución de sulfato de protamina al 1 por ciento, con agitación durante quince minutos. Se separa el precipitado obtenido por centrifugación y se descarta.

El sobrenadante que contiene toda la actividad enzimática presenta una actividad específica de 5.

c) *Fraccionamiento con acetona*

Al extracto anterior se agrega poco a poco y con agitación acetona

enfriada a — 10 °C hasta obtener una concentración final de acetona del 40 por ciento. Esta operación se inicia a 5 °C y gradualmente se va enfriando, de forma que al finalizar el proceso la temperatura sea de — 10 °C. El precipitado obtenido se separa por centrifugación y se descarta.

El sobrenadante se lleva a una concentración final de acetona del 50 por ciento y el precipitado obtenido se recoge por centrifugación y se suspende en una solución de sulfato amónico del 50 por ciento, se centrifuga de nuevo y el sobrenadante presenta una actividad específica de 25.

d) Fraccionamiento con gel de fosfatos

El extracto anterior se dializó durante dos horas a 2 °C frente a solución de fosfatos 0,001 M a pH 7,4. Al dializado se agregaron 1,5 ml de gel de fosfato (70 mg de peso seco; edad: tres meses). Se mantuvo en agitación durante cinco minutos, se centrifugó y descartó el precipitado. Al sobrenadante se añadieron otros 1,5 ml de gel y después de centrifugar se encuentra en el nuevo sobrenadante obtenido una actividad específica de 60.

e) Primer fraccionamiento con sulfato amónico

Al extracto anterior se añadió sulfato amónico sólido, recogiendo el precipitado obtenido entre 55 y 65 por ciento de saturación. Este precipitado suspendido en tampón de fosfatos presenta una actividad específica de 194.

f) Segundo fraccionamiento con sulfato amónico

Al extracto anterior se agrega sulfato amónico sólido, recogiendo la fracción precipitada entre 58 y 62 por ciento de saturación, que suspendemos en tampón de fosfatos 0,01 M a pH 7,4, conteniendo L-cisteína en concentración de 0,005 M. Esta última suspensión presenta una actividad específica de 310.

En el *cuadro 1* se resume el proceso de purificación, expresando el volumen de extracto de cada etapa en mililitros, el contenido de proteínas en miligramos, la actividad específica en unidades de enzimas/miligramo de proteína y el factor de purificación como cociente entre la actividad específica de cada etapa y la del extracto crudo.

Cuadro 1

	Volumen, mililitros	Proteínas, miligramos	Actividad específica	Factor de purificación
a) Extracto crudo	50,0	1.300	4,1	1,0
b) Fraccionamiento con sulfato de protamina	53,5	1.070	5,0	1,2
c) Fraccionamiento con acetona (40-50 %)	15,0	150	25,0	6,0
d) Fraccionamiento con gel de fosfato	13,0	52	60,0	14,6
e) Fraccionamiento con sulfato amónico (55-65 %)	5,0	10	194,0	47,3
f) Fraccionamiento con sulfato amónico (58-62 %)	2,0	4	310,0	75,6

Identificación de la acetatocinasa

Los extractos enzimáticos de *Peptostreptococcus elsdenii* contienen una enzima que cataliza la fosforilación del acetato en presencia de ATP. Adoptamos como método de ensayo de dicha enzima el establecido por Rose y cols. (18) en extractos enzimáticos de *Escherichia coli* y *Streptococcus hemolyticus*. Dado que dicha enzima cataliza la reacción reversible $Ac^- + ATP \rightleftarrows Ac \sim P + ADP$, se puede medir la actividad enzimática determinando el $Ac \sim P$ formado cuando el extracto enzimático está en presencia de Ac^- y ATP, o inversamente, midiendo la cantidad de $Ac \sim P$ que desaparece cuando aquél se pone en presencia de ADP. Como unidad de acetatocinasa adoptamos la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de acetilfosfato/1 min en las condiciones de ensayo descritas por Rose y colaboradores (18).

Teniendo en cuenta que un ensayo positivo no demuestra categóricamente la presencia de acetatocinasa, puesto que la fosforilación del acetato puede tener lugar por otra ruta en la que no interviene dicha enzima, es necesario confirmar su presencia, para lo cual realizamos las pruebas de sustitución de ATP por ADP, ADP por AMP, ADP por AMP + PP y, finalmente, un balance de fósforo.

Sustitución del ATP por ADP

En un tubo de ensayo agregamos 800 μmol de acetato potásico, 10 μmol de cloruro magnésico, 50 μmol de tampón de tris a pH 7,4, 700 μmol de hidroxilamina neutra, 10 μmol de sal sódica de ADP (o de ATP), extracto enzimático crudo (0,23 mg de proteínas) y agua destilada hasta un volumen final de 1 ml. Al cabo de dos minutos de incubación a 30 °C, detenemos la reacción agregando 1 ml de ácido tricloroacético del 10 por ciento y después de centrifugar determinamos la cantidad de acetilfosfato formada. En el *cuadro 2* se exponen los resultados obtenidos del experimento completo y los respectivos testigos, expresando en micromoles las cantidades de acetilfosfato.

Cuadro 2

Sistema reaccionante	Acetilfosfato, micromoles
Substrato + enzima	0,00
Substrato + ATP	0,00
Substrato + ADP	0,00
Substrato + ATP + enzima	1,96
Substrato + ADP + enzima	0,10

Se observa, por tanto, que el ADP no fosforila al acetato en presencia de un extracto enzimático de *Peptostreptococcus elsdenii.* El valor de 0,1 μmol que se obtuvo en presencia de ADP se debe probablemente a las impurezas de ATP que acompaña al ADP.

Sustitución del ADP por AMP

Para observar si el ADP puede ser sustituido por el AMP en reacción inversa a la anterior, colocamos en un tubo de ensayo 11,4 μmol de acetilfosfato, 50 μmol de tampón de tris a pH 7,4, 20 μmol de cloruro magnésico, 10 μmol de ADP (o AMP), extracto enzimático crudo (0,3 mg de proteínas) y agua destilada hasta un volumen final de 1 ml. Después de dos minutos de incubación a 30 °C detenemos la reacción mediante la adición de 5 ml de tampón de acetato 0,125 M, a pH 4,

saturado de sulfato amónico. Centrifugamos y en el sobrenadante se determinó la cantidad de acetilfosfato residual. En el *cuadro* 3 se exponen los resultados obtenidos de un experimento completo y sus respectivos testigos.

Cuadro 3

Sistema reaccionante	Acetilfosfato, micromoles	
	Inicial	Final
Substrato + ADP + enzima	11,4	6,0
Substrato + enzima	11,4	11,6
Substrato + AMP + enzima	11,4	10,9
Substrato + ADP	11,4	10,8
Substrato + AMP	11,4	11,0

Se observa, por tanto, que la reacción de transformación de acetilfosfato en acetato y ATP es catalizada por extractos enzimáticos de *Peptostreptococcus elsdenii* en presencia de ADP.

Sustitución del ADP por AMP + PP

A fin de completar el experimento anterior, realizamos otro análogo, en el que se investiga la posibilidad de sustitución del ADP por la mezcla de AMP + PP. Utilizamos la misma cantidad de extracto enzimático que en el experimento anterior y 12 μmol de acetilfosfato en cada uno de los tubos, que se incubaron a 30 °C durante cuatro minutos. Los resultados obtenidos se exponen en el *cuadro 4*.

Cuadro 4

Sistema reaccionante	Acetilfosfato, micromoles	
	Inicial	Final
Substrato + AMP + PP + enzima	12	11,6
Substrato + AMP + PP	12	12,3
Substrato + ADP + enzima	12	3,0

Balance del fósforo

Para este experimento se eligió un extracto enzimático purificado, con un contenido de proteínas de 1 γ, convenientemente diluido con ovoseralbúmina.

Se hizo actuar la enzima sobre ATP y acetato y se detuvo la reacción con tricloroacético a diferentes intervalos de tiempo.

En el *cuadro* 5 se exponen los resultados obtenidos, expresando en micromoles la cantidad de acetilfosfato sintetizada, así como la de fósforo ligado a dicho compuesto.

Cuadro 5

Minutos	Acetilfosfato	Fosfato liberado	
		Con substrato	Sin substrato
3	0,75	0,96	0,20
6	1,50	1,58	0,20
12	1,80	1,94	0,23
18	2,62	2,74	0,24
24	2,70	2,84	0,23

También se realizó el balance de fósforo para la reacción inversa, es decir, la llevada a cabo entre el acetilfosfato y el ADP. Para lo cual se dispusieron cinco tubos de ensayo, numerados del 1 al 5; los tubos 1 y 2 contienen todos los reactivos necesarios; los restantes son testigos (el 3 carece de enzima; el 4, de ADP, y el 5, de acetilfosfato). Antes de agregar la enzima, se retiraron de cada tubo tres muestras, para analizar en una de ellas la cantidad de acetilfosfato, en otra el fósforo libre y en la otra el fósforo total (libre + el hidrolizable con ClH N, a 100 °C, durante diez minutos).

En el *cuadro* 6 se exponen los resultados de estos análisis, expresando las cantidades en micromoles.

La reacción se inició al agregar la enzima y se detuvo a los diez minutos mediante la adición de tampón de acetato 0,125 M, a pH 4, saturado de sulfato amónico.

Cuadro 6

Tubo	Acetilfosfato	Fósforo libre	Fósforo total
1	13,5	2,9	25,0
2	13,5	2,9	25,8
3	13,5	2,6	25,6
4	13,5	2,1	16,0
5		0,1	10,1

Después de centrifugar, se tomaron muestras del sobrenadante de cada tubo para analizar el acetilfosfato, el fósforo libre y el fósforo total. En el *cuadro 7* se exponen los resultados de estos análisis, expresando las cantidades en micromoles.

Cuadro 7

Tubo	Acetilfosfato	Fósforo libre	Fósforo total
1	7,2	2,8	25,4
2	7,2	2,7	25,3
3	14,1	3,1	25,9
4	13,7	3,2	15,2
5		0,8	10,5

Del sobrenadante anterior se tomaron muestras de 3 ml, a cada una de las cuales se agregaron 0,25 g de carbón activo, a fin de determinar el fósforo adsorbido (compuestos adenílicos) y el no adsorbido; se llevó a un volumen final de 5 ml con ácido tricloroacético del 5 por ciento, se agitó durante cinco minutos y se separó el carbón por filtración. Después de lavar el carbón con agua destilada, se juntaron las aguas de lavado con el líquido filtrado y se tomaron muestras para determinar en ellas el fósforo total no adsorbido.

Para analizar el fósforo adsorbido se trató el carbón con 2 ml de ClH N a 100 °C durante diez minutos y se filtró y lavó el carbón varias veces con agua destilada, juntando el filtrado con las aguas de lavado.

Los resultados de estos análisis se exponen en el *cuadro 8*, expresando las cantidades en micromoles.

Cuadro 8

Tubo	Fósforo adsorbido	Fósforo no adsorbido
1	16,2	8,3
2	16,5	8,5
3	9,8	15,2
4		14,6
5	9,4	0,9

Los compuestos adenílicos resultantes de la reacción anterior se identificaron por cromatografía, colocando muestras de los productos finales de la reacción sobre papel Whatman núm. 1 y empleando como disolvente una disolución de 100 ml de ácido isobutírico, 60 ml de amoniaco N y 1,6 ml de verseno 0,1 M. Después de dieciséis horas se localizaron los compuestos adenílicos mirando el cromatograma a través de una lámpara de rayos ultravioletas. La *figura 1* muestra una fotografía del cromatograma obtenido. Las dos manchas de la izquierda corresponden a las muestras problemas; la central corresponde a un testigo de AMP; la siguiente, a un testigo de ADP, y la última de la derecha, a un testigo de ATP, que, como se puede observar, va contaminado con ADP.

Especificidad del substrato

La actividad enzimática del extracto purificado se ensayó frente a otros ácidos orgánicos, entre ellos, propiónico, butírico, succínico, láctico, acrílico y acetoáctico. En este experimento se emplearon 1.000 μmol de cada uno de los substratos. Después de incubar con la enzima durante diez minutos, se analizaron los acilderivados formados, encontrando 24 μmol de acetilfosfato y 0,9 μmol de propionilfosfato, con los substratos acético y propiónico, respectivamente. Con los demás substratos no se detectó cantidad alguna de acetilfosfato.

Efectos de la CoA

Para averiguar si la acetatocinasa del *Peptostreptococcus elsdenii* es dependiente de la CoA, se realizó un experimento en el que al extracto enzimático se agregaron diferentes cantidades de CoA y se determinó la actividad enzimática siguiendo la técnica usual. En el *cuadro 9* se exponen los resultados de este experimento.

Cuadro 9

Unidades de CoA	Acetilfosfato sintetizado
0	1,4
20	1,5
30	1,5
60	1,4

Proporcionalidad entre la cantidad de enzima y su actividad

Para ensayar esta propiedad se tomó un extracto parcialmente purificado, de actividad específica 60 y contenido en proteínas de 4 mg/1 ml y se analizó el número de micromoles de acetilfosfato sintetizados/minuto con cantidades crecientes de extracto enzimático. En la *figura 2* se representan los valores encontrados.

Influencia del pH

La actividad máxima de la acetatocinasa se presenta a pH 7,4. La actividad es nula a valores de pH inferiores a 5 y superiores a 9. La *figura 3* representa la actividad de un extracto crudo ensayado a diferentes pH.

Efecto de la concentración de substrato y ATP

La afinidad de la enzima para el acetato es pequeña, ya que la concentración necesaria para reducir la velocidad de la reacción a la mitad de su valor límite es aproximadamente 0,35 M. Sin embargo, la concentración de ATP para producir el mismo efecto es 0,002 M.

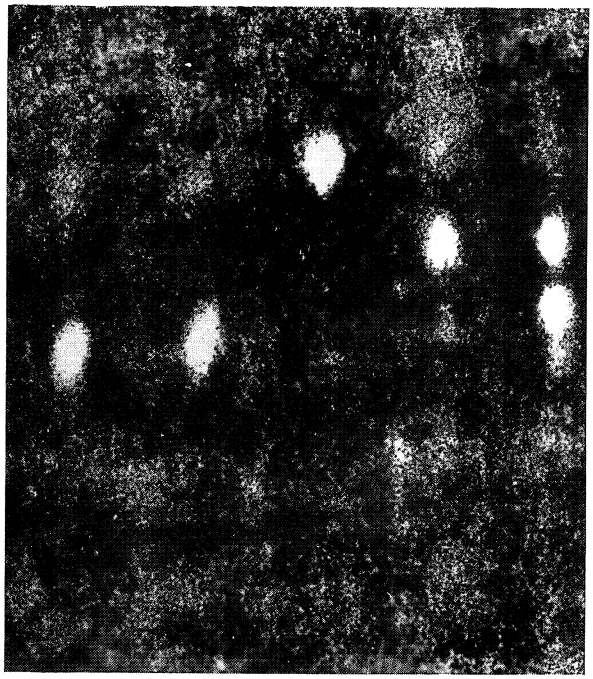


Figura 1

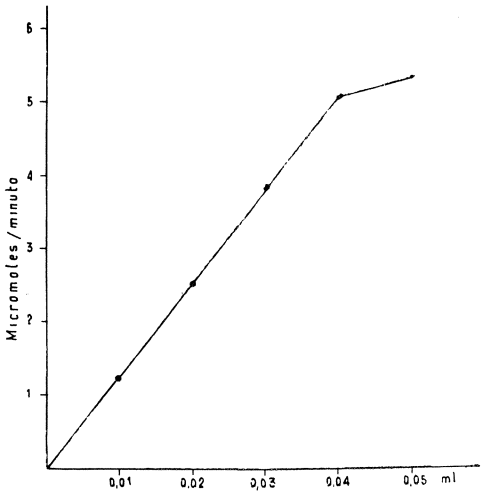


Figura 2

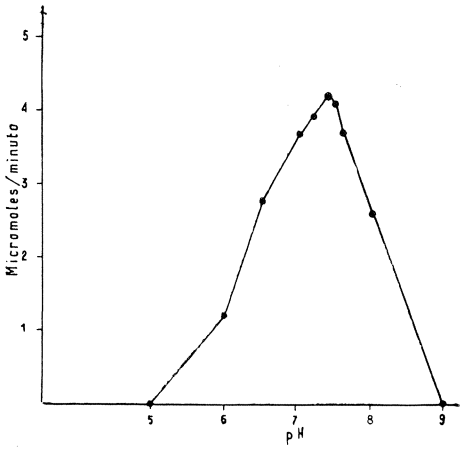


Figura 3

DISCUSION

Hasta hace unos pocos años, una gran parte de los estudios sobre el metabolismo de ácidos grasos se limitó a los procesos de oxidación de los mismos y lo que se conocía acerca de la biosíntesis eran deducciones basadas en la reversibilidad de las reacciones enzimáticas que intervenían en los procesos de aquellas oxidaciones. Esta reversibilidad, en principio postulada, encontró su confirmación con los trabajos realizados por la escuela de Popjak (2, 5, 8) en tejidos animales, en los que se describe la biosíntesis de ácidos grasos desde 4 a 18 átomos de carbono a partir de acetato, ATP, CoA y DPN, logrando identificar los compuestos intermediarios.

Según Stern y cols. (24), la entrada de un ácido en la serie de reacciones del ciclo de ácidos grasos se lleva a cabo mediante unos sistemas enzimáticos conocidos con el nombre genérico de tiocinasas que, en presencia de ATP y CoA, activan a dicho ácido.

Estas tiocinasas dependientes de CoA no son específicas.

Nuestros resultados con extractos de *Peptostreptococcus elsdenii* nos llevan a admitir la presencia en este microorganismo de una enzima, la acetatocinasa, que activa el acetato de forma diferente a como lo hace una tiocinasa. En primer lugar, hemos comprobado que no es dependiente de la CoA, y asimismo nuestros resultados señalan una especificidad de dicha enzima para el acetato. Los balances de fósforo realizados son lo suficientemente demostrativos de que la reacción que cataliza es la de fosforilación del acetato en presencia de ATP, para dar acetilfosfato y ADP. Por otro lado, la afinidad de la enzima para el acetato y el ATP es análoga a la encontrada por Rose y cols. (18) con la acetatocinasa de *Escherichia coli.*

Esta forma de activar el acetato, que presenta el *Peptostreptococcus elsdenii* es análoga a la indicada por Stadtman en el *Clostridium kluyveri,* en cuyo microorganismo existe, además, otra enzima, la fosfotransacetilasa, que cataliza la formación de Ac ~ CoA en presencia de Ac ~ P y CoA. Nosotros (17), hemos detectado también la presencia de fosfotransacetilasa en extractos crudos de *P. elsdenii.*

RESUMEN

En este trabajo se describe la purificación y propiedades de la acetatocinasa del *Peptostreptococcus elsdenii*. Su no dependencia de la CoA y la especificidad que muestra para el acetato, así como los balances de fósforo realizados, indican que dicha enzima participa en la activación del acetato en forma diferente a las tiocinasas.

SUMMARY

The enzyme acetokinase has been isolated and partially purified from cell free extracts of *Peptostreptococcus elsdenii*.

Some properties of the enzyme are described. The enzyme is specific for acetate and is no CoA dependent.

BIBLIOGRAFIA

1. Crane, R. R., y Lipmann, F. 1953. J. Biol. Chem., 201, 235.
2. De Waard, A., y Popjak, G. 1958. Biochem. J., 68, 6.
3. Eggleston, L. V., y Hems, R. 1957. Biochem. J., 65, 709.
4. Elsden, S. R.; Volcani, B. E.; Gilchrist, F. M. C., y Lewis, D. 1956. J. Bacteriol., 72, 681.
5. Hele, P.; Popjak, G., y Laurissens, M. 1957. Biochem. J., 65, 367.
6. Kaplan, N. O., y Lipmann, F. 1948. Federation Proc., 7, 163.
7. Krebs, H. A., y Hems, R. 1952. Biochim. Biophys. Acta, 12, 172.
8. Lachanche, P. J.; Popjak, G., y De Waard, A. 1958. Biochem J., 68, 7.
9. Lipmann, F. 1944. J. Biol. Chem., 155, 55.
10. Lipmann, F., y Tuttle, L. C. 1945. J. Biol. Chem., 159, 21.
11. Lowry, O. H., y López, J. A. 1946. J. Biol. Chem., 162, 421.
12. Markham, R., y Smith, J. D. 1949. Biochem. J., 45, 294
13. Ochoa, S. 1954. Advan. Enzymol., 15, 183.
14. Ochoa, S., y Stern, J. R. 1952. Ann. Rev. Biochem., 21, 547.
15. Peel, S. L., y Longhman. 1956. Biochem. J., 65, 709.
16. Rodríguez, D. 1963. Microbiol. Españ., 16, 71.
17. Rodríguez, D., y Pérez-Silva, J. 1962. Microbiol. Españ., 15, 277.
18. Rose, I. A.; Greenberg-Manago, M.; Korey, S. R., y Ochoa, S. 1954. J. Biol. Chem., 211, 737.
19. Stadtman, E. R. 1952. J. Biol. Chem., 196, 527.

20. STADTMAN, E. R., y BARKER, H .A. 1950. J. Biol. Chem., 184, 769.
21. STADTMAN, E. R., y LIPMANN, F. 1950. J. Biol. Chem., 185, 549.
22. STADTMAN, E. R.; NOVELLI, G. D., y LIPMANN, F. 1951. J. Biol. Chem., 191, 365.
23. STERN, J. R.; COON, M. J.; CAMPILLO, A. del, y SCHNEIDER, M. C. 1956. J. Biol. Chem., 221, 15.
24. STERN, J. R., y OCHOA, S. 1951. J. Biol. Chem., 191, 161.
25. SWINGLE, S. M., y TISELIUS, A. 1951. Biochem. J., 48, 171.
26. UMBREIT, W. W., y BURRIS, R. H. 1959. Manometric techniques, 272.
27. WALKER, D. 1958. Biochem. J., 69, 524.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

SOBRE LA POSICION SISTEMATICA DE *PEPTOSTREPTOCOCCUS ELSDENII*

POR

J. PEREZ-SILVA y D. RODRIGUEZ

INTRODUCCION

Elsden (4) aisló del contenido de la panza de la oveja una bacteria anaerobia estricta, a la que denominó provisionalmente con las siglas L. C. (large cocci), atendiendo a su morfología. Gutiérrez y cols. (6) han incluido esta bacteria en el género *Peptostreptococcus* (familia Lactobacillaceae), creando una nueva especie, *P. elsdenii.*

Nosotros en este trabajo discutimos la posición taxonómica de esta bacteria basándonos en los resultados del análisis de los productos finales de la fermentación de la glucosa.

MATERIAL Y METODOS

Hemos realizado la parte experimental de este trabajo con la estirpe original de Elsden, a la que hemos adaptado al crecimiento sobre un medio sintético que contiene glucosa como única fuente de carbono (8).

Los experimentos de fermentación de la glucosa se llevaron a cabo con células procedentes de un cultivo de dieciséis horas a 37° C, en medio glucosado, recogidas por centrifugación y lavadas en tampón de fosfatos 0,1 M a pH 6,5. Las células así obtenidas se incubaron en atmósfera de nitrógeno frente a diferentes cantidades de glucosa.

Al término de la fermentación se analizaron los productos finales por los siguientes métodos:
Los gases (hidrógeno y anhídrido carbónico) se determinaron manométricamente.
Los ácidos grasos se aislaron siguiendo la técnica de la doble destilación de Friedemann (5), y se identificaron por cromatografía de columna, según Bueding y Yale (2) y Moyle y cols. (7).
El ácido láctico se determinó por el método de Elsden y Gibson (3).

RESULTADOS

En la fermentación de la glucosa por células lavadas de *Peptostreptococcus elsdenii* encontramos como únicos productos finales hidrógeno, anhídrido carbónico y los ácidos acético, propiónico, butírico, valeriánico y caprónico.

En todos los experimentos realizados, la cantidad de carbono recuperada en los productos metabólicos osciló entre el 96 y el 98 por 100 del de la glucosa añadida, y la relación entre los índices de oxidación y de reducción totales estuvo comprendida entre 0,97 y 1.

DISCUSION

Como es sabido (1), la característica fundamental de la familia Lactobacillaceae es la formación de ácido láctico como producto final del metabolismo de los hidratos de carbono. A este carácter bioquímico queda subordinada la morfología y, por ello, se han incluido en dicha familia formas bacilares y formas cocáceas con las que, respectivamente, se han creado las tribus Lactobacilleae y Streptococceae.

En el género *Peptostreptococcus* (tribu Streptococceae) se han incluido varias especies, atendiendo a la similitud morfológica con los estreptococos productores de ácido láctico y sin tener en cuenta los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono. Tal es el caso de la especie que nos ocupa, la cual, según nuestros resultados y los encontrados por Gutiérrez y cols. (6) en seis estirpes, no produce ácido láctico al fermentar la glucosa y, en cambio, produce los ácidos propiónico y butírico. Además, *P. elsdenii* fermenta el ácido láctico (4), hecho incompatible con la formación de esta sustancia como producto metabólico final.

Teniendo en cuenta que en la taxanomía de las bacterias se tiende a subordinar la morfología al comportamiento bioquímico, sugerimos que el microorganismo L. C. de Elsden sea incluido en la familia Propionibacteriaceae, en la que se establecerían dos tribus:

Tribu I: Propionibacterieae (integrada por formas bacilares).
Géneros: *Propionibacterium*
Butyribacterium
Zymobacterium

Tribu II: Propionicocceae (integrada por formas cocáceas no productoras de ácido láctico y productoras de ácido propiónico y, o, butírico).
Género: *Propionicoccus* (*) gen. nov.
En este nuevo género se incluirían no sólo el microorganismo L. C. de Elsden, sino todas aquellas especies actualmente incluidas en el género *Peptostreptococcus*, que no produzcan ácido láctico y que produzcan los ácidos propiónico y, o, butírico.

RESUMEN

El microorganismo anaerobio L. C. de Elsden (*Peptostreptococcus elsdenii* Gutiérrez y cols.) fermenta el ácido láctico y la glucosa con producción de anhídrido carbónico, hidrógeno y los ácidos acético, propiónico, butírico y valeriánico; en la fermentación de la glucosa se produce además ácido caprónico.

Se discute la posición taxonómica de dicho microorganismo y se propone la creación de un nuevo género, *Propionicoccus*, dentro de la familia Propionibacteriaceae.

El género *Propionicoccus* comprendería todas aquellas especies actualmente incluidas en el género *Peptostreptococcus* (familia Lactobacillaceae), que no produzcan ácido láctico y sí propiónico y, o, butírico.

SUMMARY

The L. C. microorganism described by Elsden (*Peptostreptococcus elsdenii* Gutiérrez et al.) ferments lactic acid and glucose to hydrogen, carbon dioxide, acetic, propionic, butyric and valeric acids. In addition caproic acid is produced in the fermentation of glucose.

(*) Nombre propuesto en 1921 por Orla-Jensen (J. Bacteriol., 6, 263-73).

The taxonomic position of the above microorganism is discussed, and a new genus. *Propionicoccus,* within the family Propionibacteriaceae is tentatively proposed. In this new genus it should be included all those *Peptostreptococcus* species which have in common the production of propionic and/or butyric acid but not lactic acid from carbohydrates.

In accordance, the family Propionibacteriaceae would be classified as follows:

Family Propionibacteriaceae.

I. Rod-shaped cells

Tribu I: Propionibacterieae.

Genus I: *Propionibacterium*

Genus II: *Butyribacterium*

Genus III: *Zymobacterium*.

II. Spherical cells which occur in pairs or in chains.

Tribu II: Propionicocceae.

Genus I: *Propionicoccus*

BIBLIOGRAFIA

1. Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 1957. 7.ª edición. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
2. Bueding, E., y Yale, H. W. 1951. Production of methylbutyric acid by bacteria free *Ascaris lumbricoides.* J. Biol. Chem., 193, 411.
3. Elsden, S. R., y Gibson, Q. H. 1954. The estimation of lactic acid using ceric sulphate. Biochem. J., 58, 154.
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. Friedemann, T. E. 1938. The identification and quantitative determination of volatile alcohols and acids. J. Biol. Chem., 123, 161.
6. Gutiérrez, J.; Davis, R. E.; Lindahl, I. L., y Warwick, E. J. 1959. Bacterial changes in the rumen during the ouset of feed-lot bloat of cattle and characteristics of *Peptostreptococcus elsdenii* n. sp. Appl. Microbiol., 7, 16.
7. Moyle, V.; Scarisbrick, A., y Baldwin, E. 1948. Separation and estimation of saturated C_7-C_8 fatty acids by buffered partition columns. Biochem. J., 43, 308.
8. Rodríguez, D., y Pérez-Silva, J. 1962. Contribución al estudio de la biosíntesis de los ácidos grasos. I. Estudios realizados con células lavadas de *Peptostreptococcus elsdenii.* Microbiol. Españ., 15, 277.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

ACTIVIDAD VIRICIDA Y VIROSTATICA DEL CLORURO DE CETILDIMETILBENCILAMONIO Y DEL CLORURO DE CETILTRIMETILAMONIO FRENTE A LOS VIRUS DE LA PESTE AVIAR CLASICA Y DE LA PSEUDOPESTE AVIAR

POR

E. RONDA

En estudio precedente (3) indicamos la variable actividad inhibitoria de algunos compuestos de amonio cuaternario frente a los virus vacunal y encefalíticos equinos Este y Oeste. Los alentadores resultados entonces obtenidos con dos de los compuestos utilizados nos llevaron a ensayarlos en experiencias de este tipo frente a dos representantes del grupo de los Mixovirus, siguiendo una pauta de trabajo análoga: previo conocimiento de las características de toxicidad de los compuestos se establecieron contactos de virus-compuesto en condiciones variables de tiempo y temperatura, para después valorar la capacidad hemoaglutinante, letal sobre embrión de pollo e infectiva sobre fibroblastos en cultivo celular, de los virus así tratados.

MATERIAL Y METODOS

Virus

Se emplearon el virus de la peste aviar clásica («Fowl plague virus», FPV), cepa Rostock, y el de pseudopeste aviar o de Newcastle («Newcastle disease virus», NDV), procedentes ambos del «Max-Planck-

Institut für Virusforschung», de Tübinga, remitidos por el Prof. W. Schäffer.

Ambos virus fueron mantenidos por pases en saco alantoideo de embriones de pollo de diez-doce días, y durante las pruebas, el líquido alantoideo infectado a utilizar permaneció en congelación a —20 °C.

Para la titulación de los virus se siguió el método de Reed y Muench (2), determinando la dosis letal 50 por ciento (DL_{50}) sobre embrión de pollo, y la dosis infectante 50 por ciento en cultivo de tejidos ($DITC_{50}$) para fibroblastos.

Las características de estos virus quedan definidas por los siguientes datos:

	FPV	NDV
Título hemoaglutinante (HA)	1/2.560	1/1.280
DL_{50}/0,1 cm^3	$10^{6,2}$	$10^{5,8}$
$DITC_{50}$/0,1 cm^3	10^7	10^6

Huevos embrionados

Fueron utilizados huevos incubados en nuestro laboratorio, mantenidos a 39 °C antes de la inoculación y a 37 °C después de inoculados.

Fibroblastos de pollo

Células en cultivo primario, obtenidas por tripsinización, a 37 °C, de embriones de pollo de nueve días, previa eliminación de cabeza, vísceras y extremidades, empleando tripsina 1/250 de Difco, al 0,1 por ciento, en solución de Hank.

Estas células se añadieron al medio de crecimiento en una proporción de 10^5/ 1 cm^3, repartiéndolas en tubos de vidrio Pirex, tapados con tapón de goma y conservados inclinados en estufa a 37 °C. El cultivo celular permaneció en medio de crecimiento hasta lograr una capa monocelular continua, en cuyo momento se efectuaron las pruebas correspondientes de inoculación de virus o compuesto, nutriéndose a partir de entonces con medio de mantenimiento.

Medios nutritivos celulares

Se utilizaron los medios de crecimiento y mantenimiento que a continuación se indican:

Componentes	Medio de crecimiento	Medio de mantenimiento
Solución de Hank	74 %	86 %
Hidrolizado enzimático de lacto-albúmina al 5 por ciento	10 %	10 %
Suero de ternera	15 %	3 %
Rojo de fenol al 0,2 por ciento	1 %	1 %
Penicilina	100 U. I./1 cm^3	100 U. I./1 cm^3
Estreptomicina	100 μg/1 cm^3	100 μg/1 cm^3
Nistatina	20 U. I./1 cm^3	20 U. I./1 cm^3

Ambos medios se ajustaron a pH 7,2, con bicarbonato sódico.

Compuestos de amonio

Cloruro de cetildimetilbencilamonio (CDBA) y cloruro de cetiltrimetilamonio (CTA), de L. Light & Co. Ltd., cuyas características fisicoquímicas fueron ya descritas (3). Con esas sustancias se prepararon diluciones en solución salina estéril, a temperatura ambiente. El CDBA es difícilmente soluble a 4 °C, por lo que no fue posible efectuar pruebas de contacto con esta sustancia a dicha temperatura.

Ensayos de toxicidad de los compuestos

Se efectuaron frente a embrión de pollo y frente a fibroblastos.

En el primer caso se hicieron inoculaciones de diluciones decimales de ambas sustancias en solución salina, sobre embriones de pollo a dosis de 0,1 cm^3 por vía alantoidea, en grupos de cinco huevos, los cuales fueron observados durante ocho días después de la inoculación, manteniéndolos en incubadora a 37 °C. Se consideraron atóxicas las diluciones que no produjeron muerte en este período de tiempo.

Frente a fibroblastos en cultivo monocelular, la toxicidad fue ensa-

yada añadiendo los compuestos sobre el medio de mantenimiento, alcanzando hasta diluciones finales del orden de 10^{-10}. Se interpretaron como atóxicas las diluciones finales que no dieron lugar a alteraciones celulares observables macroscópica o microscópicamente.

En ambos casos se intentó fijar la dosis máxima tolerada (DMT) de cada uno de los compuestos estudiados.

Pruebas de hemoaglutinación

Para su realización se siguió el método de Burnet (1) en placa de plástico excavada, utilizando el virus en diluciones seriadas (0,25 cm^3) al duplo en solución tampón veronal al 1/5 en agua destilada (pH 7,2). En cada pocillo, a la dilución del virus se añadió un volumen igual de hematíes de gallina al 0,5 por ciento en solución tampón de veronal 1/5.

La lectura de resultados fue efectuada después de una hora a 4 °C.

Estudio de la actividad viricida

Se realizó mediante contactos del virus con las sales de amonio cuaternario, preparando una suspensión en solución salina del líquido alantoideo infectado, hasta lograr una dilución final que correspondiera a 2×10^3 DL_{50} ó 2×10^3 $DITC_{50}$.

A esta suspensión se añadió un volumen igual de una dilución con 2 DMT de la sustancia problema. De este modo, obteníamos una suspensión de 10^3 DL_{50} del virus frente al compuesto con 1 DMT; mezcla que se mantuvo durante tiempos variables (treinta, sesenta y ciento veinte minutos) a diferentes temperaturas (4°, 25° y 37 °C) sobre un agitador magnético en la oscuridad. Transcurridos estos contactos, variables en temperatura y tiempo, fue inoculada la mezcla en varios grupos de cinco huevos.

En nuestros ensayos de toxicidad para estos compuestos de amonio pudimos comprobar que la DMT por los fibroblastos resultaba débil para actuar frente a los virus en estudio. Para obviar este inconveniente, practicamos una centrifugación de cada una de las muestras, variables en temperatura y tiempo, a 2.000 r/m durante diez minutos, seguida de una centrifugación del sobrenadante a 35.000 r/m durante treinta minutos, recogiendo el sedimento, que se resuspendía en solución salina para volver a centrifugar a 35.000 r/m durante el mismo tiempo.

El sedimento final fue nuevamente resuspendido en medio de mantenimiento en cantidad suficiente para restituir el volumen primitivo y este medio se añadió a los tubos de cultivo, agrupándolos en varios lotes de cinco. Mediante este procedimiento hemos logrado añadir el virus tratado con altas concentraciones del compuesto, sin que se presentaran los efectos tóxicos sobre células originados por estas sales de amonio.

Asimismo se siguieron pruebas paralelas de lavado de virus sin tratar, obteniéndose en todos los casos destrucción del cultivo celular cuando habían sido infectados con aquellos virus.

Estudio de la actividad virostática

Se efectuó mediante pruebas de inoculación del virus sin tratar a embriones de pollo y a fibroblastos, realizando en ambos casos dos tipos de ensayos de acuerdo con el siguiente protocolo:

Embriones

I) Inoculación al embrión de 1 DMT por vía alantoidea antes de la infección por la misma vía con 10^3 DL_{50} del virus, que se llevó a cabo en tiempos diferentes (treinta, ciento veinte o doscientos cuarenta minutos).

II) Inoculación al embrión de 10^3 DL_{50} del virus por vía alantoidea y posterior tratamiento con 1 DMT, por idéntica vía, en tiempos diferentes (treinta, ciento veinte o doscientos cuarenta minutos).

Fibroblastos

I) Adición de la sustancia problema al medio de mantenimiento hasta lograr 1 DMT por tubo de cultivo e inoculación posterior con 10^3 $DITC_{50}$ del virus, a intervalos diferentes (treinta, ciento veinte o doscientos cuarenta minutos).

II) Inoculación del virus en el medio de mantenimiento hasta lograr un título de 10^3 $DITC_{50}$ en cada tubo de fibroblastos, añadiendo más tarde compuesto suficiente para 1 DMT con intervalos de treinta, ciento veinte o doscientos cuarenta minutos.

RESULTADOS

Los diferentes resultados se indican en los *cuadros 1-10.*

Cuadro 1. Ensayos de toxicidad de los compuestos para embriones de pollo

Compuestos	Diluciones ensayadas	Número de embriones muertos/inoculados	Probabilidad de muerte
CDBA	10^{-1}	15/15	1,00
	10^{-2}	4/15	0,26
	10^{-3}	0/15	0,00
CTA	10^{-1}	12/15	0,80
	10^{-2}	3/15	0,20
	10^{-3}	0/15	0,00

En ambos casos, las dosis máximas toleradas (DMT) correspondieron a las diluciones 10^{-3}.

Cuadro 2. Ensayos de toxicidad de los compuestos para fibroblastos de pollo

Compuestos	Diluciones finales en el medio	Grado de toxicidad sobre las células (*)
CDBA	10^{-3}	+ + + +
	10^{-4}	+ + + +
	10^{-5}	+ + + +
	10^{-6}	+ + +
	10^{-7}	+ +
	10^{-8}	—
CTA	10^{-3}	+ + + +
	10^{-4}	+ + + +
	10^{-5}	+ + +
	10^{-6}	+ +
	10^{-7}	—
	10^{-8}	—

(*) Diversos grados de alteración que van desde el desprendimiento inmediato de la capa monocelular (+ + + +) hasta ligeras variaciones en la morfología de las células (+) o ausencia total de actividad detectable (—).

Para el CDBA, la DMT se encontró en la dilución 10^{-8}, mientras que para el CTA, esta dosis estaba en la dilución 10^{-7}.

Cuadro 3. Poder viricida frente al virus de la peste aviar (FPV) determinado sobre embrión de pollo

Compuesto	Condiciones de la experiencia		Resultados sobre el virus tratado				Virus testigo no tratado y mantenido en las condiciones de la experiencia			
	Ti_c (a), min	Te_c (b), °C	Ti_h (c), 1/	DL_{50}/ 0,1 cm^3	Poder letal (d)	P_m (e)	Ti_h, 1/	DL_{50}/ 0,1 cm^3	Poder letal	P_m
CDBA 1 DMT (10^{-3} en solución salina)	30	25	2.560	10^3	3/15	0,2	2.560	10^6	15/15	1
		37	1.280	$10^{3,1}$	3/15	0,2	2.560	$10^{6,1}$	15/15	1
	60	25	2.560	0	0/15	0	1.280	$10^{6,2}$	15/15	1
		37	2,560	0	0/15	0	2.560	10^6	15/15	1
	120	25	1.280	0	0/15	0	1.280	10^6	15/15	1
		37	2.560	0	0/15	0	1.280	$10^{6,2}$	15/15	1
CTA 1 DMT (10^{-3} en solución salina)	30	4	1.280	$10^{4,2}$	6/15	0,40	2.560	$10^{6,1}$	15/15	1
		25	2.560	10^4	4/15	0,26	2.560	$10^{6,2}$	15/15	1
		37	2.560	10^4	4/15	0,26	1.280	10^6	15/15	1
	60	4	1.280	0	0/15	0	1.280	10^6	15/15	1
		25	2.560	0	0/15	0	2.560	$10^{6,1}$	15/15	1
		37	2.560	0	0/15	0	2.560	$10^{6,2}$	15/15	1
	120	4	1.280	0	0/15	0	2.560	$10^{6,1}$	15/15	1
		25	2.560	0	0/15	0	1.280	$10^{6,2}$	15/15	1
		37	2.560	0	0/15	0	1.280	$10^{6,1}$	15/15	1

(a) Tiempo de contacto. (b) Temperatura de contacto. (c) Título hemoaglutinante.
(d) Embriones: muertos/inoculados. (e) Probabilidades de muerte.

Cuadro 4. Poder viricida frente al virus de la peste aviar (FPV) determinado sobre fibroblastos de pollo

Compuesto	Condiciones de la experiencia		Resultados sobre el virus tratado				Virus testigo no tratado y mantenido en las condiciones de la experiencia			
	Ti_c, min	Te_c, °C	Ti_h, 1/	$DITC_{50}$/ 0,1 cm^3	Poder infectivo (*)	P_1 (**)	Ti_h, 1/	$DITC_{50}$/ 0,1 cm^3	Poder infectivo	P_1
CDBA (10^{-3} en solución salina con posterior centrifugación y lavado del virus)	30	25	2.560	$10^{4,5}$	2/15	0,13	1.280	10^{7}	15/15	1
		37	2.560	$10^{4,5}$	2/15	0,13	1.280	10^{7}	15/15	1
	60	25	1.280	0	0/15	0	2,560	$10^{6,4}$	15/15	1
		37	2.560	0	0/15	0	1.280	$10^{6,6}$	15/15	1
	120	25	1.280	0	0/15	0	2.560	$10^{6,9}$	15/15	1
		37	2.560	0	0/15	0	1.280	$10^{6,8}$	15/15	1
CDBA 1 DMT (10^{-8} en solución salina)	30	25	1.280	$10^{6,7}$	15/15	1	1.280	$10^{6,5}$	15/15	1
		37	2.560	$10^{6,5}$	15/15	1	1.280	10^{7}	15/15	1
	60	25	2.560	$10^{6,5}$	15/15	1	2.560	$10^{6,9}$	15/15	1
		37	1.280	$10^{6,6}$	15/15	1	2.560	$10^{6,4}$	15/15	1
	120	25	2.560	$10^{6,5}$	15/15	1	1.280	$10^{6,7}$	15/15	1
		37	2.560	$10^{6,7}$	15/15	1	2.560	10^{7}	15/15	1
CTA (10^{-3} en solución salina con posterior centrifugación y lavado del virus)	30	4	1.280	$10^{4,8}$	3/15	0,20	2.560	$10^{6,8}$	15/15	1
		25	2.560	10^{5}	4/15	0,26	2.560	10^{7}	15/15	1
		37	2.560	$10^{4,5}$	2/15	0,13	1.280	$10^{6,4}$	15/15	1
	60	4	1.280	0	0/15	0	2.560	$10^{6,6}$	15/15	1
		25	2.560	0	0/15	0	1.280	$10^{6,5}$	15/15	1
		37	1.280	0	0/15	0	1.280	10^{7}	15/15	1
	120	4	1.280	0	0/15	0	2.560	$10^{6,4}$	15/15	1
		25	2.560	0	0/15	0	1.280	$10^{6,8}$	15/15	1
		37	1.280	0	0/15	0	2.560	$10^{6,9}$	15/15	1
CTA 1 DMT (10^{-7} en solución salina)	30	4	1.280	$10^{6,7}$	15/15	1	1.280	$10^{6,9}$	15/15	1
		25	2.560	$10^{6,5}$	15/15	1	2.560	10^{7}	15/15	1
		37	2.560	$10^{6,6}$	15/15	1	2.560	$10^{6,6}$	15/15	1
	60	4	1.280	$10^{6,4}$	15/15	1	1.280	$10^{6,4}$	15/15	1
		25	2.560	$10^{6,6}$	15/15	1	1.280	$10^{6,8}$	15/15	1
		37	1.280	$10^{6,7}$	15/15	1	2.560	10^{7}	15/15	1
	120	4	2.560	$10^{6,5}$	15/15	1	1.280	$10^{6,5}$	15/15	1
		25	1.280	$10^{6,6}$	15/15	1	1.280	$10^{6,7}$	15/15	1
		37	2.560	$10^{6,4}$	15/15	1	2.560	$10^{6,8}$	15/15	1

(*) Tubos con efectos citopáticos/inoculados. (**) Probabilidad de infección.

Cuadro 5. Poder viricida frente al virus de la pseudopeste aviar (NDV) determinado sobre embrión de pollo

Compuesto	Condiciones de la experiencia		Resultados sobre el virus tratado				Virus testigo no tratado y mantenido en las condiciones de la experiencia			
	Ti_c, min	Te_c, °C	Ti_h, 1/	DL_{50}/ 0,1 cm^3	Poder letal	P_m	Ti_h, 1/	DL_{50}/ 0,1 cm^3	Poder letal	P_m
CDBA 1 DMT (10^{-3} en solución salina)	30	25	1.280	$10^{3,2}$	6/15	0,40	1.280	10^{6}	15/15	1
		37	640	10^{3}	5/15	0,33	1.280	$10^{5,9}$	15/15	1
	60	25	1.280	0	0/15	0	640	$10^{5,8}$	15/15	1
		37	1.280	0	0/15	0	1.280	10^{6}	15/15	1
	120	25	640	0	0/15	0	1.280	$10^{5,7}$	15/15	1
		37	1.280	0	0/15	0	1.280	10^{6}	15/15	1
CTA 1 DMT (10^{-3} en solución salina)	30	4	640	$10^{4,3}$	12/15	0,80	640	$10^{5,8}$	15/15	1
		25	1.280	$10^{4,6}$	10/15	0,66	1.280	10^{6}	15/15	1
		37	1.280	$10^{4,5}$	10/15	0,66	1.280	$10^{5,7}$	15/15	1
	60	4	640	0	0/15	0	1.280	$10^{5,9}$	15/15	1
		25	1.280	0	0/15	0	640	10^{6}	15/15	1
		37	1.280	0	0/15	0	640	$10^{5,8}$	15/15	1
	120	4	1.280	0	0/15	0	1.280	$10^{5,9}$	15/15	1
		25	640	0	0/15	0	640	$10^{5,8}$	15/15	1
		37	1.280	0	0/15	0	1.280	$10^{5,6}$	15/15	1

Cuadro 6. Poder viricida frente al virus de la pseudopeste aviar (NDV) determinado sobre fibroblastos de pollo

Compuesto	Condiciones de la experiencia		Resultados sobre el virus tratado				condiciones de la experiencia Virus testigo no tratado y mantenido en las			
	Ti_c, min	Te_c, °C	Ti_h, 1/	$DITC_{50}$/ 0,1 cm^3	Poder infectivo	P_1 (*)	Ti_h, 1/	$DITC_{50}$/ 0,1 cm^3	Poder infectivo	P_1
CDBA (10^{-3} en solución salina con posterior centrifugación y lavado del virus)	30	25	1.280	10^5	10/15	0,66	640	$10^{5,8}$	15/15	1
		37	640	$10^{4,8}$	10/15	0,66	1.280	$10^{5,8}$	15/15	1
	60	25	640	0	0/15	0	640	$10^{5,5}$	15/15	1
		37	1.280	0	0/15	0	640	$10^{5,4}$	15/15	1
	120	25	1.280	0	0/15	0	1.280	$10^{5,7}$	15/15	1
		37	1.280	0	0/15	0	1.280	$10^{5,6}$	15/15	1
CDBA 1 DMT (10^{-8} en solución salina)	30	25	640	$10^{5,4}$	15/15	1	1.280	$10^{5,5}$	15/15	1
		37	1.280	$10^{5,2}$	15/15	1	640	$10^{5,4}$	15/15	1
	60	25	1.280	10^5	15/15	1	640	$10^{5,8}$	15/15	1
		37	640	$10^{5,3}$	15/15	1	1.280	$10^{5,6}$	15/15	1
	120	25	1.280	$10^{5,4}$	15/15	1	1.280	$10^{5,7}$	15/15	1
		37	1.280	$10^{5,2}$	15/15	1	1.280	$10^{5,7}$	15/15	1
CTA (10^{-3} en solución salina con posterior centrifugación y lavado del virus)	30	4	640	$10^{5,7}$	14/15	0,93	640	$10^{5,4}$	15/15	1
		25	640	$10^{5,2}$	12/15	0,80	1.280	$10^{5,8}$	15/15	1
		37	1.280	$10^{5,2}$	13/15	0,86	1.280	$10^{5,7}$	15/15	1
	60	4	640	$10^{5,2}$	15/15	0	1.280	$10^{5,5}$	15/15	1
		25	1.280	$10^{5,2}$	15/15	0	640	$10^{5,7}$	15/15	1
		37	1.280	$10^{5,2}$	15/15	0	640	$10^{5,7}$	15/15	1
	120	4	640	$10^{5,2}$	15/15	0	1.280	$10^{5,6}$	15/15	1
		25	1.280	$10^{5,2}$	15/15	0	1.280	$10^{5,4}$	15/15	1
		37	1.280	$10^{5,2}$	15/15	0	1.280	$10^{5,6}$	15/15	1
CTA 1 DMT (10^{-7} en solución salina)	30	4	1.280	$10^{5,3}$	15/15	1	640	$10^{5,6}$	15/15	1
		25	640	$10^{5,1}$	15/15	1	1.280	$10^{5,4}$	15/15	1
		37	1.280	10^5	15/15	1	1.280	$10^{5,7}$	15/15	1
	60	4	1.280	$10^{4,7}$	15/15	1	640	$10^{5,8}$	15/15	1
		25	640	$10^{4,6}$	15/15	1	1.280	$10^{5,8}$	15/15	1
		37	1.280	$10^{5,2}$	15/15	1	1.280	$10^{5,6}$	15/15	1
	120	4	640	$10^{4,9}$	15/15	1	640	$10^{5,5}$	15/15	1
		25	640	$10^{4,8}$	15/15	1	1.280	$10^{5,4}$	15/15	1
		37	1.280	$10^{4,6}$	15/15	1	1.280	$10^{5,7}$	15/15	1

Cuadro 7. Poder virostático frente al virus de la peste aviar (FPV) determinado sobre embrión de pollo

Compuesto	Experimento I. Inoculación del virus (10^3 DL_{50}) después del compuesto			Experimento II. Inoculación previa del virus		
	Inoculación del virus después de minutos	Embriones muertos/inoculados	P_m	Administración del compuesto (1 DMT) después de minutos	Embriones muertos/inoculados	P_m
CDBA 1 DMT (10^{-3} en solución salina)	30	15/15	1	30	15/15	1
	120	15/15	1	120	15/15	1
	240	15/15	1	240	15/15	1
CTA 1 DMT (10^{-3} en solución salina)	30	15/15	1	30	15/15	1
	120	15/15	1	120	15/15	1
	240	15/15	1	240	15/15	1

Cuadro 8. Poder virostático frente al virus de la peste aviar (FPV) determinado sobre fibroblastos de pollo

Compuesto	Experimento I. Inoculación del virus (10^3 $DITC_{50}$) después del compuesto			Experimento II. Inoculación previa del virus (10^3 $DITC_{50}$)		
	Inoculación del virus después de minutos	Tubos con efectos citopáticos/inoculados	P_i	Adición del compuesto (1 DMT) después de minutos	Tubos con efectos citopáticos/inoculados	P_i
CDBA 1 DMT (10^{-8} en solución salina)	30	15/15	1	30	15/15	1
	120	15/15	1	120	15/15	1
	240	15/15	1	240	15/15	1
CTA 1 DMT (10^{-7} en solución salina)	30	15/15	1	30	15/15	1
	120	15/15	1	120	15/15	1
	240	15/15	1	240	15/15	1

Cuadro 9. Poder virostático frente al virus de la pseudopeste aviar (NDV) determinado sobre embrión de pollo

Compuesto	Experimento I. Inoculación del virus (10^3 DL_{50} después del compuesto			Experimento II. Inoculación previa del virus		
	Inoculación del virus después de minutos	Embriones muertos/inoculados	P_m	Administración del compuesto (1 DMT) después de minutos	Embriones muertos/inoculados	P_m
CDBA 1 DMT (10^{-3} en solución salina)	30	15/15	1	30	15/15	1
	120	15/15	1	120	15/15	1
	240	15/15	1	240	15/15	1
CTA 1 DMT (10^{-3} en solución salina)	30	15/15	1	30	15/15	1
	120	15/15	1	120	15/15	1
	240	15/15	1	240	15/15	1

Cuadro 10. Poder virostático frente al virus de la pseudopeste aviar (NDV) determinado sobre fibroblastos de pollo

Compuesto	Experimento I. Inoculación del virus (10^3 $DITC_{50}$) después del compuesto			Experimento II. Inoculación previa del virus (10^3 $DITC_{50}$)		
	Inoculación del virus después de minutos	Tubos con efectos citopáticos/inoculados	P_i	Adición del compuesto (1 DMT después) de minutos	Tubos con efectos citopáticos/inoculados	P_i
CDBA 1 DMT (10^{-8} en solución salina)	30	15/15	1	30	15/15	1
	120	15/15	1	120	15/15	1
	240	15/15	1	240	15/15	1
CTA 1 DMT (10^{-7} en solución salina)	30	15/15	1	30	15/15	1
	120	15/15	1	120	15/15	1
	240	15/15	1	240	15/15	1

De cada lote de ensayos en los que resultó muerte de embriones o destrucción celular, se efectuó la determinación del título hemoaglutinante y de la DL_{50} o $DITC_{50}$, obteniendo resultados demostrativos de que el virus había recuperado en el pase a través del embrión o del cultivo celular los títulos originales.

CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

En los *cuadros 1-2* pueden verse las diluciones que resultaron atóxicas para las distintas experiencias y compuestos, presentando un grado de toxicidad ligeramente más elevado el cloruro de cetildimetilbencilamonio. De cualquier modo, la toxicidad de ambos compuestos para los fibroblastos en cultivo era tan acusada que tuvimos necesidad de idear una modificación experimental que obviara este inconveniente, según indicamos en el apartado de técnicas.

Asimismo, de la observación de los *cuadros* 3-6, correspondientes a estudios sobre poder viricida, se ve que esta acción es independiente de la temperatura y que para que pueda lograrse esta actividad frente al virus son necesarios contactos superiores a los treinta minutos.

En cuanto a particularidades de esta actividad viricida de los compuestos de amonio ensayados, es de destacar que no alcanza a modificaciones en el título hemoaglutinante, ya que las ligeras diferencias encontradas se presentaron también en el virus testigo y sin que su aparición pueda vincularse a variaciones de tiempo o temperatura en los contactos virus-compuesto.

Esta actividad viricida se manifestó palpablemente en una marcada disminución de las DL_{50} y $DITC_{50}$, que alcanza de 5 a 6 unidades logarítmicas de base 10 respecto al título testigo.

Es posible afirmar que ambos compuestos tienen poder viricida, al que se mostró más resistente el virus de la pseudopeste aviar.

En todos los ensayos se ha podido comprobar un paralelismo de resultados para las experiencias con fibroblastos tanto como para las de embriones.

Los *cuadros 7-10*, referentes al estudio de la actividad virostática de los compuestos estudiados, demuestran de un modo concluyente la ausencia de esta acción, por cuanto no hubo protección alguna de embriones ni células en presencia de las sales de amonio.

CONCLUSIONES Y RESUMEN

Se ha estudiado la posible acción viricida y virostática de los compuestos cloruro de cetildimetilbencilamonio y cloruro de cetiltrimetilamonio frente a virus de la peste aviar clásica y de la pseudopeste

aviar o de Newcastle, mediante ensayos en embrión de pollo y cultivo de fibroblastos de pollo.

Por los resultados obtenidos es posible concluir que ambas sustancias estudiadas presentaron actividad viricida, pero no virostática, frente a los virus citados.

Que esta actividad viricida es detectable por disminución en los títulos letal o infectivo, pero no en el título hemoaglutinante.

Que el descenso de los títulos DL_{50} y $DITC_{50}$ alcanza a veces hasta 5 ó 6 unidades logarítmicas decimales.

Que así como la temperatura de contacto, dentro de los límites ensayados, no afectó a los resultados, los tiempos de contacto inferiores a sesenta minutos no bastaron para producir una acción viricida total.

Y que cuando no se lograba esta acción viricida total, los virus obtenidos de los embriones muertos y cultivos de fibroblastos alterados habían recuperado sus títulos originales de letalidad o infectividad.

SUMMARY

In the present paper the virucidal and virustatic action of cetyl-dimetyl-benzyl-ammonium chloride and cetyl-trimetyl-ammonium chloride against fowl plague virus and Newcastle disease virus was studied.

A clear virucidal action of these studied substances was found, while no virustatic action was found.

The author reported that the virucidal action determinated on chick embryo cells and embryonated eggs erises up to 5 or 6 logarithmic unities.

BIBLIOGRAFIA

1. Burnet, F. M. 1942. Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., 20, 81.
2. Reed, L. J., y Muench, M. 1938. Am. J. Hyg., 27, 493.
3. Ronda, E. 1960. Microbiol. Españ., 13, 187.

UNIVERSITY COLLEGE, DUBLIN
DEPARTMENT OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF THE TAXONOMY OF STREPTOMYCETES (*)

BY

E. KUSTER

Streptomycetes are a group of microorganisms which have become more and more significant for applied and particularly industrial microbiology as they are very important and one of the best-known antibiotic producers. This led to intense studies of these organisms, with regard to their morphology, physiology, ecology, and taxonomy. In the search for strains with antibiotic activity many types have also been found which arosed the interest of workers by demonstrating new and peculiar morphological and physiological properties which improved our knowledge not only of Streptomycetes but also of the whole class of Actinomycetes. New genera and families were introduced which are distinguished morphologically *(Table 1)*.

The genera of the Streptomycetaceae are mainly differentiated by the number and origin of spores. There are types which form one or more spores on the vegetative or aerial mycelium only, while others do it on both mycelia, for example *Thermoactinomyces* and *Micropolyspora*.

Nocardia is considered as an individual genus in this table. However, recent studies tend to the opinion that *Nocardia* are intermediates between *Mycobacterium* and *Streptomyces*. There exist asporogenous variants of *Streptomyces* which can not be separated from *Nocardia*, and on the other hand, *Nocardia* are also able to form aerial hyphae and spore chains like *Streptomyces* (5). Because of these overlappings

(*) Conferencia pronunciada en el Centro de Investigaciones Biológicas del C. S. I. C. (Madrid, 29-IV-1963).

Table 1. Actinomycetales

Family	Genus		
Actinomycetaceae	Vegetative mycelium fragmenting into bacillary elements		
	Actinomyces	anaerobic	
	Nocardia	aerobic (mesophilic & thermophilic)	
Streptomycetaceae	Vegetative mycelium not fragmenting into bacillary elements		
	Micromonospora	aerial mycelium absent	single spores on vegetative mycelium only (mesophilic)
	Thermomonospora	aerial mycelium present	single spores on aerial mycelium only (thermophilic)
	Thermoactinomyces		single spores on aerial and vegetativa mycelium (thermophilic)
	Waksmania (=*Microbispora*)		pairs of spores on aerial mycelium only (mesophilic)
	Streptomyces		chains of spores on aerial mycelium only (mesophilic & thermophilic)
	Micropolyspora		chains of spores and single spores on aerial and vegetative mycelium (mesophilic)
Actinoplanaceae	Spores ocurring in sporangia		
	Actinoplanes	aerial mycelium absent	spherical sporangia with motile sporangiospores
	Streptosporangium	aerial mycelium present	spherical sporangia with non-motile sporangiospores
	Microellobosporia		club-shaped sporangia with non-motile sporangiospores

and the close relationships some workers postulate a combination of the two genera *Nocardia* and *Streptomyces* (6, 8).

The taxonomic position of some genera is still doubtful, they are not included in this scheme. *Jensenia* (3, 4) comprise aerobic unicellular and so-called «soil-diphtheroid» forms of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, and *Nocardia*. *Chainia* (20) resemble *Streptomyces* which are able to form sclerotia on the vegetative mycelium quite easily under specific conditions. *Pseudonocardia* (9) are thermophilic forms of *Nocardia*. *Thermopolyspora* (9) are thermophilic *Waksmania* and *Streptomyces* respectively. *Streptoverticillium* (2) comprises verticillate *Streptomyces*.

Among these genera the genus *Streptomyces* is the most important one and comprises the greatest number of species. 256 species are considered in Waksman's monography (24) and since that time many new species have been described and named. Much confusion arises when a new species is not sufficiently tested and compared with type cultures. So, it can happen that the same species is named with different designations and many species may be synonyma.

It it often very difficult to fix the borderline between the species; the definition of this taxon is quite unclear in spite of all the regulations in the Code of Nomenclature. Which criteria should be considered important and necessary for a species determination? There are two groups of taxonomists, the «lumpers» and the «splitters». The lumpers using only a few characters collect into one species many types which are designated as different species by the splitters. A good help for taxonomic work is the introduction and use of infrageneric taxa such as «group», «species-group», or «series». At present we are not yet able to build up a natural system of classification of bacteria to include the Streptomycetes, based on our knowledge of their phylogeny and evolution. Each classification system and key is only a tool for describing, collecting, and grouping the various naturally occurring types of organisms.

The whole situation of bacteriological work and particularly taxonomy is complicated by the fact that our laboratory experiments do not completely reproduce the conditions and relationships in nature, the original environment of the microorganisms. Uncontrolled mutations or other changes of the genetic substance may also occur in nature, e. g. in soil, which are induced by mutagenic agents, such as metabolic

products of microorganisms or substances derived from the decomposition of organic matter. If two strains have been isolated from soil which differ in one or two characters, they will be classified as two different species. On the other hand, by a treatment with mutagenic agents mutants can be artificially produced which sometimes differ in more characters and nevertheless belong to the same parent species.

At present the following morphological and physiological characters are important and commonly used criteria for classification of Streptomycetes *(Table 2)*.

Table 2. Main characters for classification of Streptomycetes

Morphology of spore-bearing hyphae
Morphology of spore surface
Colour of vegetative and aerial mycelium
Chromogenicity (Melanin production)
Utilization of carbohydrates

The shape and structure of the spore-bearing aerial hyphae is very characteristic and stable for each species. The scheme of Pridham et al. (17) is, more or less modified, generally employed. There are also many transitions here and sometimes more than one morphological type has been found within one culture. In general, when spirals have been observed, the strain is determined as spiral even if flexous hyphae or open loops are also present. It is not yet sure if the evolution has been in the sequence straight—flexous—spiral or in the opposite way.

During the last ten years observations with the electron microscope showed that the shape of spores is not as uniform as was thought when the light microscope only was used. The surface of the spores can appear smooth or rough, in the latter case the projections are spiny, hairy, or warty (11). This character is very stable and consequently meets the prerequisite of a taxonomic criterion. Recent examinations of ultrathin sections of spores demonstrated that the spines originate from a superficial layer rather than from the spore wall proper (1, 24).

The question has been raised and discussed, whether the spiny projections of the spore surface are artificial products formed by the preparation for the electron microscope. The outerwall layer may shrink under the influence of the vacuum in a peculiar way, forming spines. Even if this is true, it is curious that only a few species always form such a shrinkage, even under different cultural conditions. Therefore, from the taxonomical point of view, the appearance of spines and other projections is a stable property, independently of which way they are formed.

Other electron microscopical studies gave evidence for the presence of a surface layer on the aerial hyphae and spores (10). This loose covering layer breaks when the spores mature and separate. If the outer layer does not rupture but remains intact and adherent, the whole spore-bearing hypha would appear as a sporangium, and the spores as sporangiospores rather than conidia. In fact, such an organism with sporangia of sausage-shaped structure containing chains of 2-6 spores has been recently described as *Microellobosporia* (7). Further observations are necessary to show if with Streptomycetes also sporangia occur more commonly than hitherto assumed.

Besides the morphological features another very noticeable character of Streptomycetes is their colorful appearance. The colonies exhibit various colours, which may be white, gray, yellow, pink, red, brown, or black. Generally the colour of the aerial mycelium is more conspicous than that of the vegetative mycelium which is commonly covered by aerial mycelium. Thus the colour of the reverse of the vegetative mycelium is observed and recorded. The colour of the aerial mycelium is not always the same as that of the vegetative mycelium. Sometimes the pigment of the vegetative mycelium is, if water-soluble, secreted into the medium and colours it. The formation of a soluble pigment largely depends upon cultural conditions, mainly on the medium used, and is generally not so stable that it can be used as a taxonomic criterion. There are wide variations in colour, and a colony is very seldom uniformly coloured. For instance, a pinkish colony shows many transitions and ranges from whitish to more or less strong pink. This makes a description of the colony and its application for taxonomic purposes difficult. Even so the colours of the aerial and vegetative mycelium are still the main criteria which are used for the first separation into series, groups and the like. There are many factors

which should be considered when colour is employed for classification. First the afore mentioned variability of the colour itself. Another difficulty arises in describing a colour. The same colour may be described differently by different workers. There are so many terms of colours which mean exactly the same with different words. The worker's individual conception of colour differs, particularly that of mixed colours. Each observer has not only a different personal perception of colours, but he may also determine the same culture differently at different times, particularly when dealing with cultures showing coloured intermediates which are termed white one day and gray another. The kind of light is also important, bright or gloomy daylight or artificial light influencing the determination of colour. Weariness of the eyes or familiarity during many hours of observation may also influence the colour determination. The variation of the colour description is at least as wide or even greater than that of the colour itself.

The use of standard colour plates with code numbers may partly eliminate these difficulties because they also comprehend the intermediates, but the subjective manner of observing and describing is not completely excluded. The best solution might be a physical method by which the colour would be determined objectively. The first experiments and measurements have been done, using a reflectance spectrophotometer (15). Although the results are not yet sufficiently satisfying they may be the basis for further studies in this direction. Until a physical method of colour determination is developed a colour scheme introduced as «Colour Wheels» by Tresner (21), seems to be convenient and suitable for taxonomic purposes and for separation of strains into the first categories of series or groups. It consists of a simple reduced Colour Harmony Guide System, commonly used in USA, which is arranged in a circular manner. All the colour shades which occur with one series or species-group of Streptomycetes are on one circle. It is quite easy then to compare even a culture which never shows a uniform colour, with the «Wheel» of a type species or series. Many cultures show a colourless, whitish, or creamy colour, some of them with a tendency to yellow, others to red or another colour which is characteristic for each series. This fact is respected in this scheme and is one of the main advantages.

In several keys of classification the melanin reaction is used as one of the first and more significant criteria. The melanin reaction

means the browning of organic media containing peptone. Strains capable of browning peptone are called chromogenic. It is very important to choose the right peptone which is darkened in a specific manner. In the earlier descriptions of species it was only stated if peptone media were browned or not. Later, tryptone-containing media were found to be suitable for the application of this test (14). However, here also intermediates of doubtful determination occur occasionally. Peptone Iron Agar (Difco) is still a more suitable medium and gives results which can be described more clearly as positive or negative. This medium was originally introduced and commonly recommended for the detection of H_2S formed by the growing organisms (22). Using these two media it was found that a correlation exists between the melanin- and H_2S-test. Melanin-positive chromogenic strains also blackened the peptone-iron-agar; negative strains are always negative on both media. It was demonstrated that the blackening of the peptone-iron-agar is not due to H_2S production, but only to that of melanin (16, 23).

Recent studies on the H_2S test showed that the lead acetate strip test indicates a true H_2S formation only (Küster & Williams, unpublished data). This test consists of a strip of filter paper, soaked and saturated with lead acetate solution on which the gaseous H_2S, evolved by the growing organisms, is adsorbed and consequently blackens the strip. This test, commonly used also with bacteria, is usually employed with liquid media. However this test is more sensitive on solid than on liquid media with Streptomycetes. For this, H_2S must be liberated from the agar medium by treatment with HCl. When the blackening of the medium is due only to H_2S formation, the treatment with hot concentrated HCl decolourizes the medium completely. If the medium is only partially decolourized, it indicates the formation of melanin as well. In this way the differentiation between H_2S-positive and- negative and melanin-positive and-negative strains respectively becomes quite simple and easy. The H_2S test is based on the formation of black metal-sulfide compounds which are differentiated by their different stability *(Table 3)*. Bismuth-sulfide (Bi_2S_2) is the most stable, it does not blacken the test strip without HCl treatment. PbS takes an intermediate position. FeS is most unstable, the medium remains uncoloured or becomes colourless very quickly. Tests with pure H_2S confirmed this suggestion. Detailed results will be published elsewhere.

It could also be demonstrated that the melanin reaction is due to the activity of phenolases, probably of the laccase type. In this connection it may be interesting to mention the observation that the intensity of the browning of a tyrosine agar can be improved by the addition of amino acids which are not oxidized and affected by the phenolases, mainly lysine, glutamic and aspartic acids. Similarly the various sugars used as carbon source in the tyrosine medium influence its browning. Studying a large number of *Streptomyces* species it was found that each species needs a specific sugar-amino acid combination for optimal browning of the tyrosine medium (13). This might have also a classificatory value which is similar to and comparable with the so-called

Table 3. Detection of H_2S-production by melanin-negative strains of Streptomyces

	Peptone-Iron-Agar	Lead-Acetate-Agar	Bismuth-Nitrate-Agar
Blackening of lead acetate strip	+	+	—
Browning of the media	—	+	+
H_2S evolved from media after HCl treatment	—	+	+

carbohydrate spectrum or the utilization of nitrogen compounds. These experiments also showed that the added amino acids either increase the enzyme activity by building up the phenolase protein or that they induce and improve the formation of phenolic metabolic products which are oxidized by the phenolase originally present. Phenolases take part in or are essential for some metabolic reactions of Streptomycetes. This is particularly true as far as the formation of antibiotics with quinonoid structure is concerned (18, 19). The formation of quinonoid metabolic products which are considered as intermediates or precursors of humic acids also depends on the presence and activity of phenolases (12).

REFERENCES

1. Arai, T., & Kuroda, E. 1962. Fine structure of spiny spores of *Streptomyces*. J. Bacteriol., 83, 924-25.
2. Baldacci, E. 1959. Criteria for the improvement of the classification of Actinomycetes. Intern. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxonomy, 9, 81-87.
3. Bisset, K. A., & Moore, F. W. 1949. The relationship of certain unbranched bacterial genera. J. Gen. Microbiol., 3, 387-91.
4. Bisset, K. A. 1950. *Jensenia*, a new genus of the Actinomycetales. J. Gen. Microbiol., 4, 280.
5. Bradley, S. G. 1959. Sporulation by some strains of *Nocardia* and Streptomycetes. Appl. Microbiol., 7, 89-93.
6. Bradley, S. G., & Anderson, D. L. 1958. Taxonomic implication of actinophage host-range. Science, 128, 413-14.
7. Cross, T.; Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. 1963. A new genus of the Actinomycetales, *Microellobosporia* gen. nov. J. Gen. Microbiol., 31, 421-29.
8. Gordon, R. E., & Mihm, J. M. 1962. The type species of the genus *Nocardia*. J. Gen. Microbiol., 27, 1-10.
9. Henssen, A. 1957. Beiträge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Aktinomyceten. Arch. Mikrobiol., 26, 373-414.
10. Hopwood, D. A. & Glauert, A. M. 1961. Electron microscope observations on the surface structures of *Streptomyces violaceoruber*. J. Gen. Microbiol., 26, 325-30.
11. Küster, E. 1953. Beitrag zur Genese und Morphologie der Streptomyceten-Sporen. Intern. Congr. Microbiol., 6th, Rome, 1953, 1, 114-16.
12. Küster, E. 1955. Humusbildung und Phenoloxydasen bei Streptomyceten. Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk., 69, 137-42.
13. Küster, E. 1958. Der Einfluss der C- und N-Quelle auf die Peptonbraunfärbung durch Streptomyceten. Zentr. Bakteriol., Parasitenk., Abt. II, 111, 227-34.
14. Küster, E. 1961. Results of a comparative study of criteria used in the classification of the Actinomycetes. Intern. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxonomy, 11, 91-98.
15. Paulin, N. 1960. La valutazione obiettiva del colore nelle colonie di Attinomiceti. Giorn. Microbiol., 8, 91-114.
16. Prauser, H., & Meyer. 1961. Zum Nachweis der H_2S-Bildung bei Streptomyceten. Naturwissenschaften, 48, 463.
17. Pridham, T. G.; Hesseltine, C. W., & Benedict, R. G. 1958. A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups. Appl. Microbiol., 6, 52-79.
18. Sevcik, V. 1957. Occurrence of phenol oxidase in *Streptomyces antibioticus* producing Actinomycin B. Nature, 179, 1.191-92.

19. Sevcik, V. 1958. The relationship of the amount of phenol oxidase in the mycelium of *Streptomyces antibioticus* to the production of Actinomycin B. Folia Biol., 4, 156-59.
20. Thirumalachar, M. J. 1955. *Chainia*, a new genus of the Actinomycetales. Nature, 176, 934-35.
21. Tresner, H. D., & Backus, E. J. 1963. System of colour wheels for Streptomycete taxonomy. Appl. Microbiol., 11, 335-38.
22. Tresner, H. D., & Danga, F. 1958. Hydrogen sulfide production by *Streptomyces* as a criterion for species determination. J. Bacteriol., 76, 239-44.
23. Turri, M., & Silvestri, L. 1960. Osservazioni su un saggio biochimico proposto per la classificazione degli Attinomiceti. Ann. Microbiol., 10, 71-76.
24. Waksman, S. A. 1961. The Actinomycetes. II. Classification, identification and descriptions of genera and species. Williams & Wilkins, Baltimore.
25. Welch, M. M., & Lechevalier, H. A. 1960. Ultramicroscopic structure of the spiny spore surface of *Streptomyces violaceus*. Bacteriol Proc., 54.

UNIVERSITY COLLEGE, DUBLIN
DEPARTMENT OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

STUDIES ON IRISH PEAT BOGS AND THEIR MICROBIOLOGY (*)

BY

E. KUSTER

Ireland is known as the «Emerald Isle». The same factors which cause this fame also induce the formation of peat. A humid climate in which the rainfall is greater than the evaporation is common in coastal countries of the temperate zone. A high air humidity and frequent showers in combination with the presence of impermeable limestone are the ideal conditions for bog formation. This is particularly true of Ireland. Approximately 20 per cent of the country consists of bogland. The peat layers may be several (3-7 m) meters deep and many fields comprise 1,000 ha and more. When a bog is at least 150-250 ha in area a technical development becomes economic. The first step of bog development is drainage which removes half the water content (95 per cent to 90 per cent). After this the peat is harvested either by cutting sods or by scraping one layer of the surface after the other. Both types of harvested peat, sod peat and milled peat respectively, are stored in large piles (500 yards long, 6-8 feet high, 10 feet wide) to dry them and to reduce the moisture content from 90 per cent to 55 per cent or 35 per cent in the case of sod peat. This material becomes ready for use as fuel either as briquettes or in power stations. Another important product is peat moss which is used as a soil conditioner and as livestock bedding in agriculture and horticulture. Peat moss is also

(*) Extracto de la conferencia pronunciada en el Centro de Investigaciones Biológicas del C. S. I. C. (Madrid, 30-IV-1963).

composted with sand and soil and shows a very good effect on plants. In many other industries peat is used, for instance as packing and insulating material, or in a pressed state for the production of flower pots.

In the search for new commercial uses for peat the possibility of microbial fermentations has also been considered. The utilization of peat by microorganisms to produce substances of high economic value is an idea, promising and rich in prospects. One of the main tasks of the Department of Industrial Microbiology is to find out and to elaborate the fundamentals and conditions under which this suggested project could be realized.

When we want to work with and to use peat we have first of all to know its chemical composition and biological properties as exactly as possible. Peat is a very heterogenous material varying according to its formation and botanical origin. In general, peat may be defined as a material which derives from dead organic material, chiefly from plants, after an incomplete and anaerobic decomposition. It is an intermediate step in the course of carbonization. The carbon content increases with progressive carbonization, that of oxygen decreases, hydrogen and nitrogen remain constant. The more decomposed, humified, and carbonized the carbon material, the more unavailable it becomes for microbes.

The manner of formation and the botanical origin influence the composition and the value of peat to a great extent. Two main types of bog formation are differentiated: the high- and the low-moor. The low-moor originates in places with a high groundwater level. It is rich in nutrients and distinguished by a high ash content. The high-moor is formed by means of the water-holding capacity of some plants, mainly of *Sphagnum*. This type of raised bogs is poor in nutrients. The Irish bogs mainly consist of high-moor *Sphagnum* and *Phragmites* peat.

The proportion of utilizable C-compounds depends on the grade of decomposition. Proteins, mono- and disaccharides, and also cellulose are quickly decomposed so that the proportion of lignin and hemicelluloses increases. Besides carbohydrates as nutrients organic compounds in peat have also been found which act as growth-inhibiting and/or -promoting substances. Corresponding to the manner of prepa-

ration and to the different peat type various compounds have been isolated.

The old conception that peat is more or less a sterile material without considerable microbial life and activity was revised in the last decades by the studies of Waksman and many others. The number of microorganisms found in peat is much higher than originally assumed. Many microbial processes of decomposition and transformation of peat substances take place in the natural habitat. The total number of microorganisms averaged 10,000 per gram peat from the pile. The conditions in a peat pile are quite different from those in an untouched bog. A better aeration may explain the higher microbial figures and activity obtained.

In accordance with the acid reaction (pH 3.7-4.5) of the peat under examination the number and proportion of fungi was high. As opposed to samples of mineral soils peat samples only contain a few different varieties of organisms. Penicilli were the dominant fungi in the peat samples. The frequent occurrence of *Cladosporium, Aleurisma, Cephalosporium* and others is probably due to their strong cellulolytic activity.

Microbial counts of samples from peat profiles showed that the number of bacteria did not decrease steadily, but increased again at 100 cm with a maximum at 150-175 cm. This second maximum coincides with a change in peat structure and grade of decomposition (H 5 to H 7-8). The same has been observed with a sample of milled peat which was harvested from a layer were a change from *Phragmites*- to *Sphagnum*-peat appeared.

We also found a clear relationship between peat quality and microflora *(Table 1)*. The poorer the quality of peat, the higher are the figures of microorganisms as obtained by the plate counting method.

Table 1. Relationship between peat quality and microflora

Quality	Relative total count	Fungi in per cent	Anaerobic colonies per plate	Furfural in per cent	O_2-uptake in mm^3
Excellent	80	20	51	0.98	84
Average	100	55		0.94	100
Poor	450	90	216	1.21	129

Poor quality is equivalent to low decomposition. It means that poor peat still contains organic matter which is utilizable by microorganisms. The growth of microorganisms on peat of different origin and quality has been examined by measuring the O_2-uptake in the Warburg apparatus. The O_2-uptake of the peat sample when additionally inoculated with a peat suspension nearly corresponded to the content of hemicelluloses measured as furfural.

Cold, warm, and hot water extracts have been prepared from peat because the most easily utilizable substances for microorganisms are water soluble. This was confirmed by the determination of the total carbohydrates with anthrone as reagent *(Table 2)*. In growth experiments with fungi the hot water extract showed the highest effect. The weight of mycelia increased parallel to added quantities of the extracts. This result is probably caused by an adsorption of precipitated

Table 2. Determination of carbohydrates in aqueous peat extracts

Water extracts	Glucose in per cent
Cold	0.012
Warm	0.350-0.400
Hot	0.750-1.120
Hot (Catalyzed)	2.600
Dry Peat	5.600

humus-like particles on the fungal hyphae. The different water extracts are differently coloured and contain increasing quantities of dark brown sediments in the order cold—warm—hot. In respiration studies, a water extract obtained by autoclaving yielded a higher O_2-uptake by fungi than the warm water extract of the same peat sample. A further increase can be reached by autoclaving in presence of diluted H_2SO_4 as a catalyst. By this so-called wet carbonization a larger amount of fermentable matter becomes available.

Drain water from a bog was also used in respiration experiments and gave similar results. It may be defined as an aqueous extract of

peat obtained under natural conditions. Bog water in a concentrated form showed a stimulating effect ranging between those of hot- and cold-water extracts. The effect increased when using bog water purified with charcoal. It means that organic substances with an inhibiting effect have been removed by the charcoal treatment. This was confirmed by an antibiotic test in which the washings of the charcoal showed the strongest antibiotic effect *(Table 3)*. Utilizable carbohydrates have also been removed by the purifying treatment so that the O_2-uptake rapidly decreases after 3 days.

Table 3. Antibiotic activity of ether extracts of bog water

Test organisms	Ether extracts of		
	Raw	Purified	Washings
	(Inhibition zones in mm)		
E. Coli	1.0	2.0	1.5
B. subtilis	2.0	3.5	6.5
Cladosporium	1.5	5.0	8.0

It is well known that a treatment with ether, toluene, benzene-alcohol removes waxes and other incrusting substances from peat so that the utilizable carbohydrates become more available for micro-organisms. The respiration on differently treated peat as well as on its water extracts was determined.

The water extracts of ether extracted samples showed a greater effect on respiration and metabolism than those of untreated peat. Besides the experiments in the Warburg apparatus the respiration of a mixed or pure culture of microorganisms was also determined by the CO_2-evolution. The O_2-uptake as well as the CO_2-evolution was retarded after the benzene-alcohol treatment as compared to that after ether- or ether-alcohol treatment or with untreated peat. The total respiration (after 5 days) was considerably higher with benzene-alcohol extracted peat and its water extracts than with the other samples. Only a benzene-alcohol mixture induces this peculiar effect but neither an ether-alcohol mixture, nor alcohol or benzene alone. The content of reducing sugars after an acid hydrolysis in benzene-alcohol treated peat is 2-4 times higher than that of ether-treated peat.

This high amount of hydrolyzable hemicelluloses and cellulose after a pre-treatment with benzene-alcohol may induce a stronger respiration, but cannot sufficiently explain the observation of the delayed metabolism. The afore mentioned purification effect on hot water extracts did not occur with those which were prepared from benzene-extracted material. This could mean that the inhibiting substances are benzene-soluble and the consequent charcoal treatment only removes carbohydrates.

The influence of Ca and N added to peat on microbial respiration has been examined. A positive Ca- and N-effect was observed when each of these substances was added to peat with and without additional inoculation with a peat suspension. But there was no or a depressing effect in the presence of Ca and N together. The Ca-effect is strongest in the first 2-3 days and decreases very quickly in the subsequent days. The C/N-ratio in peat is unfavourable changed by the addition of too much N with regard to available carbon present. When a treatment with organic solvents releases carbohydrates, the N-effect will be higher after such a treatment.

Another interesting problem which arises with regard to microbial activity in peat is the phenomenon of self-heating of peat piles. Heating and spontaneous combustion have been occasionally observed in piles of milled peat. It can occur spontaneously at any place in the pile, and no chemical or biological differences between the heated and non-heated places have yet been found. The heating of peat is to some extent comparable to that of hay, compost and the like. The heating is favoured in low-decomposed peat in comparison to well-decomposed peat with a higher caloric value as fuel. The total numbers of micro-organisms from the heated places are much lower than those of places with normal temperature, but the proportion of thermophiles grown at 45 °C increases from 3 up to 10-20 per cent in the heated samples.

Depósito Legal: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15 - Madrid