# Microbiologia Española

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



#### 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 ACROBIOLOGIA (publicada por el Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 PTA; extranjero, 240 PTA. Número: España, 20 PTA; extranjero, 30 PTA.
- ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI» (Estación Experimental de «Aula Dei». Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 50 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 PTA; extranjero, 220 PTA. Número: España, 200 PTA; extranjero, 230 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 175 PTA. Número: España, 160 PTA; extranjero, 185 PTA.
- ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 PTA; extranjero, 100 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.
- ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 165 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 60 PTA
- CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 45 PTA.
- COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 125 PTA. Número: España, 110 PTA; extranjero, 135 PTA.
- CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO «LUCAS MALLADA» (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 PTA; extranjero, 80 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 70 PTA.
- ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.
- FARMACOGNOSIA (Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 35 PTA; extranjero, 45 PTA.
- GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 80 PTA; países restantes, 120 PTA. Número: España y Portugal, 25 PTA; países restantes, 35 PTA.
- PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.



#### CONSEJO DE REDACCION

- Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.
- Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.
- Dr. 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
La infraciliación de <i>Frontonia acuminata</i> Ehrenberg, por <i>Rosa-</i> rio Gil y J. Pérez-Silva	
Estudios sobre la esporulación del Bacillus subtilis, por P. Sán- chez-Franco y B. Regueiro	
Estudios sobre la germinación del <i>Bacillus subtilis</i> , por <i>P. Sánchez-Franco</i> y <i>B. Regueiro</i>	
Metabolismo del triptofano por el <i>Pseudomonas savastanoi</i> , por R. Beltrá	
Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. VII. Influencia de la aireación en el metabolismo de los ácidos nucleicos del Staphylococcus aureus irradiado, por Eulalia Cabezas de Herrera y Pilar Aznar	e r
Actividad pectolítica de Erwinia carotovora, por Genoveva Teje- rina y M. Santaolalla	
Formas irregulares en Bacillus megaterium, por F. Fernández	155
Premio «Alonso Herrera»	. 165

### C. S. I. C. INSTITUTO "JAIME FERRAN" DE MICROBIOLOGIA

#### LA INFRACILIACION DE FRONTONIA ACUMINATA EHRENBERG

por
Rosario GIL y J. PEREZ-SILVA

#### INTRODUCCION

Como consecuencia de las teorías de Chatton y colaboradores (2-3) referentes a la autonomía y continuidad genética de los cinetosomas, y de las ideas de Faure-Fremiet (4) acerca de la morfogénesis de los ciliados, se tiende desde hace unos treinta años a revisar la taxonomía de estos protozoos, considerando como criterio fundamental las características de la infraciliación, y subordinando a él la morfología, tamaño, habitat, configuración de los núcleos, etc., en los que se basan los sistemas anteriores.

La mayoría de las investigaciones en este sentido se han llevado a cabo sobre ciliados holotricos, principalmente tricostómidos e himenostómidos. Roque (9-10) ha estudiado la infraciliación de varias especies del género *Frontonia*, entre ellas *Fr. acuminata*. Todos estos estudios llevan implícita la idea de que la infraciliación es un carácter fijo dentro de la especie, hasta el punto de que Thompson (11) ha afirmado recientemente que «la infraciliación es la huella dactilar de un protozoo».

Nosotros, sin embargo, hemos observado en *Frontonia depressa* (5) y en *Fr. leucas* (6), que, dentro de la especie, pueden haber variaciones raciales en cuanto a los detalles de la infraciliación.

En el presente trabajo se describe la infraciliación de una estirpe de *Frontonia acuminata* y se compara con la descripción de Roque (10). Además, se establecen diferencias entre esta especie y *Fr. depressa*.

#### MATERIAL Y METODOS

La estirpe de Frontonia acuminata Ehrenberg, objeto de nuestro estudio, fue aislada por uno de nosotros a partir de una muestra de musgo recogida en el Jardín Botánico de Tubinga (Alemania), en agosto de 1960, y se mantuvo en cultivo hasta enero de 1961, en un medio de infusión de suelo al que se le añadía como alimento una suspensión de Haematococcus.

Este medio de infusión de suelo es el que se usa en el Instituto Zoológico de la Universidad de Tubinga, para el cultivo de protozoos de vida libre. Se prepara partiendo de una solución madre que se obtiene mezclando 100 g de tierra (que no haya sido abonada con sustancias minerales) con 500 ml de agua destilada; la mezcla se lleva al autoclave durante dos horas a 130 °C, luego se deja enfriar hasta unos 60 °C y se filtra por papel. Se mezclan 50 ml de esta solución madre con 1 l de agua destilada y desionizada. A esta mezcla se le añade 1 ml de solución de NO<sub>3</sub>Na al 0,4 por ciento y 1 ml de solución de PO<sub>4</sub>NHa<sub>2</sub> al 0,008 por ciento. Por último, se esteriliza al autoclave durante treinta minutos, a 120 °C.

Para poner de manifiesto la infraciliación empleamos el método de impregnación argéntica de Chatton-Lwoff, tal como lo describe Corliss (1).

Como medida del primer penículo tomamos la longitud de la cuerda que une los dos extremos de dicho penículo.

#### **RESULTADOS**

#### Morfología

La forma del cuerpo es oval o elipsoidal, bastante ensanchada (figura 2) y ligeramente deprimida. El tamaño oscila entre 65-85  $\mu$  de largo por 35-55  $\mu$  de ancho (cuadro 1).

La abertura bucal es relativamente grande (alcanza casi un tercio de la longitud del cuerpo) y está situada en la mitad anterior del cuerpo. Tiene forma oval, algo apuntada en su parte anterior. En la parte posterior derecha de la abertura bucal se inicia la sutura postoral, bien

definida, que se extiende igualmente hasta el extremo posterior del cuerpo.

Posee una vacuola pulsátil situada detrás de la línea ecuatorial, hacia la mitad derecha del cuerpo. Generalmente hay un solo poro excretor (figura 3), pero en algunos individuos puede haber dos (figura 4).

Existe un solo macronúcleo elipsoidal, que presenta una concavidad en la que se aloja un micronúcleo esférico relativamente grande.

#### Ciliación somática

El cuerpo presenta unas 55 cinetias somáticas meridianas. Los cinetosomas de estas cinetias están agrupados de tres en tres y estos grupos alternan con los tricocistos. Detrás de la abertura bucal, y a la izquierda de la sutura postoral, se encuentra el campo postoral integrado por cinco cinetias cortas, que van desde el borde posterior de la abertura bucal hasta la sutura postoral, donde terminan escalonadamente.

#### Infraciliación vestibular

A la derecha de la abertura bucal existen tres cinetias vestibulares (figuras 1 y 5). Las dos primeras (las más próximas a la boca) parten del vértice anterior de la abertura bucal, mientras que la tercera comienza a la altura de la parte media de la cavidad bucal. Los cinetosomas de estas cinetias forman grupos de tres muy próximos entre sí. El tamaño de estos cinetosomas es intermedio entre los peniculares y los somáticos.

#### Infraciliación bucal

En la pared izquierda de la cavidad bucal existen tres penículos (figuras 1-2). Los dos primeros (los más externos) corren muy juntos entre sí y paralelos al borde izquierdo de la cavidad bucal. Cada uno de estos penículos está integrado por cinco hileras completas de gránulos muy finos. La longitud del primer penículo es de  $24~\mu$  (cuadro 1).

El tercer penículo está algo separado de los otros dos y en su tercio posterior se incurva hacia el fondo de la cavidad bucal. También este penículo está integrado por cinco hileras de gránulos, pero no todas son completas. La primera de dichas cinetias (la más externa) está representada por dos o tres cinetosomas situados en la parte anterior del penículo. La segunda se interrumpe poco antes de alcanzar el extremo

posterior del penículo. La tercera y la cuarta son completas. Y la quinta está representada por unos pocos gránulos en la parte anterior.

Entre el borde derecho de la cavidad bucal y la primera cinetia ves-

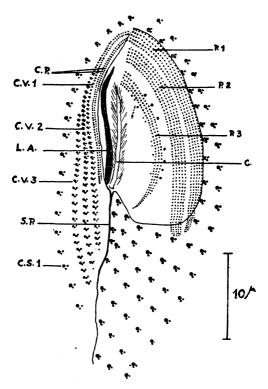
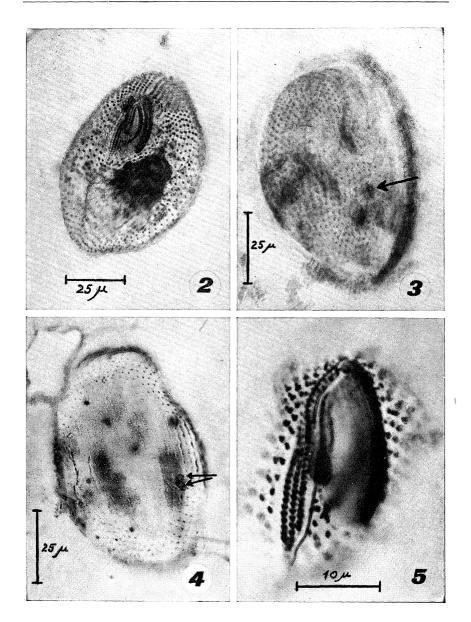


Figura 1. Representación esquemática de la zona oral de Frontonia acuminata. C, citostoma; C.S.1, primera cinetia somática; C.P., cinetias paraorales; C.V.1, primera cinetia vestibular; C.V.2, segunda cinetia vestibular; C.V.3, tercera cinetia vestibular; L.A., linea argentófila; P.1, P.2 y P.3, primero, segundo y tercer penículo, respectivamente; S.P., sutura postoral

tibular existen dos cinetias paraorales (figura 1) que se inician frente a la parte anterior del primer penículo, corren muy próximas entre sí y paralelas al borde de la cavidad bucal hasta alcanzar el borde posterior de la misma.

En la pared derecha de la cavidad bucal se encuentra la línea argen-



Figuras 2-5. Frontonia acuminata. Impregnación argéntica. 2) Individuo visto por la cara ventral. Se observa la infraciliación somática y bucal. 3-4) Individuos vistos por la cara dorsal. Las flechas indican los poros excretores. 5) Cinetias vestibulares y sutura postoral

tófila (figura 1), muy patente, que se extiende desde la parte anterior de dicha cavidad hasta el comienzo de la sutura postoral.

Cuadro 1. Medidas de la longitud (L) y anchura (A) del cuerpo, relación entre longitud y anchura (L/A) y longitud (P) del primer penículo, tomadas en ocho individuos de Frontonia acuminata impregnados con plata

Individuos	L, micras	A, micras	L/A	P, micras
1	85	55	1,54	25
2	80	50	1,60	24
3	70	42	1,66	24
4	71	38	1,86	24
5	80	45	1,77	24
. 6	70	35	2,00	24
7	65	40	1,62	24
8	78	40	1,95	24

#### **DISCUSION**

Según las claves de Kahl (7), la principal diferencia entre Frontonia acuminata Ehrenberg y Fr. depressa Stokes estriba en que ésta posee un solo poro excretor, mientras que Fr. acuminata presenta dos o tres. Basándonos en ello, en un trabajo previo (8), identificábamos la estirpe de Frontonia objeto del presente trabajo como Fr. depressa, ya que todos los individuos que hasta entonces habíamos observado, presentaban un solo poro excretor. Posteriormente, al realizar el estudio detallado de la infraciliación, hemos podido diferenciar claramente ambas especies. En efecto, en Fr. depressa (5), la longitud del primer penículo es de 15  $\mu$ , existe cinetia frontal y un solo poro excretor, mientras que en Fr. acuminata, la longitud del primer penículo es de 24  $\mu$ , no existe cinetia frontal (aunque la tercera cinetia vestibular es incompleta) y se observan uno o dos poros excretores. Este último carácter está de acuerdo con la descripción que hace Roque de Fr. acuminata (10).

También en los demás detalles de la infraciliación nuestras observaciones coinciden en líneas generales con la descripción de Roque, pero nosotros interpretamos de distinto modo el campo vestibular, ya que consideramos que la primera cinetia vestibular de las cuatro que describe esta autora es más bien una segunda cinetia paraoral; nos basamos para ello en que esta cinetia está integrada por cinetosomas sencillos, sigue un recorrido exactamente paralelo al de la primera cinetia paraoral y en que no rebasa el borde posterior de la abertura bucal. Naturalmente, esta interpretación queda supeditada al comportamiento de dicha cinetia durante la estomatogénesis.

Otra diferencia en cuanto a la interpretación del campo vestibular de Frontonia acuminata es la referente a la longitud y trayectoria de las dos cinetias vestibulares más externas. Según Roque (10), la última cinetia vestibular es completa, esto es, se extiende desde el vértice anterior de la abertura bucal hasta la sutura postoral, mientras que la penúltima es incompleta (se inicia a la altura de la parte media de la abertura bucal). Nosotros, en cambio, hemos observado que la cinetia incompleta es la última (la más externa), mientras que la penúltima tiene el recorrido completo.

Finalmente, en el campo postoral hemos observado sólo cinco cinetias, mientras que Roque describe seis. En este caso puede tratarse de una diferencia racial, análoga a las que ya hemos encontrado en *Fron*tonia depressa (5) y en *Fr. leucas* (6).

#### RESUMEN

Empleando el método de impregnación argéntica de Chatton-Lwoff, se estudia la infraciliación de una estirpe de *Frontonia acuminata* Ehrenberg. Como caracteres de posible interés taxonómico se señalan: la longitud del primer penículo  $(24 \mu)$ , la existencia de uno o dos poros excretores y la ausencia de cinetia frontal.

#### **SUMMARY**

By using the Chatton-Lwoff silver impregnation technique, the infraciliature of a strain of *Frontonia acuminata* Ehrenberg is studied. Some features with possible taxonomic value are indicated. Such features include: the length  $(24~\mu)$  of the first peniculus, presence of one or two excretal pores, and absence of frontal kinety.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- CORLISS, J. O. 1953. Silver impregnation of ciliated Protozoa by Chatton-Lwoff technic. Stein Technol., 28, 97-100.
- CHATTON, E., y BRACHON, S. 1935. Discrimination, chez deux infusoires du genre Glaucoma, entre système argentophile et infraciliature. Compt. Rend. Soc. Biol., 118, 399-403.
- CHATTON, E.; LWOFF, A., y LWOFF, M. 1931. Sur la continuité génétique des systèmes ciliaires chez les ciliés Foettingériides. Compt. Rend. Soc. Biol., 107, 356-40.
- 4. FAURE-FREMIET, E. 1950. Morphologie comparée et systematique des ciliés. Bull. Soc. Zool. France, 75, 109-22.
- GIL, R., y PÉREZ-SILVA, J. 1964. The infraciliature of Frontonia depressa Stokes. Arch. Protistenk. (en prensa).
- 6. GIL, R., y Pérez-Silva, J. La infraciliación de Frontonia leucas Ehrenberg (en preparación).
- Kahl, A. 1930-1935. Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). II. Holotricha, en Die Tierwelt Deutschland. G. Fischer, Jena.
- PÉREZ-SILVA, J., y GIL, R. 1962. Algunas observaciones sobre el aparato bucal de Frontonia (Ciliados, Holotricos). Microbiol. Españ., 15, 187-98.
- 9. Roque, M. 1961. Frontonia microstoma. J. Protozol., 8, 41.
- 10. Roque, M. 1961. Recherches sur les Infusoires ciliés. Les Hymenostomes peniculiens. Bull. Biol. France Belg., 95, 432-519.
- 11. Thompson, J. C. 1962. The buccal infraciliature as the distinguishing characteristic in the ciliate order Hymenostomatida. J. Protozool. (Suppl.), 9, 12.

# C. S. I. C. INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## ESTUDIOS SOBRE LA ESPORULACION DEL BACILLUS SUBTILIS

por

P. SANCHEZ-FRANCO y B. REGUEIRO

#### INTRODUCCION

El examen microscópico de las células bacterianas revela ciertas estructuras diferenciadas. Dentro de este tipo de estructuras podemos situar a las esporas que se forman a partir de las formas vegetativas de algunas bacterias. Dentro de la sistemática bacteriana, la facultad de producir esporas casi se limita a los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

Estas bacterias capaces de esporular pueden crecer y reproducirse como células vegetativas, pero en cierta fase de su desarrollo esporulan, es decir, forman esporas.

El proceso de esporulación se caracteriza por una acumulación del material protoplasmático que al rodearse de una membrana y quedar en libertad, constituye la espora. Si ésta se lleva a un medio ambiente favorable, germina, es decir, vuelve a formar una célula vegetativa; si no, permanece en estado de espora durante tiempo indefinido. Cada célula vegetativa forma una espora y cada espora, una célula vegetativa.

El tema de la formación y germinación de las esporas ha sido objeto de numerosos estudios por su gran importancia biológica y revisiones muy completas han sido últimamente realizadas por diversos autores (2, 4, 9-11, 15, 21-22).

La formación y mantenimiento del estado de latencia de la espora representa un interesante problema para el microbiólogo, que pretende estudiar su naturaleza y factores que conducen a su formación, así como la naturaleza de su resistencia a condiciones físicas y químicas adversas. Durante los últimos años se realizaron grandes avances en el estudio de las esporas, pero quedan aún muchos problemas sin resolver. Uno de ellos es el de las condiciones nutritivas necesarias para el desarrollo de la espora, así como el efecto de la temperatura, pH y otros factores, sobre los que se tratará en este trabajo.

#### REVISION BIBLIOGRAFICA

#### Formación de esporas

Una espora puede reconocerse por los caracteres siguientes: su refringencia; su impermeabilidad a los colorantes; su resistencia al calor, agentes químicos, radiaciones, etc.; su estructura, y por contener ácido dipicolínico o piridin-2-6-dicarboxílico (ADP).

Estudios citológicos de la formación de esporas han sido realizados por Young y Fitz-James (31).

El crecimiento vegetativo no siempre lleva a la formación de esporas, como ocurre, por ejemplo, cuando las bacterias crecen en un medio sin fuente de carbono o nitrógeno; cuando hay inhibidores de la esporogénesis, o cuando el medio es deficiente en manganeso, como demuestran Charney y colaboradores (3). Si las células vegetativas se recogen al final de la fase logarítmica y se lavan, tampoco esporulan, como demuestran Gollocota y Halvorson (6).

Se sabe que las condiciones desfavorables para el crecimiento previenen, más que producen, formación de esporas y que si las condiciones son favorables para el desarrollo de la espora, el único factor relacionado con la iniciación de la esporulación es la deficiencia en algún factor necesario para la terminación del crecimiento vegetativo.

Según Nakata y Halvorson (23) se sabe muy poco sobre los cambios fisiológicos que ocurren desde que termina el crecimiento vegetativo hasta que comienza la esporulación, y hay diferencias de comportamiento entre especies e incluso entre razas, y de aquí la diferencia de resultados entre diversos autores. Por estas razones se necesitan más conocimientos antes de plantear una hipótesis general de esporulación o formación de esporas.

#### Factores externos que influyen en la formación de esporas

Durante el proceso de formación de esporas, el medio de crecimiento y el medio intracelular varían y muchos factores de ambos son interdependientes. También influyen factores genéticos, que hacen variar la esporulación, aun dentro de la misma raza de bacteria.

Entre los factores externos que pueden influir en la formación de esporas, los hay de tipo mecánico, como los estudian Knaysi y Curran (16). La temperatura de incubación afecta a la velocidad y cantidad de esporar formadas, así como a las propiedades de las mismas. La esporogénesis es más rápida a la temperatura óptima de crecimiento y la resistencia al calor y el contenido de ADP en esporas de Bacillus subtilis, aumenta con el aumento de temperatura de esporulación. El pH, que no afecta al crecimiento vegetativo, puede impedir la formación de esporas. Roth y colaboradores (28) observan para el Bacillus subtilis que el pH del medio desciende rápidamente de 7,0 a 5,0, para subir después a 8,0 en la última fase de la esporulación. Gollocota y Halvorson (6) encuentran las necesidades en varios compuestos (cationes, fosfatos, etc.) para subir el pH y para esporulación. Para la formación de esporas es necesario el oxígeno, aunque esta necesidad en las últimas fases de la esporogénesis no está aún clara. En general, los límites de todos los factores mencionados son más estrechos para la formación de esporas que para el crecimiento, aunque el óptimo es parecido.

Numerosos compuestos inorgánicos son esenciales y con función específica en la formación de esporas, mientras que otros apenas influyen en la misma. La deficiencia en ciertos iones metálicos puede limitar el crecimiento, pero también la formación de esporas. Kolodziej y Slepecky (17) demuestran que si a un medio sintético que permite la esporulación se le purifica de oligoelementos contaminantes, sigue siendo posible el crecimiento, pero no la esporulación.

También es importante para la formación de esporas la naturaleza de los compuestos orgánicos del medio, y así, el equilibrio carbono/nitrógeno puede determinar o no, la formación de esporas. Muchos compuestos orgánicos de carbono afectan más a la esporulación que al crecimiento vegetativo y, en general, el agotamiento de la fuente de carbono señala el comienzo de la esporulación. También la fuente de carbono puede afectar a las propiedades de la espora; así, la adición de glucosa,

lactosa o almidón a un medio con peptona, aumenta la resistencia al calor de las esporas del Bacillus subtilis.

La forma de realizarse la nutrición nitrogenada en un medio complejo, es difícil de apreciar. Sin embargo, tanto las bacterias que crecen en un medio sencillo inorgánico, como las que lo hacen en un medio complejo orgánico, sintetizan los mismos compuestos intracelulares de reserva. Ciertas observaciones permiten suponer que la esporulación puede iniciarse por agotamiento de la fuente de nitrógeno. En un medio complejo puede iniciarse la esporulación por deficiencia en uno o más aminoácidos, bien por bajo nivel inicial o por agotamiento del mismo durante el metabolismo, como señala Grelet (8). Krask (18) observa que la formación de esporas en un medio sencillo de glucosa-glutamato-sales, precisa más glutamato que el necesario para el solo crecimiento vegetativo y que la sulfóxidometionina, inhibidor de la conversión de glutamato o glutamina, impide la esporulación, pero no el crecimiento vegetativo.

Se conoce poco sobre el efecto de factores de crecimiento y coenzimas en la formación de esporas. Otras diferentes substancias pueden afectar a la esporulación, como: ácidos grasos, filtrados de cultivos, etc.

Relacionado con todos los factores mencionados está la *permeabili-dad* de las células a los materiales, tema que revisan Gerard y Black (5), que afirman que la pared celular de la espora es permeable.

#### Factores internos que influyen en la formación de esporas

Como es lógico, la principal fuente de materiales para la formación de esporas se encuentra en el medio intracelular, existiendo diferencias notables en la composición de la espora y la célula vegetativa, como demuestran Salton y Marshall (29) para la pared celular.

Durante la esporulación cesa la concentración de aminoácidos, purinas y pirimidinas en la célula vegetativa y algunos de estos compuestos se incorporan a la espora, habiéndose demostrado que antimetabolitos de los anteriores compuestos inhiben completamente la esporulación, siendo esto reversible por adición del correspondiente metabolito.

#### Biosintesis del ácido dipicolínico

Durante la esporulación es importante la formación del ADP y la incorporación de calcio. El ADP aparece al comienzo de la esporulación y no es detectable en las células vegetativas. Su velocidad de formación está relacionada con el proceso de formación de la espora (24, 26).

Fue Powell (25) quien señaló por primera vez la presencia del ADP y lo aisló de las esporas, sugiriendo un mecanismo de biosíntesis. En los últimos años aumentó el interés hacia este compuesto, en un esfuerzo de explicar su papel en el proceso de esporulación, según observan Halvorson y Howitt (12).

El mayor interés sobre el ADP comenzó cuando se determinó que las esporas que lo sintetizaban eran termoestables y dejaban de serlo cuando perdían el complejo ADP + Ca<sup>++</sup>. Walker y colaboradores (30) encuentran esta relación entre el ADP y resistencia al calor en el *Bacillus subtilis*.

Keynan y colaboradores (14) determinan que el contenido en ADP de las esporas puede variar con las condiciones de crecimiento y esporulación y sugieren que el ADP forma parte del sistema de latencia de la espora. Esto orienta a pensar en una mayor estabilidad de las enzimas de la espora, y esto, quizá, pueda producirse por la propiedad del ADP + Ca<sup>++</sup> de formar complejos con aminoácidos y probablemente con las proteínas.

En el presente trabajo, realizado con una raza de *Bacillus subtilis* R, tratamos de determinar la influencia de los componentes de un medio sintético en la esporulación y en relación con el pH y crecimiento, así como un estudio sobre la producción de ADP en diferentes condiciones y la influencia del antimetabolito: ácido picolínico.

#### MATERIALES Y METODOS

En el presente trabajo se emplea una raza de *Bacillus subtilis* R, amablemente enviada por el Dr. Richmond, del Consejo de Investigaciones Médicas, de Londres, y a quien agradecemos su envío en forma liofilizada.

Durante estos trabajos se emplearon diversos medios de cultivo. Para

crecimiento, medio de caldo común (enriquecido con glucosa e hidrolizado de caseína); para aislamiento de colonias, medio de agar + caldo común enriquecido y para esporulación, medio de caldo + patata. Las experiencias se realizan en el medio sintético C, de Roberts (27), enriquecido con glucosa y ácido glutámico (medio C.G.G.), con la composición siguiente: glucosa, 0,3 por ciento; L-glutámico, 0,1 por ciento; ClNH<sub>4</sub>, 0,2 por ciento; PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>, 0,6 por ciento; PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, 0,3 por ciento; ClNa, 0,3 por ciento; Cl<sub>2</sub>Mg, 0,001 por ciento; SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>, 0,0026 por ciento.

Se obtienen esporas del *Bacillus subtilis* R en el medio caldo+patata, se centrifugan y lavan varias veces con agua destilada, tratando con lisozima ( $100\gamma/ml$ ) para destruir restos de paredes vegetativas. Se prepara una suspensión en agua destilada de  $2\times10^{10}$  esporas/ml, que se conserva en frigorífico y se emplea a través de todas las pruebas que se mencionan.

Para las experiencias de crecimiento vegetativo y esporulación se emplea el medio C.G.G. + manganeso, en matraces de 1.000 ml, con 200 ml de medio. Se inoculan con 5 ml de la suspensión de esporas y se incuban en agitación (90 impulsos/min, en un recorrido de 10 cm), a 37 °C.

En muestras tomadas a intervalos de tiempo se determina: pH (Beckman, modelo G), crecimiento (extinción en fotocolorímetro de Kipp, filtro 53), esporulación (se hace extensión de muestras en portaobjetos y tiñe por azul de metileno, se cuentan esporas no coloreadas con auxilio de un retículo ocular y se establece el porcentaje de esporulación) y ácido dipicolínico, por el método de Jansen y colaboradores (13).

#### EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

Influencia de factores limitantes del medio en la esporulación

Antes de estudiar los factores limitantes de la esporulación en el medio que empleamos, conviene establecer las condiciones normales de crecimiento y esporulación. Se realiza un cultivo en condiciones normales en el medio C. G. G.  $\pm$  Mn<sup>++</sup>, según las técnicas generales. Los resultados se expresan en la figura 1.

La fase de crecimiento logarítmico comienza a las cuatro horas y termina a las diez horas; el pH inicial, de 7,1, comienza a descender al iniciarse la fase logarítmica, bajando hasta 6,4 a las doce horas; al terminar la fase logarítmica vuelve a subir, alcanzando 7,1 a las veinticuatro horas, subiendo después lentamente. La esporulación comienza a las catorce horas, llegando al 100 por ciento a las veinticuatro horas.

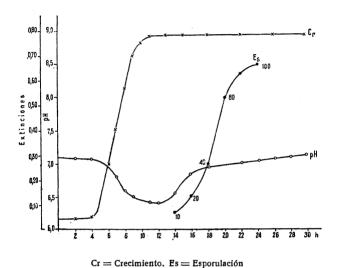


Figura 1. Condiciones normales. Esporulación, en porcentajes

Es decir, la esporulación comienza al terminar el crecimiento vegetativo y comienza a subir el pH.

A continuación se realizan una serie de experiencias en las mismas condiciones anteriores, pero en las que algún componente del medio C. G. G.  $\pm$  Mn<sup>++</sup> se suprime o añade en concentración mitad de la normal, observándose, por comparación con la experiencia anterior, el efecto del compuesto de que se trata, en el crecimiento, pH y esporulación.

#### Glucosa

Los resultados de la experiencia en que se suprime o añade mitad de concentración, se expresan en la figura 2.

A mitad de concentración no se afecta el crecimiento, pero si se suprime la glucosa, entonces el crecimiento no comienza hasta las doce horas, siendo muy lento y escaso. En relación con el pH, la ausencia de glucosa no produce variación del mismo. Por último, en relación con la esporulación, la ausencia de glucosa produce ausencia de esporulación, luego la glucosa es necesaria en la formación de esporas. Con una concentración mitad de la normal, la esporulación se retrasa considerablemente, no comenzando hasta las veinte horas; un 70 por ciento

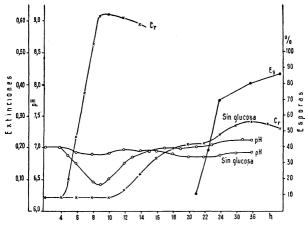


Figura 2. Glucosa, 15 por ciento

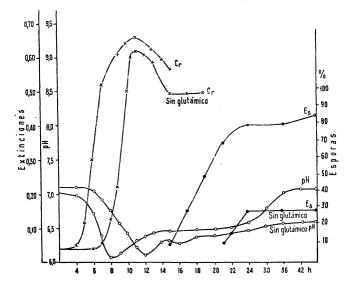


Figura 3. Acido glutámico, 0,005 por ciento

de células vegetativas esporulan entonces rápidamente, mientras un 20 por ciento lo hacen más lentamente; esto significa que un 10 por ciento de bacilos no esporulan.

#### Acido glutámico

Los resultados de la experiencia en que se suprime o añade mitad de concentración, se expresan en la figura 3.

Unicamente cuando se suprime totalmente el ácido glutámico se retrasa dos horas la iniciación de la fase logarítmica, que después continúa normalmente. En cuanto al pH, ocurre lo mismo, es decir, se retrasa el descenso y elevación del mismo en dos horas, aunque en ausencia de glutámico no se alcanza después el nivel original. En relación con la esporulación, si se añade mitad de concentración de glutámico, el 80 por ciento de los bacilos esporulan normalmente, llegando a un total del 90 por ciento a las cuarenta y dos horas. Si se suprime el glutámico, la esporulación comienza a las veintiuna horas y sólo llega a un 30 por ciento.

#### Cloruro amónico

Los resultados de esta experiencia, en que se suprime o añade sólo la mitad de concentración, se expresan en la figura 4.

Unicamente si se suprime totalmente el ClNH4 se retrasa ligeramente

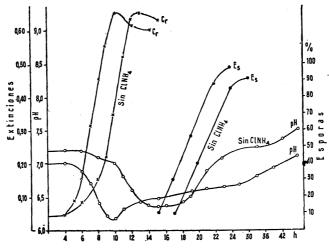


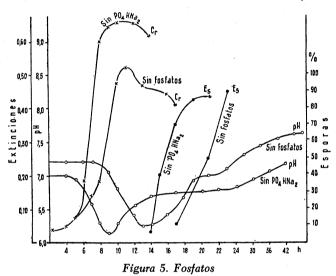
Figura 4. Cloruro amónico, 0,1 por ciento

el crecimiento. Lo mismo ocurre con la variación de pH, que es poco demostrativa. En cuanto a la esporulación, únicamente en ausencia de ClNH<sub>4</sub> hay un retraso de dos horas en relación con la esporulación normal.

#### **F**osfatos

Los resultados de esta experiencia, en que se suprimen los fosfatos o únicamente se pone PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>, se expresan en la figura 5.

Si se suprimen los fosfatos, se retrasa el crecimiento y la cantidad

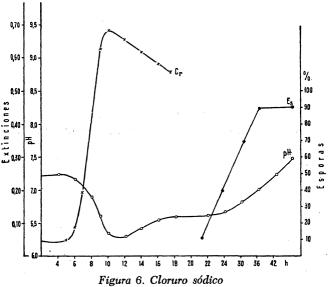


del mismo es menor que la normal; en cambio, si sólo se suprime el PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>, no hay variaciones en el crecimiento. Lo mismo ocurre con el pH; únicamente en ausencia de fosfatos, y como parece lógico, el descenso del pH es más lento, mientras que la subida llega a 7,6 más rápidamente. Por último, en relación con la esporulación, únicamente en ausencia de fosfatos comienza algo más tarde, pero es más rápida en llegar al 100 por ciento.

#### Cloruro sódico

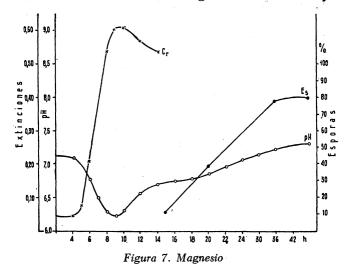
En esta experiencia, únicamente se expresan en la figura 6 los resultados de su ausencia. El crecimiento y el pH, en un medio en ausencia del ClNa, es normal, aunque el último tiene una elevación más

lenta que la normal. La esporulación también se retrasa hasta las veinte horas, llegando sólo a un 90 por ciento.



#### Magnesio

También en esta experiencia, únicamente se expresan en la figura 7 los resultados de la ausencia del ion Mg++. El crecimiento y el pH en

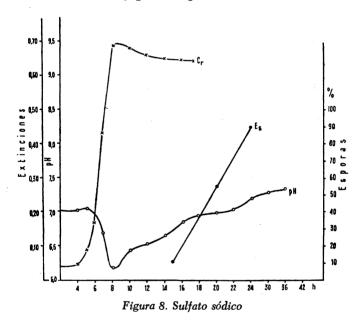


11

ausencia del mismo son normales, aunque el último tiene una subida más lenta que la normal. El comienzo de la esporulación es normal, a las catorce horas, pero se desarrolla lentamente, llegando hasta un 80 por ciento. Su influencia será seguramente sobre las enzimas de formación de esporas.

#### Sulfato sódico

Como en las últimas experiencias, en la figura 8 sólo se expresan los resultados de la ausencia del SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>. En ellos no se observa variación en el crecimiento y pH, aunque éste tiene una fase de descenso



más rápida que la normal. La esporulación, aun comenzando a las catorce horas, es algo más lenta que la normal.

#### Manganeso

Los resultados de la experiencia, en que se demuestra el efecto de diversas concentraciones de Mn<sup>++</sup>, se expresan en la *figura* 9, solamente sobre el crecimiento. Unicamente a partir de la concentración de 0,001 por ciento parece que se frena la fase logarítmica de crecimiento.

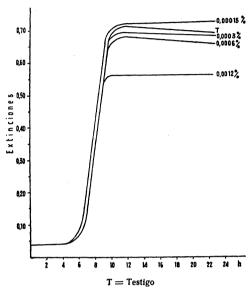


Figura 9. Manganeso

En relación con la esporulación, que es donde fundamentalmente actúa el Mn<sup>++</sup>, se obtienen los resultados en porcentaje de esporulación, a diferentes concentraciones de Mn<sup>++</sup> y horas, que expresa el cuadro 1.

Cuadro 1

			Horas		
Mn <sup>++</sup> , porcentaje	14	18	21	24	30
porcentaje			porcentaje	1	1
Testigo		25	43	90	100
0,000125		67	85	96	100
0,000500		56	70	88	100
0,001250		37	60	80	95
0,002500		21	57	80	95
0,005000		18	20	50	95
0,010000		8	12	50	50

De estos resultados se deduce que la concentración óptima de Mn<sup>++</sup> en esporulación está alrededor del 0,000125 por ciento.

#### Efecto del ácido etilendiaminotetracético (EDTA)

Se realiza esta experiencia por los métodos generales. En una de ellas se determina la concentración de EDTA necesaria para inhibir el crecimiento del *Bacillus subtilis*. Se prueban concentraciones de  $0.03 \times 10^{-3}$  M a  $0.3 \times 10^{-3}$  M. Se demuestra que a partir de una concentración de  $0.15 \times 10^{-3}$  M se produce dicha inhibición.

En otra experiencia, se adiciona la concentración de  $0.15 \times 10^{-3}$  M a diferentes edades de cultivo, y en la *figura 10* se expresan los resultados sobre el crecimiento y pH, pues en ningún caso se produce esporulación.

La adición en cada una de las fases produce inhibición del crecimiento del *Bacillus subtilis*.

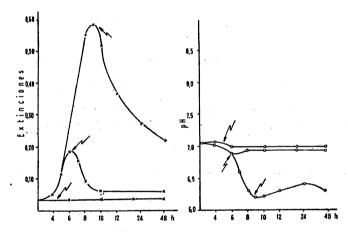


Figura 10. Acido etilendiaminotetracético. Adición, a distintos tiempos. Crecimiento y pH

Experiencias sobre biosíntesis del ácido dipicolínico

#### Biosíntesis del ácido dipicolínico

Debido a la gran importancia que tiene el ADP en la formación de esporas, se realizan algunas experiencias para aclarar algunos puntos en su metabolismo.

En primer término, se trata de ver, dentro de las condiciones y métodos generales, la formación y contenido de ADP en las esporas del

Bacillus subtilis R. En la figura 11 se puede observar la curva de formación del ADP y su relación con la de crecimiento. Los valores se refieren a peso seco de gérmenes.

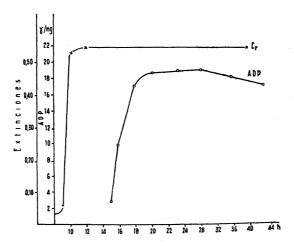


Figura 11. Biosíntesis del ácido dipicolínico en relación con el tiempo de cultivo

Influencia de los componentes del medio en la biosíntesis del ADP

Se determina el ADP de las esporas procedentes de varios medios y a la misma edad. Los resultados, en el *cuadro 2*.

Cuadro 2

Medio	ADP (γ/mg)
C.G.G. + Mn++	43
Con mitad de glucosa	32
Sin glucosa	— (sin esporas)
Con mitad de glutámico	25
Sin glutámico	— (sin esporas)
Con mitad de ClNH4	37
Sin ClNH4	20
Sin fosfatos	54
Sin PO <sub>4</sub> H <sub>1</sub> va <sub>2</sub>	60
Sin ClNa	38
Sin Mg++	33
Sin SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	38

De estos resultados se deduce que la glucosa y el ácido glutámico son necesarios para la formación de esporas. La ausencia o disminución de fosfatos aumenta la cantidad de ADP formado.

A continuación se realiza otra experiencia para probar la resistencia al calor de las esporas formadas en los medios anteriores. Para esto se coloca una suspensión de cada tipo de espora a una extinción de 0,298 (filtro 53 y agua destilada como testigo) en un tubo y se introduce en un baño a 100 °C. A intervalos de tiempo se toma un asa de muestra e inocula en placa de caldo+agar; las placas se incuban a 37 °C durante veinticuatro horas y se determina cuál es la última en la que no hubo vecimiento (cuadro 3).

Cuadro 3

Medio	Minutos de resistencia a 100 °C
C.G.G. + Mn++	14
Con mitad de glucosa	14
Con mitad de glutámico	13
Con mitad de ClNH <sub>4</sub>	12
Sin ClNH <sub>4</sub>	15
Sin fosfatos	13
Sin PO₄HNa₂	12
Sin ClNa	15
Sin Mg++	14
Sin SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	13

Influencia del calcio en la biosíntesis del ADP

Se realizan dos ensayos, uno en medio normal y otro en el mismo adicionado con 0,02 por ciento de Ca<sup>++</sup>. Los resultados sobre crecimiento se expresan en la figura 12.

El calcio retrasa ligeramente el crecimiento, dando menor cantidad; a su vez, también se retrasa la esporulación hasta las diecisiete horas. La cantidad de ADP (por seco seco) es algo menor en las esporas desarrolladas en el medio con calcio; en cambio, la resistencia al calor es la misma en ambos tipos de esporas.

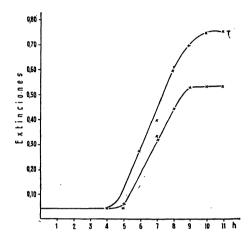


Figura 12. Relación entre la cantidad de calcio (0,02 por ciento) existente en el medio y la del ácido dipicolínico en las esporas

Influencia del ácido picolínico en la biosíntesis del ADP

Considerando al ácido picolínico como antimetabolito del dipicolínico, se trata de ver su efecto en el metabolismo del *Bacillus subtilis*.

Se realizan las experiencias por los métodos generales dados anteriormente. Se adiciona ácido picolínico en concentración de  $0.6 \times 10^{-3}$  M,  $1.2 \times 10^{-3}$  M y  $1.8 \times 10^{-3}$  M, en el momento inicial del crecimiento, a las tres y a las seis horas de edad. Se dan los resultados sobre el crecimiento y el pH en las *figuras 13-15*.

No se observan variaciones demostrativas en el crecimiento; en cambio, sí se observan cambios en el pH, que en todos los casos alcanzan niveles más inferiores que en el testigo, cosa lógica si se piensa en el aumento de acidez del medio. En cuanto a la esporulación, en las condiciones experimentales señaladas, la adición de ácido picolínico a cualquier edad hasta las nueve horas retrasa su iniciación hasta las veintiocho horas. A más edad, el retraso disminuye.

En todos los casos se llega a un 100 por ciento de esporulación, como se observa en el *cuadro 4*.

En una prueba complementaria se recogen las esporas de cuarenta

Cuadro 4

		Inicial		3 horas		6 horas		9 horas		12 horas	
Horas	Medio testigo, porcentaje	0,6 × 10 <sup>-3</sup> M	$\begin{vmatrix} 1.2 \times 10^{-3} \text{ M} \\ 1.8 \times 10^{3-} \text{ M} \end{vmatrix}$	0,6 × 10 <sup>-3</sup> M	$1.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ $1.8 \times 10^{3-} \text{ M}$	0,6 × 10 <sup>-3</sup> M	1	$0.6 \times 10^{-3} \text{ M}$	$\begin{vmatrix} 1.2 \times 10^{-3} \text{ M} \\ 1.8 \times 10^{3-} \text{ M} \end{vmatrix}$	$0.6 \times 10^{-3} \text{ M}$	$\begin{vmatrix} 1.2 \times 10^{-3} \text{ M} \\ 1.8 \times 10^{3-} \text{ M} \end{vmatrix}$
	1				<u> </u>						<u> </u>
14	10										
16	20										
18	40										
20	80									20	10
22	95									40	15
24	100									60	20
28	100	10		10		10				100	80
3 <b>2</b>	100	40	10	30	10	10	10	10		100	100
36	100	80	60	60	20	30	20	30	10	100	100
40	100	95	88	80	40	60	40	60	20	100	100
44	100	100	90	95	75	80	70	80	60	100	100
48	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

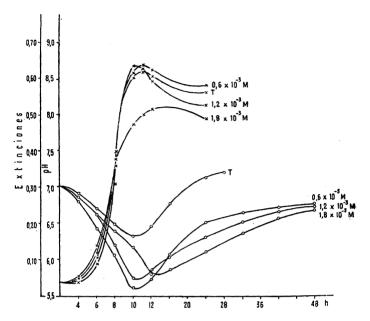


Figura 13. Acido picolínico. Adición, en el momento de iniciarse la incubación

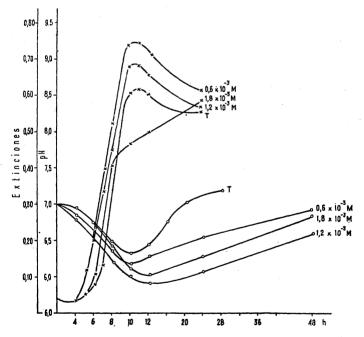


Figura 14. Acido picolínico. Adición, a las tres horas de iniciarse la incubación

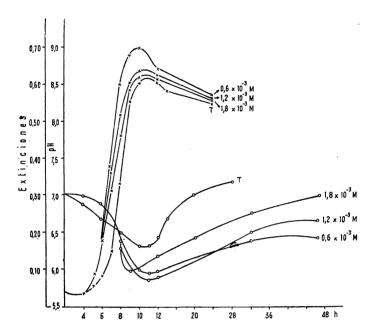


Figura 15. Acido picolínico. Adición, a las seis horas de iniciarse la incubación

y ocho horas procedentes de la concentración  $1.2 \times 10^{-3}$  M, de ácido picolínico, y se determina la cantidad de ADP y la resistencia al calor (cuadro 5).

Cuadro 5

Horas	ADP (γ/mg)	Minutos de resistencia a 100°C
0	36	14
3	34	13
6	34	13
9	30	12
12	20	13

Se observa una disminución progresiva en la cantidad de ADP y ninguna variación en la resistencia al calor de tales esporas.

Se piensa que pueda contrarrestarse el efecto del ácido picolínico por adición de ADP y se añaden  $1,2\times 10^{-3}$  M de ambos. Los resultados se dan en la *figura 16*. Se retrasa considerablemente la esporulación hasta las sesenta-setenta y dos horas y además quedan bastantes bacilos sin esporular.

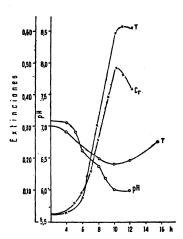


Figura 16. Adición de ácidos picolínico y dipicolínico, al comienzo de la incubación.

#### **DISCUSION**

A pesar de la gran cantidad de trabajos realizados sobre la formación de esporas, es relativamente pequeña la proporción de los dedicados al *Bacillus subtilis*, el germen más abundante en la naturaleza. Por otra parte, dentro de los trabajos dedicados a la formación de esporas por este microorganismo, existen resultados y conclusiones poco concordantes entre diferentes autores, que probablemente se debe a la raza de bacilo empleada en sus trabajos.

Por esta anterior razón tratamos de relacionar en el presente trabajo los resultado sobtenidos con la raza de Richmond con los de otros autores, con objeto de deducir alguna conclusión general para este bacilo.

Inicialmente se corroboran los resultados de Charney y colaboradores (3) sobre la necesidad de adición de un 0,0003 por ciento de manganeso al medio C. G. para conseguir la esporulación. A continuación establecemos las condiciones óptimas de crecimiento y esporulación en el medio anterior sometido a agitación y con un número fijo de esporas como inóculo; la germinación se inicia a las cuatro horas y el máximo crecimiento se logra a las doce horas; a las catorce horas comienza la esporulación, que llega al 100 por ciento a las veinticuatro horas. Durante el crecimiento se oxida la glucosa a ácidos acético y pirúvico, lo cual hace bajar el pH de 7,2 a 6,4; al comenzar la esporogénesis se utilizan dichos ácidos y el pH entonces se eleva hasta 7,3. Estos resultados están sensiblemente de acuerdo con los de Roth y colaboradores (28).

Como se comprende fácilmente, los componentes del medio influyen en el metabolismo general del *Bacillus subtilis*. Compuestos orgánicos e inorgánicos afectan en general más a la esporulación que al crecimiento. Estudiando el efecto de la glucosa sobre el *B. subtilis*, encontramos que su ausencia produce retraso en la iniciación del crecimiento, el cual es más lento que el normal y no produce esporulación; a su vez, no hay variación en el pH, como se comprende al no metabolizarse el azúcar. Con menor cantidad que la óptima de glucosa, únicamente la esporulación se retrasa hasta las veinte horas y no es completa.

La fuente de nitrógeno también influye en el crecimiento y esporulación. Esto se refiere sobre todo al glutamato, pues la presencia o ausencia de sal amónica cuando hay glutamato no tiene influencia demostrativa. En ausencia de glutamato se retrasan el crecimiento y la esporulación, la que, por otra parte, no llega al 30 por ciento. La adición de la mitad del óptimo de glutamato no produce variación en el crecimiento y la esporulación sólo llega al 85 por ciento. Krask (18) afirma que para la formación de esporas es necesaria la presencia de glutamina formada a partir de glutamato y de ahí la posible importancia de éste en la formación de esporas.

Las bacterias son muy variables en cuanto a sus necesidades en diversos iones, sobre los que los resultados en literatura son muy contradictorios. Nosotros encontramos necesaria la presencia de fosfatos para el crecimiento y esporulación y no vemos la necesidad de ClNa, de la que hablan varios autores. En cambio, encontramos acuerdo con la acción estimulante del magnesio en la esporulación del *Bacillus subtilis*.

En relación con el manganeso, observamos que al añadir menos del 0,001 por ciento disminuye el crecimiento, su ausencia impide la espo-

rulación y encontramos como concentración óptima para ésta la del 0,00125 por ciento.

Gould (7) afirma que el EDTA no influye en la germinación, y Mayer y Traveler (27) observan que el EDTA y los quelantes, en general, estimulan el crecimiento del *Bacillus subtilis* a pequeña concentración y son inhibidores a mayor concentración que la óptima para iniciar el crecimiento. En nuestro trabajo, por el contrario, no vemos efecto estimulante; en cambio, vemos efectos inhibidor a concentración de  $0.15 \times 10^{-3}$  M. Por otra parte, hacemos adiciones a diferentes edades y en todos los casos hay retraso de crecimiento e inhibición de la esporulación, seguramente por complejarse iones necesarios para la misma, como el manganeso.

En el *Bacillus subtilis*, como en todas las bacterias esporuladas, tiene una gran importancia la biosíntesis del ADP, compuesto sólo existente en las esporas. Observemos en nuestras experiencias que el ADP empieza a formarse al comenzar la fase de esporulación y termina en cinco horas, lo cual está de acuerdo con los resultados de otros autores. Martin y Foster (19) afirman que el glutamato es un eficiente precursor del ADP. Nosotros encontramos que la ausencia de fosfato favorece la producción de ADP y es necesario para el crecimiento y la esporulación.

Una característica muy importante de las esporas es su resistencia al calor. Determinamos la de las del *Bacillus subtilis* en diferentes condiciones, y de los resultados obtenidos podemos afirmar que no encontramos relación entre el contenido en ADP y la resistencia a la temperatura, opinión contraria a la de otros autores trabajando con otras especies de bacilos.

También se afirma que el calcio influye en la producción de ADP. Nosotros observamos que la presencia de calcio produce cierto retraso en la iniciación del crecimiento y en la esporulación, así como una menor producción de ADP. En contradicción con los resultados logrados por Black y colaboradores (1) trabajando con el *Bacillus cereus*, observamos que la resistencia al calor de las esporas del *B. subtilis* no sufren variaciones.

Reemplazando el ADP de la espora por un compuesto de estructura parecida, Gollocota y Halvorson (6) mencionan el ácido picolínico y observan que dicho compuesto no tiene efecto apreciable en el crecimiento vegetativo o en la germinación; en cambio, inhibe específicamente la esporulación y la síntesis del ADP, si se añade cuando comien-

za a descender el pH. Nosotros extendemos estas observaciones, y concretando a la influencia en la esporulación, si el ácido picolínico se añade durante la fase de crecimiento activo, la esporulación se retrasa considerablemente hasta las veintiocho horas; pero si la adición se hace después de las doce horas, ya en la fase estacionaria, el retraso disminuye, seguramente porque el picolínico actúa en reacciones metabólicas anteriores.

Las propiedades de las esporas formadas en presencia de ácido picolínico no presentan diferencias comparadas con las normales, a no ser una biosíntesis mitad de la normal en ADP, en las formadas cuando la adición se realizó a las doce horas. En otra experiencia se demuestra un efecto antagónico del ADP sobre el ácido picolínico.

#### RESUMEN

De los resultados obtenidos en las experiencias realizadas con la raza de *Bacillus subtilis* R y en las condiciones señaladas, podemos derivar algunas conclusiones de interés.

Cultivos de *Bacillus subtilis* en agitación y en medio C. G. necesitan un óptimo de 0,00125 por ciento de manganeso para esporular a las catorce horas de iniciación del crecimiento y hasta las veinticuatro horas, en que se logra un 100 por ciento de esporulación.

Para esta esporulación es necesaria la presencia de glucosa y de glutamato.

El EDTA a concentración de  $0.15 \times 10^{-3}$  M inhibe la esporulación del *Bacillus subtilis* añadido a cualquier edad de crecimiento.

Al comenzar la esporulación del *Bacillus subtilis* comienza la biosíntesis del ADP, que se termina a las cinco horas, siendo esto favorecido por la ausencia de fosfatos y calcio. No encontramos relación entre el contenido en ADP y la resistencia al calor de esporas del *Bacillus subtilis*.

Por último, el ácido picolínico en cantidades entre  $0.6 \times 10^{-3}$  M y  $1.8 \times 10^{-3}$  M retrasa la esporulación, aunque no la inhibe; además, no produce variaciones en el contenido en ADP, a no ser que la adición se realice en fase estacionaria, en cuyo caso el contenido en ADP baja a la mitad.

#### **SUMMARY**

From our experiments with a strain of *Bacillus subtilis* R and in our conditions and medium for growth, we can derivate some conclusions.

Culture of *Bacillus subtilis*, need a 0.00125 per cent of Mn<sup>++</sup> for sporulation between 14 and 24 hrs (100 per cent spores) in presence of glucose and glutamate.

The EDTA at a  $0.10\times10^{-3}$  M concentration inhibit sporulation at any age of growth. The total biosynthesis of DPA, need five hours and it is favorised by ausence of phosphate and calcium.

We can not demostrate correlation between DPA and temperature resistence in spores of *Bacillus subtilis*.

Picolinic acid in  $0.6 \times 10^{-3}$  M to  $1.8 \times 10^{-3}$  M concentration produce some sporulation inhibition; but there are not variations in DPA content of spores: only if the addition it is realize in stationary phase the DPA content it is a 50 per cent low.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- 1. Black, S. H.; Hasimoto, T., y Gerard, P. 1960. Calcium reversal of the heat susceptibility and dipicolinate deficiency of spore formed endotrophycally in water. Can. J. Microbiol., 6, 213.
- 2. Cook, R. P. 1932. Bacterial spores. Biol. Rev. Biol. Proc. Cambridge Phil. Soc., 7, 1.
- 3. Charney, J.; Fisher, W. P., y Hegarty, C. P. 1951. Mn<sup>++</sup> as an esential element for sporulation in the generus *Bacillus*. J. Bacteriol., 62, 145.
- FOSTER, J. W. 1956. Morphogenesis in bacterial: some aspect of spore formation. Quart. Rev. Biol., 31, 102.
- 5. Gerard, P., y Black, S. H. 1961. Permeability of bacterial spores. Spores. II.
- 6. Gollocota, K. G., y Halvorson, H. O. 1960. Biochemical changes during sporulation of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol., 79, 1.
- GOULD, G. W. 1962. Microscopical observations on the emergence of cells of Bacillus sp. from spores under different cultural conditions. J. Appl. Bacteriol., 25, 35.
- 8. Grelet, N. 1957. Growth limitation and sporulation. J. Appl. Bacteriol., 20, 315.
- 9. Halvorson, H. O. 1957. Spores. I.
- 10. Halvorson, H. O. 1961. Spores. II.
- 11. Halvorson, H. O., y Church, B. 1957. Biochemistry of spores of aerobic bacilli with special reference to germination. Bacteriol. Rev., 21, 112.
- 12. Halvorson, H. O., y Howitt, C. 1961. The role of DPA in bacterial spores. Spores. II.

- Janssen, F.; Lund, A., y Anderson, L. 1958. Colorimetric assay for dipicolinic acid in bacterial spores. Science, 127, 26.
- KEYNAN, A.; MURREL, W. G., y HALVORSON, H. O. 1961. DPA content, heat activation and the concept of dormancy in the bacterial endospore. Nature, 192, 1.211.
- 15. Knaisy, G. 1948. The endospore in bacteria. Bacteriol. Rev., 12, 19.—1952. Symp. on the biology of bacterial spores. Bacteriol. Rev., 16, 90.
- 16. Knaisy, G., y Curran, H. R. 1961. Effects of some mechanical factors on the endospore of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 82, 691.
- 17. Kolodziej, B. J., y Slepecky, R. A. 1962. A copper requirements for the sporulation of *Bacillus megaterium*. Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists), 48.
- Krask, B. J. 1953. Methionine sulfoxide and its specific inhibition of sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 66, 374.
- MARTIN, H. H., y FOSTER, J. W. 1958. Biosynthesis of DPA in Bacillus megaterium. J. Bacteriol., 76, 167.
- 20. Mayer, G. D., y Traxler, R. W. 1962. Action of metal quelates on growth initiation of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 83, 1.281.
- Murrell, W. G. 1957. Formation and germination of bacterial spores. J. Appl. Bacteriol., 20, 305.
- 22. Murrel, W. G. 1961. Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment. XI Symposium Soc. Gen. Microbiol., 100.
- NAKATA, H. M., y HALVORSON, H. O. 1960. Biochemical changes occurring during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. J. Appl. Bacteriol., 83, 1.281.
- Perry, J. J., y Foster, J. W. 1955. Sudies on the biosynthesis of DPA in spore of *Bacillus cereus*, var. mycoides. J. Bacteriol., 69, 337.
- POWELL, J. F. 1953. Isolation of DPA from spores of Bacillus megaterium. Biochem. J., 54, 210.
- 26. Powell, J. F., y Strange, R. E. 1956. Biochemical changes occurring during sporulation in *Bacillus* species. Biochem. J., 63, 661.
- 27. ROBERTS, R. B., y colaboradores. 1955. Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*. Carnegie Inst. Wash. Publ. N.º 607.
- 28. ROTH, N. G.; LIVELY, D. H., y METCALFE, S. N. 1958. Correlation of environmental and biological changes occurring in a complex medium during growth and sporulation of *Bacillus* species. J. Bacteriol., 75, 436.
- Salton, M. R. J., y Marshall, B. 1959. The composition of the spore wall and the wall of vegetative cells of *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol., 21, 415.
- Walker, H. W.; Matches, J. M., y Ayres, J. C. 1961. Release of DPA during heating of spores of species of *Bacillus*. Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists), 57.
- 31. Young, I. E., y Fitz-James, P. C. 1959. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 467 y 483.

#### C. S. I. C.

## INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

# ESTUDIOS SOBRE LA GERMINACION DEL BACILLUS SUBTILIS

por

P. SANCHEZ-FRANCO y B. REGUEIRO

#### **INTRODUCCION**

Como complemento a un trabajo anterior (30) sobre algunas experiencias de esporulación con una raza de *Bacillus subtilis*, se realizaron algunas pruebas de germinación con esporas de dicho germen, en diferentes condiciones experimentales y sometidas a la influencia de diversos factores.

Toda espora colocada en condiciones favorables germina, es decir, vuelve a formar una célula vegetativa; cada espora forma una célula vegetativa y viceversa.

El tema de germinación de esporas ha sido objeto de numerosos trabajos por su gran importancia biológica y revisiones muy completas han sido realizadas por diversos autores (1, 4-6, 14-16, 21, 31).

La germinación de esporas es un problema interesante para el microbiólogo, el cual pretende dilucidar el mecanismo bioquímico de iniciación de germinación y los factores que intervienen en la misma, con objeto de plantear una hipótesis general de germinación. Quedan aún muchos problemas por resolver y aquí se tratan algunos relacionados con la raza de *Bacillus subtilis* empleada por nosotros.

#### REVISION BIBLIOGRAFICA

Señalan Evans y Curran (3) que las esporas en condiciones no apropiadas pueden permanecer viables por muchos años, pero a los pocos minutos de encontrar un medio favorable comienzan a aumentar de tamaño, se hacen permeables a los colorantes y pierden su resistencia al calor; estos cambios, más o menos simultáneos, señalan la iniciación de la germinación. O'Brien y Campbell (17) denominan «brotación» al período de tiempo entre la iniciación de la germinación y la primera división celular.

En ocasiones, algunas esporas en condiciones favorables no germinan, están en «latencia», en cuyo estado, como señala Doi (2), todas las actividades enzimáticas están frenadas, hasta el punto de que no se detecta actividad respiratoria.

#### Condiciones necesarias para iniciar la germinación

Como se comprende, interesa siempre conocer las necesidades mínimas de germinación de cualquier tipo que sea. La germinación puede observarse determinando: pérdida de resistencia al calor, permeabilidad a los colorantes, pérdida de turbidez, etc.; todos estos métodos, como afirma Powell (20), están de acuerdo para indicar la germinación.

La germinación puede producirse por iniciación química, por influencia de sustancias sencillas específicas (glucosa, L-alanina, adenosina) donde se pueden desarrollar tan rápidamente como en los medios complejos. El conjunto de compuestos que pueden iniciar la germinación es muy variable. Desde que Hills (9) mostró que la L-alanina inicia específicamente la germinación del Bacillus subtilis se han mencionado más de 50 compuestos específicos con esta actividad, aunque hay la posibilidad de existencia de muchos más. Todos ellos se sitúan entre azúcares simples, aminoácidos y ribósidos.

Para realizar alguna generalización, Stedman (32) realiza una revisión sobre los iniciadores químicos de germinación y señala que ninguna de las sustancias probadas mostró actividad para todos los tipos de esporas; que la L-alanina es el compuesto más común (aunque también el más utilizado) y que en todos los casos varía con la concentración.

Keynan y Halvorson (11) y Rode y Foster (27), para sistematizar el

proceso de germinación, han dividido ésta en varios tipos, que comprenden: la «germinación fisiológica», como respuesta a agentes alimenticios; la «germinación química», como respuesta a agentes superficiales y quelantes no metabólicos, y la «germinación mecánica», como respuesta a tratamientos mecánicos.

Concretando a la germinación de esporas del *Bacillus subtilis*, Hermier (7-8), divide ésta en una fase inicial y en otra de crecimiento, que difieren en sus necesidades, observando que la L-alanina, L-valina y L-isoleucina son activas si las esporas previamente se ponen a 100 °C durante treinta minutos; en caso contrario, sólo actúan la L-valina y L-isoleucina; en cambio, otros autores observan lo contrario. Esto demuestra que las necesidades para germinación varían, incluso entre esporas de una misma raza.

Hyatt y Levinson (10) estudian el efecto de la glucosa y la L-alanina a diferentes concentraciones, observando que se necesita menos glucosa que L-alanina y que la velocidad es mayor si se usan estas dos sustancias. El calentamiento previo de las esporas disminuye su necesidad de forma cuantitativa.

Wolf y Thorley (36) observan que la glucosa y el manganeso no inician la germinación en el *Bacillus subtilis*, pero sí en otros bacilos.

Por otra parte, compuestos parecidos químicamente a los iniciadores, poseen efecto inhibidor. Así, Hills (9) observa que la D-alanina, a concentración 0,03 veces mayor que la L-alanina, inhibe su acción. Otros compuestos fueron estudiados por Woese y colaboradores (34).

La literatura no contiene mucha información sobre el efecto de los agentes quelantes en la germinación. Rieman y Ordall (24) demuestran que el ácido dipicolínico (ADP) y el calcio, en proporción 1:1, inducen a la germinación específicamente. Por otra parte, Keynan y colaboradores (13) comparan la iniciación de germinación por L-alanina con la producida por el complejo ADP + Ca<sup>++</sup>, observando que la primera es más rápida y más dependiente de la activación por el calor. También Rieman (23) revisa la iniciación de germinación por agentes quelantes no nutritivos y parece que su acción puede ser debida a complejar iones metálicos existentes en la espora.

En otro tipo de experiencias de *iniciación mecánica*, Rode y Foster (26), trituran esporas con polvo de vidrio y las hacen germinar en un 80-90 por ciento.

Las esporas de algunos gérmenes germinan en agua destilada, des-

pués de que se han activado por calor, como comprueban Powell y Hunter (22). Esto puede ser debido a una variación en las necesidades para la iniciación o a una activación metabólica. Connor y Halvorson (18) dicen que puede ser por liberación de alguna sustancia endógena capaz de catalizar el proceso, como puede ser el ADP. Rode y Foster (28-29) se afirman en la dificultad de racionalizar todos los métodos de estudio de germinación de las esporas bacterianas.

Teorías sobre los mecanismos de iniciación de la germinación

De todo lo expuesto se deduce que en general se necesitan unas sustancias específicas y unas condiciones físicas apropiadas para poder iniciar la germinación; algunos de los factores tienen el efecto de producir cambios en la permeabilidad de la espora. Se han sugerido por diversos autores varios mecanismos que conducen a la iniciación de la germinación.

Powell supone que la reacción clave de la iniciación se debe a la activación de una enzima lítica que actúa sobre la cubierta de la espora, liberando ciertos componentes y produciendo su hidratación. Otros autores encuentran en la espora enzimas activadas por  $Mn^{++}$ , que atacan a las proteínas y liberan sustancias como la L-alanina. Steward y Halvorson (33) demuestran en esporas una L-alaninarracemasa y O'Connor y Halvorson (19) una L-alaninadeshidrogenasa sobre la que actúa la L-alanina, afirmando que sólo los substratos precursores de piruvato son germinantes. Otros autores observan que la acción del calor o de los iniciadores sobre las esporas, activan sistemas transaminasa y sistemas respiratorios productores de energía.

De toda la información anterior y de otra mucha no expuesta se deduce la necesidad de más estudios sobre el problema de la germinación de esporas de bacilos; de los cuales nosotros nos concretamos a las del *Bacillus subtilis* y la acción sobre ellas de diferentes compuestos de diversos tipos.

#### MATERIALES Y METODOS

En el presente trabajo se emplea una raza de *Bacillus subtilis* R, amablemente enviado en forma liofilizada por el Dr. Richmond, del Consejo de Investigaciones Médicas, de Londres, a quien agradecemos su envío.

A este bacilo se le hace esporular en medio de patata+caldo y crecer en caldo común (enriquecido con glucosa e hidrolizado de caseína), agar + caldo enriquecido y medio C.G.G. con glucosa, ácido glutámico (según Roberts y colaboradores (25) y manganeso.

Durante las experiencias se determina el pH (Beckman, modelo G), peso seco (calentar a 100 °C a peso constante) y germinación.

Para la germinación se parte de una suspensión de esporas en agua destilada y conservada a 4 °C. Como sistema de germinación se emplea tampón, suspensión de esporas ( $8 \times 10^{10} / \text{ml}$ ) y agente germinante. Como tampón empleamos fosfato M/30 y tris a diversos pH. Las esporas de algunas experiencias se calientan a 60 °C antes de la prueba, para activarlas. Las experiencias se realizan en tubos con 5 ml de volumen total del medio de germinación. La germinación se mide por coloración con recuento al microscopio y por medida de turbidez en fotocolorímetro, después de un período de incubación en diferentes condiciones.

El método microscópico consiste en realizar una extensión en portaobjetos, tiñendo por azul de metileno, y contando células teñidas (germinadas) y no teñidas (no germinadas o esporas) se calcula el porcentaje. El método del fotocolorímetro se funda en que una suspensión de esporas, al germinar, pierde turbidez y esta pérdida es proporcional al número de esporas germinadas, como se demuestra controlando por el método microscópico y construyendo una gráfica que da la relación anterior.

### EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

#### Germinación en medio normal

En una serie de tubos se colocan 4,5 ml de medio C.G.G. + Mn<sup>++</sup> y 0,5 ml de suspensión de esporas, empleando como testigos esporas en tampón a pH 7,3 y 5,6; la incubación se realiza en baño a 37 °C. Se hace un ensayo con esporas normales y otro con esporas calentadas a 60 °C durante veinte minutos. Se dan los resultados en la figura 1. Se puede apreciar que no existe diferencia apreciable entre unas esporas y otras. La germinación comienza a la primera hora y alcanza el 100 por ciento de germinación a las cuarenta y ocho horas.

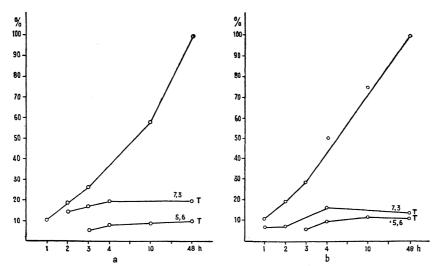


Figura 1. Medio normal. a) Sin precalentamiento; b) Con precalentamiento. Testigo (T), en tampón de fosfato

En otra experiencia se prueba el efecto del pH en la germinación de esporas en el medio C.G.G. + Mn<sup>++</sup>; los resultados se expresan en la figura 2.

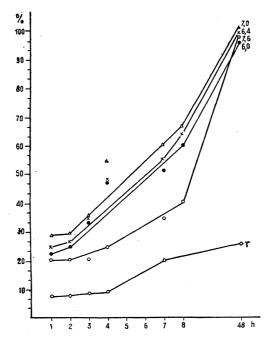


Figura 2. Medio normal. pH. Testigo, en agua destilada

No se aprecian diferencias apreciables entre pH 6,0 y 7,6, aunque a este último la germinación va más lenta en las primeras horas.

#### Germinación en medios sencillos

El sistema de germinación se compone de 4,2 ml de tampón de fosfato M/30 (pH 7,3); 0,3 ml de suspensión de esporas (8  $\times$  10½ /ml) y 0,5 ml de solución de agente de germinación. Se emplean esporas normales y precalentadas. El agente se emplea a concentración 1, 10 y 100  $\mu$ mol. La incubación se hace en baño a 30 °C. La medida de la germinación se hace por los métodos generales. Los agentes empleados fueron: glucosa, DL-alanina, D-alanina y L-alanina y los resultados se expresan en las figuras 3-5. De ellas se deduce que la D-alanina no induce germinación

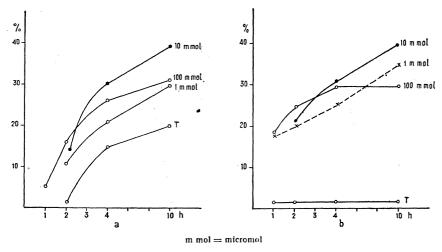


Figura 3. Glucosa. a) Sin precalentamiento; b) con precalentamiento

y que la DL-alanina lo hace sólo a la baja concentración de 1  $\mu$ mol, lo mismo con esporas normales que precalentadas. La glucosa produce germinación en todas las proporciones empleadas, llegando a un 40 por ciento a las diez horas. Se da el caso de que esporas testigos precalentadas no germinan, mientras que las normales dan un 20 por ciento a las diez horas. La L-alanina da una rápida germinación, llegando al 80 por ciento entre las cuatro y seis horas, lo mismo en esporas normales que precalentadas.

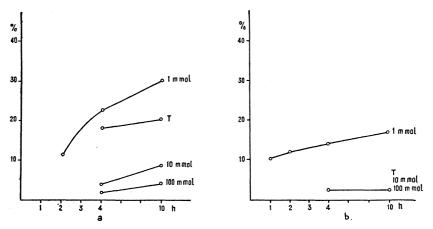


Figura 4. DL-alanina. a) Sin precalentamiento; b) con precalentamiento

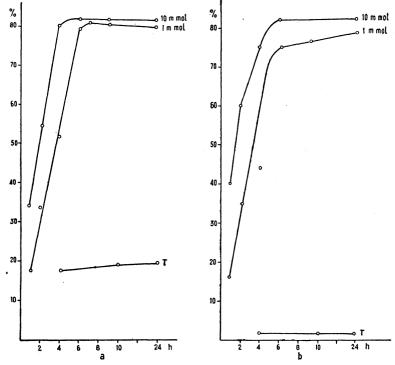


Figura 5. L-alanina. a) Sin precalentamiento; b) con precalentamiento

En las experiencias anteriores creemos es de interés el conocer si sobre ellas tiene influencia el tampón empleado. Para esto se realiza otra experiencia con tampón de fosfato y tampón tris, utilizando la L-alanina como agente germinante; los resultados se expresan en la figura 6. Se observa una mejor germinación con el tampón de fosfato que produce el 100 por ciento de germinación a los setenta y cinco minutos, mientras que el tampón de tris sólo llega al 60 por ciento.

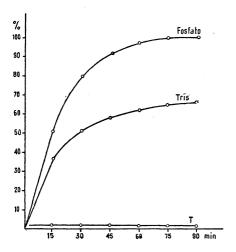
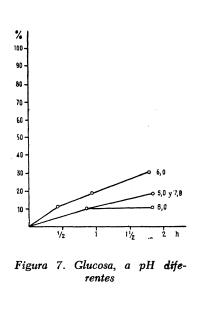


Figura 6. L-alanina, en tampones de fosfato y tris. Testigo, en tampón tris, sin agente

También es de interés el conocer el pH óptimo de germinación que probamos en los cuatro agentes anteriormente mencionados y en las condiciones generales; los resultados se expresan en las figuras 7-10. Observamos que con glucosa, DL-alanina y D-alanina, la germinación es escasa (no pasa del 20 por ciento), dando un ligero incremento con glucosa a pH 6,0 y con DL-alanina a pH 7,0. En cuanto al efecto sobre la acción germinante de la L-alanina, ésta llega al 100 por ciento de germinación a los sesenta minutos a pH 7,0-8,0, mientras que a pH 5,0-6,0 necesita ciento ochenta minutos.



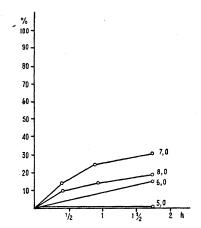
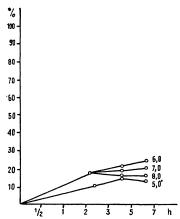


Figura 8. DL-alanina, a pH diferentes



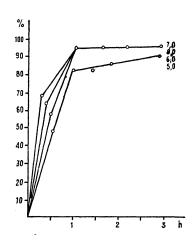


Figura 9. D-alanina, a pH diferentes

Figura 10. L-alanina, a pH dife-

También se trató de determinar la temperatura óptima de germinación con los anteriores agentes. Se realiza la experiencia en las condiciones generales y sometiendo los sistemas de germinación a 20°, 30° y 40 °C. Los resultados se expresan en la figura 11. Se comprueba que la temperatura óptima en todos los casos es la de 30 °C. Como prueba complementaria, se trata de ver si esporas mantenidas durante algún tiempo a temperatura de 4 °C de conservación, realizan la germinación

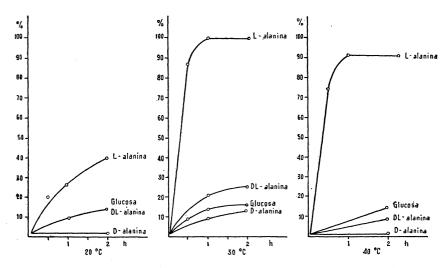


Figura 11. Glucosa, DL-alanina, D-alanina y L-alanina, a temperaturas diferentes

a igual velocidad, una vez que comenzaron a germinar; se va elevando la temperatura y sólo a partir de los 20° C comienza la germinación. Por otra parte, las esporas que empezaron a germinar a 30 °C mantienen la germinación a 0 °C, según puede verse en el  $\it cuadro~1$ .

Cuadro 1

Grados centígrados	Minutos	Germinación, porcentaje	
30			
30	10	54	
0	30	70	
0	45	75	
0	60	80	
0	75	. 85	
0	90	90	

#### Germinación por otros compuestos

A continuación tratamos de ver la acción germinante de otros agentes, por los métodos anteriormente señalados. Se prueban los compuestos siguientes, comparándolos en todos los casos con un testigo con L-alanina ( $10~\mu\mathrm{mol}$ ):

Acido dipicolínico: produce escasa germinación con 40 µmol.

Acido dipicolínico y cloruro cálcico: 40 μmol de ADP con 40 μmol u 80 μmol de Cl<sub>2</sub>Ca, tienen efecto escaso en la germinación.

Acido picolínico y cloruro cálcico: 40  $\mu$ mol de ácido picolínico con 40  $\mu$ mol de Cl<sub>2</sub>Ca, no tienen efecto alguno en la indicación de la germinación.

Glucosa y manganeso: la glucosa a concentración de 10  $\mu$ mol con manganeso a la de  $10^{-4}$  M, no tienen efecto en la germinación, después de cinco horas de incubación.

Nitrato potásico: a la concentración de 20  $\mu$ mol no tienen efecto después de ocho horas de germinación.

Glucosamina: iguales condiciones con los mismos resultados.

N-acetilglucosamina: iguales condiciones con los mismos resultados. Protamina: después de siete horas de incubación no se demuestra efecto con 1 y 10  $\gamma$ /ml del producto, en la germinación.

Dodecilamina: se emplea a la concentración de 10<sup>-4</sup> M, y a los noventa minutos ya germinó el 100 por ciento de las esporas, lo que demuestra ser buen agente de germinación.

8-azaguanina: se emplea a la concentración de 40  $\mu$ mol, no demostrando efecto alguno en germinación. Se intentó ver si esta sustancia era antagonista del efecto de la L-alanina y los resultados no mostraron efecto alguno sobre dicho efecto en la germinación.

#### **DISCUSION**

Una espora colocada en condiciones favorables se convierte en célula vegetativa por el proceso llamado germinación, durante el cual la espora aumenta de tamaño, se hace permeable a los colorantes y pierde su resistencia al calor. Las condiciones necesarias para este proceso son muy variables, por lo cual su estudio se simplifica si se reducen al mínimo las condiciones de germinación.

En un trabajo anterior hemos visto cómo las esporas inician su desarrollo en el medio C.G.G. + Mn<sup>++</sup> en determinadas condiciones. Para el estudio de la fase de germinación se emplean esporas de una raza de *Bacillus subtilis*, conservadas a 4 °C y en concentración de  $8 \times 10^{10}$  esporas/ml.

Aunque varios autores señalan el efecto de activación de la germinación por el calor, nosotros no encontramos tal efecto, como se demuestra en varias experiencias con medio C.G.G. + Mn $^{++}$  y con agentes sencillos de germinación.

Powell (20) no encuentra diferencia de germinación de las esporas del *Bacillus megaterium* entre pH 6,0 y 8,0; nosotros probamos esto en el medio C.G.G. + Mn<sup>++</sup> a diferentes pH y no observamos diferencias entre pH 6,0 y 7,6, para esporas de *Bacillus subtilis*.

La serie de compuestos que pueden iniciar la germinación de esporas es muy numerosa y variable. Nosotros estudiamos el caso particular de una raza de *Bacillus subtilis* y desde que Hills (9) señaló la L-alanina como germinador específico, fueron estudiados numerosos compuestos. Es en este y otros casos parecidos donde algunos autores señalan el efecto del precalentamiento.

Encontramos que la glucosa presenta algún efecto germinador sobre esporas normales o precalentadas, siendo las diferencias entre ambas muy ligeras. Cuando se utiliza alanina como estimulante, existe una gran diferencia según la forma que se emplea; así, la dextro es inhibidora y la levo estimulante y entre ambas está la racémica, que a baja concentración estimula (1  $\mu$ mol) y a más alta concentración inhibe; como se comprende, esto depende del efecto de la forma dextro sobre la forma levo en la germinación de esporas de *Bacillus subtilis*. La D-alanina no ejerce ningún efecto, en cambio, la L-alanina estimula rápidamente la germinación, no observándose diferencia entre esporas normales y precalentadas, lo que está en contradicción con los resultados de algunos autores (7, 10).

Estamos de acuerdo con la hipótesis de Hills (9), que observaba que la germinación de esporas se iniciaba al actuar una L-alaninadeshidrogenasa de la espora sobre la L-alanina, y que si se añadía D-alanina, ésta actuaba en competencia e inhibía la acción anterior. Esto se corro-

bora por el trabajo de Woese y colaboradores (34), que ven que la D-alanina se une más fuertemente que la L-alanina.

Cuando determinamos el pH óptimo de germinación, encontramos los resultados que resumimos a continuación:

Glucosa: 25 por 100 de germinación en dos horas y a pH 6,0.

DL-alanina: 10 por ciento de germinación en dos horas y a pH 7,0.

D-alanina: 10 por ciento de germinación en nueve horas y a pH 6,0.

L-alanina: 90 por ciento de germinación en una hora y a pH 7,6.

Estos resultados están de acuerdo con los de Powell (21) con *Bacillus megaterium*, pero en contradicción con los de Wolf y Mahmoud (35), que para el *B. subtilis* obtienen un óptimo de germinación con la L-alanina a pH 8,5 y con glucosa a pH 5,5. Como afirmábamos al principio, las discrepancias se deben, sobre todo, a la raza utilizada.

Con relación a la temperatura óptima para la germinación, algunos autores señalan que la temperatura aumenta la velocidad de germinación; nosotros observamos esta influencia dentro de ciertos límites. Keynam y colaboradores (12) no logran germinación con L-alanina por debajo de 18 °C, pero si la germinación está iniciada continúa aún por debajo de 0 °C. Tales resultados son comprobados por nosotros para las esporas de *Bacillus subtilis*.

Aparte de la L-alanina, que actúa como agente germinante, se han probado otros varios compuestos del tipo de los agentes quelantes, sobre los que no hay mucha información y sobre los que hace una revisión Rieman (23). Comprobamos en una serie de experiencias que comparando con un testigo de L-alanina, que da un 100 por ciento de germinación en dos horas, el ácido dipicolínico da un 23 por ciento, el ADP+Ca (1:1) da un 57 por ciento y el ADP+Ca (1:2) da un 24 por ciento; por otra parte, el ácido picolínico y el calcio por separado no inducen germinación, cosa que hacen en un 28 por ciento, cuando se ponen juntos. Alguno de estos resultados fue visto anteriormente, como el de la actividad germinante del ADP+Ca (1:1), por Rieman y Ordall (24). Keynan y colaboradores (13) sugieren que la iniciación por L-alanina y por agentes quelantes posee diferente mecanismo. El de estos últimos pudiera ser el complejar iones metálicos inhibidores de la germinación, aunque sabemos que el ADP+Ca es incapaz de hacerlo por estar el calcio muy

unido al ADP. El ADP y el Ca<sup>++</sup> se encuentran en la espora en forma de ADP+Ca+proteína celular; al romperse la unión con la proteína se inicia el metabolismo de germinación. Aparte los agentes anteriores, se han probado otros varios, que en algunos trabajos se han visto actuaban como germinantes de algunas esporas. Encontramos resultados negativos en glucosa + manganeso; nitrato potásico, glucosamina y acetilglucosamina (estos tres hacen germinar esporas de Bacillus megaterium); protamina, 8-azaguanina, que son inhibidores de síntesis de proteínas; la última no actúa, una vez iniciada la germinación por L-alanina.

Por último, Rode y Foster (27) observan germinación de esporas de *Bacillus megaterium* con dodecilamina, y nosotros lo confirmamos con las del *B. sutilis*. Estas esporas germinadas mueren inmediatamente, quizá por ser sensibles a las concentraciones germinantes.

#### RESUMEN

En el presente trabajo se realizan algunas experiencias sobre la germinación de las esporas de una raza de Bacillus subtilis R, en diferentes condiciones y medios. Cuando se realizan en el medio C.G.G. + + Mn<sup>++</sup>, lo hacen rápidamente, tanto las esporas normales como las precalentadas, sin influir el pH inicial entre 6,0 y 7,6. Se prueba la germinación empleando como agentes estimulantes: glucosa, DL-alanina, D-alanina y L-alanina; este último es el mejor estimulante a concentración 1 µmol, pH 7,0, a 30 °C; en sesenta minutos da un 100 por ciento de germinación de esporas, tanto normales como precalentadas. La germinación en las condiciones mencionadas no comienza hasta llegar a 20 °C v no se afecta por las bajas temperaturas, una vez iniciada. El ácido dipicolínico o el mismo con calcio inician germinación de esporas, que, en cambio, no es afectada por el ácido picolínico y calcio por separado, que, juntos, sí producen germinación. No encontramos efectos sobre la germinación de: glucosa + manganeso, nitrato potásico, glucosamina, N-acetilglucosamina, protamina y 8-azaguanina. Este último no afecta a la germinación por L-alanina. La dodecilamina produce un 100 por ciento de germinación rápidamente, pero después destruye las células vegetativas.

#### **SUMMARY**

In the present research we make some experimental work on spore germination of a Bacillus subtilis R strain in different mediums and conditions. When this is made in C.G.G. + Mn++ media, there are a quickly germination of normal and heat activated spores and between pH 6.0 and 7.0. We try germination with: glucose, DL-alanine, D-alanine, L-alanine; the last one it is the best agent at 1 mM concentration, pH 7.0-8.0, 30 °C, in 60 minutes we get 100 per cent germination of normal and heat activated spores. In this conditions, the germination are iniciate at 20 °C and it is unanffected by low temperature when germination is iniciate. The dipicolinic acid or dipicolinic and calcium, iniciate germination that is unanffected by picolinic acid or calcium; this compounds when are added together produced germination. We do not see germination with: glucose plus manganese, potasium nitrate, glucosamine, N-acetil-glucosamine, protamine and 8-azaguanine. The 8-azaguanine do not affected the germination by L-alanine. The dodecylamine produce 100 per cent quickly germination, but also produce the destruction of vegetative cell.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- Cook, R. P. 1932. Bacterial spores. Biol. Rev. Biol. Proc. Cambridge Phil. Soc., 7, 1.
- 2. Doi, R. H. 1961. Control of metabolic activity and its relations to breacking the dormant state. The Spores. I.
- Evans, F. R., y Curran, H. R. 1960. Influence of heating, pH and holding temperature upon viability of bacterial spores for longs periods in buffer sustrates. J. Bacteriol., 79, 361.
- 4. Halvorson, H. O. 1957. The Spores. I.
- 5. Halvorson, H. O. 1961. The Spores. II.
- 6. HALVORSON, H. O., y CHURCH, B. 1957. Biochemistry of spores of aerobic bacilli with special reference to germination. Bacterial. Rev., 21, 112.
- HERMIER, J. 1962. The germination of spores of B. subtillis. I. Ann. Inst. Pasteur, 102, 629.
- 8. Hermier, J. 1962. The germination of spores of B. subtillis. II. Ann. Inst. Pasteur, 103, 728.
- 9. HILLS, G. H. 1950. Chemical factors in the germination of spore bearing

- aerobes: observations on the influence of species, strain and conditions of growth. J. Microbiol., 4, 38.
- HYATT, M. T., y LEVINSON, H. S. 1961. Interaction of heat, glucose, L-alanine and potassium nitrate in spore germination of *B. megaterium*. J. Bacteriol., 81, 204.
- KEYNAN, A., y HALVORSON, H. O. 1962. Calcium dipicolinic acid-induced germination of *B. cereus* spores. J. Bacteriol., 83, 100.
- KEYNAN, A.; HALTMAN, M., y Avi-Dor. The influence of temperature on the different stages of germination of B. subtilis spores. Intern. Congr. Microbiol., 7th, Stockholm, 1958.
- KEYNAN, A.; MURREL, W. G., y HALVORSON, H. O. 1961. Multiple pathways of initiating germination in aerobic spores. Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists), 76.
- KNAYSI, G. 1948. The endospore in bacterial Bacteriol. Rev., 12, 19.—1952.
   Symp. Biology bacterial spores. Bacteriol. Rev., 16, 90.
- MURREL, W. G. 1957. Formation and germination of bacterial spores. J. Appl. Bacteriol., 20, 305.
- 16. Murrel, W. G. 1961. Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment. XI Symp. Soc. Gen. Microbiol., 100.
- O'BRIEN, R. T., y CAMPBELL, L. L. 1956. The nutritional requirements for germination and outgrowth of spores thermophilic bacteria. Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists), 46.
- O'Connor, R. O., y Halvorson, H. 1959. Intermediate metabolism of aerobic spores. IV. Alanine deamination during the germination of spores of B. cereus. J. Bacteriol., 78, 844.
- O'CONNOR, R. O., y Halvorson, H. 1961. The function of L-alanine dehidrogenase in L-alanine induced germination. Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists), 76.
- POWELL, J. F. 1951. The sporulation and germination of a strain of B. megaterium. J. Gen. Microbiol., 5, 993.
- Powell, J. F. 1957. Biochemical changes occurring during spore germination in *Bacillus* species. J. Appl. Bacteriol., 20, 349.
- POWELL, J. F., y HUNTER, J. R. 1955. Spore germination in the genus *Bacillus*; the modification of germination requirements as a result preheating. J. Gen. Microbiol., 13, 59.
- 23. RIEMAN, H. 1961. Germination of bacteria by chelating agents. The Spores. II.
- 24. RIEMAN, H., y ORDALL, Z. J. 1961. Germination of bacterial endospores with calcium and DPA. Science, 133, 1.703.
- ROBERTS, R. B., y colaboradores. 1955. Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*. Carnegie Inst. Wash. Publ. 607.
- Rode, L. J., y Foster, J. W. 1960. Induce release of DPA from spores of B. megaterium. J. Bacteriol., 79, 650.
- Rode, L. J., y Foster, J. W. 1961. Germination of bacterial spores with alkyl primary amines. J. Bacteriol., 81, 768.

- 28. Rode, L. J., y Foster, J. W. 1962. Ionic and non-ionic compounds in the germination of spores of *B. megaterium* Texas. Arch. Mikrobiol., 43, 201.
- Rode, L. J., y Foster, J. W. 1962. Ionic germination of spores of B. megaterium QMB 1551. Arch. Mikrobiol., 43, 1.831.
- SÁNCHEZ-FRANCO, P., y REGUEIRO, B. 1964. Estudios sobre la esporulación del Bacillus subtilis. Microbiol. Españ., 17, 79.
- 31. SCHMIDT, C. F. 1955. The resistence of bacterial spores with reference to spore germination and its inhibition. Am. Rev. Microbiol., 9, 387.
- 32. Stedman, R. L. 1956. Biochemical aspects of bacterial endospore formation and germination. Am. J. Pharm., 84, 114.
- 33. STEWARD, B. T., y HALVORSON, H. O. 1953. Studies on the spores of the aerobic bacteria. I. The occurrence of alanine racemase. J. Bacteriol., 65, 160.
- 34. Woese, C. R.; Morowitz, H. J., y Huchinson, C. A. 1958. Analisis of action of L-alanine analogues in spore germination. J. Bacteriol., 76, 598.
- 35. Wolf, J., y Mahmoud, S. A. 1957. The effects of L and D-alanine on the spores germination of some *Bacillus*. J. Appl. Bacteriol., 20, 373.
- 36. Wolf, J., y Thorley, C. M. 1957. The effects of various germination agents on the spores of some strains of B. subtilis. J. Appl. Bacteriol., 20, 284.

#### C. S. I. C.

## INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

## METABOLISMO DEL TRIPTOFANO POR EL PSEUDOMONAS SAVASTANOI (\*)

por

#### R. BELTRÁ

#### INTRODUCCION

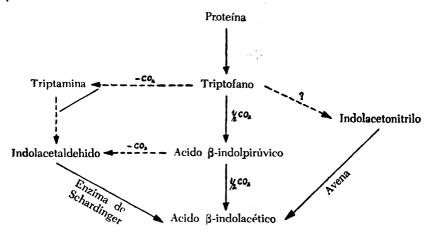
Diversos autores creen que las auxinas y en especial el ácido  $\beta$ -indolacético (A.I.A.) influyen en la formación de los tumores vegetales, específicamente en la fase de promoción, en la que actúan como activadoras del crecimiento en el proceso de cancerización vegetal.

En un trabajo anterior (1) se estudió la producción de A.I.A. por diversos *Pseudomonas* patógenos de plantas, en medios de cultivo con triptofano y su relación con el tipo de lesión que producían sobre la planta huésped. Se encontró que sólo las especies productoras de A.I.A. en el medio de cultivo (como el *Pseudomonas savastanoi*) daban tumores como síntoma de infección sobre la planta huésped.

Posteriormente se investigó la presencia y biogénesis del A.I.A. en los tumores que produce esta bacteria sobre el olivo (2), encontrándose que se seguía la vía central dada por Thimann (9), que tiene como intermediarios el ácido  $\beta$ -indolpirúvico (A.I.Pc). Este autor considera a la triptamina e indolacetonitrilo (I.A.N.) miembros de la familia del A.I.A., como precursores de esta sustancia y de los que no se sabe si se producen a partir del triptofano, pero sí que pueden dar el A.I.A.

<sup>(\*)</sup> Trabajo presentado a la II Reunión de Microbiólogos Españoles, celebrada en Madrid en noviembre de 1962.

Los procesos seguidos por el triptofano son probablemente una desaminación oxidante para dar A.I.P.c., creyéndose que este ácido, posteriormente, por descarboxilación oxidante da el A.I.A. Skoog (8) propone otra vía de formación del A.I.A., la del  $\beta$ -indolacetaldehido (I.Ac.), producido como intermediario en la oxidación de la triptamina. Thimann resume las posibles vías de síntesis biológica del A.I.A. según el esquema 1.



Esquema 1. Vías de la síntesis biológica del ácido β-indolacético

En el presente trabajo hemos querido comprobar si la biogénesis del A.I.A., a partir del triptofano in vitro y mediante la acción de la bacteria Pseudomonas savastanoi, se realiza por la misma vía que se encontró al estudiar la biogénesis del A. I. A. en los tumores producidos en el olivo por el Ps. savastanoi (2), y que se puede resumir: Triptofano  $\rightarrow$  A.I.Pc.  $\rightarrow$  A.I.A

## PARTE EXPERIMENTAL

Se ha trabajado con el *Pseudomonas savastanoi* núm. 64, procedente de la colección del Dr. W. J. Dowson, de la Colección Nacional de Fitopatógenos, de la Universidad de Cambridge.

Para nuestras experiencias hemos cultivado la bacteria en el medio de cultivo dado por Kaper y Veldstra (5), que contiene triptofano, glu-

cosa y sales minerales. Después de un período de incubación de siete días a 26°-27 °C, en matraces con 200 ml de medio y con agitación, se centrifugó el cultivo a 3.500 r/m para separar el líquido metabólico de las bacterias. De este líquido metabólico se separaron las fracciones hormonales ácida y neutra, siguiendo las técnicas de Yamaki y Nakamura (10) y Bitancourt (4).

Estas fracciones se estudiaron por cromatografía, siguiendo las mismas técnicas que se han descrito en un trabajo anterior (2).

#### **RESULTADOS**

#### Fracción ácida

En los cromatogramas de la fracción ácida hormonal de los líquidos metabólicos se ha encontrado una serie de seis o siete manchas, cuyos Rf y características de coloración se dan en el *cuadro 1*.

Cuadro 1. Fracción ácida hormonal del líquido metabólico (según Yamaki y Nakamura y Bitancourt)

Rf de las manchas obtenidas al desarrollar con alcohol isopropíli- co+amoníaco (28 %)+agua (80:10:10)	Coloraciones obtenidas al revelar con reactivo de Ehrlich		
0,98-0,99	Rojo violeta		
0,93	Azul verdoso		
0,81	Amarillo castaño		
0,54	Azul fuerte		
0,40	Rosa		
0,35	Rojo		
0,21	Amarillo, que vira a verde. Se refuerza por el calor		

En el cuadro 2 se dan los Rf y coloraciones de las sustancias testigos usadas en el estudio de la fracción hormonal ácida.

Cuadro 2. Características de las auxinas usadas como testigos

Sustancia testigo	Rf en alcohol isopropílico + +amoníaco (28 %) + agua (80:10:10)	Coloraciones con el reactivo de Ehrlich
A.I.A. (Merck)	0,49-0,54	Azul fuerte
I.A. (Fluka)	0,97-0,98	Rojo violeta
I.A.N. (Light)	0,99	Azul verdoso
	0,98-0,99	Rojo violeta
	0,92	Azul verdoso
	0,81	Amarillo castaño
A.I.Pc. (*)	0,54	Azul fuerte
	0,40	Rosa
	0,35	Rojo
		Amarillo que vira a verde.
	0,21	Se refuerza por el calor.

<sup>(°)</sup> Esta sustancia ha sido sintetizada por los Dres. Kaper y Veldstrá, de la Universidad de Leyden (Holanda), a quienes expresamos nuestro agradecimiento.

#### Fracción neutra

No se ha identificado ningún compuesto indólico, aunque sí se han obtenido dos manchas que no hemos logrado indentificar. Como testigo hemos usado indolacetato de etilo (I.A.E.), indolacetonitrilo (I.A.N.) e indolacetaldehido (I.Ac.) sintetizado por nosotros, según la técnica de Miller y colaboradores (7).

En el cuadro 3 se resumen los resultados de Rf y colaboración de las manchas sin identificar y de los testigos empleados.

#### **DISCUSION**

A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta la igualdad con los obtenidos cuando trabajábamos con extractos etéreos de tumores (2), podemos afirmar que en las condiciones expuestas, la bacteria *Pseudomonas savastanoi* sintetiza A.I.A. *in vitro* y a partir del triptofano, siguiendo la misma vía de formación que en los tumores, o sea vía A.I.Pc. Prue-

Cuadro 3. Rf y coloraciones con diferentes reactivos de los cromatogramas de la fracción hormonal neutra y de los testigos empleados

Disolvente	Revelador	Rf y coloraciones			
		Fracción neutra	I.Ac. (Fluka)	I.A.N. (Fluka)	I.A.E. (Fluka)
Alcohol isopropílico + + amoníaco (28 %) + + agua (80:10:10)	Eck	0,45-0,97 Castaño oscuro	0,45-0,50 Rojo violeta	0,98 Pardo verdoso	
	Ehrlich	0,97 Anaranjado	0,45-0,50 Rojizo	0,98 Pardo azul	0,99 Púrpura

ba de ello es el haber identificado en la fracción de auxinas ácidas una serie de siete manchas producidas por descomposición del A.I.Pc., cuando se estudia por cromatografía con disolventes alcalinos. Estos productos de descomposición ya se han citado anteriormente por Bentley y Housley (3) y Kaper y Veldstrá (5), estos últimos cuando trabajan con otra bacteria tumorígena, Agrobacterium tumefaciens.

De las siete manchas encontradas, la de Rf: 0,54 corresponde al A.I.A.; la de 0,98-0,99 corresponde al I.A. Queda demostrado que estas siete manchas se han producido por rotura del A.I.Pc. cuando se estudia en condiciones alcalinas, al estudiar comparativamente y en las citadas condiciones alcalinas un cromatograma que contenía A.I.Pc. puro y la fracción hormonal ácida del cultivo de la bacteria *Pseudomonas savastanoi* (figura 1).

En resumen, creemos que la bacteria *Pseudomonas savastanoi* sintetiza A.I.A. *in vitro* y a partir del triptofano, siguiendo el siguiente camino, dado por Thimann (9): Triptofano  $\rightarrow$  A.I.Pc.  $\rightarrow$  A.I.A.

Esta misma vía se encontró anteriormente (2) al estudiar la biogénesis del A.I.A. contenido en los tumores que produce la bacteria *Pseudomonas savastanoi* sobre el olivo. Posteriormente a nuestras experiencias, Magie y colaboradores (6), cuando incuban con DL-triptofano-<sup>14</sup>C-2, células lavadas de *Ps. savastanoi*, identifican dos metabolitos radiactivos: indolacetamida y A.I.A.; la indolacetamida se produce según algunos autores a partir del indolacetonitrilo. Magie y colaboradores (6) no creen en la presencia de este intermediario, ya que no han podido demostrar su presencia por vía enzimática.

A la vista de estos resultados se ha sugerido una nueva vía en la conversión del triptofano a A.I.A.: Triptofano → indolacetamida → A.I.A.

#### RESUMEN

Se ha encontrado que la bacteria Pseudomonas savastanoi metaboliza el triptofano,  $in\ vitro$ , siguiendo el camino del ácido  $\beta$ -indolpirúvico, cuyos productos de descomposición hemos identificado en los extractos ácidos del líquido metabólico, mediante cromatografía en disolventes alcalinos. El ácido  $\beta$ -indolacético se produce como un producto intermediario de la descomposición del ácido  $\beta$ -indolpirúvico.

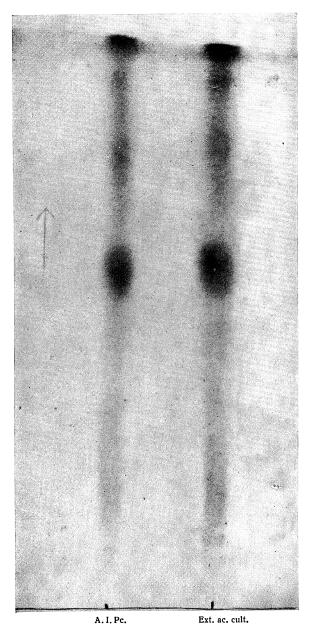


Figura 1. Cromatografía del A. I. Pc. puro y del extracto ácido hormonal de un cultivo de la bacteria Pseudomonas savastanoi. Disolvente: alcohol isopropílico + amoníaco (28 %) + agua (80 : 10 :10). Revelador: reactivo de Ehrlich

#### **SUMMARY**

The *in vitro* metabolism of triptophan by *Pseudomonas savastanoi*, has been studied. We have found that the metabolism takes place via  $\beta$ -indolepyruvic acid, whose degradation products are identified by chromatography in alkaline solvents. The  $\beta$ -indoleacetic acid is produced as an intermediate product.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- Beltrá, R. 1959. El ácido β-indolacético y los tumores vegetales de origen bacteriano. Rev. Latinoam. Microbiol., 2, 23-32.
- Beltra, R. 1962. Estudio de la fracción hormonal de los tumores producidos en el olivo por el *Pseudomonas savastanoi*. I. Biogénesis del ácido β-indolacético contenido en los tumores. Microbiol. Españ., 15, 13-33.
- Bentley, J. A., y Housley, S. 1956. Growth of avena coleoptile sections in solutions of 3-indolylacetic acid and 3-indolylacetonitrile. Physiol. Plantarum., 6, 480.
- BITANCOURT, A. A. 1954. La nature des auxines des tumeurs végétales. Année Biol., 30, 7-10.
- KAPER, J. M., y VELDSTRÁ, H. 1958. On the metabolism of tryptophan by Agrobacterium tumefaciens. Biochim. Biophys. Acta, 30, 401-20.
- 6. Magie, A. R.; Wilson, E. E., y Kosugf, L. 1963. Indoleacetamide as an intermediate in the synthesis of indoleacetic acid in *Pseudomonas savastanoi*. Science, 141, 1.281-82.
- 7. MILLER, C. O.; SKOOG, F.; OKAMURA, F. S.; SALTZA, M. H., y STRONG, F. M. 1956. Isolation structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. J. Am. Chem. Soc., 78, 1.375-80.
- 8. Skoog, F. 1937. A deseeded avena test method for small amounts of auxin and auxin precursor. J. Gen. Physiol., 20, 311-34.
- 9. THIMANN, K. V. 1956. L'origine et les fonctions des auxines, 13-24.
- Yamaki, T., y Nakamura, K. 1952. Formations of indoleacetic acid in maize embryo. Sci. Papers Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo, 3, 81-98.

#### C. S. I. C.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

## ESTUDIO DE LOS EFECTOS QUE PRODUCE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LAS BACTERIAS

VII. Influencia de la aireación en el metabolismo de los ácidos nucleicos del Staphylococcus aureus irradiado

por

EULALIA CABEZAS DE HERRERA y PILAR AZNAR

#### INTRODUCCION

El efecto bactericida de la radiación ultravioleta es considerado más como una inhibición específica de la división celular que como una inhibición del metabolismo general de la célula.

Las investigaciones de Morse y Carter (20) sobre el efecto de la radiación ultravioleta en la síntesis de los ácidos nucleicos, son un ejemplo de que las funciones metabólicas específicas están íntimamente relacionadas con la división celular.

Si comparamos una estirpe bacteriana con su mutante resistente a la radiación, vemos que las dos estirpes no difieren en el contenido de ácidos nucleicos, según han demostrado Gillies y Alper (10) y Harold y Ziporin (11). Ambas estirpes son muy influidas por los tratamientos de post-irradiación. Alper y Gillies (1) han llegado a la conclusión de que las diferencias entre las dos estirpes no están en el daño inicial, sino en los procesos metabólicos producidos inmediatamente después de la irradiación.

La naturaleza de las moléculas sobre las cuales las radiaciones producen un daño eventual no ha sido establecida. Lo más frecuente es creer que los cambios ocurridos en el ADN son los responsables de tales daños. Bacq y Alexander (4) creen, por el contrario, que la ruptura de las membranas internas puede desorganizar el sistema enzimático de la célula.

Muchos son los factores que influyen no sólo en la sensibilidad de las bacterias a la luz ultravioleta, sino también en la recuperación del daño causado por la radiación.

Después de irradiada una bacteria, por ejemplo, *Escherichia coli*, se obtiene mayor supervivencia si se cultiva en agar sintético que si se cultiva en agar + caldo común. Y la supervivencia es mucho mayor cuando se cultiva en medio líquido que cuando se cultiva en medio sólido (21).

Billen y colaboradores (6), estudiando la respiración de *Escherichia coli* irradiada, vieron que la respiración decae y que este descenso depende del substrato.

Heinmts y colaboradores (12) estudiaron la recuperación de las bacterias inactivadas por la luz ultravioleta, por metabolitos y cofactores.

Monod y colaboradores (17), trabajando con Escherichia coli, observaron que tratando con catalasa las células irradiadas aumentaba el índice de supervivencia. La temperatura también influye en la supervivencia de las bacterias irradiadas (2-3, 14, 25).

Por todo lo anteriormente expuesto, y con el fin de aportar un dato más para el conocimiento del mecanismo del efecto bactericida de la radiación, en el presente trabajo estudiamos la influencia que tiene la aireación en el metabolismo de los ácidos nucleicos del *Staphylococcus aureus* irradiado con luz ultravioleta.

#### **CULTIVOS SINCRONICOS**

La sensibilidad de las bacterias a la luz ultravioleta es diferente según los estadios de su ciclo de crecimiento.

Ya Hollaender y Claus, en 1936 (13), encontraron que la *Escherichia coli* de siete horas de cultivo era más resistente a la luz ultravioleta que la que había sido cultivada durante quince horas. El examen microscópico de las células cultivadas durante siete horas reveló que el 70 por ciento de las células eran dobles, a lo cual se puede deber en gran parte la diferencia de sensibilidad.

Demerec y Latarjet (8) observaron que las células de *Escherichia* coli en crecimiento son más sensibles que las células en reposo.

Morse (19) y Morse y Carter (20) demostraron que el contenido de ácidos nucleicos de *Escherichia coli*, estirpes B y B/r, se triplicaba a lo largo de su ciclo de crecimiento. Como el máximo de acción bactericida del espectro está en los 2.600 Å, es lógico que la sensibilidad de la bacteria sea distinta según su contenido en ácidos nucleicos.

Witkin (28) comprueba una mayor sensibilidad en la fase logarítmica de crecimiento de las bacterias.

Stapleton (24) estudió la relativa sensibilidad de *Escherichia coli* B/r, comprobando que hay un descenso en la sensibilidad durante la fase estacionaria, seguido por un marcado aumento en la fase logarítmica, alcanzando el máximo de sensibilidad al final de la misma.

Por lo tanto, para que los resultados tengan un valor más exacto, será necesario que toda la población bacteriana se encuentre en el mismo momento de su ciclo de crecimiento.

Esto sólo es posible trabajando con cultivos sincrónicos.

Nosotros los obtenemos siguiendo el método de Scott y Chu (22) y con ellos realizados todas las experiencias.

#### MATERIAL Y METODOS

Estirpe. Staphylococcus aureus procedente de la Colección Nacional de Cultivos Tipo, de Londres.

Conservamos la estirpe en cultivo sobre agar + caldo, en nevera a 4 °C.

Las características fisiológicas y bioquímicas de esta estirpe fueron estudiadas en un trabajo anterior (7).

Preparación de muestras para la valoración de los ácidos nucleicos de la estirpe patrón. Con cultivos sincrónicos en fase logarítmica de crecimiento, inoculamos dos series de matraces con caldo común y cultivamos a 37 °C, una serie, en reposo, y otra, con aireación.

Cultivo en aireación. Lo realizamos haciendo pasar a través del medio una corriente de aire, que pasamos, primero, por ácido sulfúrico concentrado para esterilizarlo, y a continuación, por agua destilada estéril.

A las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 12 horas de incubación a 37 °C recogemos

muestras de cada una de las series, enfriamos a 4 °C, centrifugamos y lavamos varias veces con agua destilada estéril a 4 °C y desecamos a baño María.

#### Irradiación

Irradiamos con 4 lámparas de mercurio «Sylvania», de 15 W cada una, que emiten una longitud de onda de 2.357 Å. Estas lámparas están dispuestas en la parte superior de una cámara que tiene las paredes recubiertas con planchas de aluminio.

La cámara está instalada en una cámara oscura y sobre un agitador de vaivén de 113 r/m.

En una bandeja de 14,5 cm de distancia del foco de emisión ponemos las placas de Petri, de 4,5 cm de diámetro.

Teniendo en cuenta las indicaciones de Morowitz (18) para obtener una intensidad efectiva de radiación a través de la muestra, calculando la concentración celular de la suspensión y la profundidad de la capa, consideramos que las condiciones óptimas se consiguen con 10<sup>9</sup> células/cm³ y 2 cm³ de esta suspensión en cada placa.

#### Curva de letalidad

Irradiamos durante 5, 10, 15, 30 y 45 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos.

1 cm³ de suspensión irradiada la sembramos en agar caldo fundido, haciendo homogénea la suspensión para recuento en placa.

Preparación de muestras para la valoración de ácidos nucleicos de la estirpe irradiada

Irradiamos durante 15 minutos una suspensión bacteriana de 10º células/cm³, de un cultivo sincrónico en plena fase logarítmica de crecimiento.

Después de irradiada, recogemos la suspensión y sembramos en matraces con caldo común. Una serie la cultivamos en reposo y otra con aireación, siempre al abrigo de la luz.

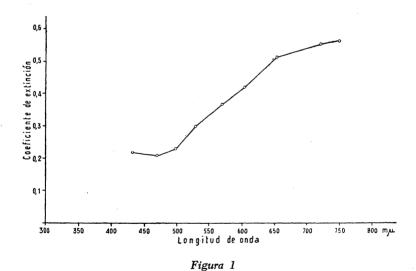
A las 3, 4, 6, 8 y 12 horas de incubación a 37 °C, de cada una de las series, recogemos muestras, enfriamos a 4 °C, centrifugamos, lavamos varias veces con agua destilada estéril a 4 °C y desecamos a baño María.

#### Valoración de ácidos nucleicos

La valoración de los ácidos nucleicos la efectuamos por el método de Schmidt y Thannhauser (23), valorando el fósforo por el de Fiske y Subbarow (9).

Como en el desarrollo de la coloración, pueden ejercer influencia algunos factores como el pH, ciertos componentes de los extractos, etc. No empleamos una curva patrón para todas las determinaciones, sino que para que sea más exacto, operamos según Melnik y Field (16), añadiendo a una parte alícuota del líquido que se analiza una proporción exactamente conocida de fósforo. De esta manera hallamos el valor del coeficiente de extinción, debido al derivado coloreado procedente del fósforo, en cada caso particular.

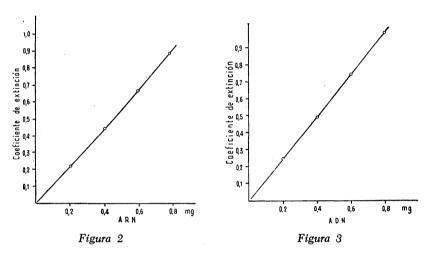
Empleamos el fotómetro de Pulfrich-Zeiss, eligiendo el filtro más adecuado, que en nuestro caso es el S-75, según puede verse en la *figura 1*.



Comprobamos el cumplimiento de la ley de Beer, realizando colorimetrías con soluciones patrones de ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico, con concentraciones que varían de 0,2-0,8 mg. En las figuras 2-3

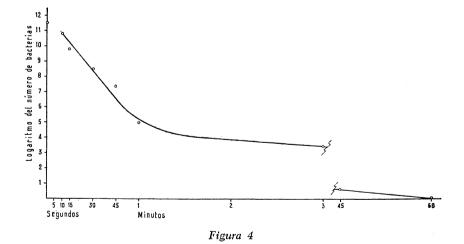
puede verse el satisfactorio ajuste de las rectas obtenidas entre estos límites de concentración.

Hacemos determinación de materia seca de las muestras para referir los resultados a tanto por ciento de la misma.



## **RESULTADOS**

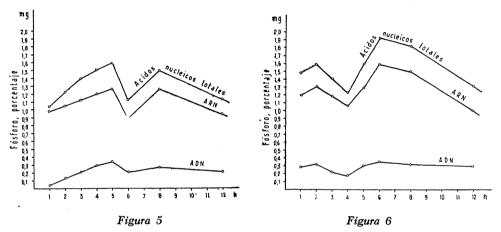
La figura 4 muestra la curva de letalidad del Staphylococcus aureus. A los 15 minutos de irradiación mueren más del 90 por ciento de las células; por ello elegimos esta dosis para nuestras experiencias, con el



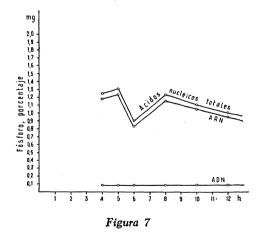
fin de asegurarnos de que la totalidad de las células han sufrido el efecto de la luz ultravioleta.

Si hacemos un estudio comparativo de las funciones metabólicas de los ácidos nucleicos de las estirpes patrón e irradiada, cultivadas a 37 °C, a) en cultivo estático y b) pasando a través del mismo una corriente de aire, observamos:

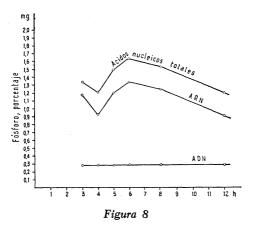
1.º El metabolismo de los ácidos nucleicos de la estirpe patrón es mucho más intenso cuando se cultiva pasando a través del medio una corriente de aire, que cuando el cultivo es estático (figuras 5-6).



2.º Cuando cultivamos en reposo la estirpe irradiada, la luz ultravioleta bloquea casi totalmente el metabolismo del ADN (figura 7).



3.º Si la estirpe irradiada la cultivamos pasando a través del medio una corriente de aire, el bloqueo del ADN es mucho menor y el metabolismo del ARN es más intenso (figura 8).



#### **DISCUSION**

Los resultados obtenidos vienen en apoyo de la tesis sostenida por Sykes (26) de que el daño producido por la luz ultravioleta en las bacterias no se refleja inmediatamente, sino más tarde, como consecuencia del desequilibrio del metabolismo de la célula.

Si estimulamos el metabolismo celular por aireación del cultivo, la célula recupera parte de sus funciones y el efecto del daño producido es menor.

Esto indica que las células conservan su facultad de reproducirse a pesar de las condiciones adversas, o porque éstas no sean lo suficientemente drásticas para que su efecto tenga consecuencias de destrucción.

También esto puede implicar que la célula ha sido capaz de adaptarse a las nuevas condiciones, por una capacidad de modificar sus actividades metabólicas, por hacer mejor uso de los nutrientes a su alcance o por activación de enzimas que estaban presentes, pero sólo con un papel recesivo.

#### RESUMEN

En el presente trabajo hacemos el estudio de la influencia de la aireación en el metabolismo de los ácidos nucleicos del *Staphylococcus aureus*, estirpe normal e irradiada con luz ultravioleta.

Hemos podido ver cómo estimulando el metabolismo celular por aireación del cultivo, en la célula normal, el metabolismo de los ácidos nucleicos es más intenso; y la célula irradiada se recupera en parte del daño producido por la luz ultravioleta y el bloqueo del metabolismo del ADN es menos intenso.

#### **SUMMARY**

The influence of the aireation on the metabolism of nucleic acids in a normal strain of *Staphylococcus aureus* and the same irradiated was studied.

In the normal strain the metabolism of nucleic acids during aireation was higher than without aireation.

The irradiated strain after aireation recovered partially from the injury of the U. V. irradiation.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- Alper, T., y Gillies, N. R. 1960. The influence of the metabolic events immediatly after irradiation on the difference in sensitivity between E. coli
  B and E. coli B/r. Intern. J. Radiation Biol., Supl. Immediate Low Level
  Effects Ionizing Radiations, Proc. Symp., Venice, 1959.
- Anderson, E. II. 1949. Reactivation of ultraviolet irradiated bacteria. Am. J. Botany. 36.
- Anderson, E. H. 1951. Heat reactivation of ultraviolet inactivated bacteria.
   Bacteriol., 61, 389.
- 4. Bacq, Z. M., y Alexander, P. 1961. Fundamentals of Radiobiology, 2.ª edición. Oxford, Pergamon Press.
- 5. Barner, H. D., y Coffen, S. S. 1956. The relation of growth to the lethal damage induced by ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 71, 149.
- 6. BILLEN, D.; STAPLETON, G. E., y HOLLAENDER, A. 1953. The effect of X-radiation on the respiration of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 65, 131.
- CABEZAS DE HERRERA, E. 1961. Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. IV. Alteración del comportamiento fisiológico del S. aureus. Microbiol. Españ., 14, 113.

- 8. Demerec, M., y. Latarjet, R. 1946. Mutations in bacteria induced by radiations. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 11, 38.
- 9. Fiske, C., y Subbarow, Y. 1925. J. Biol. Chem., 66, 375.
- GILLIES, N. E., y ALPER, T. 1960. The nucleic acid content of Escherichia coli strain B and B/r. Biochim. Biophys. Acta, 43, 182.
- HAROLD, F. M., y ZIPORIN, Z. Z. 1958. Effect of nitrogen and sulphur mustard on nucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 28, 482.
- Heinmis, F.; Taylor, N. W., y Lehmann, J. J. 1954. The use of metabolites in the restoration of the viability of heat and chemically inactivated E. coli. J. Bacteriol., 67, 5.
- Hollaender, A., y Claus, W. D. 1936. The bactericidal effect of ultraviolet radiation on *Escherichia coli* in liquid suspensions. J. Gen. Physiol., 19, 753.
- Kelner, A. 1949. Photoreactivation of ultraviolet-irradiated Escherichia coli with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet induced mutation. J. Bacteriol., 58, 511.
- LATARJET, R., y CALDAS, L. R. 1952. Restoration induced by catalase in irradiated microorganisms. J. Gen. Physiol., 35, 455.
- Melnik, D., y Field (Jr.), H. 1940. Determination of nicotinic acid in biological materials by means of photoelectric colorimetry. J. Biol. Chem., 134, 1.
- Monod, J.; Torriani, A. M., y Jalit, M. 1949. Sur la réactivation de bactéries stérilisées par le rayonnements ultraviolet. Compt. Rend., 229, 557.
- Morowitz, H. J. 1950. Absorption effects in volume irradiation of microorganisms. Science, 111, 229.
- Morse, M. L. 1950. Resistance to ultraviolet radiation in Escherichia coli, strain B and B/r. Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists), 50, 135.
- 20. Morse, M. L., y Carter, C. E. 1949. The effects of ultraviolet irradiation on the synthesis of nucleic acid by *Escherichia coli*. Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists), 49, 14.
- 21. Roberts, R. B., y Aldous. 1949. Recovery from ultraviolet irradiation in Escherichia coli. J. Bacteriol., 57, 363.
- 22. Scott, Mc. N., y Chu, E. 1958. Synchronized division of growing cultures of E. coli. Exptl. Cell Res., 14, 166.
- 23. Schmidt, C., y Thannhauser, S. J. 1945. J. Biol. Chem., 161, 83.
- 24. Stapleton, G. E. 1952. Variations in the radiosensitivity of *Escherichia coli* during the growth cycle. Tesis doctoral, Universidad de Tennessee.
- 25. Stein, W., y Meutzner, I. 1950. Reaktivierung von U.V. naktivierten Bacterium coli durch wärme. Naturwissenschaften, 37, 167.
- SYKES, G. 1963. The phenomenon of bacterial survival. J. Appl. Bacteriol., 25, 287.
- 27. Thornley, M. J. 1963. Radiation resistence among bacteria. J. Appl. Bacteriol., 26, 334.
- 28. WITKIN, E. M. 1951. Nuclear segregation and the delayed appearance of induced mutations in *Escherichia coli*. Cold Sprig Harbor Symp. Quant. Biol., 16, 357.

#### C. S. 1 C.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

## ACTIVIDAD PECTOLITICA DE ERWINIA CAROTOVORA

por

GENOVEVA TEJERINA y M. SANTAOLALLA

#### INTRODUCCION

Un gran número de enfermedades que frecuentemente presentan los vegetales tienen como causa fundamental la destrucción de la pared celular, a la que sigue una autólisis del protoplasma que conduce a ablandamientos de tejidos y podredumbres en general. Puesto que los componentes fundamentales de la lámina media son de naturaleza péctica, todos aquellos sistemas que pueden intervenir en su degradación han de tener un especial interés en Fitopatología.

Desde que De Barry (3) señaló que las enfermedades que presentaban las plantas atacadas por *Sclerotinia libertiana* eran causadas por acción de enzimas microbianas que atacaban a los compuestos pécticos, se ha venido prestando gran atención a la actividad pectolítica de microorganismos, e incluso se ha intentado encontrar alguna relación entre la invasión de tejidos vegetales por patógenos facultativos y su capacidad de producir enzimas pectolíticas.

Si bien la composición de la lámina media es bastante constante, las enzimas producidas por microorganismos pueden atacar a la molécula péctica en diferentes puntos y de diferentes modos, e incluso enzimas que actúan de la misma manera se pueden caracterizar por distintas propiedades físicas, químicas y especialmente el pH en que trabajan. Si además se tiene en cuenta que un mismo microorganismo puede producir

distintas enzimas pécticas (16) queda bien justificada la gran confusión de nombres con que se ha pretendido designar a cada una de las enzimas que tienen acción pectolítica. Revisiones de las distintas clasificaciones, según muy diferentes criterios, se deben a Demain y Phaff (4) y a Kertesz (7). Entre todas estas enzimas señalamos la designada con el nombre de pectin-poligalacturonasa (PG), por ser la estudiada en el presente trabajo. Hasta 1935 esta enzima fué denominada pectinasa y su actividad ha sido estudiada en un número comparativamente mucho más alto de hongos que de bacterias. Se caracteriza por hidrolizar las uniones glucosídicas 1-4 del ácido péctico, originando ácidos poligalacturónicos de peso molecular inferior y ácido monogalacturónico.

La presencia de esta enzima se ha señalado en varias bacterias, entre las que figuran las correspondientes al género *Erwinia* o *Bacterium*, como en un principio se designó. Jones (6) da el nombre de citasas a las enzimas capaces de hidrolizar paredes celulares y señala al *Bacterium carotovorum* como productor de estas enzimas citolíticas.

Davison y Willaman (2) observan en *Erwinia carotovora*, desarrollada en un medio con zanahoria, una marcada acción de PG.

Mas recientemente, Wood (16) indica que una estirpe de *Erwinia carotovora*, entre cinco de las probadas, produce pectin-glucosidasa. El mismo autor (17) señala en *E. aroideae* la presencia de enzimas pécticas que por diálisis a 5 °C pierden su actividad.

Simultáneamente, Tribe (13) efectúa un estudio de enzimas pécticas en *Bacterium aroidease*, estimando su actividad por maceración de discos de patata, zanahoria y pepino, así como sobre pectina cítrica y pectato sódico. Al igual que Wood, señala que las preparaciones pierden actividad por diálisis en agua, no liberan ácido galacturónico y liberan pocos grupos reductores aunque se prolongue su acción.

Kraght y Starr (8) ensayan la actividad de *Erwinia carotovora* en distintos medios de cultivo y hacen notar que esta actividad aumenta al añadir pectina al medio. Asimismo prueban que el ácido galacturónico es metabolizado por la bacteria a medida que aparece en el medio como consecuencia de la acción enzimática.

Smith (11) estudia enzimas pécticas en diferentes bacterias: *Erwinia* aroideae, E. atroseptica, E. carotovora y E. phytophtora, sin encontrar diferencias cualitativas entre ellas.

Tanto las técnicas utilizadas en los estudios que hemos señalado como las condiciones en que se efectúan las distintas pruebas, son diferentes, y aunque todos ellos coinciden en atribuir al género *Erwinia* actividad pectolítica, no se pueden establecer de manera uniforme las propiedades que caracterizan a estas enzimas pectolíticas, ni las condiciones necesarias para que alcancen su mejor actividad.

Un factor de gran importancia para poder establecer relaciones comparativas es el pH necesario para que se manifieste la actividad pectolítica. Debiendo señalar en este aspecto los trabajos de Friedman y Ceponis (5), que estudian podredumbres producidas por *Erwinia carotovora* y hacen notar que la capaciadd enzimática de la bacteria es pobre
en condiciones ácidas y se incrementa en circunstancias menos ácidas
o alcalinas, con el consiguiente aumento de virulencia, que va unido
a la capacidad del microorganismo para atacar las sustancias pécticas
presentes en el tejido huésped.

Nosotros hemos recurrido a una estirpe de *Erwinia carotovora* para observar si es capaz de producir enzimas pectolíticas, condiciones en que la actividad se manifiesta, tipo de esta actividad y factores que actúan sobre ella de manera más decisiva.

## MATERIAL Y METODOS

Utilizamos la estirpe 312 de *Erwinia carotovora* procedente de la Colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas, de Harpenden, que conservamos sobre agar glucosado inclinado, en nevera.

## Producción de enzima

La Erwinia carotovora se cultivó en matraces de 500 ml sobre el medio indicado por Smith (11), que contiene 0,25 por ciento de pectina citrus (Fluka, A. G.). Este mismo medio, exento de pectina, así como caldo común, se utilizaron para observar el carácter inducible de la enzima. Como inóculo se empleó un cultivo de veinticuatro horas en agar glucosado inclinado y la incubación se realizó a 25 °C, con agitación, siguiendo su desarrollo en un spectronic 20 (Bausch and Lomb), a 600 mμ.

#### Ensayo de actividad de la enzima

Se efectúa en el sobrenadante obtenido por centrifugación a 7.000 r/m durante veinte minutos, de un cultivo de *Erwinia carotovora* de diferentes períodos de incubación, que van de veinticuatro horas a

dos meses, con el fin de conocer la producción de enzima en función de la edad. Algunas de las muestras son dializadas en agua a 5 °C durante veinticuatro horas, para saber así si la enzima es o no dializable.

Cada una de las muestras a ensayar se añade en una proporción del 10 por ciento a la mezcla de incubación formada por 0,35 por ciento de ácido péctico (L. Light and Co. Ltd., Inglaterra), 0,2 por ciento de FNa (para prevenir contaminaciones) y 50 por ciento de distintos tampones 0,1 M, a pH que oscila entre 4,0 y 10,5.

Una vez conocido el pH más adecuado para la enzima, preparamos distintas mezclas de incubación, modificando gradualmente las concentraciones del substrato, así como las cantidades de sobrenadante, a fin de establecer las condiciones óptimas para la actividad enzimática. Para cada muestra se prepara un testigo en el que el sobrenadante ha sido inactivado por calentamiento en baño María a ebullición, durante diez minutos.

Cada ensayo se incuba a 30°-32 °C, en baño María, y periódicamente se toman partes alícuotas de 5 cm³ para valorar su actividad.

#### Valoración de la actividad enzimática

Se realiza en muestras de 5 cm³ tomadas de la mezcla de incubación a 30°-32 °C, sobre 1,8 cm³ de CO₃Na₂ 1M, que detendrá la acción de la enzima. La técnica que seguimos consiste en valorar los grupos reductores que aparecen como resultado de la hidrólisis glucosídica efectuada en la molécula de ácido péctico. Seguimos la modificación del método de Jansen y MacDonnell, según indican Winsteal y Walker (15), que consiste en añadir 5 cm³ de una solución de yodo 0,1 N, y transcurridos veinte minutos en oscuridad se acidifica con 4 cm³ de SO₄H₂ 2M para valorar el yodo residual con S₂O₃Na₂ 0,05N. Se hace una corrección de valores teniendo en cuenta el poder reductor encontrado en las muestras con sobrenadante inactivado por calentamiento. Los resultados se expresan como miligramos de ácido galacturónico/mililitro del sobrenadante.

## Cromatografía

Para observar si aparece ácido galacturónico como producto de la acción enzimática, se recurre a cromatografía monodimensional descendente sobre papel Whatman núm. 1, usando como disolvente buta-

nol—n + ácido acético + agua, en la proporción 4:1:5. Se revela con una solución que contiene 0,5 g de bencidina, 10 ml de ácido acético, 10 ml de ácido tricloracético al 45 por ciento y 95 ml de etanol de 95 por ciento, y finalmente se mantiene el cromatograma durante dos minutos en estufa a 105 °C.

Empleamos muestras sin ningún tratamiento, así como sometidas a una purificación mediante precipitaciones con alcohol, cloruro cálcico al 1 por ciento y pase por amberlita I. R. 120, según la técnica descrita por Smith (12). Junto con estas muestras se cromatografían testigos de ácido galacturónico (Fluka A.G.), sobrenadante dializado y substrato.

#### RESULTADOS

Influencia de la pectina en la producción de enzimas pectolíticas

En *Erwinia carotovora* cultivada en caldo común o en medio de Smith sin pectina no hemos podido detectar la presencia de enzimas pectolíticas, en las diferentes condiciones en que el ensayo se efectúa, modificando el valor de pH desde 4,0 a 10,5, así como las concentraciones de substrato (0,05-50 por ciento) y sobrenadante (2,5-50 por ciento).

## Efecto del pH y edad del cultivo

Utilizando el sobrenadante de cultivos de Erwinia carotovora de tres días en el medio indicado por Smith (que contiene 0,25 por ciento de pectina), se estudia la actividad enzimática a diferentes pH, cuyos valores están comprendidos entre 4,0 y 10,5. Así se observó actividad pectolítica en dos zonas diferentes: una, ácida, y otra, alcalina. La primera abarca valores de pH 4,7 a pH 6,5 aproximadamente, y la segunda muestra un óptimo a pH 9,0, como representa la figura 1. Estas determinaciones se han venido repitiendo en cultivos de E. carotovora con diferentes tiempos de incubación: desde un día hasta sesenta. La actividad en zona alcalina se mantiene con muy ligera disminución durante todo este período, mientras que en la zona ácida se manifiesta con menos intensidad y se pierde a los diez días de cultivo. Expresamos los resultados en la figura 2, junto con la curva de crecimiento de E. carotovora.

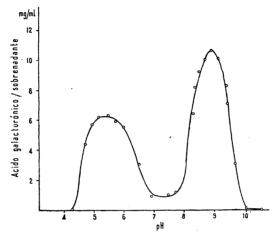


Figura 1. Actividad pectolítica de un cultivo de tres días, en función del pH

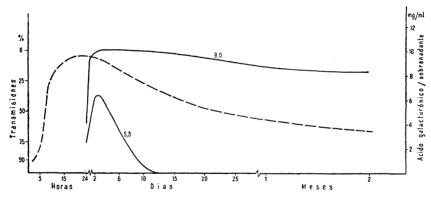
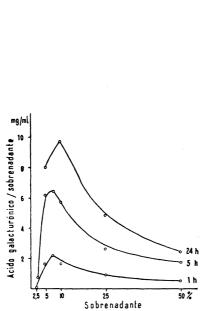


Figura 2. Desarrollo del cultivo y actividad pectolítica a pH 5,3 y 9,0 en función del tiempo de incubación

## Efecto de la concentración de la enzima

Manteniendo constante la concentración de ácido péctico (0,35 por ciento), modificamos en la mezcla de incubación el aporte de la enzima, añadiendo distintas cantidades de sobrenadante. El ensayo se efectúa tanto a pH ácido como alcalino. Las determinaciones de actividad se practican a diferentes tiempos de incubación, y los resultados se reflejan en las figuras 3-4.



Acido galacturánico / sobrenadante / sobrenadante / sobrenadante

Figura 3. Actividad pectolítica a pH 5,3 y diferentes tiempos de incubación, en función de la concentración de sobrenadante

Figura 4. Actividad pectolítica a pH 9,0 y diferentes tiempos de incubación, en función de la concentración de sobrenadante

En ambos casos, el máximo de actividad ha correspondido a una concentración inferior al 10 por ciento de sobrenadante, siendo ligeramente más bajo este valor para la mezcla a pH 9,0 que a pH 5,3. Cantidades mayores del 10 por ciento reducen la actividad, hasta casi anularla al alcanzar un 50 por ciento.

Tanto en condiciones ácidas como alcalinas, la prolongación hasta veinticuatro horas del tiempo de incubación incrementa los grupos reductores liberados, siendo más rápida la hidrólisis en la primera fase a pH 5,3 y en la última a pH 9,0.

## Efecto de la concentración de ácido péctico

Para efectuar esta prueba fijamos en 7,5 y 5,0 por ciento la concentración de sobrenadante para los pH 5,3 y 9,0, respectivamente, de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo previo que acabamos

de describir, y la actividad se determina frente a concentraciones de ácido péctico que oscilan entre los límites de 0,05 y 50 por ciento. La valoración de los grupos aldehídicos liberados se hace a la hora, cinco y veinticuatro horas. En estas condiciones se observa que a pH alcalino la velocidad de hidrólisis aumenta en proporción al aumento de substrato, sin que exista apenas diferencia entre los resultados que se presentan a las cinco y veinticuatro horas, según puede verse en la figura 5, por lo que se deduce que los valores más altos se consiguen con 0,75 por ciento de substrato a las cinco horas.

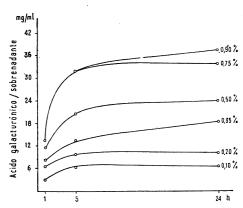


Figura 5. Actividad pectolítica a pH 9,0 y diferentes concentraciones de substrato, en función del tiempo de incubación

También cuando se opera a pH 5,3 se incrementa la actividad enzimática con relación a la concentración de substrato, siendo este aumento más significativo a las veinticuatro horas de incubación; entonces los valores más altos se consiguen en presencia de 0,75 por ciento de ácido péctico, mientras que a las cinco horas la mayor actividad corresponde a 0,5 por ciento, como queda indicado en la figura 6.

### Diálisis

El sobrenadante de un cultivo de *Erwinia carotovora* de tres días se dializa a 5 °C durante veinticuatro horas y se estudia su actividad pectolítica en comparación con un testigo sin dializar. La diferencia en los resultados de una y otra muestra es poco significativa, ya que no pasa de 6-7 por ciento. Por lo tanto, la enzima no es dializable.

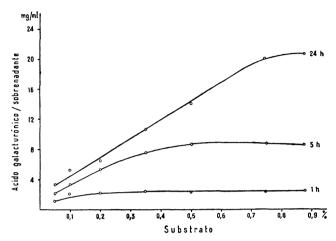


Figura 6. Actividad pectolítica a pH 5,3 y diferentes tiempos de incubación, en función de la concentración del substrato

## Cromatografía

No se ha hecho ningún intento de aplicación de métodos cromatográficos cuantitativos, ya que sólo intentamos saber si aparece o no ácido galacturónico por comparación directa con un patrón de 40 µg, prescindiendo de determinar su Rf, ya que este valor varía en ± 0,3, por su gran sensibilidad a las condiciones ambientales. Las muestras correspondientes al sobrenadante, así como al substrato de ácido péctico, no forman mancha alguna. En cambio, la cromatografía de muestras en las que hemos observado actividad pectolítica revela la aparición de tres compuestos, tanto en el caso en que la enzima trabaja a pH ácido como alcalino. En el primer caso, es decir, cuando el pH es de 5,3, las tres manchas avanzan más lentamente que cuando la enzima actúa a pH 9,0 y ninguna de ellas corresponde a ácido galacturónico, por lo que podemos admitir que el producto final de la acción enzimática de Erwinia carotovora en condiciones ácidas está formado por una mezcla de polímeros intermedios entre los ácidos péctico y galacturónico (7). Por el contrario, en el caso de actividad en zona alcalina, de los tres compuestos que revela el análisis cromatográfico, uno de ellos ha sido identificado como ácido galacturónico y los otros dos corresponden a polímeros de bajo peso molecular.

#### DISCUSION

Siendo uno de los puntos fundamentales para la diferenciación de enzimas el pH al que su actividad se manifiesta, debemos señalar, a la vista de los resultados obtenidos, que Erwinia carotovora presenta acción pectolítica a dos pH completamente diferentes, por ser el uno ácido y el otro alcalino. Pero no ya el pH, sino la velocidad de hidrólisis y la relación más adecuada enzima/substrato, marcan diferencias características en cada uno de los casos. Esto puede indicar que estas diferentes propiedades reflejan la presencia de dos enzimas distintas o, por el contrario, es una única enzima que puede trabajar en condiciones diferentes. El problema de la pluralidad de enzimas pectolíticas producidas por microorganismos, por una parte, y la multiplicidad de acciones de una sola enzima que hidroliza uniones glucosídicas en la molécula péctica, por otra, ha sido considerado en hongos y levaduras, sin que haya prevalecido ninguno de los dos criterios que defienden una u otra idea. Ayres y colaboradores (1) señalan en el Aspergillus foetidus una poligalacturonasa que es un complejo de dos enzimas con pH óptimo de 5,3 y 3,5. De igual forma, Schubert (10) habla de cuatro enzimas pectolíticas en el cultivo de A. niger. Por el contrario, Phaff y Demain (9), trabajando con Saccharomyces fragilis, presentan una enzima única con tres actividades diferentes sobre la molécula de ácido péctico y que trabaja a un pH inicial de 4,4, aunque se puede acelerar el final de la reacción disminuvendo el pH hasta 3.5.

En cuanto al tipo de enzima responsable de la actividad que observamos en condiciones ácidas, podría ser identificada con la poligalacturonosa bacteriana, que, según Kraght y Starr (8), es activa a un pH óptimo de 5,3. Pero si consideramos los estudios de Walton y Cappellini (14), nuestra PG será la enzima que trabaja a pH 9,0, que es el óptimo que estos autores fijan para la PG de una Erwinia carotovora que cultivan en medio con pectina o glucosa como fuente de carbono.

Wood (17) señala la presencia de distintas enzimas pectolíticas en *Bacterium aroideae*; una de ellas, denominada despolimerasa (DP), difiere de PG en que degrada el ácido péctico sin llegar al punto en que se forman moléculas de ácido galacturónico. Nuestra enzima con actividad a pH 9,0 podría también ser una DP, ya que, según Wood, éste es el pH óptimo para la DP que describe; no obstante, existe una

diferencia entre ambas, que consiste en que el medio de cultivo que Wood utilizó no tiene pectina y que su DP pierde actividad por diálisis.

A pesar de estas contradicciones y que algunos autores, entre ellos Smith (11), señalan la posibilidad de que la misma enzima puede tener dos pH óptimos diferentes, nosotros creemos que la actividad pectolítica observada en *Erwinia carotovora* es obra de dos enzimas distintas, ya que las condiciones en que actúa cada una de ellas, son diferentes, como también lo son los productos finales de la reacción que catalizan. Bajo este punto de vista podríamos suponer que la enzima que observamos a pH ácido es del tipo DP, mientras sería PG la enzima que trabaja en zona alcalina, ya que es esta enzima y no la anterior la que libera como producto final ácido galacturónico, según hemos podido observar por análisis cromatográfico. Si ambas enzimas son independientes en su acción o trabajan conjuntamente, es problema que debe ser estudiado, así como otros aspectos interesantes, antes de poder dar una interpretación única a la naturaleza de la actividad pectolítica que hemos observado en *E. carotovora*.

#### RESUMEN

Se estudia la producción de enzimas pectolíticas por *Erwinia carotovora*, ensayando esta actividad a diferentes pH (4,0-10,5). La presencia de enzimas es determinada por valoración de grupos reductores, y así se observa la actividad a dos pH diferentes, con óptimos a 5,3 y 9,0. Observamos la mejor concentración de enzima y substrato en cada uno de los casos y se discute la posibilidad de que existan dos enzimas distintas frente a la idea de que sea una sola la que cataliza diferentes reacciones.

#### **SUMMARY**

The production of a pectolitic enzyme by *Erwinia carotovora* is studied.

The activity of the enzyme at different pH has been determined being pH 5.3 and 9.0 the optima. The action on the activity of enzyme concentration and substratum concentration at different times of incubation has been determined.

The possibility of the enzyme being a complex of two different ones working in a different pH range is discussed.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- 1. Ayres, A.; Dingle, J.; Phipps, A.; Reid, W. W., y Solomons, G. L. 1952. Nature, 170, 834-36.
- 2. Davison, F. R., y Willaman, J. J. 1930. Botan. Gaz., 83, 329.
- 3. De Barry, A. 1887. Comparative morphology and biology of the Fungi, Mycetozoa and Bacteria. Oxford.
- 4. Damain, A. L., y Phaff, H. J. 1957. Wallerstein Lab. Commun., 20, 119-40.
- 5. Friedman, B. A., y Ceponis, M. J. 1964. Phytopathology, 54, 237.
- 6. Jones, L. R. 1905. Zentr. Bakteriol. Parasitenk, Abt, II, 14, 257-72.
- 7. Kertesz, Z. I. 1951. The pectic substances. Interscience Publishers, Nueva York y Londres.
- 8. Kraght, A. J., y Starr, M. P. 1953. Arch. Biochem. Biophys., XLII, 271-77.
- 9. Phaff, H. J., y Demain, A. L. 1956. J. Biol. Chem., 218, 875-84.
- 10. Schubert, E. 1952. Nature, 169, 931-32.
- 11. Smith, W. K. 1958. J. Gen. Microbiol., 18, 33-41.
- 12. Smith, W. K. 1958. J. Gen. Microbiol., 18, 42-47.
- 13. TRIBE, H. T. 1955. Ann. Botany, XIX, 351-58.
- 14. Walton, G. S., y Cappellini, R. A. 1962. Phytopathology, 52, 927.
- 15. Winstead, N. N., y Walker, J. C. 1954. Phytopathology, 44, 153-58.
- 16. Wood, W. A. 1951. Nature, 167, 771.
- 17. Wood, W. A. 1955. Ann. Botany, XIX, 1-27.

# LABORATORIOS ALTER DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION SERVICIO DE MICROBIOLOGIA

## FORMAS IRREGULARES EN BACILLUS MEGATERIUM

por

#### F. FERNANDEZ

## INTRODUCCION

Desde hace bastante tiempo se conoce el hecho de que la morfología de las células del *Bacillus megaterium* varía con facilidad en cultivos antiguos. Knaysi señaló en 1933 (4) una serie de detalles al respecto, que volvió a poner de relieve en su magnífico libro de 1951 (5). Las formas irregulares que pueden producirse son denominadas por Knaysi «formas de involución», y son tan variadas, que ello nos movió a producirlas y estudiarlas utilizando métodos de coloración personales (3). Posteriormente diversos autores se han ocupado de estos problemas, y así Chatterjee y Williams (2) han estudiado los cambios que se producen en cultivos viejos de *B. anthracis* y que son análogos a algunos de los observados por nosotros en la especie objeto de estudio. En el Manual de Bergey (1), al describir la morfología del *B. megaterium*, se alude a una serie de formas raras, que han sido puestas en evidencia por nosotros.

## MATERIAL Y METODOS

Los gérmenes empleados han sido diversas estirpes de *Bacillus mega*terium, aisladas e identificadas por nosotros. La identificación de esta especie bacteriana es sumamente fácil, utilizando el esquema de Bergey (1). Los microorganismos objeto de estudio se hicieron crecer sobre diferentes medios, de los que vamos a destacar dos por la sencillez de su fórmula. Uno contiene, por litro: peptona Difco, 10 g, y agar, 15 g; y el otro, digesto pancreático de caseína Difco, 40 g, y agar, 15 g. Se empleó el sistema de tubos inclinados y la temperatura de incubación fue de 30 °C. Las observaciones se efectuaron semanalmente durante un período de tiempo superior a dos meses.

Los procedimientos de tinción se describen en un trabajo anterior (3) y permiten poner en evidencia la morfología del germen, aun cuando las células estén vacías.

#### RESULTADOS OBTENIDOS

Según los medios empleados se han obtenido resultados diferentes. Ahora bien, hay que destacar que no todas las estirpes se han comportado de igual manera. Así, mientras en unos casos se producían formas muy largas en el medio de peptona, en otros predominaban las formas cortas y redondas. En dicho medio se han observado las formas siguientes: formas cortas y casi redondas (figura 1), formas con los extremos en porra (figura 2), formas con los extremos aguzados (figura 3), formas ramificadas y bífidas (figuras 4-6) y formas largas y en tirabuzón (figuras 7-8). Algunas formas pequeñas recuerdan a las artrosporas a que se refiere Knaysi (5). También pueden observarse formas (figuras 2 y 6) donde se efectúa una división asimétrica, hecho puesto también en evidencia por Knaysi (5).

En el medio que contenía el hidrolizado de caseína, se ha observado en algunas especies el fenómeno de partición y fragmentación del citoplasma hasta quedar reducido a pequeños gránulos (figura 2). En la figura 9 puede verse claramente que en el bacilo que se halla localizado en el centro de la fotografía pueden contarse perfectamente siete gránulos que se encuentran agrupados, observándose gránulos fuera de la célula. La figura 10 muestra bacilos vacíos y deshechos y pueden verse bastantes gránulos sueltos. En este último medio hemos observado la aparición de numerosas colonias secundarias, en algunas de las cuales se hallaba notablemente alterada la morfología de las células. Este hecho de la aparición de colonias secundarias en Bacillus megaterium también ha sido señalado por Knaysi (5), y el estudio de la morfología de los

organismos que las componen será objeto de un próximo trabajo. En este medio, muy raramente se observó la aparición de esporas.

## RESUMEN

En el presente trabajo se describen las formas irregulares que puede adoptar el *Bacillus megaterium* en cultivos antiguos. Se han utilizado diferentes medios. Se emplearon métodos de coloración del autor.

#### **SUMMARY**

In the present paper, the irregular forms of *Bacillus megaterium* on old cultures are described. Different media are employed. Staining methods of the author are used.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 1957. 7.ª edición. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- 2. Chatergee, B. R., y Williams, R. P. 1962. Cytological changes in aging bacterial cultures. J. Bacteriol., 84, 340.
- Fernández, F. 1963. Aplicaciones del rojo congo a la tinción de bacterias. Microbiol. Españ., 16, 255.
- KNAYSI, G. 1933. Morphological and cultural studies of Bacillus megaterium with special reference to dissociation. J. Bacteriol., 26, 623.
- KNAYSI, G. 1951. Elements of bacterial Citology. Comstock Publishing Co. Inc., Ithaca N. Y.

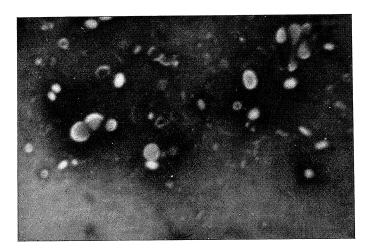


Figura 1

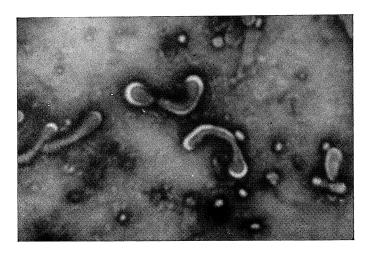


Figura 2

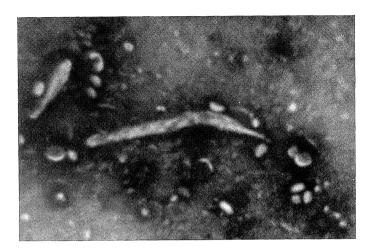


Figura 3

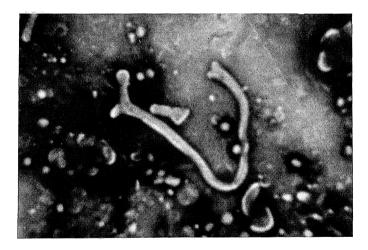


Figura 4



Figura 5

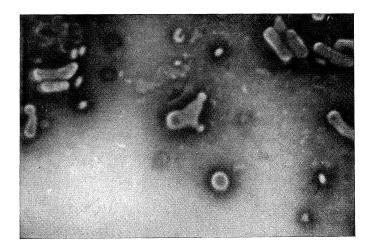


Figura 6

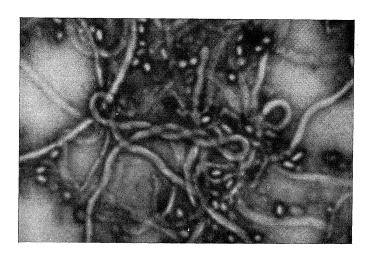


Figura 7

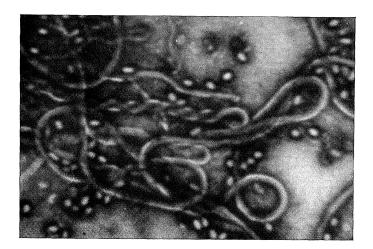


Figura 8

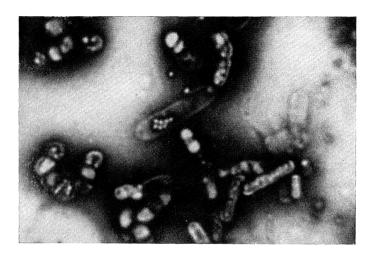


Figura 9

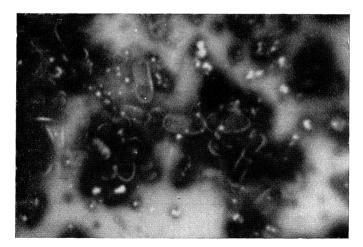


Figura 10

## PREMIO «ALONSO DE HERRERA»

Ha sido concedido el Premio «Alonso de Herrera» 1963, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, al trabajo «Contribución al estudio del virus vacunal», del que son autores los doctores Angel García Gancedo, María Luisa Alonso Puertas, Emilio Ronda Laín, Carmen Gil Fernández, Eduardo Gallardo Martínez (†), Pilar Vilas Minondo y Rosario Zuazo Aguirre, miembros del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Depósito Legal: M. 702. - 1958.