

---

VOLUMEN 20. 1967

ENERO - JUNIO. NUMEROS 1 - 2

# *Microbiología Española*

*Revista*

*del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología  
y de la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

## MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

CALLE DE JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 200 PTA; extranjero, 300 PTA

Número: España, 60 PTA; extranjero, 90 PTA

---

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

- ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología, «José María Albareda». Madrid). Mensual. Suscripción: España, 430 PTA; extranjero, 540 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 50 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, 60 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 200 PTA; extranjero, 250 PTA. Número: España, 220 PTA; extranjero, 270 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero. 200 PTA. Número: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA.
- ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería) Semestral. Suscripción: España, 60 PTA; extranjero, 75 PTA. Número: España, 75 PTA; extranjero, 100 PTA.
- ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 200 PTA; extranjero, 480 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 180 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, 70 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 80 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, 150 PTA; extranjero, 210 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.
- GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 100 PTA; países restantes, 160 PTA. Número: España y Portugal, 30 PTA; países restantes. 45 PTA
- PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 200 PTA; extranjero, 300 PTA. Número: España, 75 PTA; extranjero, 100 PTA.



Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirectores: Prof. Gerardo Clavero, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Titulado Superior de 1.ª del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

---

## INDICE

	Página
El empleo de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana, por <i>A. Ramos</i> y <i>V. Callao</i> ... ..	1
Producción de oxiclrororafina y un glucolípido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y actividad antimicrobiana de la oxiclrororafina, por <i>F. Reyes</i> ... ..	13
Valoración de la antibioticorresistencia derivada del empleo <i>in vitro</i> de asociaciones antibióticas no sinérgicas, por <i>M.ª Teresa Pérez-Ureña</i> ... ..	19
Utilización de distintas fuentes de carbono y de nitrógeno por levaduras, por <i>J. L. Fernández-Puentes</i> y <i>J. Pérez-Silva</i> ... ..	37
Contribución al estudio del metabolismo del triptofano por <i>Escherichia coli</i> . I. Empleando medios con glucosa y sin glucosa y en condiciones aeróbicas, por <i>Fanny N. Ola</i> y <i>Ceferina R. Ordóñez</i> ... ..	53
La lisis producida por el ácido $\gamma$ -2, 4-diclorofenoxibutírico sobre cultivos de algunas bacterias del género <i>Bacillus</i> , por <i>María Román</i> y <i>Cándida González</i> ... ..	63
Resistencia térmica de diferentes especies de <i>Clostridium</i> , aisladas de salmueras de aceitunas verdes aderezadas alteradas, por <i>F. González-Cancho</i> y <i>M. J. Fernández-Diez</i> ... ..	73
El IX Congreso Internacional de Microbiología ... ..	81
El VI Congreso Internacional de Microscopía Electrónica ... ..	83
Bibliografía, por <i>A. García-Gancedo</i> ... ..	85

C. S. I. C.  
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN. GRANADA

## EL EMPLEO DE LA SOLUBILIZACION DE FOSFATOS EN PLACA COMO TECNICA DIFERENCIAL BACTERIANA

por

A. RAMOS y V. CALLAO

A primeros de siglo se detectaron por primera vez gérmenes capaces de solubilizar fosfatos (7), incrementándose a partir de este momento las investigaciones bajo el punto de vista de aplicación en la mejora del suelo y relación con los vegetales (1-2 y 9), o en la valoración de las técnicas empleadas en el estudio de la solubilización del fósforo por los microorganismos (4-5).

Pretendemos, en el presente estudio, juzgar la importancia que pueda tener la aplicación de tal técnica al estudio diferencial de gérmenes, basándonos en que tal solubilización de fosfatos, al ser causada como consecuencia de la formación de ácidos en el metabolismo de las bacterias, podría servir como sistema indicador.

### MATERIAL Y METODOS

En la realización del trabajo se estudian una serie de bacilos gram-negativos, 183, aislados en orinas infectadas (6) y clasificados con arreglo a la sistemática de Bergey; 6 *Pseudomonas savastoni* (de ellos, una raza fue enviada desde Madrid y otra es procedente de Lausana); así como 17 cepas distintas de *Pseudomonas* aislados del suelo.

En todos ellos se estudió previamente su actuación sobre la glucosa

en el medio de Hugh y Leifson (3), con el fin de investigar la formación de ácidos y el mecanismo bioquímico de la misma (oxidativa o fermentativamente).

El medio ensayado por nosotros para observar la solubilización de fosfatos fue el siguiente:

Agar	22 g
Extracto de levadura	2 g
Glucosa	20 g
Agua	1.000 ml

El pH del medio es, aproximadamente, 7.

El medio preparado se llevaba a fundir y se repartía en tubos conteniendo 10 ml, que se esterilizaban al autoclave. Antes de tender la placa, se les añadía la glucosa estéril y 1 ml de una suspensión de fosfato bicálcico (puede usarse el tricálcico, indistintamente) preparada al 1 por ciento en goma arábica al 0,5 por ciento; esta suspensión de fosfato se mantuvo en agitación durante un día, para conseguir una perfecta homogeneización del fosfato (11). En las placas sembramos el germen en forma masiva, tal como puede apreciarse en cualquiera de las figuras.

También usamos el mismo medio anteriormente descrito, en el que sustituimos la glucosa por el gluconato potásico o por diversos azúcares; utilizando como comprobante en cualquiera de los casos el medio de Hugh y Leifson. También sembramos los gérmenes en el medio de Shaw y Clarke (8), para observar la utilización del gluconato, empleando como reactivo indicador la solución de Benedict.

## RESULTADOS

En el *cuadro 1* exponemos los datos correspondientes a la solubilización de fosfatos en placa: todos los gérmenes que produjeron solubilización también formaron ácidos a partir de la glucosa en el medio de Hugh y Leifson, apreciándose que cuando la solubilización del fosfato bicálcico fue tardía, también fue tardía la producción de ácidos en el medio de Hugh y Leifson, correspondiéndose los tiempos de actuación.

La figura 1 nos indica el grado de solubilización de acuerdo con el tamaño de halo que se manifestó a las veinticuatro horas. Los signos que empleamos fueron: +++ = solubilización muy intensa; ++ = solubilización intensa; + = ligera solubilización, y — = ausencia de solubilización.

En los medios de cultivo con gluconato no se produjo solubilización, aunque los gérmenes que utilizaban el gluconato acidificaran el medio.

Cuadro 1. Solubilización del fosfato bicálcico en medios con glucosa

Microorganismo	Grado de solubilización			Solubili- zación	Ausencia
	+	++	+++	tardía	—
<i>Escherichia coli</i>	4	42	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	0	0	15	0	0
<i>Aerobacter</i>	4	3	0	0	0
<i>Proteus</i>	22	2	0	0	0
<i>Pseudomonas aerugi- nosa</i>	0	7	29	0	0
<i>Escherichia freundii</i>	5	14	4	0	0
<i>Paracolobactrum</i>	2	23	0	0	0
<i>Ps. savastoni</i>	1	1	0	3	1
<i>Pseudomonas</i> spp. (suelo)	0	3	14	0	0
Varios (*)	0	0	0	0	7
Totales	38	95	62	3	8

(\*) En el grupo Varios incluimos aquellos gérmenes que no tuvieron acción sobre la glucosa, ni oxidativa, ni fermentativamente.

Las pruebas de utilización del gluconato dieron positivas para los *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Pseudomonas* aislados del suelo. Tan sólo en dos especies de *Aerobacter* se puso amarillento el medio de cultivo con gluconato, al agregarle el reactivo de Benedict y calentar a ebullición durante diez minutos, sin llegar al color anaranjado típico

de los *Klebsiella* y *Ps. aeruginosa*. Las cepas de *Ps. savastanoi* ensayadas fueron negativas.

Los gérmenes que acidificaban el medio de Hugh y Leifson a partir de azúcares diferentes a la glucosa, también producían solubilización de los fosfatos en placa, en presencia de estos azúcares.

### COMENTARIOS

La aplicación de la solubilización de fosfatos como técnica bacteriológica en el estudio de la acción microbiana sobre los azúcares es de fácil consecución. Une a la ventaja de sencillez en la preparación del medio de cultivo la de una visualización completa de la actuación bacteriana sobre los glúcidos, pudiéndose investigar en una misma placa ocho cepas bacterianas a la vez, e incluso más. La validez del método es total, puede que con las excepciones de gérmenes que posean acción directa sobre fosfatos minerales insolubles, concretamente el fosfato bicálcico; o que produzcan ácidos inorgánicos capaces de solubilizar por este mecanismo al fosfato bicálcico. La investigación de tales gérmenes constituiría motivo de confusión; sin embargo, tal posibilidad de confusión también existe en los medios en los que se usa un indicador de cambio de acidez, que son la mayoría de los utilizados. Sin embargo, en nuestro caso, siempre es sencillo operar con un testigo; bastaría utilizar el mismo medio de cultivo desprovisto del azúcar, y en el supuesto de que en tales condiciones se originase solubilización nos haría pensar en causas distintas a las de la actuación sobre el azúcar. En realidad, no es necesaria tal precaución, pues creemos que en el 99 por ciento de los casos la probabilidad de que esto ocurra es nula.

Independientemente de tal aplicación anterior, el método puede tener validez como diferenciador de géneros y especies; concretamente, observamos mayor solubilización en el género *Klebsiella* que la originada por el *Aerobacter*; en las figuras 2-3 se observan perfectamente señaladas estas diferencias. Esta causa, junto con el hecho de que el *Pseudomonas aeruginosa* y los *Pseudomonas* aislados del suelo (figura 4) produjeran una mayor intensidad en el halo de disolución, nos lleva a admitir como cierta la existencia de diferencias bioquímicas de los *Klebsiella* en relación con los *Aerobacter*. La posible vía metabólica sería la de producción de ácido glucónico, o alguno de sus cetoácidos derivados;

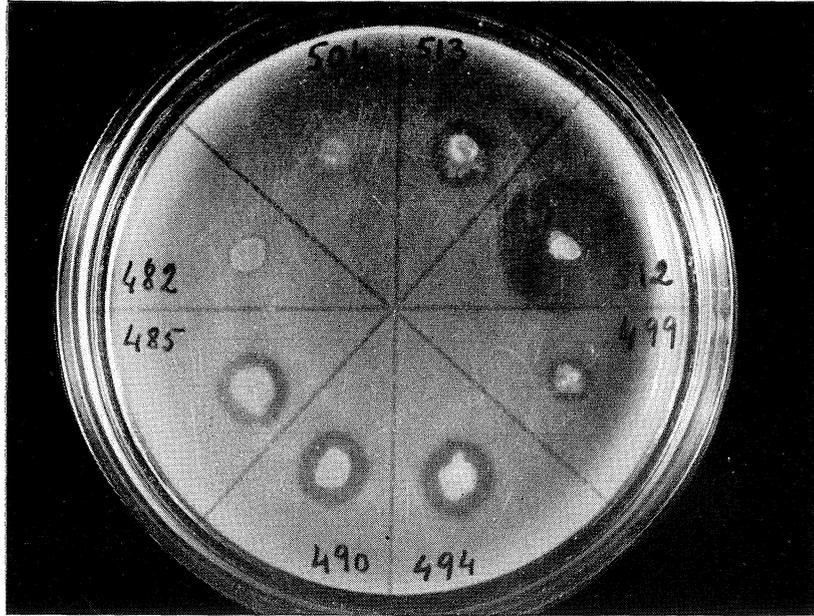


Figura 1. +++ = 512 (Klebsiella). ++ = 513, 499, 494, 490 y 485. + = 482 (Escherichia). - = 504 (Anitratum)

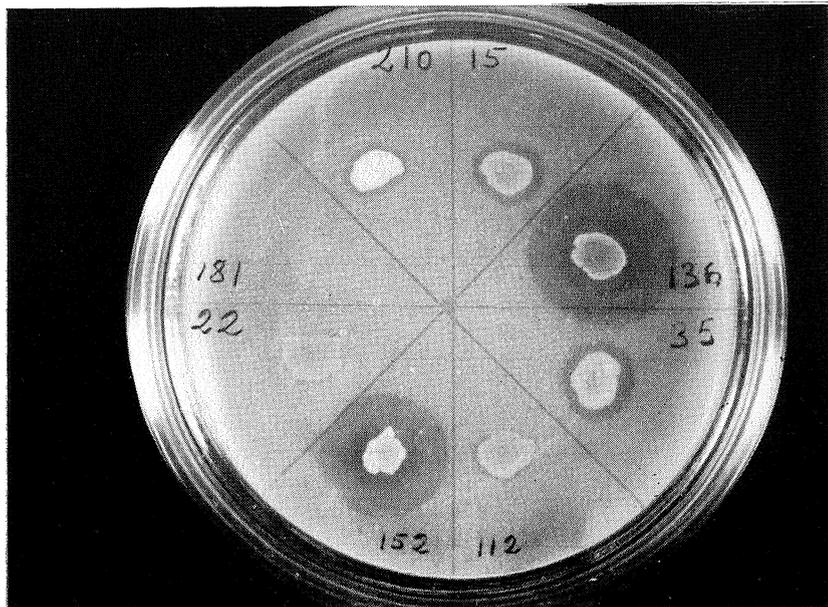


Figura 2. 136 y 152 = Klebsiella. 210 y 35 = Escherichia. 15 = Aerobacter. 22 y 112 = Proteus. 181 = No hubo crecimiento. Lectura a las veinticuatro horas

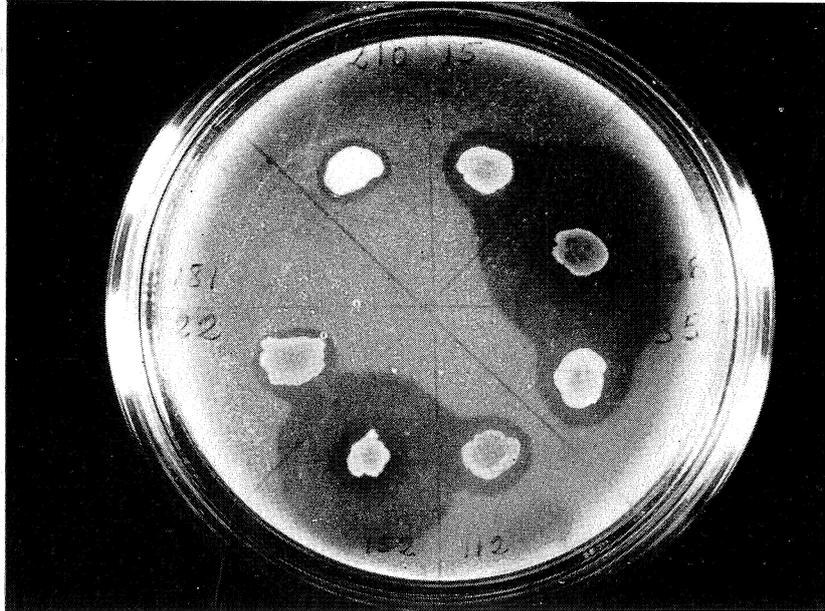


Figura 3. Los mismos gérmenes de la figura 2. Puede apreciarse una doble zona de solubilización. Lectura a las cuarenta y ocho horas

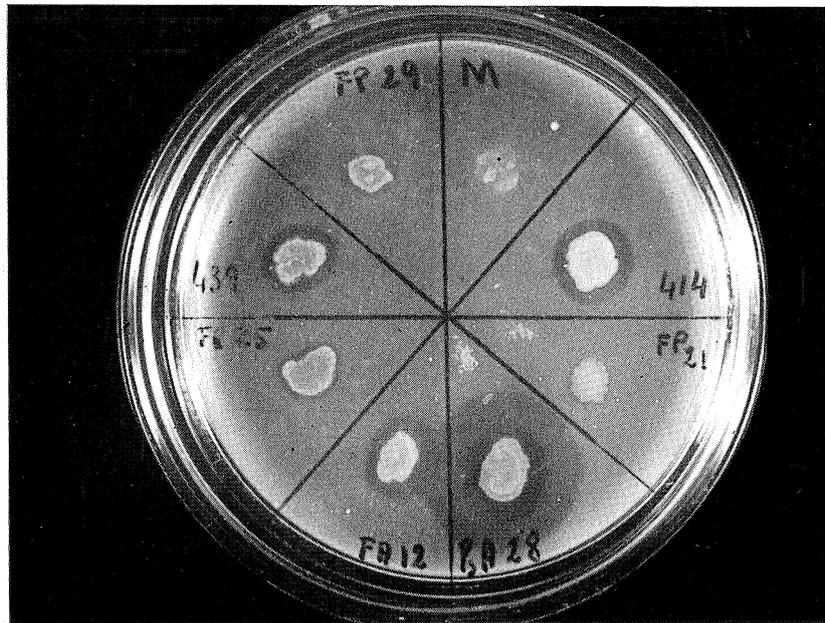


Figura 4. PsA28 = Pseudomonas aeruginosa. FP21 = Proteus. FA12 = Aerobacter. FP25 y FP29 = Proteus. 414 = Escherichia. 439 = Paracolobactrum. M = Ps. savastanoi

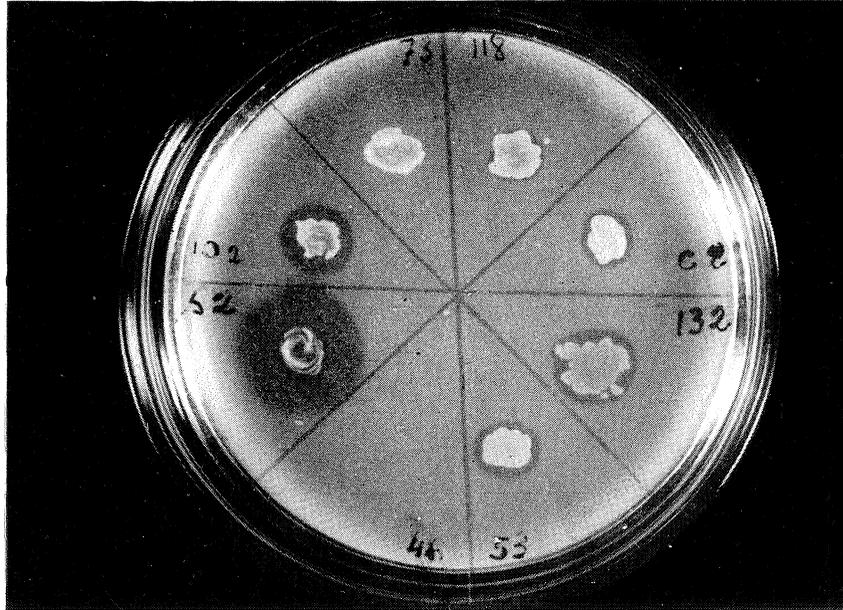


Figura 5. 52 = Klebsiella. 102, 132, 53 y c2 = Escherichia. 118 = Proteus. 73 = Anitratum (Bacterium). 46 = Sin desarrollo

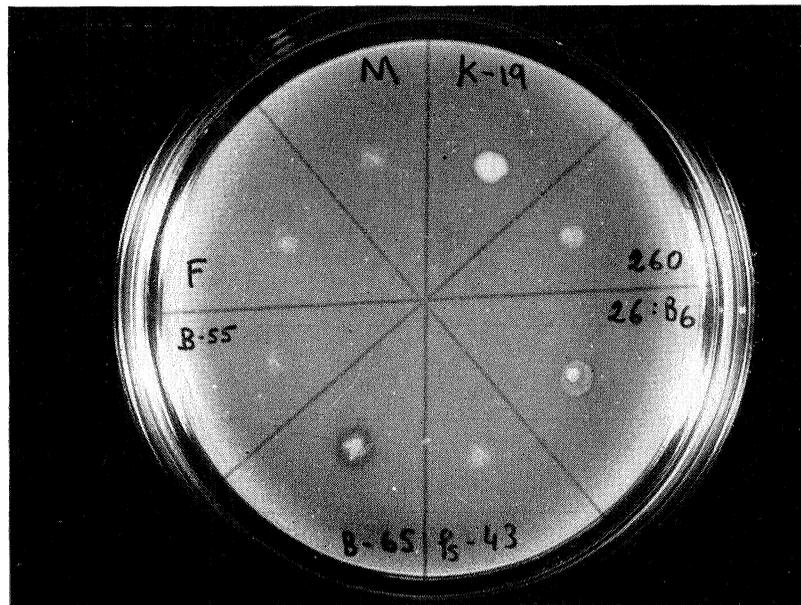


Figura 6. K-19 Aerobacter. 260 = Mima. 26:B6 = Escherichia coli. Ps-43, B-65 y B-55 = Pseudomonas savastanoi. F = Ps. savastanoi (Lausana). M = Ps. savastanoi (Madrid). Lectura a las ocho horas

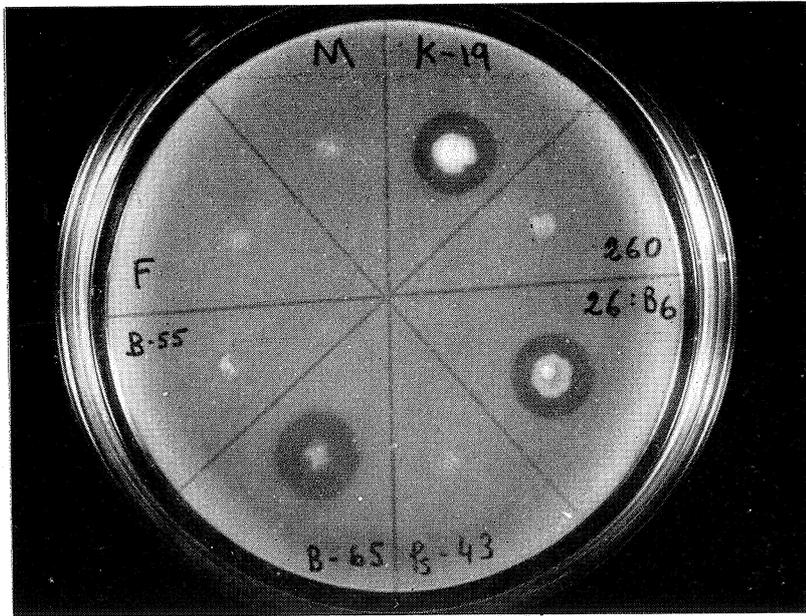


Figura 7. Los mismos gérmenes de la figura 6. Lectura a las veinticuatro horas

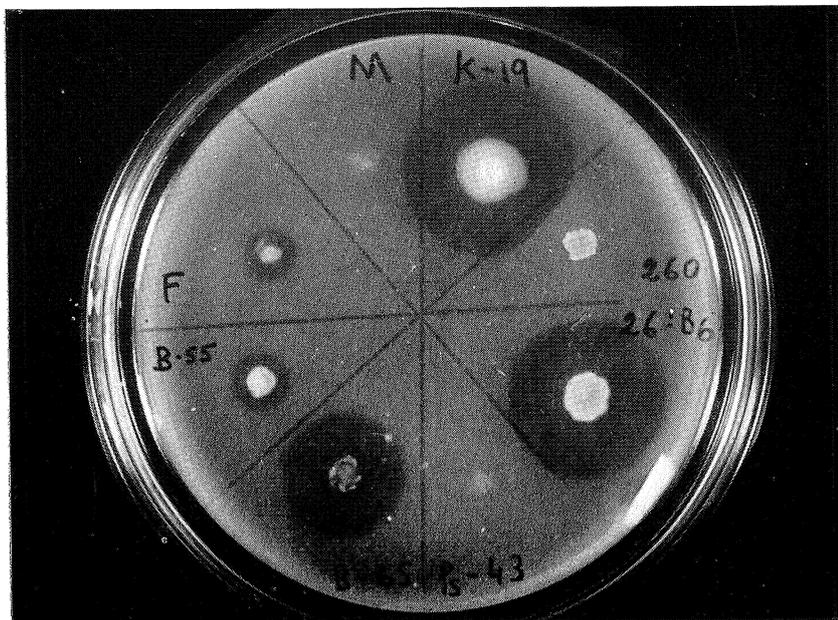


Figura 8. Los mismos gérmenes de la figura 6. Lectura a las ciento veinte horas

pues precisamente al ácido 2-cetoglucónico se le atribuye la solubilización de fosfatos en el suelo (12), sin descartar la posibilidad de solubilización debida a otros ácidos (10), que sin duda debe ser de menor intensidad.

Debemos añadir que la solubilización no se debe a los ácidos originados en el metabolismo del gluconato, pues utilizando este compuesto en medios de cultivo con fosfatos no apareció solubilización, aunque el germen fuera capaz de producir ácidos a partir del gluconato, como ocurrió en bastantes de las cepas ensayadas.

Hecho curioso y destacable fue la formación de un doble halo correspondiente a los gérmenes *Pseudomonas* (figura 4) y *Klebsiella* (figuras 2-3 y 5); la explicación más probable, de acuerdo con las anteriores consideraciones, sería la de que tales microorganismos siguieran una doble vía metabólica.

En relación con las diferencias expuestas entre los géneros *Aerobacter* y *Klebsiella*, puede indicarse que la cifra de gérmenes utilizados no es suficiente para dar resultados categóricos, pero sí que resulta significativa de que tales diferencias existen, aunque muchos autores los consideren como único género.

El método no sólo tiene aplicación en el caso de la glucosa, sino que también es satisfactorio respecto a otros azúcares (maltosa y sacarosa), hecho que comprobamos experimentalmente viendo que siempre que se originaba acidez en el medio de Hugh y Leifson también apreciábamos solubilización en placa. Pudimos comprobar en todos los casos una manifiesta correlación, es decir, que cuando la solubilización de fosfatos ocurría al cuarto día, aproximadamente en esa fecha se apreciaba viraje del indicador en el medio de Hugh y Leifson; con la enorme ventaja de que las dudas que con el uso de indicadores pueden ocurrir respecto a la tonalidad exacta de color en los casos de una acción tardía, desaparecen con la técnica de solubilización de fosfatos en placa, en la que tan sólo existen las posibilidades de disolución o no disolución, sin grados intermedios. Mientras que en todos los métodos hasta el momento existentes se emplean virajes de indicador, observándose franquicia cuando la producción de ácidos es intensa, pero no en los casos de acidificación lenta, en los que resulta difícil apreciar cuándo se produce el viraje, no sólo por la lentitud del proceso, sino por causas correspondientes a metabolitos secundarios. En las figuras 6-8 se aprecia claramente lo ante-

riormente expuesto, con la observación de halos de aclaramiento totales, aunque la solubilización ocurriera de forma tardía.

Nos interesa señalar varias precauciones que deben aplicarse al utilizar el método. Una, bastante interesante, se refiere al modo de realizar la siembra; la cantidad a tomar con el asa de platino debe ser la que se adhiera al asa al tocar la colonia, sin tomar volúmenes excesivos; una modificación pequeña apenas influye, pero creemos que sí pueden influir diferencias grandes. No obstante, puede que más interesante que la precaución anterior sea la de realizar una lectura diaria, pues las diferencias en relación con el tiempo son verdaderamente extraordinarias; baste considerar las *figuras* 6-8, correspondientes al mismo medio de cultivo con los mismos gérmenes sembrados, pero en tiempos distintos (respectivamente, a las ocho, veinticuatro y ciento veinte horas. El halo del *Escherichia coli* (26:B6, a las veinticuatro horas), tiene un tamaño correspondiente a las ++; sin embargo, realizada la lectura a las ciento veinte horas, deberíamos incluirlo en el grupo de +++; y, si por el contrario, la lectura la hubiéramos realizado a las ocho horas se correspondería con el +. Sin embargo, no habría inconveniente en realizar la lectura tardía si sólo nos interesara la solubilidad o formación de ácidos a partir del azúcar, ya que en este caso no tendría importancia el tamaño del halo; pero existe otra posibilidad que indicamos en las *figuras* 2-3; en ellas puede apreciarse la existencia de dos gérmenes muy solubilizadores, correspondiéndose la segunda de las *figuras* al mismo cultivo de gérmenes, pero a las cuarenta y ocho horas se observa en ella un incremento en el tamaño de halo que puede dificultar la observación de si existieron o no halos en relación con los gérmenes próximos a estos dos considerados.

#### RESUMEN

Se exponen las ventajas e inconvenientes que podría tener la aplicación de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana en el estudio de la acción microbiana sobre los azúcares.

El método se ensayó frente a 206 gérmenes gram-negativos, comprobándose la exactitud del mismo comparativamente con la actuación de estos gérmenes en el medio de Hugh y Leifson (3).

El procedimiento aprecia más claramente la formación de ácidos a

partir de los glúcidos que aquellos métodos en los que se utiliza el viraje de indicadores, sobre todo cuando la formación de ácidos es tardía, aunque no se pueda diferenciar si los gérmenes actúan oxidativa o fermentivamente.

Además, el método puede servir para la diferenciación de las especies bacterianas; concretamente, se observaron diferencias entre los géneros *Aerobacter* y *Klebsiella*.

#### SUMMARY

The advantages and disadvantages that the application of phosphate solubilization on plate could have as a differential bacterial technique in the study of the microbiological action on sugars, are exposed.

The method was tested against 206 Gram negative organisms, proving its accuracy in comparison with the behaviour of these organisms in the Hugh and Leifson medium (3).

The procedure identified the formation of acids from carbohydrates more clearly than those methods in which use is made of turn of indicators, especially when acid formation is delayed, even though it can not be distinguished whether the organisms act oxidatively or fermentatively.

Furthermore, the method can be used for the differentiation of bacterial species; concretely were observed between *Aerobacter* and *Klebsiella*.

#### BIBLIOGRAFIA

1. GELOWIOSKA, J. 1956. A method of investigation of microbial population playing a part in the transformation of phosphorus compounds in soil. *Acta Microbiol. Polon.*, 5, 125.
2. GERRETSEN, F. C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate uptake by the plants. *Plant Soil*, 1, 51.
3. HUGH, R., y LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gramnegative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66, 24.
4. JOHNSTON, H. W. 1951. Arrangement to Gerretsen's technique for the preparation of plates used for phosphate dissolving microorganisms. *Plant Soil*, 3, 94.

5. LOUW, H. A., y WEBLEY, D. M. 1959. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. *J. Appl. Bacteriol.*, 22, 227.
6. RAMOS, A. 1964. Estudio bacteriológico de las infecciones urinarias producidas por gérmenes gram-negativos en la provincia de Granada. *Ars. Pharm.*, 6, 387.
7. SACKETT, W. C.; PATTEN, A. J., y BROWN, C. W. 1908. The solvent action of soil bacteria upon the insoluble phosphates of raw bone meal and natural raw rock phosphate. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II*, 28, 688.
8. SHAW, C., y CLARKE, P. H. 1955. Biochemical classification of *Proteus* and Providence cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 13, 155.
9. SPERBER, J. I. 1957. Solution of mineral phosphates by soil bacteria. *Nature*, 180, 994.
10. STEWART, D. J. 1959. Production of 5-ketogluconic acid by species of *Pseudomonas*. *Nature*, 183, 1.133.
11. WEBLEY, D. M. 1960. Evaluation of the plate technique in use for studying phosphate dissolving microorganisms. *Trans. Intern. Congr. Soil Sci. 7th Madison*, III, 657.
12. WEBLEY, D. M., y DUFF, R. B. 1965. The incidence in soils and in other habitats of microorganisms producing 2-ketogluconic acid. *Plant Soil*, 22, 307.

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

PRODUCCION DE OXICLORORAFINA  
Y UN GLUCOLIPIDO POR *PSEUDOMONAS*  
*AERUGINOSA* Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA  
DE LA OXICLORORAFINA

por

F. REYES

INTRODUCCION

La clororafina fue considerada como un metabolito exclusivo de *Pseudomonas chlororaphis*, hasta que Birkofer, en 1947 (1), halló cristales de oxiclolorafina en un cultivo de *Ps. aeruginosa*. Sierra y Veringa (9) y Takeda (11), trabajando independientemente, fueron los primeros investigadores que confirmaron el trabajo de Birkofer. En 1962, Haynes y Rhodes (4) observaron que varias cepas productoras de cristales de clororafina y oxiclolorafina que habían sido erróneamente clasificadas como *Ps. chlororaphis*, eran realmente *Ps. aeruginosa*.

Purificada la oxiclolorafina no parece tóxica al ser inyectada a animales de experimentación (3 y 9). Este compuesto presenta actividad antibacteriana débil (6). Inhibe fuertemente el crecimiento de varios mohos patógenos causantes de candidiasis y otras micosis (9), microorganismos patógenos de plantas (11) y el virus encefalítico equino Oeste (3).

Debido a sus interesantes propiedades antibióticas y con el fin de estudiar más extensamente su acción biológica, nosotros intentamos producir este compuesto con mejor rendimiento que el conseguido hasta

ahora. Para ello estudiamos su producción por varias estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*. Simultáneamente se estudió en el mismo líquido metabólico, la producción por estas estirpes de un glucolípido aislado primeramente por Jarvis y Johnson (5) y de estructura establecida recientemente por Edwards y Hayashi (2), como el 2-o- $\alpha$ -l-ramnopiranosil- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato. Su efecto hemolítico fue estudiado por Sierra (8).

## MATERIALES Y METODOS

### *Microorganismos*

En este trabajo hemos utilizado las siguientes estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*:

ATCC. Estirpe, 14.885, productora de clororafina y oxiclolorafina, descrita por Sierra y Zagt (10).

NRRL. Estirpes, B-1.682, B-79, B-1.684, B-1.718, B-1.731, B-1.732, B-1.739, B-1.745, B-2.160 (\*).

CICC. Estirpes, 422, y 424 (\*\*).

Las estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* y las bacterias utilizadas para ver la acción antibiótica se conservaron en agar común; las levaduras, en saboureau, y los hongos, en czapek-dox.

### *Medida del poder antimicrobiano de la oxiclolorafina*

Los microorganismos se cultivaron en placa, en los medios indicados anteriormente y en presencia de solución de oxiclolorafina contenida en pocillos realizados en las placas. La actividad viene determinada por el diámetro del halo de inhibición producido.

### *Aislamiento y purificación del glucolípido*

El glucolípido se aisló y purificó por el procedimiento descrito por Jarvis y Johnson (5), siendo recristalizado en éter de petróleo de 30°-60 °C.

(\*) Recibidas por cortesía del Dr. W. C. Haynes, Northern Utilization Research and Development Division, Departamento de Agricultura, Peoria, Illinois (Estados Unidos de América del Norte).

(\*\*) Recibidas por cortesía del Dr. P. Hauduroy, Centre International de Collection de Cultures, Lausanne (Suiza).

PARTE EXPERIMENTAL

*Producción, aislamiento y purificación de la oxiclrorafina*

El medio de cultivo empleado tiene la siguiente composición:

Extracto de carne Liebig	0,3 g
Bacto-peptona (Difco)	4,0 g
Glicerina	3,0 ml
Agua destilada	100 ml
pH final, 7	

La glicerina se esterilizó aparte a 110 °C, durante veinte minutos y el resto del medio de cultivo a 120 °C, durante treinta minutos.

Como inóculo se emplearon 40 ml de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, de veinticuatro horas, crecido en agitación, a 28 °C, para 1 l de medio de cultivo estéril, contenido en un matraz de 6 l de capacidad.

La producción máxima se consiguió entre los cinco y siete días de incubación, a 28 °C, cuando el cultivo fue sometido a un movimiento de vaivén con desplazamiento de 15 cm y frecuencia de 60 períodos/min.

En el *cuadro 1* se exponen los resultados de estos experimentos.

*Cuadro 1. Producción de oxiclrorafina y glucolípido por diferentes estirpes de Pseudomonas aeruginosa, a los seis días*

Estirpe	Oxiclororafina Gramos/litro	Glucolípido Gramos/litro
B- 79	0,3	0,10
14.885	0,1	0,10
B-1.718	0,1	0,05
B-1.739	0,1	0,02
B-1.745	0,1	0,05
B-1.682	0,0	0,00
B-1.684	0,0	indicios
B-1.731	0,0	indicios
B-1.732	0,0	0,10
B-2.160	0,0	0,00
422	0,0	0,00
424	0,0	0,02

La estirpe B-79 fue la mejor productora de oxiclrorafina y glucolípido. Queremos hacer notar que todas las estirpes productoras de clrorafina y oxiclrorafina producen también glucolípido.

*Actividad antimicrobiana de la oxiclrorafina*

El *cuadro 2* indica el efecto de la oxiclrorafina sobre varias levaduras.

*Cuadro 2. Efecto de la oxiclrorafina sobre algunas levaduras. Oxiclrorafina: 50 µg/ensayo*

Microorganismo	Diámetro del halo de inhibición Milímetros
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1	30
<i>Sac. rosei</i> 2	26
<i>Sac. globosus</i> 5	20
<i>Sac. pastori</i> 6	25
<i>Sac. cerevisiae</i> 10	20
<i>Sac. cerevisiae</i> 125	20
<i>Sac. cerevisiae</i> 126	20
<i>Sac. cerevisiae</i> 178	22
<i>Sac. cerevisiae</i> 209	20
<i>Sac. cerevisiae</i> 246	20
<i>Sac. cerevisiae</i> 274	22
<i>Sac. cerevisiae</i> 278	22
<i>Sac. cerevisiae</i> 281	25
<i>Sac. cerevisiae</i> 284	24
<i>Sac. cerevisiae</i> 312	25
<i>Candida albicans</i> 193	22
<i>Sporobolomyces</i> 45	20

La misma concentración de oxiclrorafina (50 µg) producía un ligero halo de inhibición frente a los microorganismos *Trichothecium roseum*

40, *Mucor sphaerosporus* 41, *Saccharomyces carlsbergensis* 3, *Saccharomyces carlsbergensis* 4, *Penicillium claviforme* 39, *Penicillium notatum* 21, *Aspergillus oryzae* 6, *Aspergillus niger* 3, *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium phlei*.

No se detectó actividad frente a los microorganismos siguientes: *Aspergillus terreus*, *Penicillium roqueforti*, *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium*, *Saccharomyces rouxii* y *Saccharomyces chevalieri*.

### DISCUSION

La producción de oxiclrorafina y glucolípido por *Pseudomonas aeruginosa* no es una propiedad característica de esta bacteria. Algunas de sus estirpes producen estos compuestos, mientras que otras no los producen.

El rendimiento conseguido con cualquiera de las estirpes productoras de oxiclrorafina por el procedimiento descrito, fue mucho más alto que cualquiera de los obtenidos anteriormente y descritos en la literatura con la misma bacteria. Así, Birkofer obtuvo un rendimiento de 5-16 mg/l y Takeda, de 35 mg/l.

Aunque la oxiclrorafina es un antibiótico débil contra bacterias, otros trabajos y el nuestro nos permiten considerar a este compuesto como un antibiótico eficaz frente a hongos.

### RESUMEN

Se describe la producción de oxiclrorafina y de un glucolípido por diferentes estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*. Los rendimientos de oxiclrorafina obtenidos con las estirpes productoras fueron muy superiores a los previamente descritos para el mismo microorganismo. Asimismo, se prueba que la oxiclrorafina es un potente antibiótico frente a diversas levaduras.

### SUMMARY

The production of oxy-chlororaphin and a glycolipid for different strains of *Pseudomonas aeruginosa* is described.

The yield of oxy-chlororaphin obtained from these strains was higher than the previously described for the same microorganism. Also, it is shown that the oxy-chlororaphin is a strong antibiotic against different kinds of yeasts.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BIRKOFER, L. 1947. *Chem. Ber.*, 80, 212.
2. EDWARDS, J. R., y HAYASHI, J. A. 1965. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 415.
3. GARCÍA-GANCEDO, A., y SIERRA, G. 1959. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 25, 350.
4. HAYNES, W. C., y RHODES, L. 1962. *J. Bacteriol.*, 84, 1.080.
5. JARVIS, F. G., y JOHNSON, M. J. 1949. *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 4.124.
6. McILWAIN, H. 1941. *Nature*, 148, 628.
7. SIERRA, G. 1958. *Nature*, 182, 265.
8. SIERRA, G. 1960. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 2, 189.
9. SIERRA, G., y VERINGA, H. A. 1958. *Microbiol. Españ.*, 3, 199.
10. SIERRA, G., y ZAGT, R. 1960. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 26, 193.
11. TAKEDA, R. 1958. *J. Ferment. Technol.*, 36, 286.

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

## VALORACION DE LA ANTIBIOTICORRESISTENCIA DERIVADA DEL EMPLEO *IN VITRO* DE ASOCIACIONES ANTIBIOTICAS NO SINERGICAS

por

M.ª TERESA PÉREZ-UREÑA

Atraídos por el problema que el empleo de asociaciones antibióticas puede representar para la antibioticorresistencia de carácter evolutivo y después de valorar la resistencia resultante de interacciones sinérgicas en bacterias gram-positivas (1) y gram-negativas (2), hemos querido estudiar las modificaciones que se producen en el comportamiento de los microorganismos frente a distintos antibióticos, cuando han estado sometidos a asociaciones de drogas entre las que no existe sinergismo. Estos resultados podrán dar una respuesta a los fracasos obtenidos en el uso indiscriminado de las asociaciones antibióticas.

### MATERIAL Y METODOS

Los *microorganismos* sobre los que se realizó este estudio fueron quince especies bacterianas patógenas, procedentes de la clínica, y que pertenecen a los siguientes géneros: *Staphylococcus*, 7; *Streptococcus*, 4, y *Aerobacter*, 4.

Se han utilizado quince *antibióticos* distintos y tres tipos de *medios de cultivo*. Todos ellos fueron indicados previamente (1) y lo mismo

podemos decir de la *marcha del trabajo* y de las *técnicas* empleadas (1-2).

Estos ensayos se realizaron sobre cuatro asociaciones antibióticas distintas; frente a ellas y a sus componentes aislados se adaptaron, *in vitro*, las distintas cepas bacterianas para después realizar estudios comparativos del espectro de sensibilidad de las estirpes obtenidas.

## RESULTADOS

En primer lugar, en el *cuadro 1*, aparece el protocolo de trabajo indicando las asociaciones antibióticas, las bacterias y el tipo de interacción; después se recogen los resultados de los ensayos de adaptación (*cuadros 2-5*) y los de las variaciones en el espectro de sensibilidad (*cuadros 6-9*).

*Cuadro 1. Protocolo de las experiencias realizadas*

Experiencias	Asociaciones antibióticas	Bacterias	Interacción resultante
I	Tetraciclina + eritromicina	<i>Streptococcus faecalis</i> cepas P73, 87, 88 y 90	Antagonismo
II	Clorotetraciclina + oleandomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> cepas P107, 110, 103	Aditividad
III	Neomicina + ristocetina	<i>Staphylococcus aureus</i> cepas P16, 28, 57 y 103	Antagonismo
IV	Colimicina + paromomicina	<i>Aerobacter aerogenes</i> cepas P12, 19, 47 y 48	Aditividad

## DISCUSION

En cuanto a la implantación de resistencia, hemos tenido ocasión de observar que, así como en los casos de sinergismo, los niveles de antibioco-resistencia frente a las asociaciones eran de mucha menor inten-

sidad, en las interacciones antagónicas, las resistencias se producen más rápidamente y en algunos casos llegan incluso a alcanzar niveles más elevados. Cuando se trata de combinaciones de drogas entre las que hay interacción aditiva, la resistencia resultante siempre es de menor intensidad que cuando intervienen sus componentes aislados.

Una vez más se comprueba variabilidad en los resultados de la interacción durante las distintas fases de la adaptación *in vitro*, ya que si aplicamos la fórmula de Welch (3) para hacer el diagnóstico, el índice de interacción no se mantiene constante.

También aquí se produce antibioticorresistencia múltiple, quizá por un fenómeno semejante al de resistencias cruzadas, originado entre los componentes de la asociación y otras drogas con las que existe algún parentesco químico. Esta resistencia múltiple parece de mayor intensidad y ello puede ser debido a una disminución de la actividad antimicrobiana por el carácter antagónico de algunas asociaciones.

A diferencia de lo observado frente a interacciones antibióticas de carácter sinérgico, puede decirse que, prácticamente, no existen incrementos de antibioticosensibilidad colateral, ya que tan sólo en contadas ocasiones se ha encontrado un ligero aumento de sensibilidad a polimixina y kanamicina en asociaciones aditivas.

Y finalmente, en relación con la persistencia del estado antibioticorresistente, creemos que éste podría llegar a desaparecer, pero es más lenta la disminución del nivel de resistencia que en el estudio precedente (2); claro que quizá estas diferencias sean consecuencia de las diferencias de nivel normales entre asociaciones de distinta eficacia antimicrobiana.

*Cuadro 2. Series de adaptación a la antibioticorresistencia de cepas de estreptococos del grupo D frente a tetraciclina, eritromicina y sus asociaciones. Variaciones en las C. M. I., según las distintas resiembras, cada cuarenta y ocho horas*

Resiembra	Cepa P73			Cepa P87			Cepa P88			Cepa P90		
	Serie tet.	Serie erit.	Serie tet. + erit.	Serie tet.	Serie erit.	Serie tet. + erit.	Serie tet.	Serie erit.	Serie tet. + erit.	Serie tet.	Serie erit.	Serie tet. + erit.
Inic.	11,25	5,62	16,08 + 8,40	1,40	2,81	4,20 + 8,40	5,62	4,68	8,4 + 8,4	2,81	0,70	8,4 + 2,10
1. <sup>a</sup>	16,80	8,40	22,50 + 11,25	2,81	11,25	5,62 + 11,25	5,62	4,20	16,8 + 16,8	2,81	0,50	16,8 + 4,20
2. <sup>a</sup>	22,50	33,70	33,70 + 16,80	2,81	33,70	8,40 + 16,80	5,62	4,20	45,0 + 45,0	2,81	0,50	8,4 + 2,81
3. <sup>a</sup>	33,70	45,00	45,00 + 22,50	8,40	67,50	11,25 + 22,50	5,62	8,40	33,7 + 33,7	5,62	1,40	8,4 + 2,81
4. <sup>a</sup>	45,00	33,70	67,50 + 33,70	8,40	90,00	11,25 + 22,50	4,20	5,62	33,7 + 33,7	8,40	1,40	16,8 + 4,20
5. <sup>a</sup>	45,00	67,50	45,00 + 22,50	5,62	90,00	16,80 + 33,70	8,40	8,40	33,7 + 33,7	5,62	8,40	33,7 + 8,40
6. <sup>a</sup>	33,70	90,00	45,00 + 22,50	16,80	90,00	16,80 + 33,70	8,40	8,40	22,5 + 22,5	5,62	8,40	22,5 + 5,62
7. <sup>a</sup>	67,50	67,50	67,50 + 33,70	11,25	90,00	11,25 + 22,50	16,80	45,00	22,5 + 22,5	11,25	22,50	22,5 + 5,62
8. <sup>a</sup>	45,00	90,00	67,50 + 33,70	22,50	90,00	45,00 + 90,00	11,25	67,50	22,5 + 22,5	11,25	11,25	33,7 + 8,40
9. <sup>a</sup>	67,50	90,00	67,50 + 33,70	11,25	90,00	45,00 + 90,00	11,25	45,00	33,7 + 33,7	33,70	45,00	33,7 + 8,40
10. <sup>a</sup>	67,50	90,00	67,50 + 33,70	11,25	90,00	45,00 + 90,00	33,70	67,50	33,7 + 33,7	22,50	45,00	22,5 + 5,62
11. <sup>a</sup>	67,50	90,00	67,50 + 33,70	33,70	90,00	45,00 + 90,00	33,70	67,50	33,7 + 33,7	22,50	90,00	33,7 + 8,40

*Cuadro 3. Series de adaptación a la antibioticorresistencia de cepas de estafilococo dorado frente a clorotetraciclina oleandomicina y sus asociaciones.  
Variaciones en las C. M. I., según las distintas resiembras, cada cuarenta y ocho horas*

Resiembra	Cepa P107			Cepa P119			Cepa P103		
	Serie clor.	Serie olean.	Serie clor. + olean.	Serie clor.	Serie olean.	Serie clor. + olean.	Serie clor.	Serie olean.	Serie clor. + olean.
Inic.	8,40	1,87	0,70 + 0,93	5,62	3,75	2,81 + 1,87	2,81	1,87	1,00 + 0,75
1. <sup>a</sup>	1,05	2,81	1,05 + 1,40	5,62	5,62	2,81 + 1,87	2,81	1,87	1,00 + 0,75
2. <sup>a</sup>	1,05	2,81	1,05 + 1,40	5,62	5,62	4,20 + 2,81	2,10	2,81	2,10 + 1,50
3. <sup>a</sup>	2,81	5,62	1,40 + 1,87	4,20	3,75	2,81 + 1,87	4,20	1,87	2,10 + 1,50
4. <sup>a</sup>	2,81	7,50	1,40 + 1,87	8,40	22,50	5,62 + 3,75	4,20	5,62	2,10 + 1,50
5. <sup>a</sup>	2,10	11,25	1,40 + 1,87	8,40	30,00	5,62 + 3,75	2,81	3,75	2,81 + 1,87
6. <sup>a</sup>	11,25	15,00	5,62 + 7,50	22,50	15,00	11,25 + 7,50	5,62	15,00	2,81 + 1,87
7. <sup>a</sup>	5,62	15,00	5,62 + 7,50	22,50	30,00	11,25 + 7,50	11,25	11,25	5,62 + 5,62
8. <sup>a</sup>	22,50	11,25	5,62 + 7,50	45,00	45,00	22,50 + 15,00	11,25	22,50	8,40 + 7,50
9. <sup>a</sup>	16,80	30,00	11,25 + 15,00	45,00	45,00	22,50 + 15,00	8,40	30,00	8,40 + 7,50
10. <sup>a</sup>	33,70	45,00	11,25 + 15,00	33,70	45,00	22,50 + 15,00	16,80	30,00	8,40 + 7,50
11. <sup>a</sup>	45,00	45,00	11,25 + 15,00	33,70	45,00	22,50 + 15,00	22,50	30,00	8,40 + 7,50

*Cuadro 4. Series de adaptación a la antibioticorresistencia de cepas de estafilococo frente a neomicina, ristocetina y sus asociaciones. Variaciones en las C. M. I., según las distintas resiembras, cada cuarenta y ocho horas*

Resiembra	Cepa P16			Cepa P28			Cepa P57			Cepa P103		
	Serie neom.	Serie rist.	Serie neom. + rist.	Serie neom.	Serie rist.	Serie neom. + rist.	Serie neom.	Serie rist.	Serie neom. + rist.	Serie neom.	Serie rist.	Serie neom. + rist.
Inic.	0,56	2,81	5,62 + 2,34	0,5	0,87	2,05 + 1,75	1,40	1,17	2,10 + 1,75	1,4	2,10	1,05 + 3,50
1. <sup>a</sup>	8,40	1,75	11,25 + 4,68	1,4	1,75	1,40 + 2,34	5,62	2,34	4,20 + 3,50	1,4	1,17	1,05 + 3,50
2. <sup>a</sup>	22,50	3,50	11,25 + 4,68	1,4	3,50	2,10 + 3,50	11,25	4,68	8,40 + 7,03	8,4	4,68	1,40 + 4,68
3. <sup>a</sup>	22,50	4,68	11,25 + 4,68	16,8	7,03	2,81 + 4,68	22,50	7,03	16,80 + 14,06	22,5	14,06	4,20 + 14,06
4. <sup>a</sup>	45,00	7,03	8,40 + 3,50	22,5	18,75	2,81 + 4,68	45,00	9,37	11,25 + 9,37	45,0	9,37	8,40 + 28,12
5. <sup>a</sup>	33,70	18,75	16,80 + 7,03	33,7	37,50	2,10 + 3,50	33,70	18,75	22,50 + 18,75	33,7	18,75	8,40 + 28,12
6. <sup>a</sup>	45,00	28,12	16,80 + 7,03	45,0	37,50	8,40 + 14,06	45,00	14,06	22,50 + 18,75	45,0	18,75	8,40 + 28,12
7. <sup>a</sup>	90,00	18,75	22,50 + 9,37	45,0	28,12	8,40 + 14,06	90,00	28,12	22,50 + 18,75	45,0	28,12	8,40 + 28,12
8. <sup>a</sup>	45,00	37,50	22,50 + 9,37	45,0	37,50	11,25 + 18,75	90,00	37,50	33,70 + 28,12	90,0	56,25	11,25 + 37,50
9. <sup>a</sup>	90,00	56,25	33,70 + 14,06	45,0	37,50	16,80 + 28,12	90,00	56,25	33,70 + 28,12	90,0	37,50	8,40 + 28,12
10. <sup>a</sup>	90,00	56,25	22,50 + 9,37	45,0	37,50	16,80 + 28,12	90,00	56,25	67,50 + 56,25	90,0	56,25	11,25 + 37,50
11. <sup>a</sup>	90,00	56,25	33,70 + 14,06	45,0	37,50	16,80 + 28,12	90,00	56,25	67,50 + 56,25	90,0	56,25	11,25 + 37,50

*Cuadro 5. Series de adaptación a la antibiotorresistencia de cepas de estreptococos del grupo D frente a colimicina, paromomicina y sus asociaciones. Variaciones en las C.M.I., según las distintas resiembras, cada cuarenta y ocho horas*

Resiembra	Cepa P12			Cepa P19			Cepa P47			Cepa P41		
	Serie col.	Serie par.	Serie col. + par.	Serie col.	Serie par.	Serie col. + par.	Serie col.	Serie par.	Serie col. + par.	Serie col.	Serie par.	Serie col. + par.
Inic.	0,70	1,40	0,50 + 1,05	0,35	2,81	0,17 + 1,40	1,40	5,62	0,70 + 2,81	2,10	4,2	1,40 + 2,81
1. <sup>a</sup>	1,40	1,05	0,70 + 1,40	0,50	2,81	0,35 + 2,81	2,81	22,50	1,05 + 4,20	2,81	16,8	2,10 + 4,20
2. <sup>a</sup>	2,81	5,62	1,05 + 2,10	0,70	2,81	0,35 + 2,81	5,62	22,50	1,40 + 5,62	5,62	22,5	2,81 + 5,62
3. <sup>a</sup>	5,62	16,80	1,40 + 2,81	1,40	22,50	0,17 + 1,40	11,25	67,50	1,40 + 5,62	16,80	33,7	4,20 + 8,40
4. <sup>a</sup>	5,62	45,00	8,40 + 16,80	1,40	22,50	0,50 + 4,20	8,40	45,00	1,05 + 4,20	11,25	33,7	4,20 + 8,40
5. <sup>a</sup>	5,62	33,70	11,25 + 22,50	1,05	45,00	0,50 + 4,20	11,25	90,00	2,81 + 11,25	16,80	33,7	2,81 + 5,62
6. <sup>a</sup>	16,80	45,00	11,25 + 22,50	4,20	67,50	2,10 + 16,80	11,25	90,00	2,81 + 11,25	16,80	67,5	11,25 + 22,50
7. <sup>a</sup>	11,25	45,00	16,80 + 33,70	2,81	67,50	1,40 + 11,25	22,50	67,50	11,25 + 45,00	11,25	45,0	16,80 + 33,70
8. <sup>a</sup>	33,70	90,00	11,25 + 22,50	16,80	67,50	4,20 + 33,70	16,80	120,00	8,40 + 33,70	33,70	90,0	11,25 + 22,50
9. <sup>a</sup>	22,50	120,00	11,25 + 22,50	11,25	67,50	4,20 + 33,70	33,70	90,00	8,40 + 33,70	33,70	90,0	22,50 + 45,00
10. <sup>a</sup>	33,70	90,00	16,80 + 33,70	16,80	67,50	4,20 + 33,70	22,50	90,00	8,40 + 33,70	45,00	90,0	16,80 + 33,70
11. <sup>a</sup>	33,70	90,00	16,80 + 33,70	16,80	67,50	4,20 + 33,70	22,50	90,00	8,40 + 33,70	45,00	90,00	16,80 + 33,70

Cuadro 6. Variaciones de los antibiogramas en cepas de estreptococos

Cepas	Tratamiento	Fase (*)	Antibiogramas: C.M.I. d					
			Penicilina	Estreptomina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Clorotetraciclina	Oxitetraciclina
Enterococo P73	Tet.	I	30,0	56,25	5,62	11,25	11,25	22,50
		M	30,0	56,25	5,62	33,70	33,70	45,00
		F	30,0	56,25	5,62	67,50	67,50	67,50
	Erit.	M	30,0	56,25	11,25	11,25	11,25	22,50
		F	30,0	56,25	11,25	11,25	11,25	22,50
	Tet. + erit.	M	45,0	56,25	11,25	22,50	22,50	22,50
		F	45,0	75,00	22,50	22,50	22,50	33,70
	Enterococo P87	Tet.	I	45,0	37,50	5,62	1,40	5,62
M			45,0	37,50	5,62	16,80	33,70	45,00
F			45,0	37,50	5,62	33,70	45,00	90,00
Erit.		M	45,0	37,50	8,40	1,40	5,62	5,62
		F	45,0	37,50	8,40	1,40	5,62	5,62
Tet. + erit.		M	45,0	56,25	8,40	22,50	8,40	8,40
		F	45,0	56,25	11,25	33,70	8,40	8,40
Enterococo P88		Tet.	I	30,0	56,25	5,62	5,62	8,40
	M		30,0	56,25	5,62	8,40	11,25	22,50
	F		30,0	56,25	5,62	33,70	33,70	45,00
	Erit.	M	30,0	56,25	8,40	5,62	8,40	8,40
		F	30,0	56,25	11,25	5,62	8,40	8,40
	Tet. + erit.	M	45,0	56,25	22,50	8,40	11,25	11,25
		F	45,0	56,25	22,50	8,40	11,25	22,50

(\*) Fases de adaptación a la resistencia: inicial (I), intermedia (M) y final (F).

## upo D tratadas con tetraciclina, eritromicina o su asociación

tibiótico/cm <sup>3</sup> de medio líquido									
Eritro- micina	Poli- mixina	Neo- micina	Novo- biocina	Oleando- micina	Risto- cetina	Kana- micina	Coli- micina	Paromo- micina	
5,62	4,68	1,05	1,05	3,75	7,03	2,34	33,7	67,5	
5,62	4,68	1,05	1,40	2,81	7,03	2,34	33,7	67,5	
5,62	4,68	1,05	1,40	2,81	7,03	2,34	33,7	67,5	
90,00	3,50	1,05	1,40	3,75	7,03	1,75	33,7	67,5	
90,00	3,50	1,05	1,05	3,75	7,03	1,75	33,7	67,5	
90,00	4,68	1,05	1,05	3,75	14,06	1,17	33,7	67,5	
90,00	7,03	1,05	1,05	3,75	14,06	1,17	33,7	45,0	
2,81	3,50	1,40	1,05	2,81	4,68	3,50	45,0	45,0	
2,81	3,50	1,40	1,05	1,87	4,68	3,50	45,0	45,0	
2,81	3,50	1,40	1,05	1,87	4,68	3,50	45,0	45,0	
90,00	2,34	1,40	1,05	2,81	4,68	2,34	45,0	45,0	
90,00	2,34	1,40	1,05	2,81	4,68	2,34	45,0	45,0	
90,00	3,50	1,40	1,05	2,81	7,03	2,34	45,0	45,0	
90,00	3,50	1,40	1,05	2,81	7,03	2,34	45,0	45,0	
4,68	2,34	1,05	1,40	3,75	4,68	1,75	45,0	67,5	
4,68	2,34	1,05	1,40	2,81	4,68	1,75	45,0	67,5	
4,68	2,34	1,05	1,40	1,87	4,68	1,75	45,0	67,5	
8,40	1,75	1,05	1,40	3,75	4,68	1,17	45,0	67,5	
67,50	1,75	1,05	1,40	3,75	4,68	1,17	45,0	67,5	
67,50	3,50	1,05	1,40	3,75	9,37	0,87	45,0	67,5	
90,00	3,50	1,05	1,40	3,75	9,37	0,87	45,0	67,5	

Cuadro 7. Variaciones en los antibiogramas de cepas estafilocóccicas

Cepas	Tratamiento	Fase	Antibiogramas: C.M.I.					
			Penicilina	Estreptomicina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Clorotetraciclina	Oxitet ciclina
Estafilococo dorado P107	Clor.	I	0,23	14,06	5,62	8,40	8,40	8,40
		M	0,23	14,06	16,80	11,50	11,25	11,50
	Olean.	F	0,23	14,06	33,70	33,70	45,00	33,70
		M	0,93	14,06	5,62	8,40	8,40	8,40
	Clor. + olean.	F	0,93	14,06	5,62	8,40	8,40	8,40
		M	0,23	15,00	8,40	8,40	5,62	5,62
	F	0,23	15,00	8,40	5,62	5,62	5,62	
	I	0,70	18,75	11,25	11,25	5,62	11,2	
Estafilococo dorado P119	Clor.	M	0,70	18,75	11,25	22,50	22,50	22,50
		F	0,70	18,75	22,50	22,50	33,70	33,70
	Olean.	M	0,70	18,75	11,25	11,25	5,62	11,2
		F	0,93	18,75	11,25	11,25	5,62	11,2
	Clor. + olean.	M	0,70	22,50	4,20	5,62	5,62	5,6
		F	0,70	22,50	4,20	5,62	5,62	5,6
	I	1,87	18,75	5,62	11,25	2,81	8,4	
	M	1,87	18,75	16,80	22,50	5,62	11,2	
Estafilococo dorado P103	Clor.	F	1,87	18,75	22,50	22,50	22,50	33,7
		M	2,81	18,75	5,62	11,25	2,81	8,4
	Olean.	F	3,75	18,75	5,62	11,25	2,81	8,4
		M	0,93	18,75	2,81	8,40	2,81	4,2
	Clor. + olean.	F	0,93	18,75	2,81	8,40	2,81	4,2
		M	0,93	18,75	2,81	8,40	2,81	4,2

## atadas con clorotetraciclina, oleandomicina o su asociación

ibiótico/cm <sup>3</sup> de medio líquido									
ritro- micina	Poli- micina	Neo- micina	Novo- biocina	Oleando- micina	Risto- cetina	Kana- micina	Coli- micina	Paromo- micina	
4,20	2,34	0,87	0,70	1,87	2,1	0,28	67,5	45,0	
4,20	2,34	0,87	0,70	1,87	2,1	0,28	67,5	45,0	
4,20	2,34	0,87	0,70	1,87	2,1	0,28	67,5	45,0	
16,80	2,34	0,87	0,70	15,00	2,1	0,21	67,5	45,0	
22,50	2,34	0,87	0,70	45,00	2,1	0,21	67,5	45,0	
16,80	1,17	0,87	0,70	0,70	2,1	0,21	67,5	45,0	
16,80	1,17	0,87	0,70	0,70	2,1	0,21	67,5	45,0	
8,40	1,75	1,05	0,50	3,75	2,1	1,17	45,0	45,0	
8,40	1,75	1,05	0,50	3,75	2,1	1,17	45,0	45,0	
8,40	1,75	1,05	0,50	3,75	2,1	1,17	45,0	45,0	
11,25	1,75	1,05	0,50	15,00	2,1	0,87	45,0	45,0	
33,70	1,75	1,05	0,50	45,00	2,1	0,87	45,0	45,0	
16,80	1,17	1,05	0,50	0,93	2,1	0,56	45,0	45,0	
16,80	0,87	1,05	0,50	0,93	2,1	0,56	45,0	45,0	
5,62	0,87	1,40	1,05	1,87	2,1	0,87	67,5	45,0	
5,62	0,87	1,40	1,05	1,87	2,1	0,87	67,5	45,0	
5,62	0,87	1,40	1,05	1,87	2,1	0,87	67,5	45,0	
16,80	0,87	1,40	1,05	15,00	2,1	0,87	67,5	45,0	
22,50	0,87	1,40	1,05	30,00	2,1	0,87	67,5	45,0	
11,25	0,56	1,40	1,05	1,40	2,1	0,56	67,5	45,0	
11,25	0,56	1,40	1,05	1,40	2,1	0,56	67,5	45,0	

Cuadro 8. Variaciones en los antibiogramas de cepas estafilocócicas

Cepas	Tratamiento	Fase	Antibiogramas: C.M.I.					
			Penicilina	Estreptomina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Clorotetraciclina	Oxitet ciclin
Estafilococo dorado P28	Neom.	I	30,00	37,50	16,80	11,25	8,40	11,25
		M	30,00	56,25	8,40	11,25	5,62	8,40
		F	30,00	112,5	8,40	8,40	5,62	8,40
	Rist.	M	30,00	37,50	16,80	11,25	8,40	11,25
		F	30,00	37,50	16,80	11,25	8,40	11,25
	Neom. + rist.	M	7,50	37,50	14,20	14,20	12,81	14,20
F		7,50	37,50	14,20	14,20	12,81	14,20	
Estafilococo dorado P57	Neom.	I	22,50	56,25	16,80	8,40	8,40	11,25
		M	22,50	75,00	11,25	5,62	5,62	8,40
		F	22,50	112,50	8,40	5,62	5,62	5,62
	Rist.	M	22,50	56,25	16,80	8,40	8,40	8,40
		F	22,50	56,25	16,80	8,40	8,40	8,40
	Neom. + rist.	M	5,62	56,25	22,50	16,80	11,25	16,80
F		5,62	56,25	22,50	16,80	11,25	16,80	
Estafilococo dorado P103	Neom.	I	45,00	28,12	11,25	8,40	8,40	16,80
		M	45,00	56,25	8,40	5,62	5,62	8,40
		F	45,00	150,00	5,62	5,62	5,62	8,40
	Rist.	M	45,00	28,12	11,25	8,40	8,40	16,80
		F	45,00	28,12	11,25	8,40	8,40	16,80
	Neom. + rist.	M	7,50	37,50	16,80	11,25	11,25	22,50
F		7,50	37,50	16,80	22,50	11,25	22,50	

## Atadas con neomicina, ristocetina o su asociación

Antibiótico/cm <sup>3</sup> de medio líquido								
Eritro- micina	Poli- mixina	Neo- micina	Novo- biocina	Oleando- micina	Risto- cetina	Kana- micina	Coli- micina	Paromo- micina
5,62	9,37	0,50	0,70	3,75	0,87	0,87	90,0	45,0
5,62	4,68	45,00	0,50	3,75	0,56	7,03	90,0	67,5
5,62	4,68	45,00	0,87	3,75	0,56	37,50	90,0	90,0
5,62	9,37	0,50	0,70	3,75	37,50	0,87	90,0	45,0
5,62	9,37	0,50	0,70	3,75	37,50	0,87	90,0	45,0
5,62	9,37	4,20	0,35	7,50	1,17	1,17	90,0	90,0
5,62	9,37	4,20	0,35	7,50	1,17	1,17	112,5	90,0
4,20	7,03	1,40	0,35	7,50	1,17	0,87	90,0	33,7
4,20	4,68	45,00	0,17	7,50	0,87	9,37	90,0	45,0
4,20	4,68	90,00	0,25	7,50	0,87	56,25	90,0	90,0
4,20	7,03	1,40	0,25	7,50	14,06	0,87	90,0	33,7
4,20	7,03	1,40	0,25	7,50	56,25	0,87	90,0	33,7
8,40	7,03	11,25	0,25	11,25	1,75	1,75	90,0	90,0
8,40	9,37	11,25	0,25	11,25	1,75	1,75	90,0	90,0
5,62	4,68	0,17	0,50	5,62	0,56	0,56	135,0	33,7
5,62	3,50	45,00	0,35	5,62	0,43	14,06	135,0	67,5
5,62	2,34	90,00	0,35	5,62	0,43	56,25	135,0	120,0
5,62	4,68	0,17	0,50	5,62	18,75	0,56	135,0	33,7
5,62	4,68	0,17	0,50	5,62	56,25	0,56	135,0	33,7
8,40	7,03	1,75	0,35	8,40	1,05	1,17	135,0	90,0
8,40	14,06	1,75	0,35	8,40	1,05	1,17	150,0	90,0

Cuadro 9. Variaciones en los antibiogramas de cepas de *Aerobact*

Cepas	Tratamiento	Fase	Antibiogramas: C.M.I. d						
			Penicilina	Estreptomina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Clorotetraciclina	Oxitetraciclina	
<i>Aerobacter aerogenes</i> P12	Col.	I	90,0	7,03	33,70	33,70	22,50	16,80	
		M	90,0	7,03	33,70	16,80	11,25	16,80	
	Par.	M	90,0	18,75	33,70	11,25	11,25	8,40	
		F	90,0	37,50	33,70	11,25	11,25	8,40	
	Col. + par.	M	90,0	9,37	16,80	4,20	8,40	4,20	
		F	90,0	9,37	16,80	4,20	8,40	4,20	
<i>Aerobacter aerogenes</i> P19	Col.	I	90,0	4,68	22,50	33,70	33,70	22,50	
		M	90,0	4,68	22,50	22,50	22,50	16,80	
	Par.	M	90,0	28,12	22,50	16,80	8,40	16,80	
		F	90,0	37,50	22,50	16,80	8,40	16,80	
	Col. + par.	M	90,0	9,37	8,40	8,40	4,20	2,81	
		F	90,0	14,06	8,40	8,40	4,20	2,81	
<i>Aerobacter aerogenes</i> P47	Col.	I	135,0	9,37	45,00	33,70	16,80	16,80	
		M	135,0	9,37	45,00	11,25	11,25	11,25	
	Par.	M	135,0	28,12	45,00	16,80	11,25	8,40	
		F	135,0	56,25	45,00	16,80	11,25	8,40	
	Col. + par.	M	135,0	14,06	11,25	4,20	5,62	4,20	
		F	135,0	9,37	11,25	4,20	5,62	4,20	

atadas con colimicina, paromomicina o su asociación

ibiótico/cm <sup>3</sup> de medio líquido								
Eritromicina	Poli-mixina	Neomicina	Novobiocina	Oleandomicina	Ristocetina	Kanamicina	Colimicina	Paromomicina
90,0	11,25	2,81	90,0	90,0	90,0	1,75	0,70	1,40
90,0	11,25	2,81	90,0	90,0	90,0	1,75	16,80	1,40
90,0	11,25	2,81	90,0	90,0	90,0	1,75	33,70	1,40
90,0	8,40	8,40	90,0	90,0	90,0	7,03	0,70	45,00
90,0	8,40	22,50	90,0	90,0	90,0	28,12	0,70	90,00
90,0	2,81	33,70	90,0	90,0	90,0	4,68	5,62	45,00
90,0	2,81	33,70	90,0	90,0	90,0	4,68	5,62	45,00
90,0	11,25	2,10	90,0	90,0	90,0	1,17	0,35	2,81
90,0	11,25	2,10	90,0	90,0	90,0	1,17	4,20	2,81
90,0	16,80	2,10	90,0	90,0	90,0	1,17	16,80	2,81
90,0	11,25	8,40	90,0	90,0	90,0	9,37	0,35	67,50
90,0	11,25	11,25	90,0	90,0	90,0	37,50	0,35	67,50
90,0	4,20	22,50	90,0	90,0	90,0	7,03	5,62	67,50
90,0	4,20	22,50	90,0	90,0	90,0	7,03	4,20	67,50
90,0	8,40	4,20	90,0	90,0	90,0	1,75	1,40	5,62
90,0	8,40	4,20	90,0	90,0	90,0	1,75	11,25	5,62
90,0	8,40	4,20	90,0	90,0	90,0	1,75	22,50	5,62
90,0	5,62	16,80	90,0	90,0	90,0	14,06	1,40	90,00
90,0	5,62	45,00	90,0	90,0	90,0	28,12	1,40	90,00
90,0	2,81	33,70	90,0	90,0	90,0	2,81	0,70	45,00
90,0	2,81	45,00	90,0	90,0	90,0	2,81	0,70	45,00

Cuadro 10. Persistencia del estado antibioticorresistente de algunas cepas bacterianas

Experiencias	Cepas bacterianas	C. M. I. de las cepas recién adaptadas a los antibióticos aislados y sus asociaciones			C. M. I. después de ocho resiembras sobre medios exentos de antibióticos		
		A	B	A + B	A	B	A + B
Tetraciclina + eritromicina	P73	67,50	90,00	67,50 + 33,70	31,25	46,87	7,81 + 11,71
	P87	33,70	90,00	45,00 + 90,00	23,43	62,50	5,85 + 15,62
Clorotetraciclina + oleandomicina	P107	45,00	45,00	11,25 + 15,00	31,25	23,43	11,71 + 7,81
	P119	33,70	45,00	22,50 + 15,00	11,71	15,62	5,85 + 7,81
Neomicina + ristocetina	P16	90,00	56,25	33,70 + 14,06	73,75	46,87	31,25 + 15,62
	P28	45,00	37,50	16,80 + 28,12	45,00	31,25	31,25 + 23,43
Colimicina + paromomicina	P12	33,70	90,00	16,80 + 33,70	15,62	46,87	11,71 + 31,25
	P19	16,80	67,50	4,20 + 33,70	3,90	15,62	1,95 + 7,81

## RESUMEN

Con objeto de completar algunas observaciones sobre la resistencia resultante de interacciones antibióticas, se han adaptado distintas especies bacterianas a asociaciones antibióticas de carácter aditivo o antagonico, para después estudiar comparativamente los niveles de resistencia alcanzados, su persistencia y las variaciones que se originan en el espectro de antibioticosensibilidad de las cepas resistentes obtenidas.

## SUMMARY

Several species of bacteria became resistant against different additive or antagonistic antibiotics associations in order to complete our previous studies in connection with antibiotic-resistance produced by antibiotic combination.

## BIBLIOGRAFIA

1. PÉREZ-UREÑA, M. T. 1966. *Microbiol. Españ.*, 19, 287.
2. PÉREZ-UREÑA, M. T. 1966. *Microbiol. Españ.*, 19, 290.
3. WELCH, H. 1956. *Antibiot. Chemotherapy*, 6, 321.

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

## UTILIZACION DE DISTINTAS FUENTES DE CARBONO Y DE NITROGENO POR LEVADURAS

por

J. L. FERNÁNDEZ-PUENTES y J. PÉREZ-SILVA

### INTRODUCCION

El estudio de la utilización de aminoácidos como alimento plástico se ha hecho en gran número de microorganismos. El método más empleado en este tipo de estudios es el auxanográfico, del que ya en 1889 habla Beijerinck (1) considerándolo como un valioso medio para investigación de la nutrición en microorganismos; también se emplea el cultivo en determinados medios líquidos, como es el método introducido por Wickerham (6) y Wickerham y Burton (7) para levaduras. Este método permite ensayar diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono o de nitrógeno. Los resultados de estos estudios tienen a veces interés taxonómico; por ejemplo, uno de los criterios que utilizan Lodder y Kreger-Vanrij (3) en su estudio sistemático de las levaduras es la utilización de determinados compuestos orgánicos como fuente de carbono.

Schultz y colaboradores (5) ensayan en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Sacch. marxianus*, *Sacch. pastorianus*, *Candida pseudotropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. pulcherrima* (= *Torulopsis pulcherrima*) y *C. utilis* (= *T. utilis*) 18 aminoácidos como única fuente de carbono y de nitrógeno.

En el presente trabajo se describe el comportamiento de tres especies de levadura frente a distintas fuentes de carbono y de nitrógeno.

### MATERIAL Y METODOS

Hemos utilizado para nuestro trabajo las siguientes especies de levaduras, de la colección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología: *Saccharomyces pastorianus*, estirpe 75; *Candida albicans*, estirpe I. G. A., y *Debaryomyces hansenii*, estirpe 537. De esta última especie hemos obtenido un mutante resistente a la debariocidina, sustancia antibiótica descrita por Pérez-Silva y Lahoz (4). Denominamos a la estirpe sensible original 537a, y a la resistente, 537b.

#### *Medios de cultivo*

La conservación de estas levaduras se hizo en tubos de agar-malta. Para hacer los auxanogramas utilizamos el siguiente medio basal propuesto por Lodder:

SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,50 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0,10 g
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Agar noble (Difco)	1,50 g
Agua destilada c. s. p.	1.000 ml

La esterilización se llevó a cabo durante quince minutos, a 121 °C.

Cuando se quisieron ensayar aminoácidos como única fuente de carbono y de nitrógeno, se suprimió el sulfato amónico, y cuando se ensayaron como fuente de nitrógeno, se añadió 1 por ciento de glucosa en lugar de sulfato amónico.

Asimismo, para estudiar la utilización de fuentes de carbono, hemos empleado el medio descrito por Wickerham y Burton (6-7), preparado por la casa Difco con el nombre de «Yeast Nitrogen Base».

Para inducir la esporulación en *Debaryomyces hansenii* hemos utilizado el medio V8 de Mark y Phaff, modificado por Wickerham y colaboradores (8).

Los auxanogramas y ensayos en medio líquido de Wickerham se

realizaron siguiendo las técnicas recomendadas por Lodder y Krejer-Vanrij (3).

*Obtención de mutantes de Debaryomyces kloeckeri resistentes a la debarioidina*

Sembramos en placas de agar-malta una suspensión densa de células de la estirpe 537a de *Debaryomyces kloeckeri* y añadimos el antibiótico en un cilindro de vidrio. Después de cuarenta y ocho horas de incubación a 25 °C resembramos en placas de agar-malta sin antibiótico las colonias que se desarrollaron dentro del halo de inhibición. Aislamos en tubos de agar-malta y comprobamos la resistencia. De este modo conseguimos una estirpe de *D. kloeckeri* a la que denominamos 537b, que se mantiene resistente desde hace dos años a través de numerosas resiembras en ausencia del antibiótico.

Para averiguar si la resistencia se mantenía después de la esporulación, hicimos esporular la levadura en el medio V8 y obtuvimos cultivos a partir de una sola ascospora. Para ello hicimos una suspensión de la levadura esporulada en agua de malta diluyendo hasta unas 3.000 células/ml. Con una pipeta de Pasteur estéril recogíamos una cantidad de esta suspensión y la llevábamos en forma de diminutas gotas a varios cubreobjetos estériles (10 gotas/cubreobjeto) poniéndolos sobre sendos portaobjetos excavados estériles, en cuya concavidad habíamos puesto previamente una gota de agua estéril para conservar la humedad. El cubreobjetos se bordeó con aceite de cedro. Al observar estas gotas al microscopio de contraste de fases encontramos que de cada diez gotas, aproximadamente dos contenían un asca aislada (cada asca de *Debaryomyces* contiene una sola ascospora). Se incubó el porta a 25 °C. A las cuarenta y ocho horas, la cantidad de células era lo suficientemente elevada para poder obtener con éxito un cultivo ulterior en placas de agar-malta. Al cabo cuarenta y ocho horas de incubación a 25 °C se resembraron las colonias en placas con antibiótico para comprobar su resistencia. Todas las colonias ensayadas (procedentes de diez ascosporas) fueron resistentes.

## RESULTADOS

A continuación exponemos los resultados de nuestros estudios auxanográficos y ensayos en medio líquido realizados con cada una de las levaduras que nos han servido para este trabajo.

### *Debaryomyces kloeckeri*

Como ya hemos dicho, hemos utilizado dos estirpes de esta especie, que denominamos 537a y 537b. Estas dos estirpes tienen un comportamiento idéntico en cuanto a la utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono (*cuadro 1*). Sin embargo, cuando se ensayan aminoácidos como única fuente de carbono (*cuadro 2*) se encuentran claras diferencias entre ambas estirpes: la estirpe 537a puede utilizar los aminoácidos glutamato, aspartato, arginina y asparagina, mientras que la 537b no los utiliza. En el caso de la alanina, la estirpe 537b presenta un desarrollo muy pobre en comparación con el abundante crecimiento de la estirpe 537a en presencia de este aminoácido. En las

*Cuadro 1. Utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono por las estirpes 537a y 537b de Debaryomyces kloeckeri*

Ácidos orgánicos	<i>D. kloeckeri</i>	
	537a	537b
Citrato sódico	++	++
Piruvato sódico	+	+
Fumarato sódico	+	+
Acetato sódico	++	++
Succinato sódico	++	++
Acido $\alpha$ -cetoglutárico	++	++
Acido oxaloacético	+	+

++ indica un crecimiento abundante, y +, un crecimiento visible, pero escaso.

Cuadro 2. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono por las estirpes 537a y 537b de *D. kloeckeri*

Aminoácidos	<i>D. kloeckeri</i>	
	537a	537b
Asparagina	++	—
Acido aspártico	+	—
Prolina	++	++
Cistina	—	—
L-glutamato sódico	++	—
Acetil-DL-triptofano	—	—
DL--leucina	—	—
DL-valina	—	—
Tirosina	—	—
Arginina	++	++
DL- $\alpha$ -alanina	++	(+)
DL-serina	++	++
DL-treonina	—	—
DL-isoleucina	—	—
Glicocola	++	++
Cisteína	—	—
DL-fenilalanina	—	—
DL-norleucina	—	—
Histidina	—	—

++ indica un crecimiento abundante; +, crecimiento visible, pero escaso; (+), crecimiento casi nulo, y —, crecimiento nulo.

figuras 1-2 se muestran auxanogramas de estas dos estirpes, en los que se ensayan aminoácidos como única fuente de carbono. Hemos confirmado estos resultados utilizando el medio líquido de Wickerham para ensayos de fuentes de carbono, al que añadimos los aminoácidos glutamato, aspartato, arginina, alanina o valina (figura 3).

En los ensayos de aminoácidos como única fuente de nitrógeno no

se observan diferencias de desarrollo entre las dos estirpes (*cuadro 3*); ambos utilizan los cinco aminoácidos ensayados.

En los medios sin fuente de carbono ni de nitrógeno sólo la estirpe 537a utilizó los aminoácidos ensayados (*cuadro 4*).

*Cuadro 3. Utilización de aminoácidos como única fuente de nitrógeno por las estirpes 537a y 537b de D. kloeckeri*

Aminoácidos	<i>D. kloeckeri</i>	
	537a	537b
L-glutamato sódico	++	++
Asparagina	++	++
DL- $\alpha$ -alanina	++	++
Valina	++	++
Fenilalanina	++	++

*Cuadro 4. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno por las estirpes 537a y 537b de D. kloeckeri*

Aminoácidos	<i>D. kloeckeri</i>	
	537a	537b
DL- $\alpha$ -alanina	++	(+)
Asparagina	++	—
Arginina	++	—
L-glutamato sódico	+	—

#### *Saccharomyces pastorianus*

En el *cuadro 5* se exponen los resultados de la utilización de aminoácidos, ácidos orgánicos y glucosa por la estirpe 75 de *Saccharomyces pastorianus*. Esta estirpe no utiliza aminoácidos ni  $\alpha$ -cetoglutarato como fuente de carbono.

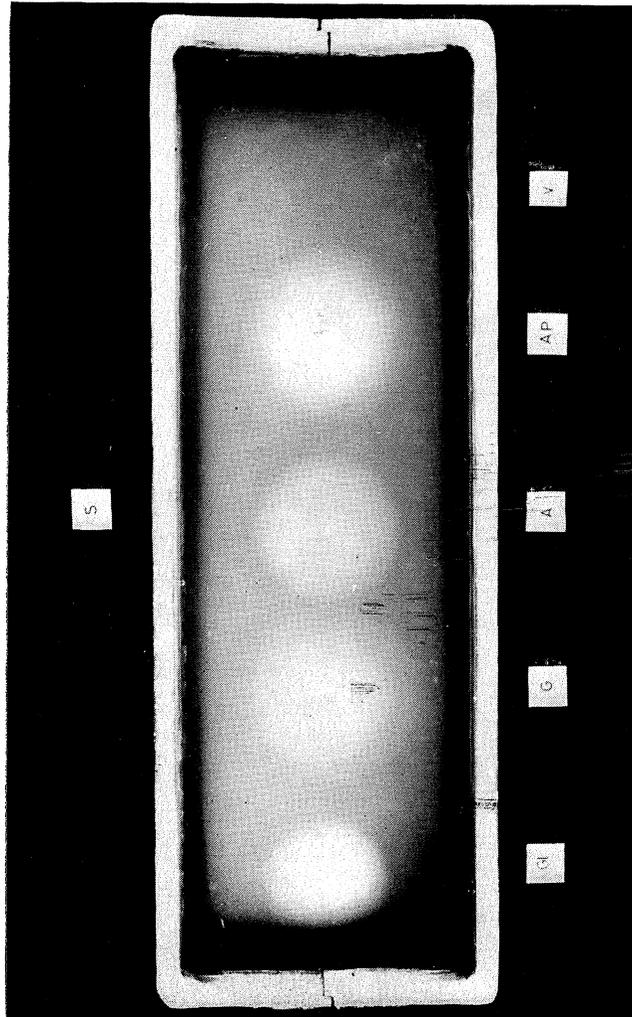


Figura 1. Auxanograma de la utilización de aminoácidos como fuente de carbono por la estirpe 537a de *Debaryomyces hansenii*. Se ha puesto la glucosa como patrón (Gl). G: L-glutamato só-dico. A: arginina. AP: ácido aspártico. V: valina

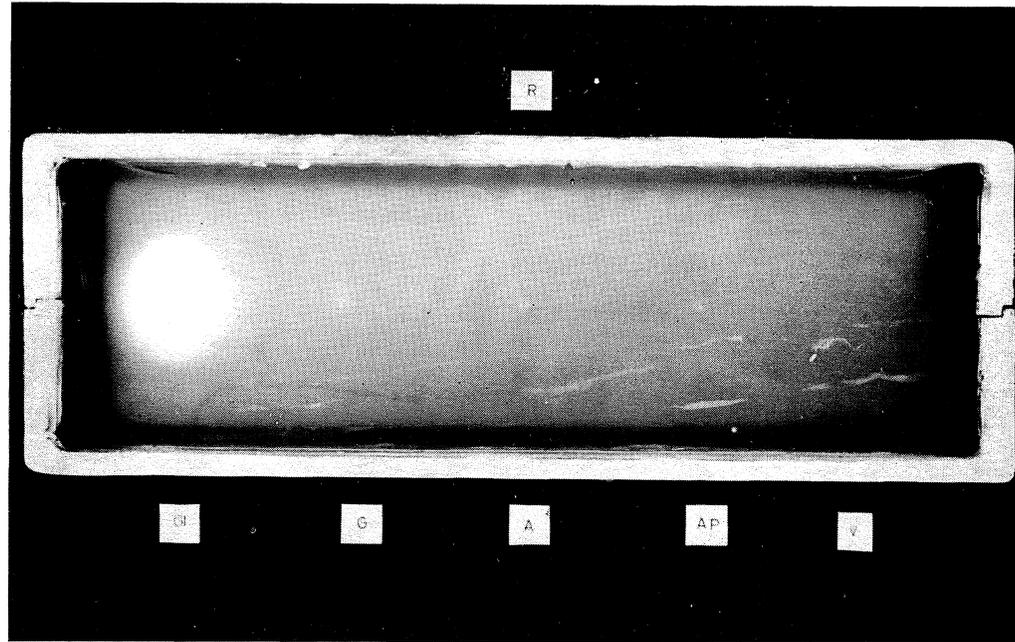


Figura 2. Auxanograma de la utilización de aminoácidos como fuente de carbono por la estirpe 537b de *D. klockeri*. Las letras tienen el mismo significado que en la figura 1

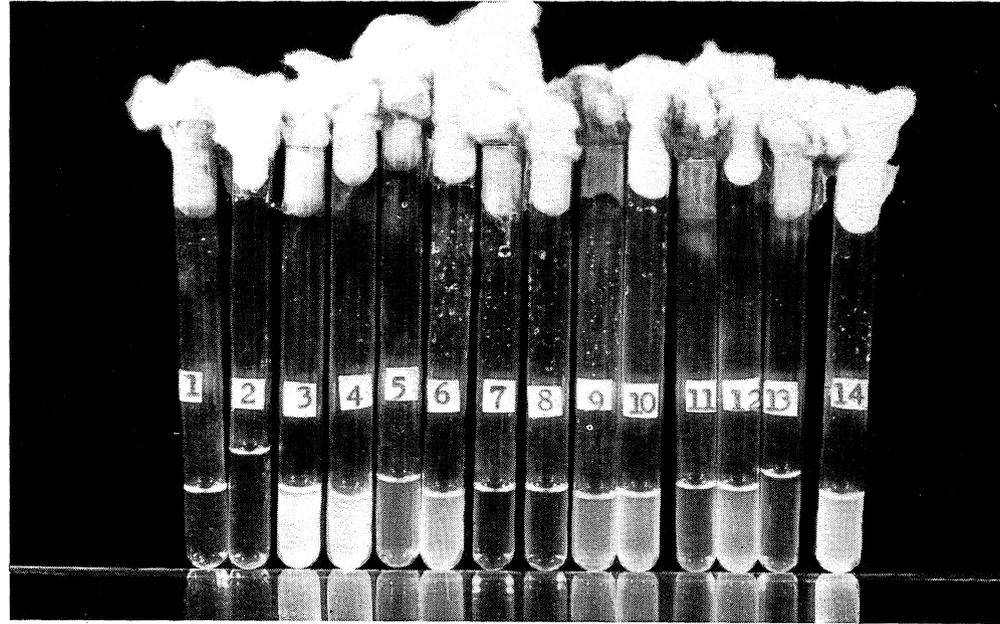


Figura 3. Ensayos en el medio líquido de Wickerham de la utilización de aminoácidos como fuente de carbono por las estirpes 537a y 537b de *D. kloeckeri*. En los tubos 1-2 no se ha puesto ninguna fuente de carbono; en los 3-4 se puso la glucosa como patrón. Tubos 5-6: l-glutamato sódico. Tubos 7-8: valina. Tubos 9-10: dl- $\alpha$ -alanina. Tubos 11-12: ácido aspártico. Tubos 13-14: arginina. Los tubos pares han sido sembrados con la estirpe 537a y los impares con la 537b. La lectura se hizo a los siete días de la siembra

Cuadro 5. Utilización de aminoácidos y otros compuestos orgánicos como única fuente de carbono por la estirpe 75 de *Sacch. pastorianus*

Fuente de carbono	<i>Sacch. pastorianus</i> Estirpe 75
Glucosa	+
Serina	—
Asparagina	—
Acido aspártico	—
Arginina	—
Piruvato sódico	+
DL- $\alpha$ -alanina	—
L-glutamato sódico	—
Acido oxaloacético	++
Prolina	—
Acido $\alpha$ -cetoglutárico	—
Glicocola	—

En el cuadro 6 se exponen los resultados de la asimilación de la glucosa, aminoácidos y ácidos orgánicos por la estirpe I. G. A. de *Candida albicans*. Se observa un comportamiento análogo al de la estirpe 537a de *Debaryomyces hloeckeri*, pues se utilizan como fuente de carbono para su crecimiento los mismos aminoácidos y ácidos orgánicos. En cambio, se observa escaso desarrollo sobre serina y espartato.

Cuadro 6. Utilización de aminoácidos y otros compuestos orgánicos como única fuente de carbono por la estirpe I. G. A. de *Candida albicans*

Fuente de carbono	<i>C. albicans</i> Estirpe I. G. A.
Glucosa	++
Serina	(+)
Asparagina	+
Acido aspártico	(+)
Arginina	++
L-glutamato sódico	+
Acido $\alpha$ -cetoglutarico	+
Prolina	++
Piruvato sódico	++
DL- $\alpha$ -alanina	++
Acido oxaloacético	+
Glicocola	++

## DISCUSION

De las tres especies de levaduras estudiadas, *Candida albicans* y *Saccharomyces pastorianus* se comportan de modo diferente en la utilización de aminoácidos como fuente de carbono, pues la primera utiliza gran número de estos compuestos, mientras que la segunda no utiliza ninguno de los ensayados. En cuanto a *Debaryomyces hansenii*, de las dos estirpes estudiadas, la 537b (mutante de la 537a) se comporta de modo análogo a *Sacch. pastorianus*, mientras que la 537a se asemeja a *C. albicans*, en el número de compuestos que asimilan.

El que algunas levaduras no utilicen aminoácidos como única fuente de carbono y que en cambio éstos sean utilizados como única fuente de nitrógeno (siempre que las células dispongan de otra fuente de carbono asimilable) sugiere la necesidad de otra fuente de energía para su entrada en la célula, o que ésta carece de sistemas enzimáticos ade-

cuados para utilizar el aminoácido como fuente de energía. Esta última hipótesis es poco probable, ya que todas las levaduras ensayadas por nosotros pueden utilizar los ácidos del ciclo de Krebs como única fuente de carbono, y como es sabido ésta es la única ruta conocida para la oxidación de aminoácidos.

Otra consecuencia que se deduce al observar los resultados de los experimentos sobre la utilización de aminoácidos como única fuente de carbono, es la variabilidad dentro de la misma especie. Así, Schultz y colaboradores (5) encuentran que su estirpe de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de crecer en glutamato, prolina, aspartato, serina o glicocola como única fuente de carbono, y nosotros no hemos podido obtener crecimiento alguno en estos aminoácidos con otra estirpe de la misma especie. En cuanto a nuestras dos estirpes de *Debaryomyces kloeckeri* se observa también una diferencia en el número de aminoácidos asimilados por cada una de ellas.

Lodder y Kreger-Vanrij (1952) emplean como carácter diferencial la utilización de azúcares como fuente de carbono. Wickerham (6) y Wickerham y Burton (7) han estudiado un amplio número de compuestos de carbono asimilables por varias especies de levaduras pertenecientes al género *Hansenula*, lo cual, según Lodder, haría posible un estudio sistemático ampliando el número de compuestos asimilables como carácter diferencial.

En la obra citada, Lodder, para basar su estudio sistemático en la diferente utilización de azúcares se apoya en la estabilidad de la fermentación y asimilación de ellos, pues los muchos estudios hechos sobre mutaciones inducidas en el laboratorio han llevado a esta conclusión.

Fernández-Puentes (2) ha visto que el mutante obtenido en nuestro laboratorio no presentaba diferencias en la asimilación de azúcares con la estirpe original.

La variabilidad dentro de la misma especie observada por nosotros en la asimilación de aminoácidos como fuente de carbono nos hace ser del criterio de que este carácter no tiene valor taxonómico.

## RESUMEN

Empleando métodos auxanográficos y ensayos en medios líquidos se estudia el comportamiento de *Saccharomyces pastorianus*, *Candida albicans* y *Debaryomyces kloeckeri* (estirpes 537a y 537b) frente a ácidos

orgánicos y azúcares como única fuente de carbono, y frente a varios aminoácidos como fuente de nitrógeno, fuente de carbono o de nitrógeno y carbono.

En cuanto a la utilización de ácidos orgánicos y azúcares como fuente de carbono, no se aprecian diferencias significativas entre las levaduras estudiadas; lo mismo ocurre con la utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno. En cambio, se encuentran notables diferencias en la utilización de aminoácidos como única fuente de carbono: *Candida albicans* utiliza todos los aminoácidos ensayados, mientras que *Saccharomyces pastorianus* no los utiliza; las estirpes de *Debaryomyces kloeckeri* 537a y 537b (mutante de la anterior) se comportan de modo análogo a *C. albicans* y *Sacch. pastorianus*, respectivamente, en cuanto a la utilización de aminoácidos como única fuente de carbono.

#### SUMMARY

Using auxanographic methods and tests in liquid media, it was studied the utilization of various carbon and nitrogen sources by *Saccharomyces pastorianus*, *Candida albicans* and *Debaryomyces kloeckeri* (two strains: 537a and 537b).

Little or no differences were observed in the utilization of organic acids or carbohydrates when added as sole carbon sources. The same is true for the amino acids as sole nitrogen sources; however, appreciable differences were found in the utilization of the latter compounds when added as sole carbon sources: whereas *Candida albicans* can utilize all the amino acids tested, *Saccharomyces pastorianus* can not utilize any of them. *Debaryomyces kloeckeri* 537a and its mutant 537b behave like *C. albicans* and *Sacch. pastorianus*, respectively, in terms of the utilization of amino acids as sole carbon sources.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BEIJERINCK, M. W. 1889. L'auxanographie, ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gélatine appliquée aux recherches microbiologiques. Arch. Néerland. Sci., 23, 367.
2. FERNÁNDEZ-PUENTES, J. L. 1964. Contribución al estudio del metabolismo de aminoácidos en levaduras. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias de la Universidad de Madrid.

3. LODDER, J., y KREGER-VANRIJ, N. J. W. 1952. The yeasts. A taxonomic study. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
4. PÉREZ-SILVA, J., y LAHOZ, R. 1958. Nota previa acerca de un nuevo antibiótico. *Microbiol. Españ.* 11, 255.
5. SCHÜTZL, A. S.; McMANUS, D. K., y POMPER, S. 1949. Amino acids as carbon source for the growth of yeasts. *Arch. Biochem.*, 22, 412.
6. WICKERHAM, L. J. 1946. A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. *J. Bacteriol.*, 52, 293.
7. WICKERHAM, L. J., y BURTON, K. M. 1948. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *J. Bacteriol.*, 56, 363.
8. WICKERHAM, L. J.; FLICKINGER, M. H., y BURTON, K. M. 1946. A modification of Henrici's vegetable-juice sporulation medium for yeasts. *J. Bacteriol.*, 52, 611.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA  
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA  
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA  
CATEDRA DE QUIMICA BIOLOGICA

## CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL TRIPTOFANO POR *ESCHERICHIA COLI*

### I. Empleando medios con glucosa y sin glucosa y en condiciones aeróbicas.

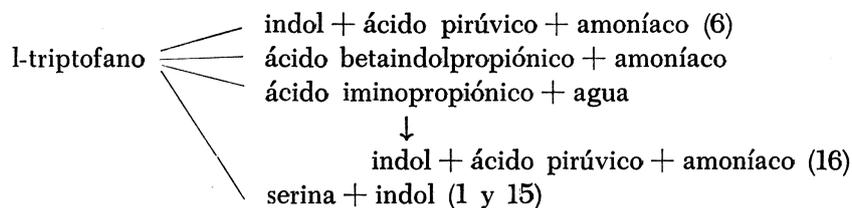
por

FANNY N. OLA y CEFERINA R. ORDOÑEZ

### INTRODUCCION

La degradación del triptofano por las bacterias ha sido considerada por diversos investigadores, quienes sostienen que los pasos metabólicos que se producen varían según las condiciones culturales y los microorganismos empleados.

De acuerdo con las experiencias que se han llevado a cabo y según sean las mismas en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, los productos del metabolismo intermedio puede resumirse en el esquema siguiente:



Kotoke (7) demostró que el *Bacillus subtilis* podía producir a partir del triptofano los siguientes metabolitos: ácido quinurénico, quinurenina, ácido antranílico, etc.

Tatum y Bonner (14) demostraron que la *Neurospora crassa* lleva el triptofano a indol con separación de serina; Palleroni y Stanier (10) lograron demostrar los mecanismos de regulación de la síntesis de las enzimas que oxidan al triptofano en *Pseudomonas fluorescens*.

En aerobiosis, el *Escherichia coli* produce a partir del triptofano, indol, ácido pirúvico y amoníaco; en cambio, en anaerobiosis forma betaindolpropiónico y amoníaco; la vía metabólica seguida debe ser distinta.

El *Escherichia coli*, al desarrollarse en medios de cultivo conteniendo l-triptofano produce triptofanasa, enzima adaptativa que le permite metabolizar este aminoácido. Dicha enzima requiere como coenzima el fosfato de piridoxal, es inhibida por iones  $\text{CN}^-$  y de metales pesados y se activa por la presencia del citocromo c (1).

Algunos investigadores sostienen que la sólo presencia de glúcidos fermentescibles, la glucosa, por ejemplo, inhibe la producción de indol por las bacterias en medios que contienen triptofano. Sin embargo, Freundlich y Linchstein (3) demostraron que el efecto inhibitorio es relativo. Monod (9) sostiene que la glucosa actúa como un «supresor enzimático», y Gale (5) asegura que la presencia de glucosa durante el crecimiento puede alterar el proceso asimilatorio de la célula, y esto se refleja en la acción enzimática, sobre todo en las referentes al ataque de aminoácidos con producción de amoníaco.

El esquema de este trabajo responde al estudio de la conversión del l-triptofano a indol por *Escherichia coli*, empleando para ello medios sintéticos con glucosa y sin glucosa y en condiciones aeróbicas. En estas experiencias se empleó una cepa tipificada de *E. coli* núm. 23, muy buena productora de indol.

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Cepa*

*Escherichia coli* núm. 23, proporcionada por la colección de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, previo estudio de sus características de tinción, bioquímicas y serológicas. Se conservó por resiembras semanales en agar nutriente.

*Medios de cultivo*

Para prepararlos se utilizaron productos puros. Los medios núms. 1 y 2 responden a la siguiente fórmula:

Medio núm. 1

L-triptofano	1,0 g
Cloruro amónico	1,0 g
Cloruro sódico	0,5 g
Sulfato magnésico heptahidratado	0,2 g
Fosfato monopotásico	3,0 g
Fosfato disódico	6,0 g
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml

pH = 7,2, después de esterilización a 0,75 atmósferas durante quince minutos.

Medio núm. 2

Idéntica composición, conteniendo además un 4 por ciento de glucosa. Este glúcido se añade asépticamente al medio de cultivo, a fin de evitar su alteración por efecto del calentamiento.

*Preparación del inóculo*

La cepa se cultiva en agar inclinado durante veinticuatro horas a 37 °C y el cultivo se suspende en 10 ml de solución fisiológica estéril. De la misma se hace una dilución de  $10^{-4}$ , sembrando 0,1 ml por cada 100 ml de medio. Se incuba ambos medios a 37 °C durante tres, seis, nueve, doce, veinticuatro, setenta y dos, noventa y seis y ciento noventa y seis horas.

*Inactivación*

Se frena el desarrollo microbiano por calentamiento en baño María a 80 °C durante veinte minutos, colocando tubo protector (para evitar pérdidas posibles de indol). También se utilizó una solución acuosa de mertiolato 1/10.000, agregando 0,10 ml por cada 100 ml de medio.

En todos los casos, los cultivos se mantienen en forma estática.

### *Determinación de indol y triptofano*

Se realiza la separación porque las reacciones cromáticas aplicadas a su determinación se deben a la presencia del núcleo indólico que figura en los dos compuestos.

Los medios de cultivo se centrifugan a 3.000 r/m, durante treinta minutos para eliminar las bacterias. A los 10 ml del sobrenadante se añaden 2 ml de tolueno, se agita enérgicamente y se centrifuga a 2.000 r/m durante diez minutos; se separan así dos fases, la superior, toluénica, que contiene todo el indol presente, y la inferior, acuosa, que contiene el triptofano.

### *Valoración del indol*

Se practicó sobre 0,5 ml de la fase toluénica, aplicando la técnica de Wood (16) basada en la clásica reacción de Ehrlich (2). La determinación colorimétrica se llevó a cabo en el espectrofotómetro de Jovin Ivon Maroc II, ajustando la longitud de onda a 50 m $\mu$ .

La curva de calibración correspondiente se estableció empleando una solución al 0,01 por ciento, que se diluyó al 1/10 antes de ser empleada.

### *Valoración del triptofano*

Se aplicó el método de Spies (13). Debido a la intensidad cromática desarrollada se realizó sobre 0,1 ml de la capa acuosa. La determinación colorimétrica se realizó en el fotómetro de Pullfrich, empleando filtro amarillo S 570.

La curva de calibración fue obtenida con una solución testigo de l-triptofano al 0,01 por ciento.

### *Investigación de otros metabolitos*

Se utilizó la cromatografía sobre papel, según la técnica de Partridge (11-12). Se empleó papel S&S 2043 bm; como fase móvil, la mezcla n-butanol+ácido acético+agua (5:1:4).

Reveladores: solución de ninhidrina y reactivo de Ehrlich (8).

Los cromatogramas fueron observados a la luz ultravioleta antes y después del revelado.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos cultivando el *Escherichia coli* núm 23 en medios sintéticos sin glucosa figuran en el *cuadro 1* y los obtenidos desarrollados en medio con glucosa figuran en el *cuadro 2*.

Cuadro 1. Medios sin glucosa

	Horas de incubación	Indol $\gamma/10$ ml de cultivo	Triptofano $\gamma/ml$ de cultivo
Calor (*)	3	5,7	727
	6	24,7	599
	9	48,0	575
	12	64,0	636
	24	103,0	569
	72	491,0	458
	96	742,0	347
	196	832,0	310
Mertiolato (**)	3	0,66	545
	6	12,00	652
	9	110,00	570
	12	63,00	590
	24	310,00	585
	72	75,00	550
	96	65,00	440
	196	55,00	455

(\*) Valores promedios de 12 determinaciones.

(\*\*) Valores promedios de 3 determinaciones.

Cuadro 2. Medios con glucosa

	Horas de incubación	Indol γ/10 ml de cultivo	Triptofano γ/ml de cultivo
Calor (*)	3	0,30	644
	6	0,08	605
	9	Negativo	600
	12	0,80	622
	24	4,10	575
	72	5,00	600
	96	1,50	645
	196	Vestigios	405
Mertiolato (**)	3	4,0	637
	6	0,2	657
	9	5,0	659
	12	14,0	800
	24	47,0	670
	72	20,0	640
	96	1,5	660
	196	Negativo	405

(\*) Valores promedios de 12 determinaciones.

(\*\*) Valores promedios de 3 determinaciones.

Las figuras 1-2 se han trazado comparativamente, para demostrar la conveniencia de la muerte de los cultivos por el calor.

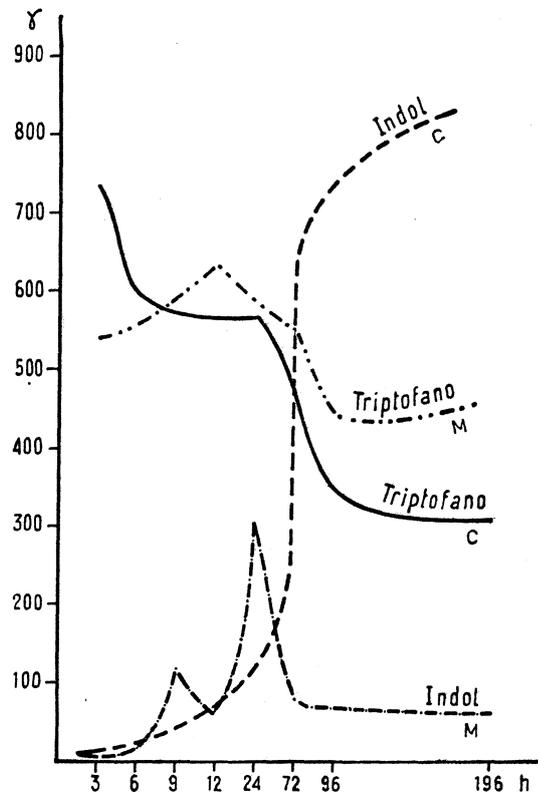


Figura 1. Medios sin glucosa. C, calor. M, mertiolato

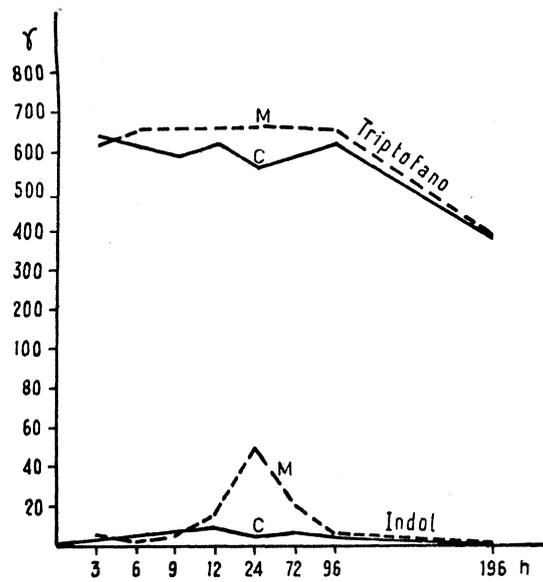


Figura 2. Medios con glucosa

## CONCLUSIONES

1) Los medios básicos empleados contienen 1.000  $\gamma$ /ml de triptofano y al cabo de ciento noventa y seis horas de incubación, a 37°C, la triptofanasa ha degradado parte de dicho aminoácido, llegando a valores de 300-400  $\gamma$ , lo que representa que un 30-40 por ciento ha sido metabolizado por el microorganismo en estudio.

2) En medios con glucosa se comprueba la formación de indol y se ha podido determinar cuantitativamente.

3) La transformación de triptofano en indol no es cuantitativa, por lo que suponemos que hay más de un camino metabólico cuyos pasos sería posible investigar con técnicas más especializadas.

4) Al paralizar el ciclo biológico de las bacterias mediante el calor y la solución de mertiolato, se observó que los resultados discrepaban. El método químico para frenar el desarrollo microbiano debe determinar fenómenos de interferencia con la reacción cromática.

5) No hay relación entre la producción de indol y el aumento de la masa bacteriana, por lo menos hasta las ciento noventa y seis horas.

6) Las experiencias fueron realizadas en medios sintéticos, en condiciones estáticas y en cultivos aeróbicos.

7) Los cromatogramas no permitieron observar otros metabolitos que el triptofano y el indol.

En futuras investigaciones estudiaremos los factores que pueden influir con mayor intensidad en la actividad de la triptofanasa, variando ciertas condiciones ambientales y las sustancias que coadyuvan o interfieren en la cuantificación del proceso enzimático de degradación del triptofano a indol por el *Escherichia coli*.

## RESUMEN

Ha sido estudiado el aspecto dinámico de la degradación del triptofano a indol por el *Escherichia coli*, empleando medios de cultivo sintéticos conteniendo glucosa y sin ella, en condiciones estáticas y aeróbicas. Dichos medios contenían 1.000  $\gamma$ /ml de aminoácido.

Se comprobó que la degradación de este aminoácido no es cuantitativa en forma absoluta y el agregado de glucosa a los medios de cultivo no interfiere en la producción de la triptofanasa, al menos en las condiciones en que las experiencias fueron llevadas a cabo.

#### SUMMARY

The dynamic aspect of the breakdown of tryptophane to indole by *Escherichia coli* was studied, for which purpose synthetic culture media were employed, which contained glucose and also those without it in static and aerobic conditions. These media contained 1.000  $\gamma$  of aminoacid/ml.

It was found that the rupture of this aminoacid is not quantitative in an absolute form, and the addition of glucose to the media does not interfere with the production of tryptophanase, at least under the conditions under which the experiments were carried out.

#### BIBLIOGRAFIA

1. DAWES, E. A., y HAPPOLD, F. C. 1949. *Biochem. J.*, 44, 349.
2. ERHLICH, P. 1906; 1909. *Biochem. Z.*, 2, 52; 18, 391.
3. ERHLICH, P. 1907; 1912. *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 40, 1.027; 45, 883.
4. FREUNDLICH, M., y LINCHSTEIN, H. 1960. *J. Bacteriol.*, 80, 633.
5. GALE, E. F. 1951. *The chemical activities of bacteria*, 68. Academic Press Inc.
6. HOPKINS, F. C., y COLE, S. W. 1903. *J. Physiol.*, 29, 451.
7. KOTOKE, I. Z. 1931; 1932. *Physiol. Chem.*, 195, 139; 214, 1.
8. MERCK, E. 1963. *Chromatography*. Amsterdam.
9. MONOD, J. 1949. *Ann. Rev. Microbiol.*, 3, 371.
10. PALLERONI, N. J., y STANIER, R. Y. 1964. *J. Gen. Microbiol.*, 35, 319.
11. PARTRIDGE, S. M. 1946. *Nature*, 158, 270.
12. PARTRIDGE, S. M. 1948. *Biochem. J.*, 35, 925.
13. SPIES, J. R., y CHAMBERS, D. C. 1948. *Anal. Chem.*, 20, 30.
14. TATUM, E. L., y BONNER, D. 1944. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 30, 30.
15. UMBREIT, W. W. 1954-1960. *Metabolic Maps I and II*. Burgess Publ. Co.
16. WOOD, W. A.; GUNSALUS, I. C., y UMBREIT, W. W. 1947. *J. Biol. Chem.*, 170, 313.

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

LA LISIS PRODUCIDA POR EL ACIDO  
 $\lambda$ -2, 4-DICLOROFENOXIBUTIRICO SOBRE  
CULTIVOS DE ALGUNAS BACTERIAS DEL GENERO  
*BACILLUS*

por

MARÍA ROMAN y CÁNDIDA GONZALEZ

ANTECEDENTES

El ácido  $\gamma$ -2,4-diclorofenoxibutírico utilizado por Scholl (6) y Klingman (4) en el control de semillas y estudiado por Gutenmann y Lisk (3) en cuanto a su eliminación en la orina de los bueyes y su descomposición en el rumen de las terneras, ha sido ensayado por nosotros como inhibidor del crecimiento de algunos microorganismos. El ácido es soluble en NaOH diluido y sus soluciones neutralizadas con ClH son estables, esterilizables por el calor e inhibidoras del crecimiento frente a cultivos de bacterias del género *Bacillus*, a concentraciones que oscilan entre 0,02 y 0,006 por ciento. Estudiando la acción de este ácido sobre los cultivos de dichas bacterias (datos no publicados) (1) se han observado dos efectos: inhibición del crecimiento y, en ciertas condiciones, lisis del cultivo. En el trabajo actual estudiamos la lisis, tratando de ver las condiciones de las que depende.

## MATERIAL Y MEDIO DE CULTIVO

Se han utilizado tres estirpes de bacterias esporuladas: *Bacillus coagulans*, *B. subtilis* y *B. megaterium* (\*).

El medio de cultivo tiene la siguiente composición:

Glucosa	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
CINH <sub>4</sub>	1,0 g
ClNa	1,0 g
SO <sub>4</sub> Mg	0,2 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0,2 g
Agua destilada c. s. p.	1.000 ml

pH = 7 — 7,2; esterilización, a 110 °C, durante treinta minutos.

Las soluciones madre del ácido a concentraciones de 0,8 — 0,2 por ciento se hicieron en NaOH diluido, ajustando el pH a 7 con ClH y esterilizándolas a 110 °C, durante treinta minutos.

## PARTE EXPERIMENTAL

Diez erlenmeyer, de 100 ml, provistos de tubuladura lateral que permite la lectura de la turbidez en el bekman, con 10 ml de medio de cultivo cada uno, se sembraron con 1 ml de cultivo de veinticuatro horas del *Bacillus coagulans* en el mismo medio, conteniendo 43.10<sup>6</sup> bacterias/ml. El inhibidor, a la concentración final de 0,008 por ciento, se añadió a los matraces después de sembrados, a 0 horas de incubación al matraz número 0 y en las horas sucesivas, a los demás; es decir, después de 1, 2, ... 9 horas de cultivo a 1°, 2° ... 10 °C. Por cada matraz con inhibidor se han preparado testigos en las mismas condiciones, sustituyendo el ácido por igual volumen de solución fisiológica. Los matraces se incubaron a 37 °C, leyendo la densidad óptica del cultivo en un spectronic 20, a una longitud de onda de 600 mμ. Los resultados del experimento se resumen en la *figura 1*, en la que se han representado

(\*) Los bacilos proceden de la colección de la Jersey Agricultural Experiment Station, New Brunswick.

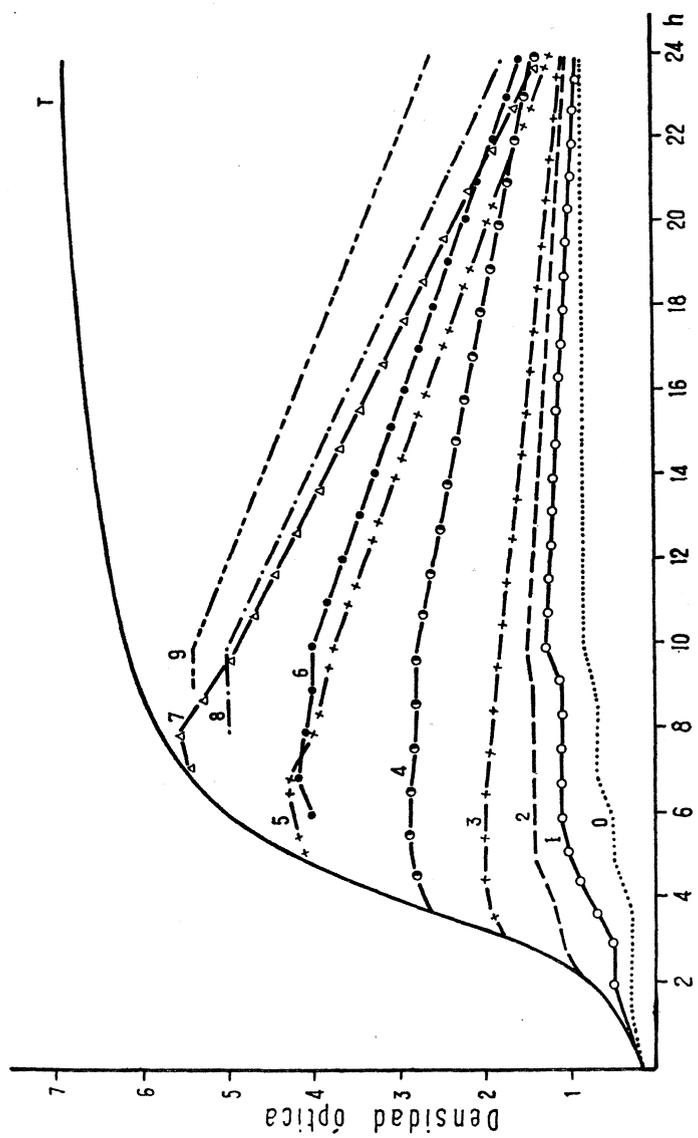


Figura 1. T, testigo. 0-9, inhibidor

únicamente los valores correspondientes a uno de los testigos, por superponerse los de los demás.

Prescindiendo del carácter inhibitor de esta sustancia, cuyo estudio se realiza en otro trabajo (1), observamos que si la solución del ácido se pone en contacto con el cultivo durante la fase de latencia o al comienzo de la exponencial, no se observa lisis de las células, ni aún después de siete días de incubación; si se añade después de cuatro o cinco horas, aparece lisis, que aumenta al aumentar el tiempo de contacto de las células con el inhibidor.

Tratando de ver el efecto que produce esta misma concentración de ácido sobre cultivos de 0 horas con distinto número de células, se planteó el siguiente experimento: células recogidas estérilmente por centrifugación de un cultivo de 24 horas del *Bacillus coagulans*, se suspendieron en medio nuevo hasta obtener suspensiones de las siguientes densidades ópticas: 0,05, 0,1, 0,25, correspondientes a 7, 14 y 38.10 bacterias/ml, aproximadamente. Se prepararon matraces dobles con cada una de estas suspensiones, añadiendo después el ácido a la concentración final 0,008 por ciento, a las 0 horas de incubación. En los matraces testigos de cada una de las suspensiones se substituyó el inhibidor por el mismo volumen de solución fisiológica estéril. La incubación se realizó a 37 °C y las lecturas de la densidad óptica se hicieron a las 0, 2, 3, 4, 6 y 24 horas de incubación. En los resultados representados en la figura 2 se aprecia en los cultivos que tienen inhibidor la misma densidad óptica durante toda la experiencia; la concentración que lisa los cultivos de 4 ó 5 horas no causa el mismo efecto en los de 0 horas.

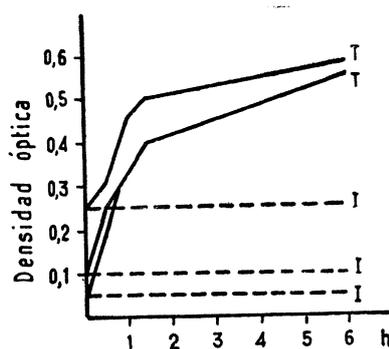


Figura 2. T, testigo. I, inhibidor

*Influencia de la concentración del inhibidor*

Un cultivo de cuatro horas del *Bacillus coagulans* se repartió estérilmente en cinco matraces de 100 ml, añadiendo el ácido a cuatro de ellos a las concentraciones finales de 0,01, 0,008, 0,006 y 0,005 por ciento. El quinto matraz, sin el ácido, se utilizó como testigo. La densidad óptica de los matraces con inhibidor y de los testigos sin él fue de 0,18, correspondiente a  $27 \cdot 10^6$  bacterias/ml. La turbidez de los cultivos se leyó a las 2, 4, 6 y 8 horas de contacto de las células con el ácido, resumiendo en la *figura 3* los resultados.

Las concentraciones comprendidas entre 0,01 y 0,006 por ciento lisan los cultivos desde la primer lectura, siendo la lisis más acusada cuanto mayor es la concentración de ácido. Concentraciones mayores de 0,01 por ciento causan, aproximadamente, el mismo efecto.

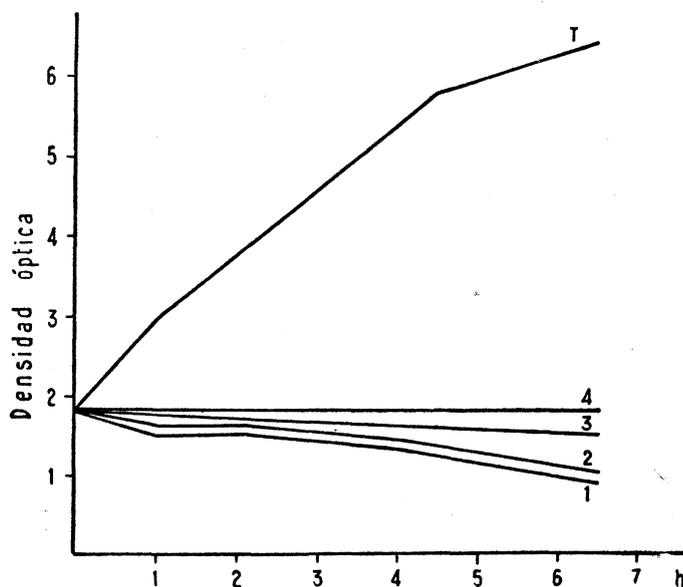


Figura 3. Concentraciones: 1) 0,01 %; 2) 0,008 %; 3) 0,006 %; 4) 0,005 %

*Efecto del ácido sobre las células muertas y las paredes celulares de las bacterias*

Las células de un cultivo de 14 horas del *Bacillus coagulans* muertas por el calor en un baño María, a temperatura de ebullición, durante quince minutos, puestas en contacto con el ácido a la concentración de 0,06 por ciento durante veinticuatro horas, a 37 °C y a temperatura ambiente, no mostraron lisis.

Las células muertas por radiaciones ultravioletas de una lámpara Sylvania, de 15 W, cuya longitud de onda es de 2.537 Å, tampoco mostraron lisis en contacto con el ácido, a esta misma concentración.

Del mismo modo las paredes celulares lavadas obtenidas por ruptura de las células de un cultivo de 24 horas del *Bacillus coagulans*, en el aparato de Braun, no sufren lisis después de veinticuatro horas de contacto con el ácido a la concentración de 0,06 por ciento.

*Microscopía electrónica*

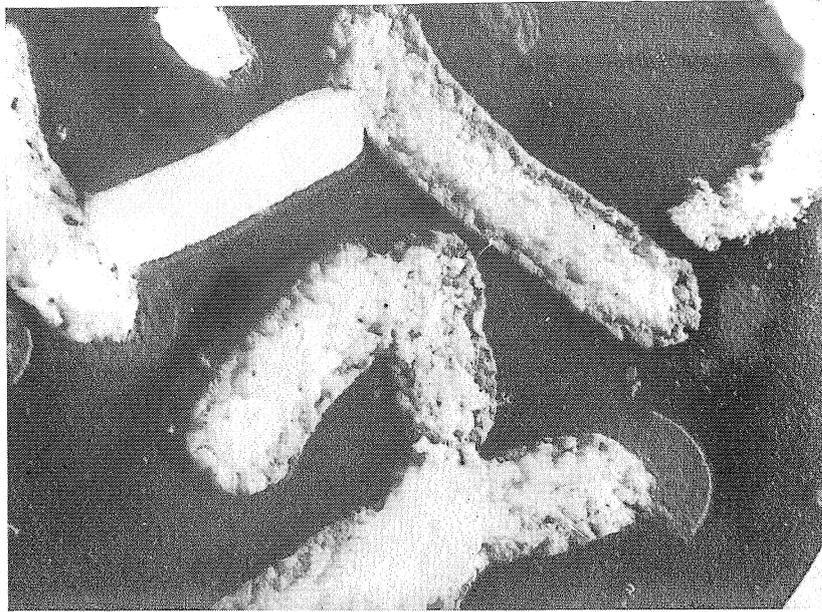
La lisis estudiada por este procedimiento se muestra en las figuras 4-7, correspondientes, respectivamente, a *Bacillus megaterium*, *B. coagulans* y *B. subtilis*, en un medio de cultivo que contiene el inhibidor a la concentración de 0,06 por ciento, después de quince horas de contacto con el ácido. La densidad óptica era de 0,27, y de 0 después de las quince horas (\*).

DISCUSION

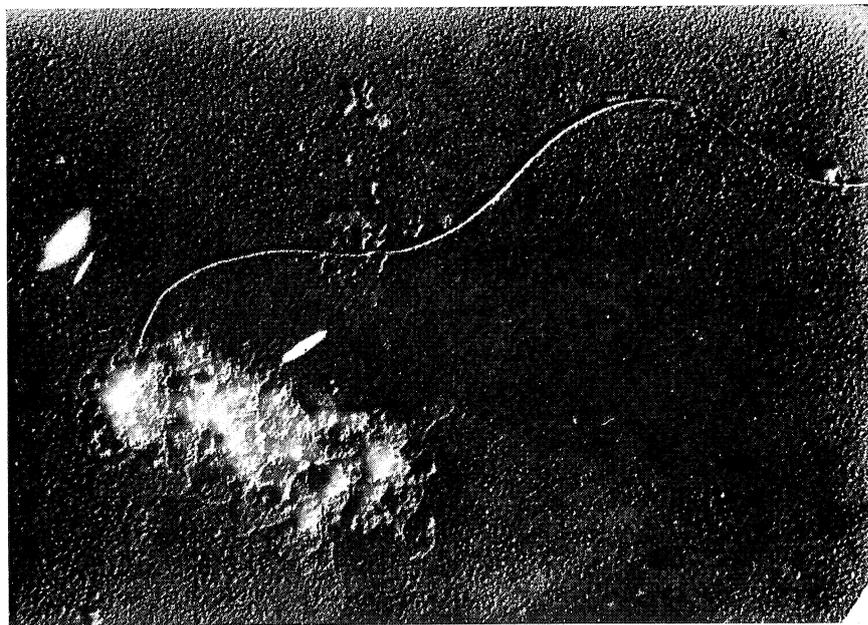
El ácido  $\gamma$ -2,4-diclorofenoxibutírico que actúa como inhibidor del crecimiento en cultivos de bacterias del género *Bacillus* a concentraciones que varían entre 0,02 y 0,006 por ciento causa también lisis de los cultivos si se añade a éstos durante la fase logarítmica o estacionaria. La misma concentración de ácido agregada al cultivo durante la fase

---

(\*) Las fotografías que figuran en el trabajo han sido obtenidas por el Dr. M. Rubio Huertos, jefe del Servicio de Microscopía Electrónica, de la División de Ciencias (C. S. I. C.), a quien agradecemos su eficaz ayuda, así como al personal del Servicio.



*Figura 4. Bacillus megaterium. Se aprecia que la pared celular ha desaparecido parcial o totalmente en las bacterias lisadas, y el protoplasma totalmente granulado, en contraste con el aspecto homogéneo de la bacteria normal × 16.000*



*Figura 5. B. coagulans. Un estado más avanzado de la lisis, en donde el protoplasma está prácticamente desintegrado. Véase la resistencia del flagelo que permanece aún inserto en la bacteria. × 28.000*

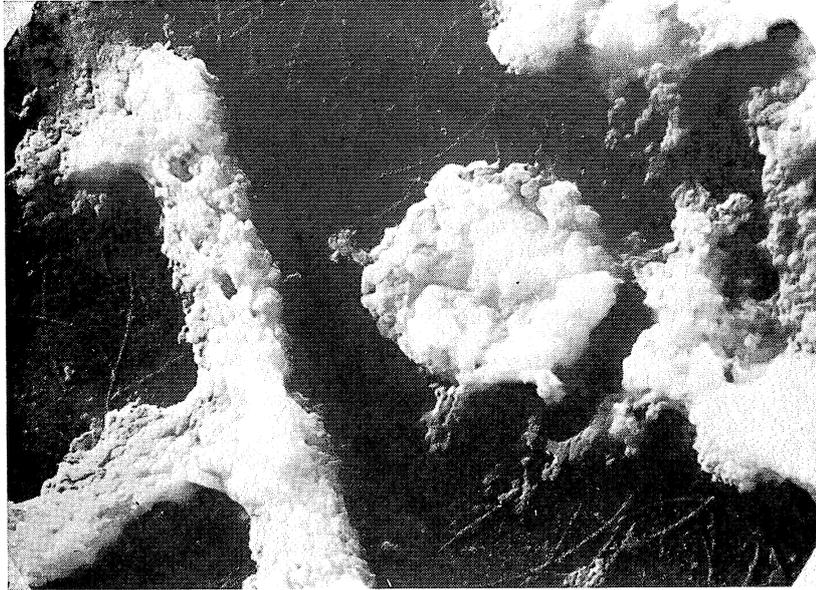


Figura 6. *B. subtilis*. Lisis avanzada. La pared ha desaparecido totalmente  
× 21.000

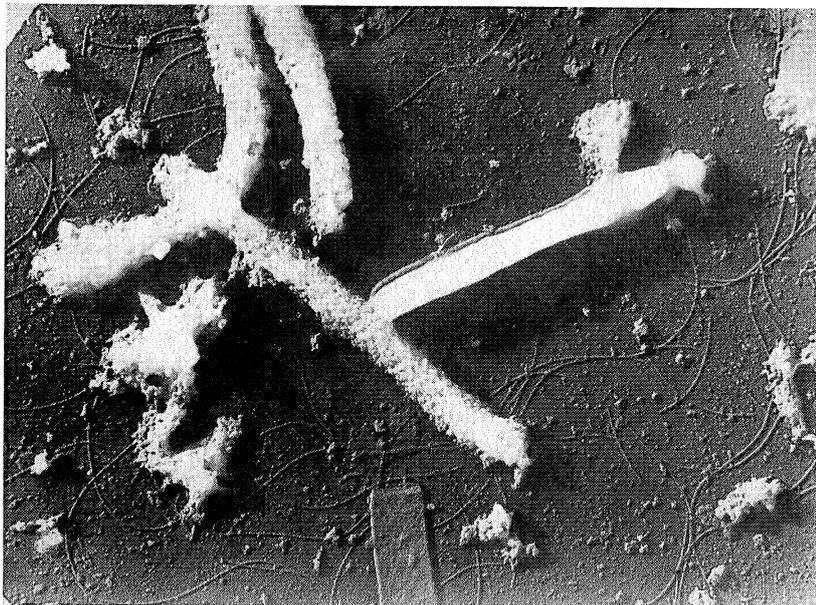


Figura 7. *B. subtilis*. Una bacteria aún no lisada, en contraste con las que presentan lisis avanzada. En el fondo de la preparación, los flagelos desprendidos de las bacterias conservan toda su integridad. × 18.000

de latencia o al principio de la exponencial, sólo tiene efecto inhibidor; la lisis del cultivo en estas condiciones exige mayores concentraciones de ácido, observándose a las cinco horas de contacto si la concentración es de 0,06 por ciento.

La lisis es progresiva a medida que aumenta el tiempo de contacto con el inhibidor, pero no se ha visto lisis total del cultivo durante todo el tiempo que duró la experiencia; la resiembra en medio nuevo, sin inhibidor, ha dado siempre células viables, aún después de treinta días de contacto. La supervivencia es inferior a 1 por ciento en cultivos que contienen 70, 50 ó 14 millones de bacterias/ml, en el momento de ponerle el inhibidor.

La resistencia a la lisis de los cultivos de 0, 1 y 2 horas de edad en las tres estirpes estudiadas cuando se emplea la concentración mínima de inhibición, hace suponer la mayor resistencia de las células más jóvenes y probablemente sean ellas las responsables de la viabilidad de los cultivos. Hemos de hacer notar que las esporas tampoco se lisan y aún cuando en el medio de cultivo no se ha visto la esporulación de estas bacterias, no podemos afirmar categóricamente la ausencia total de esporas.

Al estudiar la inhibición de crecimiento de estas bacterias se ha visto inhibición parcial de la respiración en células lavadas, pero a concentraciones de ácido mucho mayores que la mínima de inhibición. La resistencia a la lisis de las células muertas o de las paredes celulares obtenidas de ellas, así como la de lisis parcial de los cultivos viejos, nos hacen suponer que inhibición y lisis son efectos secundarios de su modo de acción; es muy posible que interfiera en los mecanismos de síntesis celular y, en consecuencia, se produzca inhibición de la multiplicación y lisis de las bacterias.

## RESUMEN

Se estudia la acción lítica del ácido  $\gamma$ -2-4--diclorofenoxibutírico sobre cultivos del *Bacillus coagulans*, *B. subtilis* y *B. megaterium*, a pH = 7. La concentración mínima que produce inhibición del crecimiento cuando se añade a un cultivo de 0 horas, causa lisis si se agrega durante la fase logarítmica o estacionaria. La lisis es progresiva al aumentar el tiempo de contacto de las células con el ácido.

Las células muertas o las paredes celulares obtenidas de las bacterias no son lisadas por las concentraciones de ácido ensayadas.

Se discute el que la inhibición de crecimiento y lisis de los cultivos puedan ser efectos secundarios del modo de acción del ácido.

#### SUMMARY

The lytic action of the  $\gamma$ -2,4-dichlorophenoxybutyric acid on cultures of *Bacillus coagulans*, *B. subtilis* and *B. megaterium*, at pH = 7 is studied.

The smallest concentration of  $\gamma$ -2,4-DB that inhibits the growth would cause lysis if it is added to cells in the logarithmical or stationary phase.

The lysis is progressive when the time of contact between cells and acid is increased.

The lytic action of  $\gamma$ -2,4-DB only takes place on living cells but not on the non-living cells or the cell walls isolated from them.

Our results seem to indicate that the inhibition of the growth and the lysis of the cells are side effects of the  $\gamma$ -2,4-DB.

#### BIBLIOGRAFIA

1. GONZÁLEZ, C., y ROMÁN, M. Datos aún no publicados.
2. GUTENMANN, W. H.; HARDEE, D. D., y HOLLAND, R. F. 1963. J. Dairy Sci., 46, 991-92.
3. GUTENMANN, W. H., y LISK, D. J. 1965. Ny Fish Game J., 12, 108-11.
4. KLINGMAN, D. L., y SHAW, W. C. 1962. U. S. Dept. Agr. Farmers' Bull., 2.183, 3-24.
5. LISK, D. J.; GUTENMANN, W. H.; BACHE, C. A.; WARNER, R. G., y WAGNER, D. G. 1963. J. Dairy Sci., 46, 1.435-37.
6. SCHOLL, J. M., y STANFORTH, D. W. 1957. Agron. J., 49, 432-35.

C. S. I. C.  
INSTITUTO DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA Y MICROBIOLOGIA

## RESISTENCIA TERMICA DE DIFERENTES ESPECIES DE *CLOSTRIDIUM*, AISLADAS DE SALMUERAS DE ACEITUNAS VERDES ADEREZADAS ALTERADAS (\*)

por

F. GONZÁLEZ-CANCHO y M. J. FERNÁNDEZ-DÍEZ

### INTRODUCCION

El proceso de aderezo de aceitunas verdes estilo español (14) es típicamente fermentativo. Cuando la fermentación no sigue su curso normal, se pueden producir en las distintas fases (13 y 16) una serie de alteraciones que en su mayoría son de origen microbiano.

Las fermentaciones butíricas son más frecuentes durante la primera fase, cuando la salmuera presenta mayor contenido de glucosa y manitol, siendo el *Clostridium beijerinckii* y *Cl. multifermentans* las especies aisladas principalmente de este tipo de alteraciones (7).

La «zapatería», que comunica a las aceitunas propiedades organolépticas muy desagradables, puede producirse cuando el pH de las salmueras es superior a 4,5 unidades (8), habiéndose aislado de dichas salmueras diferentes especies de *Clostridium*, entre las que el *Cl. sporogenes* y *Cl. bifermentans* son las más representativas.

Dentro de un programa de investigación que se está realizando en este Instituto sobre las alteraciones ya citadas, se han aislado nume-

---

(\*) Comunicación presentada al II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Varsovia, agosto de 1966. Abstract B. 3. 16.

rosa cepas de *Clostridium*, que después del correspondiente estudio sistemático han sido incluidas en las siguientes especies: *Cl. sporogenes*, *Cl. limosum*, *Cl. aerofoetidum*, *Cl. lituseburense* y *Cl. nauseum*.

Considerando que en trabajos anteriores (4-6) nos hemos ocupado de la termorresistencia de lactobacilos y levaduras, microorganismos que constituyen la flora normal de las aceitunas verdes aderezadas, hemos creído conveniente, para completar dicho estudio, incluir en él estas especies.

## PARTE EXPERIMENTAL

### A) Aislamiento de las diferentes cepas

10 ml de cada una de las salmueras alteradas se neutralizan con 0,5 g de CO<sub>2</sub>Ca estéril y se calientan a 80 °C durante quince minutos. Después de enfriar, se inocula una fracción de 1 ml en tubos de ensayo que contienen medio de infusión de hígado y se incuban a 37 °C. La purificación posterior y aislamiento se realiza por pases sucesivos en medio agar VF profundo (10).

La clasificación sistemática de las cepas aisladas se hace según Prevot (12) y Bergey (2). *Clostridium sporogenes*, *Cl. aerofoetidum* y *Cl. limosum* se aislaron de salmueras de aceitunas alteradas de la variedad Manzanilla; *Cl. nauseum* y *Cl. lituseburense*, de la variedad Gordal.

### B) Preparación de la suspensión de esporas

Las esporas se obtienen desarrollando los organismos aislados en medio VF glucosado a 37 °C, durante ocho días. Posteriormente, los cultivos se calientan a 80 °C durante quince minutos para destruir las formas vegetativas y se centrifugan durante quince minutos a 5.000 r/m. El sedimento se purifica tres veces, lavando con solución estéril de ClNa al 0,8 por ciento y centrifugación. Finalmente, las esporas se suspenden en la misma solución fisiológica y se conservan en tubos cerrados al vacío, hasta el momento de su utilización. La concentración de esporas se determina por el método de Breed (3).

### C) Preparación y tratamiento de las muestras

Tubos de ensayo de 12 × 180 mm, que contienen 5 ml de medio VF glucosado estéril a pH = 7,0, se inoculan con 0,2 ml de la suspensión

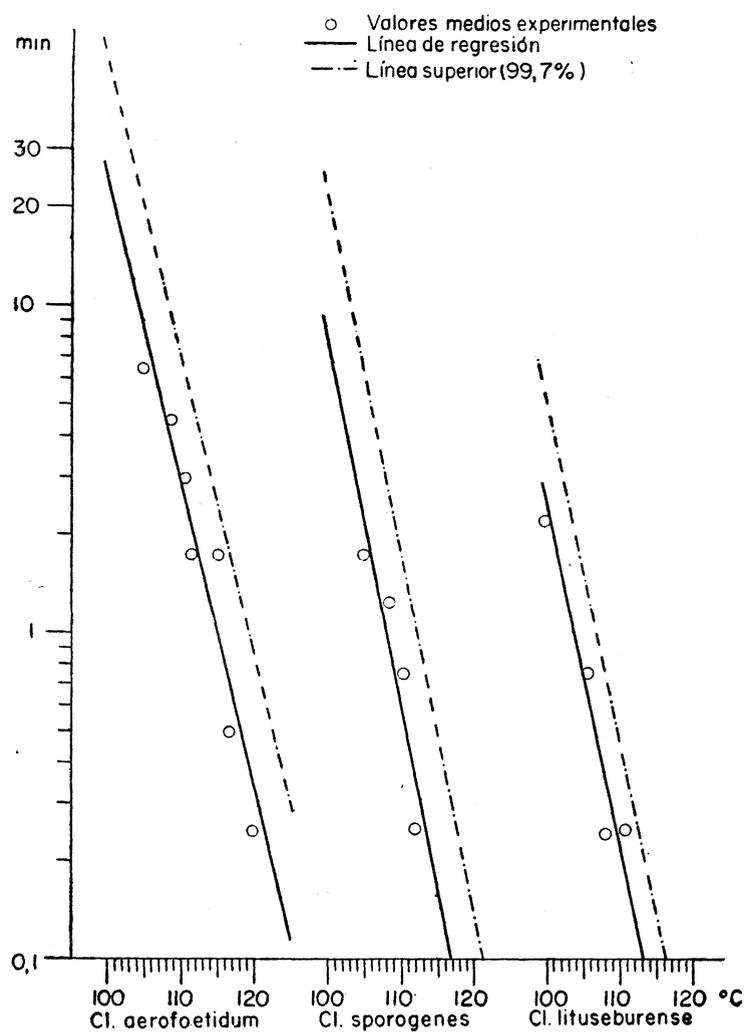


Figura 1

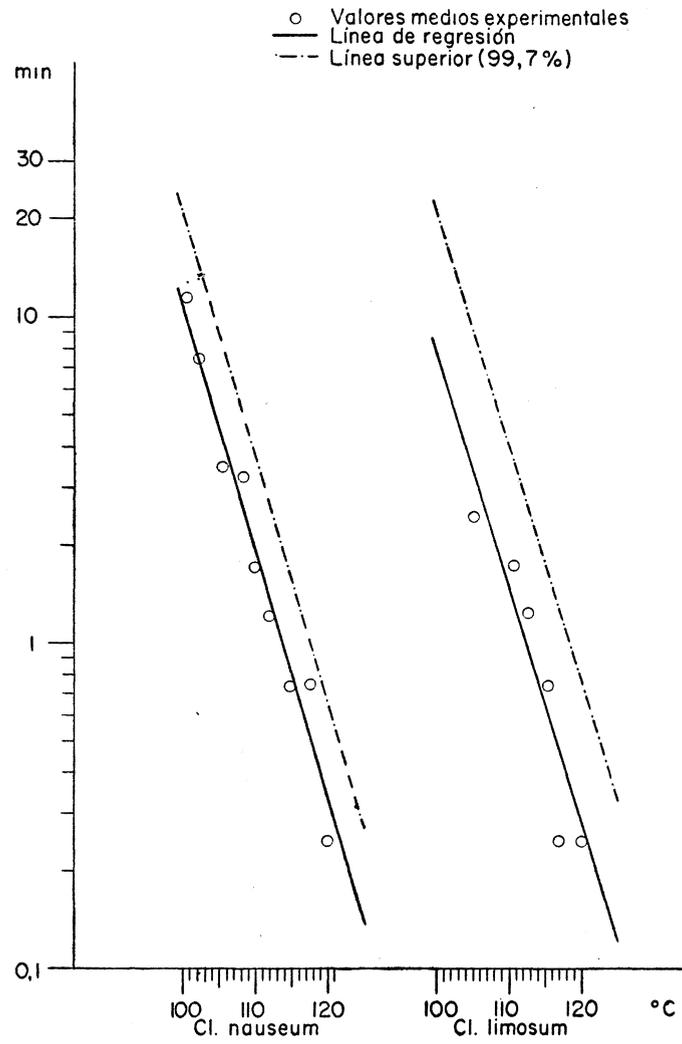


Figura 2

de esporas. A continuación se estiran a la llama, a una distancia del fondo de unos 100 mm, se hace el vacío con bomba de aire y se cierran. La concentración utilizada es de  $7,0 \times 10^5$  esporas/ml, aproximadamente. Los tubos se sumergen posteriormente en un baño de aceite calentado eléctricamente, a diferentes temperaturas constantes y durante períodos variables de tiempo. Los tubos se enfrían rápidamente en agua después del calentamiento y finalmente se incuban en estufa a 37 °C, observando el desarrollo durante ocho días.

Para cada tiempo de calentamiento y temperatura se utiliza un número de replicados comprendido entre 4 y 12, considerando como puntos de destrucción únicamente aquellos en que todos los replicados dan resultado negativo, y puntos de supervivencia, aquellos en que, al menos, uno de los tubos da resultado positivo.

#### D) Resultados y discusión

En las figuras 1-2 se representan, para cada temperatura, los valores medios del tiempo de supervivencia más alto y el de destrucción inmediato superior y la línea recta ajustada por el método estadístico de mínimos cuadrados (9). Se calculan los límites de confianza para la línea de regresión y dicha línea «primitiva» (1) se desplaza hacia arriba una cantidad igual a tres veces la desviación típica.

En el cuadro 1 se resumen todos los resultados. La baja significación encontrada para *Clostridium sporogenes* y *Cl. lituseburensis* se debe al pequeño número de grados de libertad utilizados en el cálculo del coeficiente de correlación para estas dos cepas. Los valores prácticos de los parámetros  $F_{121}$  y  $z$  se han calculado a partir del límite de confianza superior y concuerdan bastante bien con los encontrados en la bibliografía (11, 12 y 15).

#### AGRADECIMIENTO

A la señorita María Josefa Revillas Martínez y señora Mercedes Boudineau de Ruiz, por la eficaz colaboración en el desarrollo del trabajo experimental.

Cuadro 1

Especie	Coeficiente de correlación	Significación	Línea de regresión $Y = a + bX$		Desviación típica de los valores estimados de Y	Parámetros de la línea límite superior	
			a	b		F <sub>121</sub> (min) (*)	z (°C) (**)
<i>Clostridium aerofoetidum</i>	— 0,9668	P < 0,001	10,648	— 0,093	0,138	0,63	11,0
<i>Cl. sporogenes</i>	— 0,9331	0,1 > P > 0,05	12,411	— 0,115	0,162	0,10	9,0
<i>Cl. lituseburense</i>	— 0,9798	0,05 > P > 0,02	10,544	— 0,102	0,112	< 0,10	9,5
<i>Cl. nauseum</i>	— 0,9874	P << 0,001	8,629	— 0,076	0,090	0,51	13,5
<i>Cl. limosum</i>	— 0,9463	0,01 > P > 0,001	8,278	— 0,074	0,154	0,61	13,8

(\*) Número de minutos necesarios para destruir el microorganismo a 121 °C.

(\*\*) Grados centígrados necesarios para que la línea de destrucción térmica atraviese un ciclo logarítmico.

## RESUMEN

Se estudia la resistencia térmica de cinco especies de *Clostridium*, aisladas de salmueras de aceitunas aderezadas alteradas.

Para el cálculo de los parámetros fundamentales  $F_{121}$  y  $z$  se emplea el ajuste estadístico de los valores experimentales.

## SUMMARY

The thermal resistance of five species of *Clostridium*, isolated from the brine of spoiled Spanish-Style Green Olives was studied.

The parameters,  $F_{121}$  and  $z$ , were statistically calculated from the experimental values.

## BIBLIOGRAFIA

1. BALL, C., y OLSON, F. C. W. 1957. Sterilization in Food Technology. McGraw-Hill Co., Inc., Nueva York.
2. BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D., y SMITH, N. R. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7.<sup>a</sup> edición. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
3. COLLINS, C. H. 1964. Microbiological Methods. Butterworths, Londres.
4. FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J., y GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1964. Microbiol. Españ., 17, 225.
5. FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J., y GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1966. Microbiol. Españ., 19, 119.
6. FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J., y GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1967. Rev. Cienc. Apl., 115, 117.
7. GILLILAND, J. R., y VAUGHN, R. H. 1943. J. Bacteriol., 46, 315.
8. KAWATOVARI, T., y VAUGHN, R. H. 1956. Food Res., 21, 481.
9. KRAMER, A., y TWIGG, B. A. 1962. Fundamentals of Quality Control for the Food Industry. The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.
10. LEBERT, F., y TARDIEUX, P. 1952. Technique d'isolement et de Determination des Bacteries Anaerobies. 2.<sup>a</sup> Edition. Paconsly S. A. R. L. Editeurs, París.
11. LONCIN, M., y CARBALLO, J. 1965. Ingeniería Alimentaria. Editorial Dossat, Madrid.
12. PREVOT, A. R. 1961. Traité de Systematique Bacterienne, II. Dunod, París.
13. RODRÍGUEZ-DE-LA-BORBOLLA, J. M.; GÓMEZ-HERRERA, C.; GONZÁLEZ-CANCHO, F., y FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J. 1958. Grasas Aceites, 9, 118.

14. RODRÍGUEZ-DE-LA-BORBOLLA, J. M.; GÓMEZ-HERRERA, C.; GONZÁLEZ-CANCHO, F.; FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, R.; IZQUIERDO, A.; GONZÁLEZ-PELLISO, F.; VÁZQUEZ, R., y GUZMÁN, R. 1961. El Aderezo de Aceitunas Verdes. Patronato «Juan de la Cierva», de Investigación Técnica. Madrid.
15. STUMBO, C. R. 1965. Thermobacteriology in Food Processing. Academic Press, Nueva York.
16. VAUGHN, R. H., y colaboradores. 1943. Production of Spanish Type Green Olives. Bull. 678 Agr. Exptl. Sta. Berkeley.

## EL IX CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Con asistencia de delegaciones de 46 países se celebró este Congreso en Moscú, bajo la presidencia del Prof. V. D. Timakov, del 24 al 30 de julio del pasado año. Los trabajos se agruparon en las siete secciones siguientes:

- A) Fisiología y Genética de los Microorganismos.
- B) Actividades Bioquímicas de los Microorganismos.
- C) Microbiología Industrial y Agrícola.
- D) Microbiología Médica y Veterinaria.
- E) Virología.
- F) Inmunología.
- G) Epidemiología.

Se pronunciaron dos conferencias: «Agentes de la infección vírica primaria», por el Prof. A. Lwoff, y «Teoría del molde genético de la inmunogénesis y regulación neurohumoral de la formación de los anticuerpos», por el Prof. P. Ph. Zdrodowski; y tuvieron lugar, además, once simposios.

España estuvo representada por una numerosa delegación encabezada por el Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, Prof. Lorenzo Vilas. A continuación se citan los títulos y autores de los trabajos presentados.

- A) «Mecanismos de regeneración en protoplastos de hongos», Dres. J. R. Villanueva e Isabel García-Acha.
- B) «La composición química del micelio del *Aspergillus flavus* durante el proceso de autólisis», Dres. R. Lahoz, Ramona Beltrá y Fuentasanta Reyes.

«Primeros estudios sobre un nuevo medio diferencial específico para el grupo *Coli-Aerobacter*, basados en su metabolismo», Dr. Moreno-López.

- D) «Aumento de la sensibilidad colateral de los estafilococos a los antibióticos por la acción de la antibioterapia combinada», Dra. M.<sup>a</sup> Teresa Pérez-Ureña.

«Mutante virulento de *Staphylococcus albus* avirulento», Dres. B. Regueiro y Carmen Domínguez.

«Vacuna contra la peste aviar clásica preparada a partir de células de embrión de pollo inactivado por la beta-propiolactona», Dres. E. Ronda, A. García-Gancedo, M.<sup>a</sup> Luisa Alonso, Pilar Vilas, Concepción Ronda y Lourdes Lucas.

- E) «Acción de diferentes pH y temperaturas sobre las características del virus vacunal», Dres. M.<sup>a</sup> Luisa Alonso, Carmen Gil, Lourdes Lucas, A. García-Gancedo y E. Ronda.

«Estudio genético de varias estirpes del virus vacunal», Dres. A. García-Gancedo, M.<sup>a</sup> Luisa Alonso, E. Ronda, Pilar Vilas y Carmen Gil.

- F) «Contribución al estudio del problema de la detección de los anticuerpos circulantes contra los antibióticos por los métodos inmunofluorescentes», Dres. A. Portolés y Genoveva Tejerina.

«Algunos resultados de la aplicación de las técnicas de anticuerpos fluorescentes a la detección de globulinas anti-medicamentos en pacientes hipersensibles a los antibióticos», Dres. Genoveva Tejerina y A. Portolés

## EL VI CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Del 28 de agosto al 4 de septiembre pasados desarrolló este Congreso sus tareas en la ciudad de Kioto. El Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe del Servicio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias (C. S. I. C.) y Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, dio cuenta personalmente de su trabajo «Aspectos ultraestructurales de las infecciones víricas en las plantas». Posteriormente, hasta el mes de noviembre, pensionado por la Fundación «Juan March», permaneció como profesor visitante en el Departamento de Patología Vegetal de la Facultad de Agricultura, de la Universidad de Nagoya. Los resultados de las investigaciones realizadas durante esta estancia, en colaboración con los doctores Fujisawa, Matsui y Yamaguchi, se publicarán en la revista «Phytopathology».

## BIBLIOGRAFIA

*MODERN TRENDS IN MEDICAL VIROLOGY*. 1967. Butterworth Co. Ltd., Londres. 231 páginas.

Acaba de aparecer esta obra formando parte de un numeroso grupo de volúmenes («Modern Trends Series») que tratan materias de interés médico.

Consta de ocho capítulos completamente independientes, habiendo sido redactado cada uno de ellos por un prestigioso especialista en la materia, exponiéndose en ellos el estado actual de los conocimientos sobre el tema en cuestión de una forma condensada aunque bastante detallada, acompañándose por su correspondiente bibliografía.

Esta obra no es un tratado general, sino que aborda únicamente ciertos problemas importantes y de mucha actualidad dentro del actual panorama de los estudios sobre virus, como son: Ácidos nucleicos víricos, multiplicación de mixovirus, quimioterapia antivírica, defensas del huésped durante la infección vírica, rubeola, sarampión y su vacuna en los países preindustriales, la asociación entre la infección por adenovirus y la enfermedad del tracto intestinal, citomegalovirus, e inmunología de los tumores inducidos por virus.

A pesar de tener esta serie de libros una orientación médica, esta obra, sin perder este carácter, atiende fundamentalmente a los problemas biológicos tanto o más que a los aspectos prácticos tales como son etiología, diagnóstico, terapia, etc. Creemos que, tanto para los estudiosos en Virología como para todas aquellas personas interesadas en estar al corriente de los enormes y rápidos progresos que esta ciencia está experimentando, ha de resultar una obra muy útil, siendo conveniente su lectura.

A. GARCIA - GANCEDO

Depósito legal: M. 702 - 1958.

---

ARTES GRÁFICAS REYES.—Jerónima Lorente, 15.—MADRID.