

---

VOLUMEN 20. 1967

JULIO - DICIEMBRE. NUMEROS 3 - 4

# *Microbiología Española*

*Revista*

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



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

**INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA**

**Director:** Prof. Lorenzo Vilas López.  
**Secretario:** Dr. Jaime del Campo Lawday  
**Jefes de Sección:** Dr. Miguel Rubio Huertos  
Dr. Enrique Feduchy Mariño

**SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES**

**Presidente:** Dr. Gonzalo Urgoiti Somovilla  
**Vicepresidente:** Dr. Román de Vicente Jordana  
**Secretario:** Dr. Miguel Rubio Huertos  
**Tesorero:** Dr. Enrique Feduchy Mariño  
**Bibliotecario:** Dr. Alvaro Zugaza Bilbao  
**Vocales:** Dr. Angel Fernández Nafria  
Prof. Dimas Fernández-Galiano Fernández  
Prof. Sebastián Miranda Entrenas  
Dr. Julio Pérez Silva  
Prof. Agustín Pumarola Busquets  
Prof. Benito Regueiro Varela  
Prof. Julio Rodríguez Villanueva  
Dr. Fernando Ruiz-Falcó López

**«MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA»**

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

**Vicedirectores:**

Dr. Gonzalo Urgoiti, 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.



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

---

I N D I C E

	Página
Obtención y análisis químico de paredes celulares del <i>Corynebacterium sepedonicum</i> , por M. Santaolalla ... ..	87
Nota acerca de la acción lipolítica de algunos hongos, por Adela Bortol ... ..	99
Caracterización de un enterovirus bovino (M80) asociado con la enfermedad de las mucosas, por B. Moreno ... ..	107
Algunas características de las formas L fijas del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> obtenidas por medio de radiación ultravioleta, por Eulalia Cabezas de Herrera y M. Rubio-Huertos ... ..	131
Inoculación experimental del embrión de pollo con micobacterias, por J. del Rey, R. Garrido y J. A. Mira ... ..	147
Comportamiento de algunas especies de azotobacteriáceas frente a los antibióticos, por R. López ... ..	167
Variaciones en la composición de aminoácidos en especies de azotobacteriáceas antibióticorresistentes, por R. López, E. Ronda y A. Portolés ... ..	191
Study of a hemagglutination inhibitor from HeLa cells, by A. García-Gancedo, E. Ronda, M. <sup>a</sup> Luisa Alonso and Pilar Vilas ... ..	203
Producción y ultraestructura del pseudomicelio de <i>Saccharomyces fragilis</i> , por F. de Uruburu y J. Monreal ... ..	219
Producción de enzimas pectolíticas en cultivo continuo, por Genoveva Tejerina, A. Portolés y Eulalia Cabezas de Herrera ... ..	233
Nota sobre la actividad antibiótica del compuesto DAN-352, por L. Arcalís y J. Caldés ... ..	245

---

VOLUMEN 20

1967

# *Microbiología Española*

*Revista*

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



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
MADRID

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

Vicedirectores: Dr. Gonzalo Urgoiti, 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.<sup>a</sup> del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

---

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

## INDICE

	Página
<i>Alonso, M.<sup>a</sup> Luisa: véase García-Gancedo, A.</i> ... ..	203
<i>Arcalís, L., y Caldés, J.:</i> Nota sobre la actividad antibiótica del compuesto DAN-352 ... ..	245
<i>Bortol, Adela:</i> Nota acerca de la acción lipolítica de algunos hongos ... ..	99
<i>Cabezas de Herrera, Eulalia, y Rubio-Huertos, M.:</i> Algunas características de las formas L fijas del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> obtenidas por medio de radiación ultravioleta ... ..	131
<i>Cabezas de Herrera, Eulalia:</i> véase <i>Tejerina, Genoveva</i> ... ..	233
<i>Caldés, J.:</i> véase <i>Arcalís, L.</i> ... ..	245
<i>Callao, V.:</i> véase <i>Ramos, A.</i> ... ..	1
El IX Congreso Internacional de Microbiología ... ..	81
El VI Congreso Internacional de Microscopía Electrónica ... ..	83
<i>Fernández-Díez, M. J.:</i> véase <i>González-Cancho, F.</i> ... ..	73
<i>Fernández-Puentes, J. L., y Pérez-Silva, J.:</i> Utilización de distintas fuentes de carbono y de nitrógeno por levaduras ... ..	37
<i>García-Gancedo, A.:</i> Bibliografía ... ..	85
<i>García-Gancedo, A.; Ronda, E.; Alonso, M.<sup>a</sup> Luisa, and Vilas, Pilar:</i> Study of a hemagglutination inhibitor from HeLa cells ... ..	203
<i>Garrido, R.:</i> véase <i>Rey, J. del</i> ... ..	147
<i>González, Cándida:</i> véase <i>Román, María</i> ... ..	63

	Página
<i>González-Cancho, F., y Fernández-Díez, M. J.:</i> Resistencia térmica de diferentes especies de <i>Clostridium</i> , aisladas de salmueras de aceitunas verdes aderezadas alteradas ... ..	73
<i>López, R.:</i> Comportamiento de algunas especies de azotobacteriáceas frente a los antibióticos ... ..	167
<i>López, R.; Ronda, E., y Portolés, A.:</i> Variaciones en la composición de aminoácidos en especies de azotobacteriáceas antibióticorresistentes ... ..	191
<i>Mira, J. A.:</i> véase <i>Rey, J.</i> del ... ..	147
<i>Monreal, J.:</i> véase <i>Uruburu, F.</i> de ... ..	219
<i>Moreno, B.:</i> Caracterización de un enterovirus bovino (M80) asociado con la enfermedad de las mucosas ... ..	107
<i>Ola, Fanny N., y Ordóñez, Ceferina R.:</i> Contribución al estudio del metabolismo del triptofano por <i>Escherichia coli</i> , I. Empleando medios con glucosa y sin glucosa y en condiciones aeróbicas ... ..	53
<i>Ordóñez, Ceferina R.:</i> véase <i>Ola, Fanny N.</i> ... ..	53
<i>Pérez-Silva, J.:</i> véase <i>Fernández-Puentes, J. L.</i> ... ..	37
<i>Pérez-Ureña, M.<sup>a</sup> Teresa:</i> Valoración de la antibióticorresistencia derivada del empleo <i>in vitro</i> de asociaciones antibióticas no sinérgicas ... ..	19
<i>Portolés, A.:</i> véase <i>López, R.</i> ... ..	191
<i>Portolés, A.:</i> véase <i>Tejerina, Genoveva</i> ... ..	233
<i>Ramos, A., y Callao, V.:</i> El empleo de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana ... ..	1
<i>Rey, J. del; Garrido, R., y Mira, J. A.:</i> Inoculación experimental del embrión de pollo con micobacterias ... ..	147
<i>Reyes, F.:</i> Producción de oxicloraquina y un glucolípido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y actividad antimicrobiana de la oxicloraquina ... ..	13
<i>Román, María, y González, Cándida:</i> La lisis producida por el ácido $\gamma$ -2, 4-diclorofenoxibutírico sobre cultivos de algunas bacterias del género <i>Bacillus</i> ... ..	63

	Página
<i>Ronda, E.</i> : véase <i>López, R.</i> ... ..	191
<i>Ronda, E.</i> : véase <i>García-Gancedo, A.</i> ... ..	203
<i>Rubio-Huertos, M.</i> : Véase <i>Cabezas de Herrera, Eulalia</i> ... ..	131
<i>Santaolalla, M.</i> : Obtención y análisis químico de paredes celulares del <i>Corynebacterium sepedonicum</i> ... ..	87
<i>Tejerina, Genoveva; Portolés, A., y Cabezas de Herrera, Eulalia</i> : Producción de enzimas pectolíticas en cultivo continuo.	233
<i>Uruburu, F. de, y Monreal, J.</i> : Producción y ultraestructura del seudomicelio de <i>Saccharomyces fragilis</i> ... ..	219
<i>Vilas, Pilar</i> : véase <i>García-Gancedo, A.</i> ... ..	203

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

## OBTENCION Y ANALISIS QUIMICO DE PAREDES CELULARES DEL *CORYNEBACTERIUM* *SEPEDONICUM*

por

M. SANTAOLALLA

### INTRODUCCION

Continuando el estudio de las paredes celulares de los microorganismos patógenos de plantas, estudiamos ahora las paredes celulares de un microorganismo patógeno de plantas, gram-positivo: el *Corynebacterium sepedonicum*, que produce la podredumbre en anillo de la patata, caracterizada porque, si cortamos un tubérculo enfermo longitudinalmente, observamos, en los casos típicos, una coloración ligeramente amarillenta de todo o parte del anillo que forman los haces fibrovasculares; aunque la enfermedad puede manifestarse solamente por el aspecto más vidrioso del mismo.

Deseamos comparar la composición química de la pared celular de este microorganismo patógeno de plantas con la de otros ya estudiados anteriormente por nosotros (23-24), y al mismo tiempo estudiar las diferencias en la composición química de las paredes, si existen, respecto a otros gram-positivos, patógenos o no de plantas estudiadas por numerosos investigadores.

## MATERIALES Y METODOS

Empleamos una estirpe de *Corynebacterium sepedonicum* aislada del *Solanum tuberosum*, procedente de la Colección Nacional de Bacterias Patógenas de Plantas «L. Nilson», de Suecia. Es un bastoncillo muy polimorfo, no esporulado, aerobio, fácilmente coloreable por los métodos de tinción empleados comúnmente, y gram-positivo; su crecimiento es lento en los medios ordinarios aun añadiendo extracto de patata.

Cultivamos el microorganismo en cuatro matraces de Erlenmeyer de 6 l de capacidad, con 1,5 l de caldo común glucosado al 2% cada uno, con agitación, a 25 °C; a los doce días, separamos los gérmenes por centrifugación y lavamos tres veces con agua estéril; comprobamos su pureza haciendo observaciones periódicas por microscopía normal y electrónica.

### *Aislamiento del glucolípido*

Seguimos fundamentalmente el método de Wells y Dittmer (26), para lo cual tratamos los microorganismos tres veces consecutivas con 75 cm<sup>3</sup> de una mezcla cloroformo+metanol (2:1, v/v), durante dos horas, a la temperatura ambiente y en agitador magnético. Separamos por filtración los microorganismos, y dejamos evaporar los disolventes reunidos, espontáneamente, a la temperatura ambiente.

### *Obtención de las paredes celulares*

Empleamos los métodos de Cummins y Harris (3) y Salton y Horne (20-21), ya seguidos anteriormente por nosotros (23-24). En esta ocasión, las células fueron desintegradas en el aparato de Braun.

Las microfotografías electrónicas del microorganismo fueron hechas por la técnica corriente, sombreando con oro-paladio. Las correspondientes a las paredes celulares, por tinción negativa con ácido fosfotúngstico. Ambas fueron hechas con el microscopio Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas (C. S. I. C.), por el Dr. Rubio Huertos, Jefe del Servicio.

*Hidrólisis de la sustancia glucoproteica*

Para identificar los aminoácidos hidrolizamos la glucoproteína, en tubo cerrado, con ClH 6N, calentando en estufa a 115 °C, durante dieciséis horas. Evaporamos el líquido hasta sequedad en estufa, a unos 50 °C, disolvemos el residuo en agua destilada y hacemos dos evaporaciones consecutivas para eliminar las trazas de ácido clorhídrico; este residuo lo disolvemos en una pequeña cantidad de agua y con esta solución hacemos análisis cromatográfico.

Para la identificación de glúcidos hacemos dos clases de hidrólisis; una, fuerte, en tubo cerrado, con SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, 2N en estufa, a 100 °C, durante dos horas; a continuación neutralizamos el SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> en exceso con Ba (OH)<sub>2</sub> sólido, separamos el sulfato bórico precipitado por centrifugación, evaporamos el líquido a unos 50 °C y disolvemos el residuo en una pequeña cantidad de agua destilada. Realizamos una tercera hidrólisis, a baja temperatura, 37 °C, según Salton (18), con ClH 12N, durante cuarenta y ocho horas; evaporamos el ClH en desecador de vacío, con SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> y NaOH en forma de lentejas, disolvemos el residuo y lo volvemos a evaporar para, finalmente, disolverlo en una pequeña cantidad de agua destilada.

*Análisis cromatográfico sobre papel*

Para aminoácidos empleamos la cromatografía monodimensional descendente sobre papel Whatman núm. 1. Como disolvente: butanol-n, 40; etanol, 10; ácido acético, 10; agua, 20. En la cromatografía de desarrollo bidimensional usamos como disolvente, en la primera dimensión, fenol al 80 %, en agua; en la segunda: butanol-n, 80; ácido acético, 20; agua, 20. Revelamos las manchas con solución de ninhidrina al 1 % en alcohol isobutílico al 90 %.

Para monosacáridos también empleamos la cromatografía monodimensional descendente sobre papel Whatman núm. 1, y como disolvente: butanol-n, 40; ácido acético, 10; agua, hasta saturación. Como reveladores: ftalato de anilina y nitrato de plata en solución acetónica de hidróxido sódico, según Trevelyan y colaboradores (25). Los aminoazúcares los identificamos con el reactivo de Morgan y Elson (2 y 14). Investigamos acetilaminoazúcares con el reactivo de Hough (7) y con el empleado por Salton (18), que consta de lo siguiente: 1) etanol de

95% + borato sódico 0,05 M (v/v); 2) solución de p-dimetilaminobenzaldehído en acético glacial, al 2% (p/v), 10; butanol-n, 30, y ácido clorhídrico concentrado, 0,04 cm<sup>3</sup>. Pulverícese con 1). Séquese el cromatograma con vapor fluente en autoclave, durante diez minutos; pulverícese el cromatograma con 2). Conviene preparar los reactivos diariamente, bien que a la temperatura normal suelen conservarse durante una semana.

Para la investigación de glicerol en las paredes celulares empleamos el método de Ikawa y colaboradores (8).

#### *Análisis cromatográfico en placa fina*

Comprobamos los aminoácidos por cromatografía bidimensional en capa fina de celulosa, siguiendo el método de Jones y Heathcote (9). En el glucolípido disuelto en cloroformo + metanol (2:1, v/v) investigamos lípidos neutros sobre placas de silicagel, siguiendo el método de Kelley (10).

Este glucolípido lo purificamos por tratamiento con éter de petróleo (p. e., 30°-50 °C) y agua, separando las capas acuosa y etérea; tanto con la solución etérea como con la acuosa, evaporadas a pequeño volumen, hacemos análisis cromatográfico.

## RESULTADOS

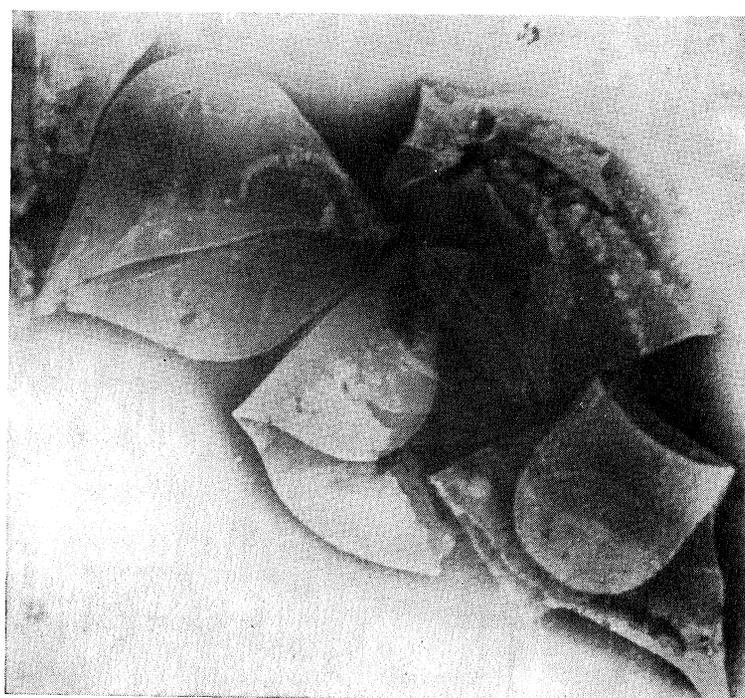
La *figura 1* muestra el *Corynebacterium sepedonicum* después de extraído el glucolípido; en la *figura 2*, correspondiente a las paredes, no se observa ninguna estructura.

Entre los aminoácidos producidos en la hidrólisis de la pared de este microorganismo encontramos fundamentalmente cinco, cuya mayor concentración coincide con el siguiente orden de exposición: ácido glutámico, alanina, glicina, lisina y ácido diaminopimélico; identificamos también indicios de valina, difenilalanina y leucina. La *figura 3*, un cromatograma monodimensional, indica claramente lo anteriormente expuesto.

Como constituyentes glúcidos predominan la glucosa y ramnosa, y en mucha menor proporción encontramos xilosa; el aminoazúcar encontrado en mayor proporción fue la flucosamina, y en mucha menor,



*Figura 1. Corynebacterium sepedonicum, sin glucolípido. × 40.000*



*Figura 2. Paredes de C. sepedonicum, tinción negativa. × 48.000*

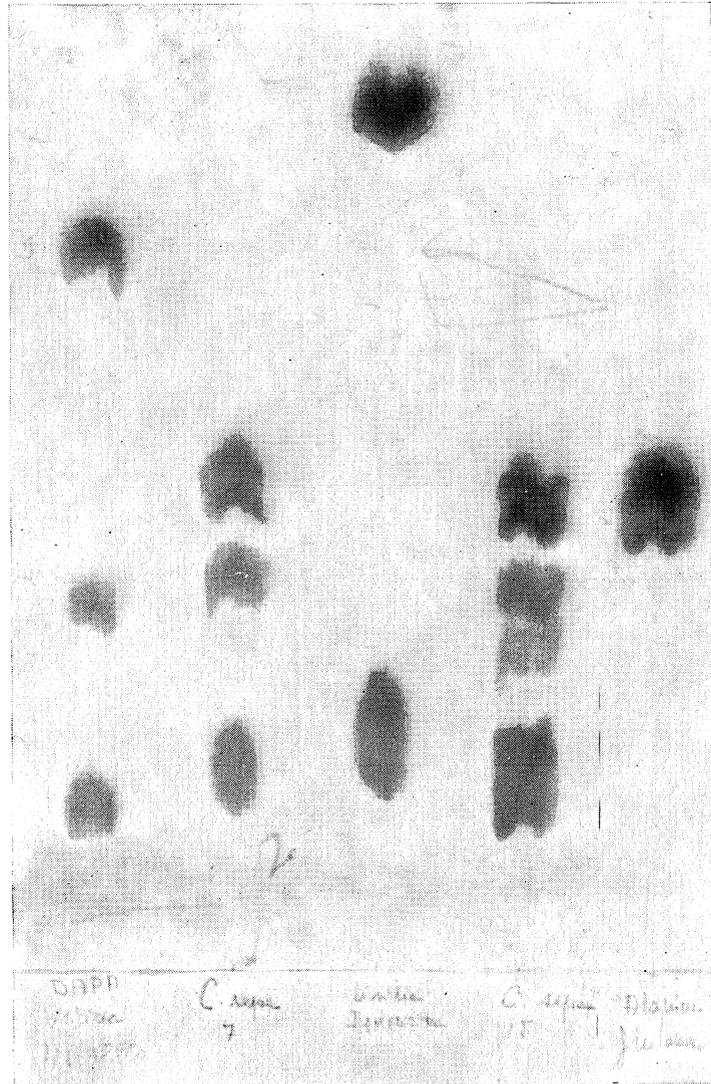


Figura 3. Cromatografía monodimensional de los aminoácidos de la pared del *C. sepedonicum*

señalamos el ácido murámico. No encontramos glicerol ni N-acetilaminoazúcares.

En el *cuadro 1* señalamos los principales componentes del glucopéptido de la pared celular de este microorganismo y su mayor concentración.

*Cuadro 1*

Componentes fundamentales del glucopeptido	Concentración (*)
Acido glutámico	+++
Alanina	+++
Glicina	++
Lisina	++
Acido diaminopimélico	+
Glucosa	+++
Rammosa	+++
Xilosa	+
Glucosamina	++
Acido murámico	indicios

(\*) El número de cruces está en relación directa con la mayor concentración encontrada en los análisis correspondientes.

Debido a la pequeña cantidad de glucolípido obtenido no podemos hacer el análisis total del mismo para la determinación de su estructura, pero sí identificamos como componentes de éste la glucosa, ácidos grasos libres y diglicéridos 1,3 y 1,2.

## DISCUSION

No podemos apreciar ninguna estructura en las microfotografías electrónicas de las paredes celulares sin glucolípido, del *Corynebacterium sepedonicum*, microorganismo gram-positivo; como tampoco la encontramos anteriormente en las paredes correspondientes al *Agrobacterium tumefaciens* y *Erwinia carotovora* (23-24), estos últimos gram-negati-

vos, obtenidos por los mismos métodos. Muchos investigadores y entre ellos Baddiley (1), Labaw y Mosley (12) Salton (22) y otros, observan distintas agrupaciones estructurales en las paredes celulares de diversas bacterias. Fischman y Weinbaum (5), estudiando la estructura submicroscópica de las paredes celulares de *Escherichia coli* B, muestran que únicamente cuando las paredes fueron calentadas diez minutos a 90 °C, antes del aislamiento, se aprecia en ellas una estructura hexagonal y que la digestión con pepsina hace desaparecer esta estructura, mientras que si son digeridas con amilasa y pancreatina mejora la visualización de la estructura hexagonal observada; sugiriendo que las lipoproteínas globulares unidas a la pared pueden ser la causa de este enrejado hexagonal sobre la capa mucopéptica. Goundry y colaboradores (6), estudiando la estructura de las paredes del *Bacillus polymyxa* (N. C. I. B. 4747), obtenidas a partir de cultivos crecidos durante períodos de tiempo distintos, encuentran en todos la misma estructura, y ésta parece apreciarse mejor una vez eliminados los lípidos por tratamiento con cloroformo + metanol que no afecta a los aminoácidos componentes de la pared; sin embargo, el referido autor señala que si las paredes son tratadas con pepsina o tripsina en tampón de fosfato, no se observa estructura, y que incubándolas en presencia de urea también se destruye, por lo menos en parte, la estructura submicroscópica de la pared; esto hace pensar también a Baddiley que el componente estructural de las paredes del microorganismo no sea el típico mucopéptido. En nuestros intentos de comprobar alguna estructura en las diversas paredes de microorganismos patógenos de plantas estudiados, los resultados negativos obtenidos pudieran ser debidos a los tratamientos con pepsina y tripsina a que sometemos las paredes con intención de librarlas de los componentes citoplasmáticos proteínicos que pudieran impurificarlas.

En la composición química de las paredes celulares de este microorganismo gram-positivo y patógeno de plantas no encontramos diferencias fundamentales con la señalada como básica para el mucopéptido de los microorganismos gram-positivos por diversos autores (13, 17, 19, 27, etc.); únicamente podemos señalar que solamente encontramos indicios de ácido murámico, aunque no descartamos la posibilidad de que esto sea debido a acciones hidrolíticas en el proceso de hidrólisis del mucopéptido. Las mayores cantidades encontradas corresponden, entre los aminoácidos, a ácido glutámico y alanina, y entre los azúcares, a la glucosa y ramnosa. El ácido glutámico lo hemos encontrado

también en gran cantidad en las paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* y *Erwinia carotovora* (23-24), predominando también en la pared de estos últimos microorganismos la alanina; encontramos la ramnosa y la ribosa como preponderante en el *A. tumefaciens*, y la glucosa en la *E. carotovora*. Encontramos glucosamina como único aminoazúcar en la composición de las paredes de *Corynebacterium sepedonicum* y pequeñas cantidades de grasa, datos que coinciden con los señalados por Salton (19) respecto a los distintos componentes de las paredes de microorganismos gram-positivos y gram-negativos.

Perkins y Cummins (16), estudiando el mucopéptido de la pared de ciertas especies de *Corynebacterium* patógenos de plantas, gram-positivos, encuentran que ninguno de ellos contiene lisina ni ácido diaminopimélico; caracterizan, sin embargo, en el *Corynebacterium tritici* (N. C. P. P. 47), el ácido 2-4 diaminobutírico, y en los *C. poinsettiae* (N. C. P. P. 177), *C. betae* (N. C. P. P. 373) y *C. flaccumfaciens* (N. C. P. P. 558), D-ornitina; posteriormente, Perkins (15) indica que, por lo menos, los tres últimos de estos microorganismos contienen también homoserina; estos resultados no coinciden con los nuestros, que corresponden muy aproximadamente a los señalados como típicos. Work (28) encuentra en el hidrolizado de la pared del *Micrococcus radiodurans*, ornitina, pero junto con otros aminoácidos, entre los que se encuentran los típicos del mucopéptido de la pared. La D-ornitina también la señalan Duc-Nguyen y Weed (4) como un constituyente de la pared de ciertos microorganismos; posteriormente, Kelly y Weed (11) identifican la taurina como constituyente de la pared de un microorganismo gram-positivo, el *Bacillus subtilis* «opaco».

## RESUMEN

Estudiamos la estructura y composición química de las paredes celulares del *Corynebacterium sepedonicum*, microorganismo gram-positivo y patógeno de plantas. No encontramos en su pared ninguna estructura submicroscópica, como muestran las microfotografías electrónicas.

En la composición química de esta pared celular, identificamos los componentes típicos de la pared celular de los microorganismos gram-positivos, en mayor proporción, ácido glutámico y alanina, y en menor, ácido diaminopimélico; como componentes glúcidos predominan la glu-

cosa y ramnosa, seguidos por glucosamina y, en menor proporción, xilosa

Nuestros resultados no coinciden con los encontrados por Perkins y Cummins (16) estudiando otros *Corynebacterium* patógenos de plantas, gram-positivos.

En el glucolípido aislado previamente, identificamos ácidos grasos libres, digliceridos, 1,3 y 1,2.

### SUMMARY

The structure and chemical composition of cell walls of *Corynebacterium sepedonicum* have been studied. No specific ultrastructure has been found by electron microscopy.

The typical chemical components of Gram positive bacteria has been found. Glutamic acid and alanine were the major components. Diaminopimelic acid was found in less quantity. Glucose, Rhamnose, Glucosamine and Xilose were found in the glucidic component.

The glucolipid component previously isolated was composed by free fatty acids, 1,3 and 1,2 diglycerids and glucose.

Our results are not in agreement with other plant pathogens *Corynebacterium* studied by other authors.

### BIBLIOGRAFIA

1. BADDILEY, J. 1964. Endeavour, 23, 33.
2. CRAMER, F. 1958. Cromatografía sobre papel. 3.<sup>a</sup> edición.
3. CUMMINS, C. S., y HARRIS, H. 1958. J. Gen. Microbiol., 18, 173.
4. DUC-NGUYEN, H., y WEED, L. L. 1964. J. Biol. Chem., 239, 3.372.
5. FISCHMAN, D. A., y WEINBAUM, G. 1967. Science 155, 472.
6. GOUNDRY, J.; DAVISON, A. L.; ARCHIBALD, A. R., y BADDILEY, J. 1967. Biochem. J., 104, 1c.
7. HOUGH, L.; JONES, J. K. N., y WADMAN, W. 1950. J. Chem. Soc., 1.702.
8. IKAWA, M.; MORROW, J. W., y HARNEY, S. J. 1966. J. Bacteriol., 92, 812.
9. JONES, K., y HEATHCOTE, J. G. 1966. J. Chromatog., 24, 106.
10. KELLEY, T. F. 1966. J. Chromatog., 22, 456.
11. KELLY, A. P., y WEED, L. L. 1965. J. Biol. Chem., 240, 2.519.
12. LABAW, W., y MOSLEY, V. M. 1954. Biochim. Biophys. Acta, 15, 325.
13. MANDELSTAN, J. 1962. Biochem. J., 84, 294.
14. MORGAN, W. T. J., y AMINOFF, S. 1948. Nature, 162, 579.

15. PERKINS, H. R. 1965. *Biochem. J.*, 97, 3 c.
16. PERKINS, H. R., y CUMMINS, C. S. 1964. *Nature*, 201, 1.105.
17. PERKINS, H. R., y ROGERS, H. J. 1959. *Biochem. J.*, 72, 647.
18. SALTON, M. R. J. 1959. *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 308.
19. SALTON, M. R. J. 1964. *The bacterial cell wall*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
20. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 9.
21. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 177.
22. SALTON, M. R. J., y WILLIAMS, R. C. 1954. *Biochim. Biophys. Acta*, 15, 325.
23. SANTAOLALLA, M. 1963. *Microbiol. Españ.*, 16, 25.
24. TEJERINA, G., y SANTAOLALLA, M. 1964. *Microbiol. Españ.*, 17, 41.
25. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P., y HARRISON, J. S. 1950. *Nature*, 166, 444.
26. WELLS, M. A., y DITTMER, J. C. 1963. *Biochemistry*, 2, 1.259.
27. WORK, E. 1961. *J. Gen. Microbiol.*, 25, 167.
28. WORK, E. 1964. *Nature*, 201, 1.110.

## NOTA ACERCA DE LA ACCION LIPOLITICA DE ALGUNOS HONGOS

por

ADELA BORTOL

Tratamos de relacionar la acción lipolítica de algunos hongos con su acción patógena, basándonos en los estudios realizados por Brabant y Delmotte (1), del Hospital Saint Pierre, sobre distintas cepas de *Candida albicans*, y siguiendo la misma técnica. Utilizamos el medio de Sierra:

Bacto-peptona (Difco)	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Cloruro cálcico, monohidratado	0,1 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 cm <sup>3</sup>

adicionado de tween 20, 40, 60 y 80 al 1 por ciento en cajas de Petri y por duplicado; hacemos el cultivo en una línea central. La acción lipásica, manifestada por precipitación del jabón cálcico, es relacionada con el tiempo en que aparece ese halo de precipitación y se establece un tiempo límite de veinte días antes de clasificarla como negativa y tenemos entonces un índice 0 y será índice máximo, de 20, cuando precipite en un día, e índice 16, por ejemplo, cuando precipite al quinto día (*figuras 1-2*).

A fin de tener un concepto más claro, incluimos otras especies de *Candida* y otros géneros de hongos. Simultáneamente se estudió el poder patógeno de distintas especies del género *Candida* sobre el conejo. Se

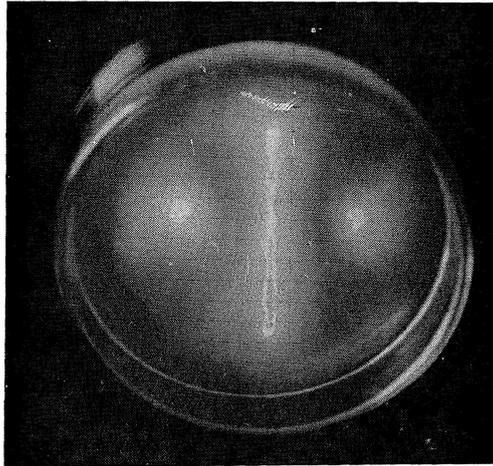
inocularon conejos con 2 cm<sup>3</sup> de una suspensión equivalente a la concentración núm. 9 de la escala de Mc. Farland, en la vena marginal de la oreja.

## RESULTADOS

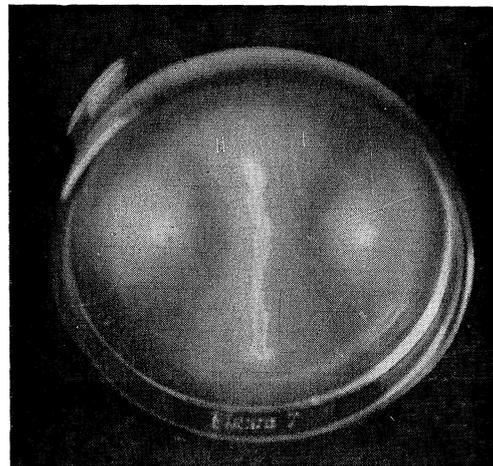
Los resultados se recogen en los cuadros 1-2.

Cuadro 1

Cepa	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80	Indice
<i>Cándida albicans</i> 1 AB	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2	76
<i>C. tropicalis</i> 4 AB	+ 2	+ 2	+ 2	+ 1	77
<i>C. tropicalis</i> 4	+ 1	+ 1	+ 2	+ 2	78
<i>Torulopsis glabrata</i> 76	0	0	0	0	0
<i>Sporotrichum schenckii</i> 36	+ 2	+ 2	+ 5	+ 6	69
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 21	+ 3	+ 6	+ 2	+ 6	67
<i>Madurella mycetomi</i> 130	+ 3	+ 6	+ 7	0	47
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 66	+ 3	+ 6	+ 5	0	49
<i>Microsporium gypseum</i>	+ 6	+ 8	+ 5	+ 7	58
<i>Streptomyces</i> sp. 1	+ 2	+ 1	+ 2	+ 2	77
<i>Streptomyces</i> sp. 2	+ 4	+ 4	+ 6	+ 6	64
<i>Hormodendrum</i> sp.	+ 3	+ 3	+10	+ 3	65
<i>Oospora lactis</i>	+ 2	+ 9	+ 4	+ 9	60
<i>Sarcina</i>	+10	+ 2	+ 2	+ 2	68
<i>C. parapsilosis</i> 7 AB	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	80
<i>Rhodotorula</i>	+ 4	+ 6	+ 2	+ 6	66
<i>Streptomyces</i> sp.	+ 3	+ 2	+ 1	+ 3	75
<i>C. parapsilosis</i> 11 AB	+ 4	+ 4	0	+ 4	51
<i>C. tropicalis</i> 12 AB	+ 1	+ 1	+ 4	+ 1	77
<i>C. albicans</i> , esputo	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	80
<i>C. krusei</i> A	0	+ 1	0	0	20
<i>C. albicans</i> C	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	80
<i>C. albicans</i> D	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	80
<i>C. tropicalis</i> H	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	80
<i>C. parapsilosis</i> i	0	+ 1	0	0	20
<i>C. parapsilosis</i> MF 1	+ 4	+15	+13	0	31
<i>C. intermedia</i> MF 2	+ 3	+14	0	0	25
<i>C. krusei</i> MF 3	0	+ 7	0	0	14
<i>Penicillium chrysogenum</i> 25	+ 1	+ 3	+ 8	+ 3	69
<i>Alternaria solium</i> 244	+ 2	+ 2	+ 2	+ 8	70
<i>Fusarium javanicum</i> 176	+ 1	+ 1	+ 1	+ 3	78
<i>Geotrichum asteroide</i> 84	0	+17	+17	+20	9
<i>Epidermophyton floccosum</i> 148	+18	0	0	0	3



*Figura 1. Candida albicans, D. Precipitación de jabón cálcico. Medio de Sierra con tween 60*



*Figura 2. Candida tropicalis, H. Precipitación de jabón cálcico. Medio de Sierra con tween 80*

Cuadro 2

Especie	Identificación de la cepa	Aislamiento de	Patogenicidad sobre el conejo	Indice lipolítico
<i>Candida albicans</i>	C	Materias fecales de hombre sano	de +2 días	80
<i>C. albicans</i>	D	Materias fecales de hombre sano	de +2 días	80
<i>C. albicans</i>	Esp.	Espuito, micosis pulmonar	+4 días	80
<i>C. albicans</i>	1 AB	Onixis	+1,5 días	76
<i>C. tropicalis</i>	H	Materias fecales de hombre sano	de Vive sacrificado a los 24 días	80
<i>C. tropicalis</i>	12 AB	Onixis	Vive 45 días	77
<i>C. tropicalis</i>	4 AB	Onixis	+3,5 días	77
<i>C. parapsilosis</i>	7 AB	Onixis	Vive	80
<i>C. parapsilosis</i>	11 AB	Onixis	Vive	51
<i>C. parapsilosis</i>	MF 1	Materias fecales de hombre sano	de Vive	31
<i>C. parapsilosis</i>	i	Materias fecales de hombre sano	de Vive	20
<i>C. krusei</i>	A	Materias fecales de hombre sano	de Vive	20
<i>C. krusei</i>	MF 3	Materias fecales de hombre sano	de Vive	14
<i>C. intermedia</i>	MF 2	Materias fecales de hombre sano	de Vive	25

### CONCLUSIONES

Estamos en desacuerdo con que se quiera catalogar la virulencia de una cepa por el origen de su aislamiento, pues es factible que por circunstancias de inmunidad del huésped, una *Candida* muy patógena

podría encontrarse como saprofita, y también una *Candida* poco virulenta, en presencia de un huésped falto de inmunidad, podría presentarse causando lesiones generales graves; por tanto, para catalogar su virulencia sólo tenemos en cuenta su acción sobre conejo o laucha.

Estudiada la actividad lipolítica en diversos géneros de hongos y en diversas especies del género *Candida*, no hemos encontrado relación entre el índice de su poder lipolítico y su acción patógena, ya sea sobre el hombre o sobre el conejo. Así, géneros inocuos, como *Streptomyces* (que no incluimos entre los Eumicetos), *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, tienen alto poder lipolítico; en cambio, hongos patógenos, como *Trichophyton mentagrophytes* y *Madurella micetomi*, tienen índices que sólo llegan a 49 y 47, respectivamente.

Con respecto al género *Candida* tampoco hemos encontrado concordancia en todas las especies:

*Candida albicans*. Aislada de afección pulmonar, de onixis y de materia fecal de persona sana; siempre tuvo índice alto, entre 76 y 80, y siempre se mostró muy patógena para los conejos, que murieron entre uno-cuatro días.

*Candida tropicalis*. Aislada de onixis y de materia fecal de persona sana; dio índices altos, entre 77 y 80, pero la virulencia para el conejo fue distinta: la de onixis lo mató entre 72 y 96 horas, y en las otras, una de onixis y la otra de materia fecal, un animal fue sacrificado a los veinticuatro días por sus manifestaciones meníngeas y el otro, a los cuarenta y cinco días, normal.

*Candida parapsilosis*. Aislada de onixis, cepa 11 AB, con índice 51, cepa 7 AB de onixis, índice 80; de materia fecal de persona sana, índice 20, y en todos los casos mostró no ser patógena para el conejo.

*Candida krusei*. Aislada de materia fecal de persona sana: en ambas, el índice fue bajo, y no patógena para el conejo.

*Candida intermedia*. Índice 25, y no patógena para el conejo; aislada de materia fecal de persona sana.

#### AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi agradecimiento al extinto maestro Dr. Luis C. Verna por haberme orientado en la realización de este trabajo.

### RESUMEN

No hemos encontrado en *Candida*, así como en otros hongos patógenos o saprofitos, ninguna relación entre virulencia y poder lipolítico.

### SUMMARY

We did not find in *Candida* as in other pathogenic or saprophytic fungies any signification between their virulence and lipolitic power.

### BIBLIOGRAFIA

1. BRABANT, H., y DELMOTTE, A. 1959. Recherches sur l'activité lipolytique de *Candida albicans*. Etude clinique des souches. Bull. Groupe. Intern. Rech. Sci. Stomatol., núm. 4.

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
FACULTAD DE VETERINARIA

## CARACTERIZACION DE UN ENTEROVIRUS BOVINO (M80) ASOCIADO CON LA ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS (\*)

por

B. MORENO (\*\*)

### INTRODUCCION

La enfermedad de las mucosas (44) y la diarrea por virus (42) fueron diagnosticadas por primera vez en Estados Unidos, habiéndose demostrado que ambas enfermedades son producidas por virus relacionados antigénicamente (19).

Posteriormente, se han aislado muchos virus relacionados con la diarrea vírica (2, 18, 32 y 43) y de casos en ganado vacuno con un síndrome respiratorio entérico (24 y 39).

En Suecia fue aislada por Bakos y Dinter (3), de casos con enfermedad de las mucosas, una cepa de virus parainfluenza III.

Una serie de virus entéricos, posiblemente no patógenos, han sido aislados en cultivo de tejidos a partir de heces de ganado vacuno aparentemente sano (6-9, 23-25, 28-30, 33, 36, 38-39 y 41).

En Inglaterra, enfermedades del complejo enfermedad de las mucosas-diarrea por virus fueron diagnosticadas por Dow y colaboradores (15) y Huck (21). Darbyshire (11) aisló de un caso de enfermedad

---

(\*) Este trabajo fue llevado a cabo en el Departamento de Virología del Laboratorio Veterinario Central, de Weybridge (Inglaterra), con la ayuda económica de una beca del Consejo Británico.

(\*\*) Dirección actual: Patronato de Biología Animal, Madrid.

de las mucosas, el virus Nantwich, no citopatógeno, que reprodujo la enfermedad al ser inoculado en terneros. Darbyshire y colaboradores (12-14) comprueban la intervención de adenovirus en procesos infecciosos respiratorios de los bóvidos.

Durante nuestra estancia en el Departamento de Virología del Laboratorio Veterinario Central, de Weybridge, tomamos parte en un amplio programa para la investigación de virus citopáticos asociados con enfermedades del ganado vacuno. El programa consistía en el aislamiento de estos virus, caracterización y determinación de su capacidad patógena, así como la puesta a punto de técnicas diagnósticas. Las enfermedades investigadas fueron la enfermedad de las mucosas, la neumonía de los terneros y la infertilidad de causa vírica. Después de su preparación adecuada, las muestras eran inoculadas en monocapas de cultivos primarios de riñón bovino para el aislamiento de agentes citopáticos, que posteriormente eran clasificados por métodos serológicos y caracterizados por sus propiedades físicas y químicas. Los resultados globales de la primera fase y parte de la segunda de este programa han sido publicados por Huck y Cartwright (22). Fueron aislados virus de 39 (19 %) de un total de 195 rebaños investigados con casos de enfermedad de las mucosas, neumonía o infertilidad. En total, 84 virus bovinos a partir de 838 animales. De estos virus, 53 fueron clasificados en 7 serotipos empleando antisuero de conejo: 4 relacionados con la enfermedad de las mucosas (M6, M63, M153 y M80), 2 con neumonía (T10 y T11f) y 1 con aborto e infertilidad (F266a). Todas las cepas fueron clasificadas como enterovirus.

En relación con la enfermedad de las mucosas se investigaron en el proyecto mencionado anteriormente 100 rebaños con casos clínicos de la enfermedad. Se estudiaron en total 404 muestras de 242 animales y fueron aislados 42 virus citopáticos, lo que representa un porcentaje de aislamientos del 17,4 % del total de animales examinados. Se aislaron virus de 22 de los 100 rebaños. De uno de estos rebaños con casos de diarrea, fue aislado, a partir de una muestra de heces, el virus M80.

En este trabajo se da cuenta de las propiedades físicas, químicas y biológicas de este virus.

## MATERIAL Y METODOS

### *Virus*

La cepa inicialmente aislada del virus M80 fue purificada por el método de propagación a partir del material obtenido de una placa y el depósito de virus empleado en estos experimentos era el quinto pase en cultivo de tejidos de riñón de ternero, del mencionado virus.

### *Preparación de los cultivos de tejidos*

Se prepararon cultivos primarios en monocapa de riñón de ternero por el método de tripsinización de Dulbecco y Vogt (16) modificado por Youngner (45). Se emplearon tubos de ensayo de vidrio borosilicatado, de 160 × 16 mm y frascos planos de prescripción médica, de 2 onzas. Las soluciones base salinas empleadas para la preparación de medios fueron solución salina equilibrada de Hanks (20) y solución salina equilibrada de Earle (17). A estas soluciones base se añadió 0,5 % de un hidrolizado de lactoalbúmina y 0,01 % de extracto de levadura. Se empleó suero bovino inactivado al 10 % en el medio de crecimiento (medio de Hanks) y no se añadió cantidad alguna de suero en el de mantenimiento (medio de Earle). La concentración final de antibióticos en ambos medios era la siguiente: penicilina, 100 U.I./ml; estreptomycin, 100 µg/ml; polimixina, 100 U.I./ml; y micostatina, 25 U.I./ml. Por un método similar se cultivaron también células de riñón porcino, testículo de ternero, endometrio bovino, fibroblastos de embrión de pollo y la línea celular HeLa. Los cultivos secundarios se prepararon según la técnica de Madin y Darby (34).

### *Métodos de titulación*

La titulación del virus se llevó a cabo por la técnica de formación de placas y observando el efecto citopático en cultivos en tubos de ensayo. En el primer caso se hicieron diluciones del virus de factor 10 en medio de mantenimiento y el inóculo por frasco fue de 0,2 ml. Se inocularon dos frascos por dilución. Los frascos inoculados se incubaron a 37 °C, durante treinta minutos, para permitir la adsorción del virus por las células. Se añadieron entonces a cada frasco 6-7 ml de

agar-medio (a 43°-45 °C). Una vez solidificado el agar, se invertían los frascos y se incubaban a 37 °C. La composición del agar-medio era medio del mantenimiento al cual se había añadido 1,2 % de agar Noble (Difco). Tres días después de la infección, los frascos se teñían añadiendo 4 ml de agar-medio al cual se había incorporado el colorante rojo neutro a una concentración final de 1:20.000. Después del recuento de las placas, el título se calculó (16) como el número de unidades formadoras de placas/ml (PFU/ml).

En la técnica de titulación en tubos se emplearon también diluciones de factor 10. Se infectaron 5 tubos por dilución y el inóculo por tubo fue de 0,1 ml. Las lecturas de los tubos se realizaron diariamente durante seis días consecutivos y los puntos finales de la actividad vírica se calcularon según el método de Kärber (27) como el número de dosis infectivas 50 % en cultivo de tejidos/ml (TCID<sub>50</sub>/ml).

#### *Inactivación térmica*

La inactivación a 56 °C se llevó a cabo en un baño de agua en tubos de aglutinación precalentados. A intervalos se tomaban los tubos, se ponían en hielo seco y se titulaban al final del experimento. En el otro experimento a 37 °C las suspensiones de virus eran mantenidas en frasquitos en una estufa, a esta temperatura.

#### *Determinación del tamaño del virus por ultrafiltración*

Los experimentos de filtración se llevaron a cabo con membranas de gradocol de diámetro medio de poro 200, 120, 42 y 22 m $\mu$  con ayuda de una presión positiva de 90 cm de agua.

#### *Efecto de los cambios de pH*

Para estudiar el efecto de los cambios de pH sobre la infectividad del virus se hicieron diluciones de éste al 1:10 en la solución tampón de ácido cítrico + fosfato de McIlwaine (35), de pH 2,15 a 8,1. Las muestras se dejaron a temperatura de habitación durante treinta minutos, pasados los cuales el pH se ajustó a 7,4-7,6 con una solución estéril N/10 de NaOH o con ácido cítrico 0,1N. Todas las muestras se ajustaron finalmente al mismo volumen con medio de mantenimiento.

*Sensibilidad al éter*

En el tratamiento con éter el método seguido fue el de Andrewes y Horstmann (1).

*Curvas de crecimiento*

Se infectaron cuatro frascos con monocapas de riñón de ternero con, aproximadamente, 1.000 PFU cada uno, a una multiplicidad de 0,00025. Después de un período de adsorción de treinta minutos a 37 °C, los cultivos se lavaron varias veces con medio de mantenimiento para eliminar el virus no adsorbido y se incubaron durante diez minutos a 37 °C con 2,5 ml de una dilución 1/10 de antisuero M80 para neutralizar el virus restante no adsorbido. Acto seguido se lavaron nuevamente con medio de mantenimiento para eliminar el antisuero. Finalmente se añadieron a cada frasco 9 ml de medio para, a continuación, volverlos a la estufa a 37 °C. Se tomaron muestras del medio de cultivo, al principio, cada hora y después, con intervalos de tiempo mayores, mezclándose las muestras de los cuatro frascos correspondientes al mismo tiempo. El volumen tomado de cada frasco fue restituido con medio de mantenimiento con el fin de conservar el volumen original. Las muestras se mantuvieron a —20 °C hasta el momento de ser tituladas.

Se llevó a cabo también un experimento de curva de crecimiento en suspensión celular para comparar las curvas obtenidas teniendo en cuenta el virus liberado en el medio de cultivo y el virus asociado a las células. Se centrifugaron 10 ml de una suspensión celular conteniendo  $5 \times 10^5$  células/ml, se resuspendieron en 10 ml de virus (título  $3 \times 10^6$  PFU/ml) y la mezcla se incubó a 37 °C durante treinta minutos. A continuación las células se lavaron y centrifugaron tres veces con medio de mantenimiento + 2 % de suero de caballo y, por último, se incubaron diez minutos con una dilución 1/10 de antisuero M80. Después de una nueva centrifugación, la suspensión celular se lavó dos veces con medio de mantenimiento y, finalmente, se resuspendió el sedimento de células en 20 ml de medio de mantenimiento conteniendo 2 % de suero de caballo. Este se consideró como tiempo cero. Se tomaron muestras de 1 ml. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación a 2.500 r/m durante treinta minutos. Los cultivos totales se congelaron y descongelaron tres veces antes de ser titulados para romper las células.

### *Efecto citopático*

El estudio en preparaciones teñidas fue llevado a cabo en cultivos secundarios en cubreobjetos de  $6 \times 22$  mm. El procedimiento de tinción fue el de la hematoxilina-eosina de Ehrlich.

### *Curva de adsorción*

Cultivos de tejidos de riñón de ternero en frascos de prescripción de 2 onzas eran infectados con 70-90 PFU de virus e incubados a 37 °C. A intervalos se tomaban grupos de 5 frascos, se lavaban con medio de mantenimiento, se añadía agar-medio y se volvían a la estufa.

### *Hemoaglutinación*

Las hemoaglutinaciones se realizaron según el método propuesto por el Comité de Procedimientos Serológicos Normalizados para el Estudio de la Influenza (10). Se ensayaron dos temperaturas: 4 °C y temperatura de habitación. Las lecturas se hicieron a los noventa minutos y dos horas, respectivamente. Se probaron glóbulos rojos de oveja, ratón y gallina.

### *Reacciones de neutralización*

El virus empleado en las reacciones de neutralización era el quinto pase de M80. Los antisueros procedían del depósito del laboratorio y habían sido preparados en conejos.

En los experimentos de inhibición de la formación de placas las diluciones de los sueros al 1:10 se prepararon en medio de mantenimiento y se inactivaron a 56 °C durante treinta minutos. Se hicieron entonces diluciones de factor 4 en idéntico medio, en cantidad de 1 ml. Se mezcló 1 ml de suspensión de virus conteniendo 100 PFU/0,1 ml, aproximadamente, con igual volumen de los antisueros diluidos. Las mezclas suero + virus se incubaron a 37 °C durante dos horas. Se inocularon 0,2 ml de la mezcla por cada frasco de cultivo y se emplearon dos frascos por cada dilución de suero. Los controles se trataron del mismo modo, pero el suero fue sustituido por medio de mantenimiento. Comparando el número de placas en los frascos control (virus + medio de mantenimiento) con el de los frascos inoculados con la mezcla suero +

virus, se determinó el grado de neutralización. El punto final se calculó como la dilución más alta de suero que produjo una reducción en el número de placas del 80 % (4).

Las reacciones de neutralización en tubos se llevaron a cabo por el método de dosis constante de virus (100 TCID<sub>50</sub>, aproximadamente) y diluciones varias del suero. Las diluciones de los sueros se prepararon del mismo modo. Se mezcló 1 ml de la suspensión de virus conteniendo unas 100 TCID<sub>50</sub>/0,1 ml, con igual volumen de los antisueros diluidos. Las mezclas se incubaron durante veinte horas a 4 °C. El inóculo fue de 0,2 ml por tubo y se emplearon 5 tubos por dilución de suero. Los títulos de los sueros fueron calculados por el método de Kärber (27) y se expresan como el recíproco de aquella dilución de suero que protegería el 50 % de los cultivos del efecto del virus.

En todas las reacciones de neutralización se incluyó suero de preinoculación y el virus fue titulado al principio y al final del experimento para comprobar que no tuvo lugar ninguna variación en el título del virus durante el tiempo de incubación.

## RESULTADOS

### *Inactivación térmica*

En la *figura 1* se representan los resultados de tres experimentos de inactivación del virus M80 a 56 °C. La pérdida de infectividad fue rápida y después de cinco minutos a esta temperatura sólo pudo observarse una mínima infectividad residual. La *figura 2* representa gráficamente la estabilidad de este virus a 37 °C. Como puede verse, la inactivación a esta temperatura fue lenta. Después de cinco días, el título del virus había disminuido 99,9 % aproximadamente.

### *Tamaño*

Los resultados de las titulaciones en cultivo de tejidos de riñón de ternero realizadas con los filtrados se representan en la *figura 3*. El virus atravesó la membrana de diámetro medio de poro de 42 m $\mu$  con muy significativa reducción del título y no fue posible recobrarlo del material filtrado a través de la membrana de 22 m $\mu$ . Teniendo en cuenta

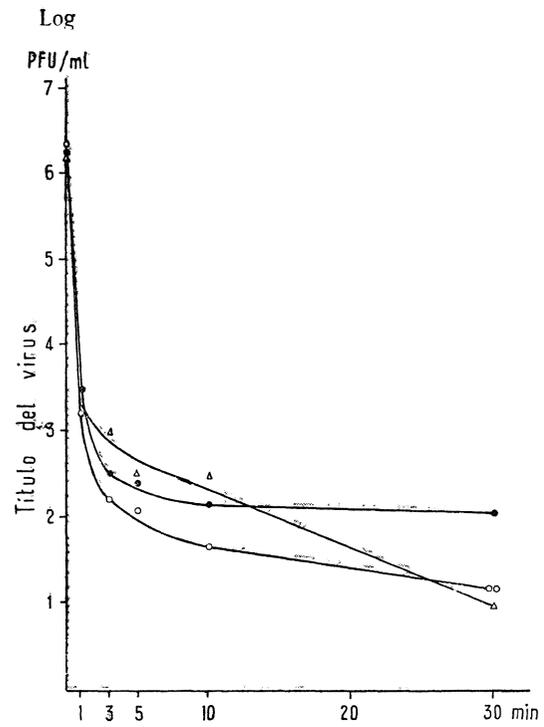


Figura 1. Inactivación del virus, a 56° C (tres experimentos)

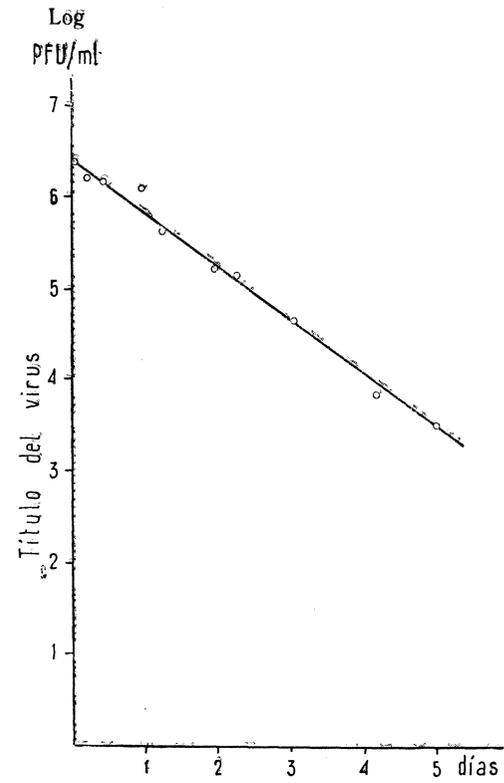


Figura 2. Estabilidad del virus, a 37° C

estos datos y aplicando el factor de Black (5) resulta que el tamaño de la partícula infectiva del virus M80 sería de 20 m $\mu$ .

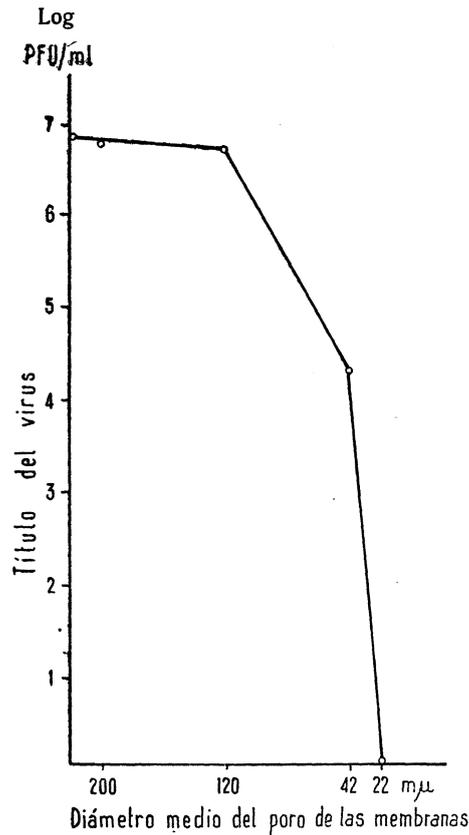


Figura 3. Filtración del virus a través de membranas de gradocol

*Estabilidad a los cambios de pH*

Los resultados de este experimento se han representado en la figura 4. Los cambios de pH en el intervalo estudiado no tienen efecto alguno sobre la infectividad del virus.

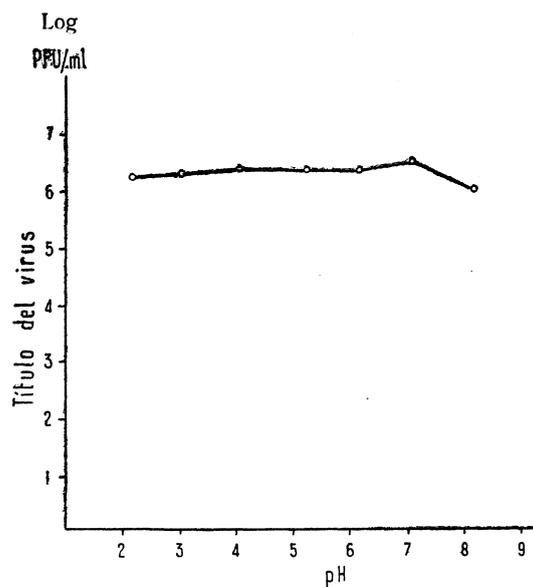


Figura 4. Estabilidad del virus en relación con los cambios de pH

#### Sensibilidad al éter

Como puede verse en el cuadro 1, el éter no tuvo ningún efecto sobre la infectividad de este virus.

Cuadro 1. Efecto del éter sobre la infectividad del virus M80

Material	Título (PFU/ml)
Muestra original	$6 \times 10^6$
Muestra no tratada	$7 \times 10^6$
Muestra tratada con éter	$9,5 \times 10^6$

#### Caracteres de las placas formadas

No existió uniformidad en cuanto a su tamaño. A las treinta horas después de la infección de los cultivos, el tamaño de las placas for-

madras era inferior a 1 mm. A las cuarenta y ocho horas su tamaño oscilaba entre 1-2 mm y a los cinco días, entre 2-5 mm. M80 produce también placas en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo.

#### Curva de crecimiento

Como puede verse en la *figura 5*, el virus comenzó a multiplicarse cinco horas después de la infección del cultivo, alcanzando títulos máxi-

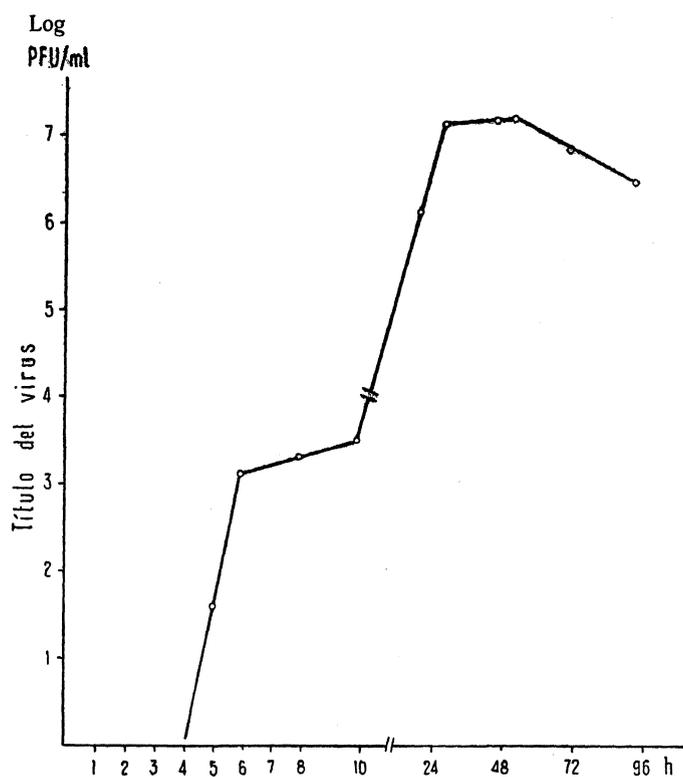


Figura 5. Crecimiento del virus

mos a las treinta, cuarenta y ocho y cincuenta y cuatro horas. Se observó una disminución gradual del título en las muestras tomadas a las setenta y dos y noventa y seis horas. En el experimento de curva de crecimiento en suspensión celular (*figura 6*) no fue posible eliminar

todo el virus no adsorbido. El aumento de título fue paralelo en el cultivo total y en el líquido de cultivo libre de células, si bien en las últimas fases la diferencia entre el título del virus en ambas fracciones fue menor.

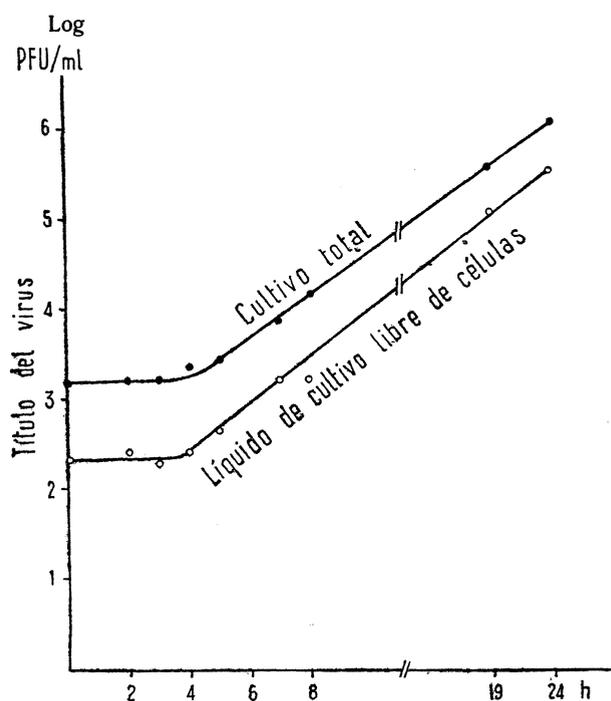


Figura 6. Crecimiento del virus en cultivos en suspensión celular

#### Efecto citopático

Cuando los cultivos en frascos planos eran inoculados con 1.000 PFU de virus, se observaron a pequeños aumentos cambios claros a las veintidós horas, en forma de áreas de células redondeadas muy refringentes. A las treinta horas, el proceso se había generalizado y a las cuarenta y ocho horas, todas las células se habían desprendido de la superficie del vidrio. En preparaciones teñidas (*figuras 7-8*) los primeros cambios se apreciaron en el núcleo y consistían en hipercromasia y condensación periférica de la cromatina en acúmulos de forma redondeada o

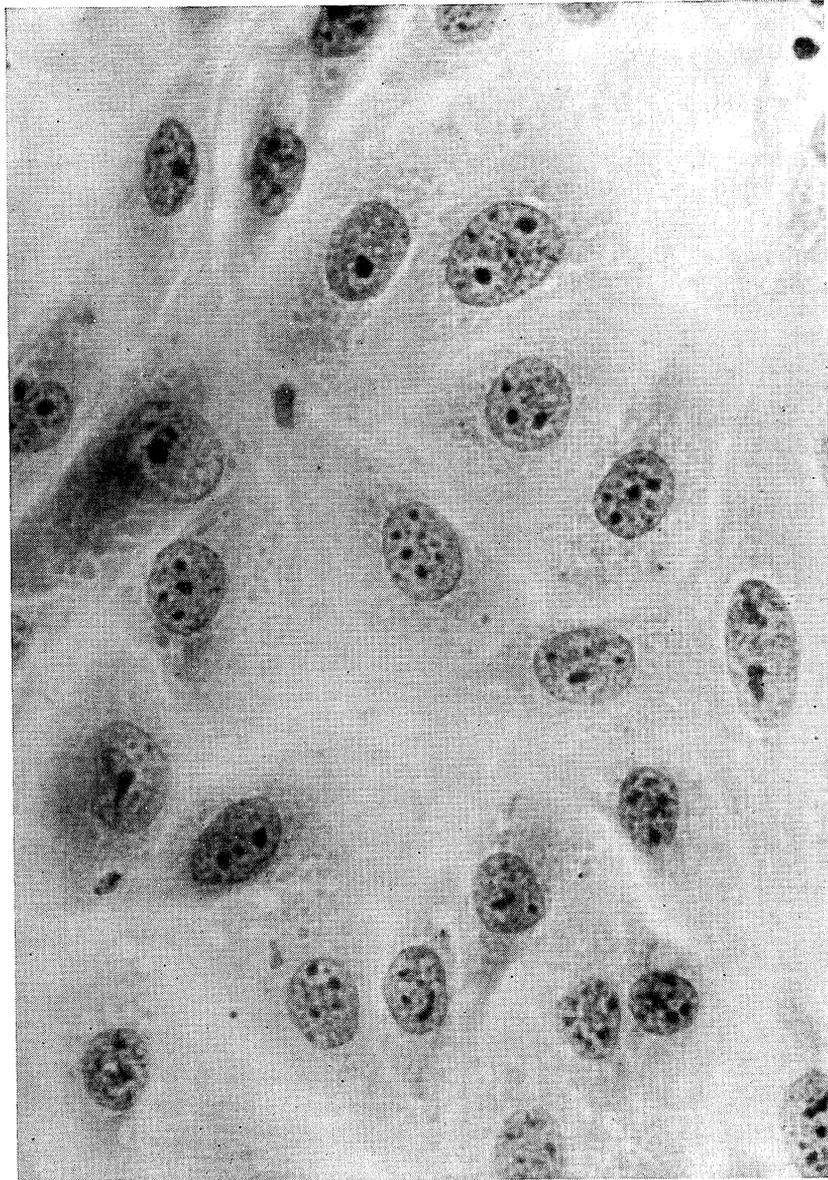
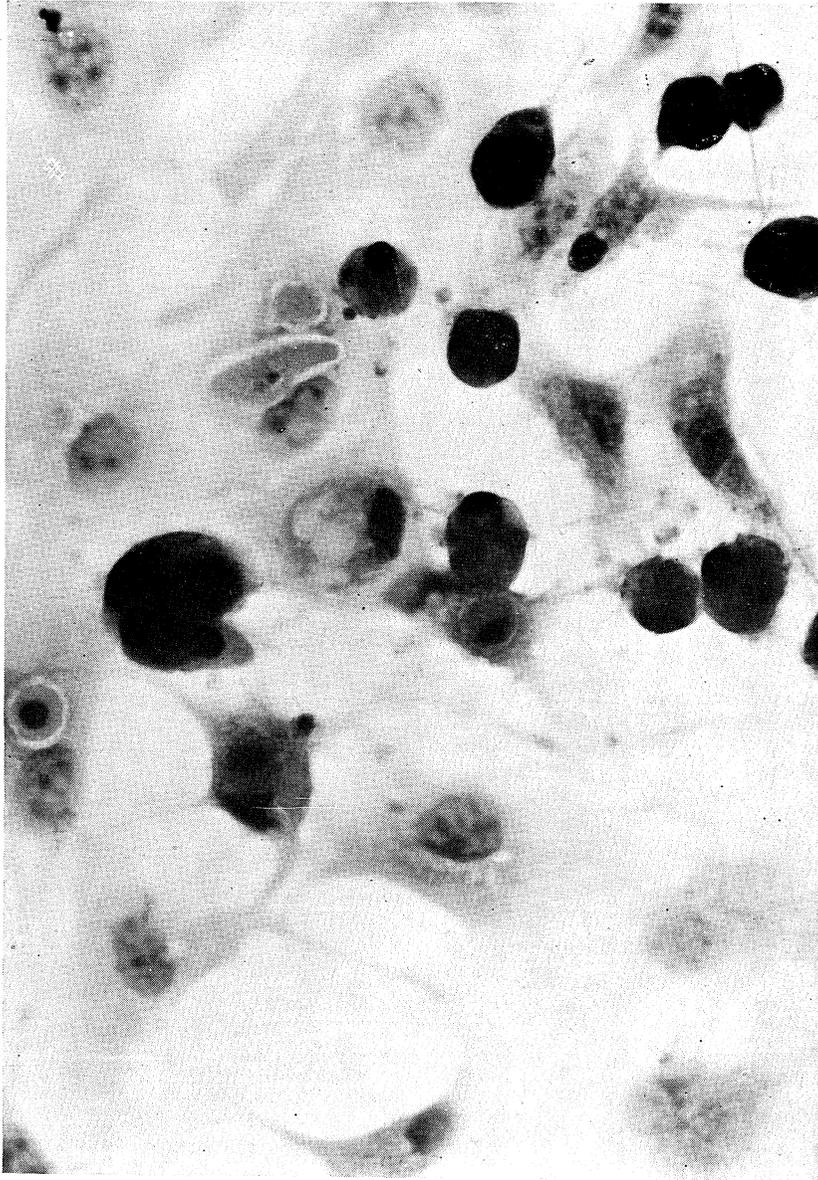


Figura 7. Cultivo de tejidos de riñón bovino, testigo.  $\times 922$ , aproximadamente



*Figura 8. Cultivo de tejidos de riñón bovino. Efecto citopático producido por el virus. × 922, aproximadamente*

semilunar. Poco después, el citoplasma aparecía intensamente teñido y las células comenzaban a retraerse, adquiriendo forma redondeada. El proceso de retracción fue más rápido en el núcleo que en el citoplasma, lo que motivó la aparición de núcleos redondeados separados por un halo claro del citoplasma. Estos cambios eran progresivos y finalmente tenía lugar la desintegración de la célula, quedando únicamente adheridos al vidrio restos celulares.

#### *Espectro celular*

El virus M80 crece en células de riñón porcino, endometrio bovino y fibroblastos de embrión de pollo y produce destrucción completa de las monocapas. Se multiplica también en cultivos de testículo de ternero, pero provoca en ellos únicamente la aparición de células redondeadas, sin llegar a ocasionar cambios degenerativos completos. Des-

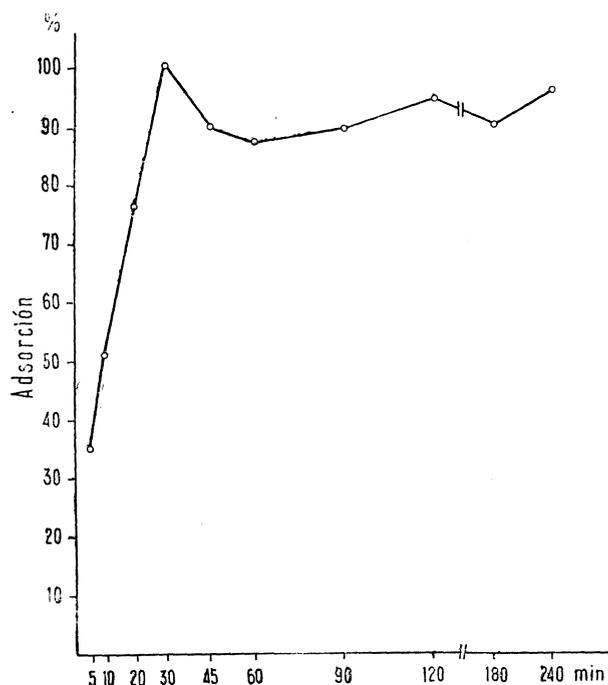


Figura 9. Adsorción del virus, a 37° C, por cultivos de riñón bovino

pués de tres pases ciegos en células HeLa no fue posible recobrar el virus en cultivo de tejidos de riñón de ternero.

#### *Curva de adsorción*

El mayor número de placas, observado cuando el tiempo de incubación fue de treinta minutos, se consideró equivalente al 100 % y la curva de adsorción se construyó teniendo esto en cuenta. Los resultados se representan en la *figura 9*. La cantidad de virus adsorbido en cinco minutos fue del 35 % y en veinte minutos, del 76 %. Un tiempo de incubación mayor de treinta minutos no aumentó el número de placas observadas, sino que, por el contrario, este número fue ligeramente inferior.

#### *Hemoaglutinación*

Fue negativa con glóbulos rojos de oveja, ratón y gallina.

#### *Reacciones de neutralización*

Los resultados de estas reacciones por la técnica de inhibición de la formación de placas se señalan en el *cuadro 2*. En el *cuadro 3* se dan los datos obtenidos por la técnica de titulación en tubos. De todo ello se deduce que el virus M80 no tiene relación antigénica con ninguno de los virus cuyos antisueros se han empleado.

### DISCUSION

El virus M80 tiene muchas propiedades de los enterovirus. Su inactivación a 56 °C fue muy rápida, observándose una mínima infectividad residual después de cinco minutos. Los enterovirus bovinos no presentan uniformidad en cuanto a la velocidad de inactivación a 56 °C. Moll y Ulrich (40) dividen los virus entéricos por ellos estudiados en tres grupos: de inactivación lenta y logarítmica, de inactivación rápida y de inactivación rápida pero con infectividad residual consecuente a la heterogeneidad de una población de partículas víricas (26). Inaba y colaboradores (24) dan cuenta de que el virus BF1 disminuyó su título 100 veces en treinta minutos y 1.000 veces en sesenta minutos. McFe-

rran (37) señala una mínima infectividad residual para el virus VG(5)27 después de una incubación de treinta minutos a 55 °C. M80 es estable a 37 °C. Su curva de inactivación a esta temperatura es idéntica a la del virus anteriormente mencionado. En ambos casos, después de cinco días, el título del virus había disminuido 99,9 %. En cambio, el virus

*Cuadro 2. Resultados de las reacciones de neutralización por el método de inhibición de la formación de placas entre el virus M80 y algunos antisueros de virus aislados del ganado vacuno*

Antisuero	Título (*)	
	Cantidad real de virus en la reacción (PFU)	
	50	70
Suero de preinoculación	160	160
M80	> 640	> 640
T11f	40	
IBR	160	
M153	160	160
M6	160	
VG(5)27	40	
F46		40
T10		160
F266a		40

(\*) Tomado como el recíproco de la dilución más alta del suero que produjo una reducción del 80 % en el número de placas.

BF1 es mucho más estable a 37 °C, ya que para una reducción del título de aproximadamente 99,9 % fueron necesarios veintiséis días.

El tamaño del virus M80 puede considerarse también característico de los enterovirus. McFerran da para el virus VG(5)27 un tamaño de 23 m $\mu$  y Kunin y Minuse (29) atribuyen al virus LC-R4 un tamaño de 23-30 m $\mu$ .

La estabilidad de este virus a los cambios de pH y la resistencia al tratamiento con éter son propiedad de los miembros de la familia enterovirus.

Es característico de muchos enterovirus bovinos la formación de placas, aunque difieren en las características de éstas.

En los experimentos de curvas de crecimiento en monocapas de ri-

*Cuadro 3. Resultados de las reacciones de neutralización en tubos entre el virus M80 y algunos antisueños de virus aislados del ganado vacuno*

Antisueños	Cantidad real de virus en la reacción (TCID <sub>50</sub> /0,1 ml)	Título (*)
Pre-inoculación	300	< 10
M80	»	550
F46	»	< 10
T10	»	15
F266a	»	< 10
M153	»	< 10
Pre-inoculación	500	33
T11f	»	< 10
IBR	»	34
M6	»	15
VG(5) 27	»	15

(\*) Expresado como el recíproco de aquella dilución del suero que protegería el 50 % de los cultivos del efecto del virus.

ñón bovino, el virus comenzó a multiplicarse cinco horas después de la infección del cultivo, alcanzando ya un título máximo a las treinta horas. La disminución del título en las muestras tomadas a las setenta y dos y noventa y seis horas fue debida posiblemente a la inactivación térmica del virus. El cambio de inflexión de la curva de crecimiento,

observado a las seis-siete horas, puede interpretarse teniendo en cuenta que el virus liberado en los primeros momentos es adsorbido por las células aún no infectadas. En el experimento de curva de crecimiento en suspensión celular, el aumento del título fue paralelo en el cultivo total y en el medio de cultivo libre de células, si bien en las últimas fases la diferencia entre el título del virus en ambas fracciones fue menor, indicando una mayor liberación de virus en el medio.

Los cambios degenerativos producidos por este virus pueden encuadrarse dentro del tipo general de efecto citopático producido por los enterovirus y, en particular, por los enterovirus bovinos.

M80 produce efecto citopático en células de riñón porcino, endometrio bovino, testículo bovino y fibroblastos de embrión de pollo, pero no en células HeLa. El espectro celular de los enterovirus bovinos es variable. Además de en tejidos de origen bovino, la mayoría de estos virus se multiplican en células de riñón de mono, pero no son uniformes en cuanto a su efecto en cultivos de riñón porcino, células HeLa y otros tejidos. Produjeron efecto citopático en células de riñón porcino el virus BF1 de Inaba y colaboradores (24) y los virus estudiados por Moll y colaboradores (38-39). No produjeron efecto citopático en cultivos de células HeLa los virus ECBO estudiados por Klein y Earley (28) y Kunin y Minuse (30), pero sí el virus BF1 de Inaba y colaboradores (24).

Los experimentos de curva de adsorción indican la rapidez de adsorción del virus por las células, señalando como óptimo el tiempo de incubación de treinta minutos.

El virus M80 no aglutinó los eritrocitos de oveja, ratón y gallina. No fueron ensayados glóbulos rojos de mono *rhesus*. Los virus entéricos aislados del ganado vacuno no son uniformes en cuanto a su capacidad de aglutinar los eritrocitos de diversas especies. Cinco de los once virus aislados por Moscovici y Maisel (41) aglutinaban eritrocitos bovinos, mientras que tres aglutinaban eritrocitos de cobayo. Ninguno de ellos era activo frente a glóbulos rojos humanos, de oveja, de gallina ni de caballo. Moll y colaboradores (38-39) señalan que fue negativa la hemoaglutinación con los diez virus por ellos aislados empleando hematies de oveja y cobayo. Tanto el virus BF1 de Inaba y colaboradores (24) como el LC-R4 de Kunin y Minuse (30) aglutinaban los glóbulos rojos de oveja y caballo, pero no los de otras especies.

El virus VG(5)27 de McFerran (37) no aglutinó glóbulos rojos humanos, de ganado vacuno, oveja, cobayo, aves y mono.

Siguiendo las observaciones de La Placa (31) de que los virus del grupo I (véase más adelante) aglutinaban los glóbulos rojos de mono *rhesus*, mientras que los del grupo II eran inactivos, Huck y Cartwright (22) ensayaron sus serotipos y encontraron que todos los incluidos en el grupo I por reacciones de neutralización con el antisuero de gallina de La Placa, excepto M63, mostraban actividad hemoaglutinante, mientras que ninguno de los incluidos en el grupo II (entre ellos M80) o los no clasificados con el mencionado antisuero eran activos.

M80 no tiene relación antigénica con ninguno de los virus cuyos antisueros se han empleado en las reacciones de neutralización y constituye un serotipo propio. Ello confirma los resultados de Huck y Cartwright (22). Estos investigadores encuadran 53 enterovirus, de los 84 por ellos estudiados, en 7 serotipos (M6, M63, M153, T10, M80, T11f y F266a), dejando sin clasificar los 31 restantes. El serotipo M80 incluye en esta clasificación 3 cepas (M80, M81 y M10). En las reacciones de neutralización hemos contado, además de con otros antisueros, con los serotipos mencionados, a excepción de M63. Huck y Cartwright (22), empleando el antisuero de gallina suministrado por el Dr. M. La Placa, de la Universidad de Bolonia, demostraron el amplio espectro de neutralización del citado antisuero. De este modo, en el grupo I de La Placa pueden incluirse los serotipos M6, M63, M153 y T10, y en el grupo II los M80, F266a y T11f, si bien estos dos últimos dan un título muy bajo (40 y 10, respectivamente). De los 31 enterovirus no clasificables en los serotipos Weybridge, 21 fueron incorporados en los grupos I y II con el antisuero de La Placa, quedando únicamente sin clasificar 10 virus.

#### AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Prof. D. Pascual López Lorenzo el haberle inculcado su entusiasmo por los problemas de la investigación en el campo de los virus.

Desea expresar también su vivo reconocimiento al Dr. A. B. Paterson, a la Srta. S. F. Cartwright, al Sr. R. A. Huck y al Dr. A. Afshar, todos del Departamento de Virología del Laboratorio Veterinario Cen-

tral, de Weybridge (Inglaterra), por su dirección de este trabajo, y a todo el personal del laboratorio por su amable acogida.

### RESUMEN

En este trabajo se estudian las propiedades físicas, químicas y biológicas de un enterovirus bovino (M80) aislado de un caso clínico de enfermedad de las mucosas.

El virus es muy sensible a la temperatura de 56 °C, pero su inactivación es lenta a 37 °C.

Su tamaño, calculado por experimentos de filtración, sería de 20 m $\mu$ .

El virus es estable a cambios de pH entre 2,15 y 8,1, y resistente al tratamiento con éter.

Produce placas en cultivos de riñón bovino y este método es adecuado para la titulación y estudio de este agente citopático.

Su ciclo de crecimiento en células de riñón bovino es corto y es citopático, además, para células de riñón de cerdo, testículo bovino, endometrio bovino y fibroblastos de embrión de pollo, pero no para células HeLa.

El virus no aglutina los glóbulos rojos de oveja, ratón y gallina.

El virus M80 no tiene relación antigénica con ninguno de los virus entéricos cuyos antiseros se han empleado en las reacciones de neutralización y constituye un serotipo propio. Pertenece al grupo II del esquema de La Placa.

### SUMMARY

This work deals with the physical, chemical and biological properties of a bovine enterovirus (M80) isolated from a clinical case of mucosal disease.

This virus is heat sensitive at 56 °C, but its inactivation at 37 °C is slow.

The size of this virus is approximately 20 m $\mu$ .

The virus is not susceptible to variations in hydrogen ion concentration. It is also resistant to ether.

M80 grows rapidly in tissue culture and produces cytopathic effect in calf kidney, calf testis, bovine endometrium, chick embryo fibroblasts and pig kidney cultures, but no cytopathic effect is produced in HeLa cells.

Haemagglutination was negative with sheep, mouse and chicken red cells.

This virus has no antigenic relationship with some viruses isolated from cattle and constitutes a different serotype. It belongs to group II in the scheme of La Placa.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ANDREWES, C. H., y HORSTMANN, D. M. 1949. *J. Gen. Microbiol.*, 3, 290.
2. BAKER, J. A.; YORK, C. J.; GILLESPIE, J. H., y MITCHEL, G. B. 1954. *Am. J. Vet. Res.*, 15, 525.
3. BAKOS, K., y DINTER, Z. 1960. *Nature*, 185, 549.
4. BARNET, E. V.; NANSON, J. P.; UTZ, J. P., y BARON, S. 1960. *New Engl. J. Med.*, 262, 563.
5. BLACK, F. L. 1958. *Virology*, 5, 391.
6. BÖGEL, K. 1961. *Mh. Tierheilk.*, 13, 129, 162.
7. BÖGEL, K., y MUSSGAY, M. 1960. *Zentr. Vet. Med.*, 7, 534.
8. BÜRKI, F. 1962. *Zentr. Vet. Med.*, 9, 748.
9. BÜRKI, F. 1962. *Mh. Tierheilk.*, 14, 321.
10. Committee on Standard Serological Procedures in Influenza Studies, 1950. *J. Immunol.*, 65, 347.
11. DARBYSHIRE, J. H. 1963. *J. Comp. Pathol. Therap.*, 73, 309.
12. DARBYSHIRE y colaboradores. 1965. *Nature*, 208, 307.
13. DARBYSHIRE y colaboradores. 1965. *J. Comp. Pathol. Therap.*, 75, 327.
14. DARBYSHIRE y colaboradores. 1966. *Res. Vet. Sci.*, 7, 81.
15. DOW, C.; JARRET, W. F. H., y McINTYRE, W. I. M. 1956. *Vet. Record*, 68, 620.
16. DULBECCO, R., y VOGT, M. 1954. *J. Exptl. Med.*, 99, 167.
17. EARLE, W. R. 1943. *J. Natl. Cancer Inst.*, 4, 165.
18. GILLESPIE, J. H.; BAKER, J. A., y McENTEE, U. 1960. *Cornell Vet.*, 50, 73.
19. GILLESPIE, J. H.; CCGGINS, L.; THOMPSON, J., y BAKER, J. A. 1961. *Cornell Vet.*, 51, 155.
20. HANKS, J. H., y WALLACE, R. E. 1949. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 71, 196.
21. HUCK, R. A. 1957. *J. Comp. Pathol. Therap.*, 67, 267.
22. HUCK, R. A., y CARTWRIGHT, S. F. 1964. *J. Comp. Pathol. Therap.*, 74, 3, 346.
23. INABA, Y.; OMORI, T.; KODAMA, T.; ISHII, S., y MATUMOTO, M. 1959. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 153, 1.669.
24. IABA, Y.; OMORI, T.; KONO, M.; ISHII, S., y MATUMOTO, M. 1962. *Japan. J. Exptl. Med.*, 32, 77.
25. INABA, Y.; OMORI, T.; TOKUDA, T.; KODAMA, T.; ISHII, S., y MATUMOTO, M. 1959. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 153, 1.653.

26. KAPLAN, C. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 58.
27. KÄRBER, G. 1931. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 162, 480.
28. KLEIN, M., y EARLEY, E. 1957. *Bacteriol. Proc.*, 31, 73.
29. KUNIN, C. M., y MINUSE, E. 1957. *Public. Health Rep.*, 72, 251.
30. KUNIN, C. M., y MINUSE, E. 1958. *J. Immunol.*, 80, 1.
31. LA PLACA, M.; PORTOLANI, M., y LAMIERI, C. 1963. *Atti XII Congr. Mar. Microbiol. Perugia*, 195, 277.
32. LEE, K. M., y GILLESPIE, J. H. 1957. *Am. J. Vet. Res.*, 18, 952.
33. LUGINBUHL, R. E., y BLACK, F. L. 1961. *Yale J. Biol. Med.*, 33, 339.
34. MADIN, S. H., y DARBY, N. B. 1958. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 98, 574.
35. MANSFIELD-CLARK, W. 1927. *The Determination of Hydrogen Ions*. Baillière, Tindall and Cox, London.
36. MCFERRAN, J. B. 1958. *Vet. Rec.*, 10, 999.
37. MCFERRAN, J. B. 1961. *Res. Vet. Sci.*, 2, 185.
38. MOLL, T., y DAVIES, A. D. 1959. *Am. J. Vet. Res.*, 20, 27.
39. MOLL, T., y FINLAYSON, A. V. 1957. *Science*, 126, 401.
40. MOLL, T., y ULRICH, M. I. 1963. *Am. J. Vet. Res.*, 24, 545.
41. MOSCOVICI, C., y MAISEL, J. 1958. *Virology*, 6, 769.
42. OLAFSON, P.; MACCALLUM, A. D., y FOX, F. H. 1946. *Cornell Vet.*, 36, 205.
43. PRITCHARD, W. R.; CARLSON, R. G.; MOSES, H. E., y TAYLOR, D. E. B. 1955. *Proc. Livestock Sanit. Assoc.*, 59, 173.
44. RAMSEY, F. K., y CHIVERS, W. H. 1953. *New Am. Vet.*, 34, 629.
45. YOUNGNER, J. S. 1954. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 85, 202.

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

## ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS FORMAS L FIJAS DEL *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* OBTENIDAS POR MEDIO DE RADIACION ULTRAVIOLETA

por

EULALIA CABEZAS DE HERRERA y M. RUBIO-HUERTOS

### INTRODUCCION

El extraordinario interés del problema planteado por la aparición de tumores secundarios en infecciones por *Agrobacterium tumefaciens*, tumores que eran completamente estériles, es decir, que no estaban producidos por la bacteria causante del tumor primario y en los cuales tampoco se encontró ninguna otra bacteria, hizo que se realizaran numerosos trabajos sobre estos tumores y se emitieran dos hipótesis para explicar su etiología: una, suponiendo que el *A. tumefaciens* llevaba consigo un virus causante de ambos tipos de tumor, y otra, por la que los tumores secundarios se formarían por sustancias químicas del tipo auxina de crecimiento, estimuladas a producirse en el huésped por la infección bacteriana en el foco primario y difundidas más tarde para formar el tumor secundario, o bien, producidas por el metabolismo de la misma bacteria dentro del tumor primario y difundidas seguidamente. Ambas hipótesis se ha probado que eran erróneas.

En 1956, Rubio-Huertos y Desjardins (9) describieron las formas L transitorias del *Agrobacterium tumefaciens* inducidas por medio de gli-

cocola y encontraron formas filtrables en la fase de desintegración de los esferoplastos; postulando, entonces, estos autores la posibilidad de que los tumores secundarios fueran producidos por dichas formas filtrables, imposibles de detectar empleando los medios bacteriológicos ordinarios. En 1962, Rubio-Huertos y Beltrá (7) consiguieron obtener formas L fijas de *A. tumefaciens*, también por medio de glicocola, y probaron su patogenicidad, es decir, consiguieron la formación de tumores primarios inoculando con dichas formas, pero sin conseguir tumores secundarios.

En el transcurso de unas experiencias para determinar la sensibilidad de las formas normales y las formas L fijas producidas por glicocola, a los rayos ultravioletas, nos encontramos que, en determinadas circunstancias, las formas normales irradiadas daban lugar a colonias compuestas exclusivamente de esferoplastos y que podían multiplicarse como tales indefinidamente en medios corrientes de cultivo (8).

En el presente trabajo damos cuenta de algunas propiedades de la forma L o esferoplastos obtenidos por irradiación ultravioleta, comparadas con las de la bacteria normal y de las formas L fijas obtenidas por medio de glicocola.

## MATERIALES Y METODOS

### *Estirpes*

*Agrobacterium tumefaciens* aislado de vid (Beltrá). Esta estirpe, forma original (AT), ha sido empleada en trabajos anteriores y en el presente, tanto para obtener formas L fijas por medio de glicocola como para obtenerlas por radiaciones ultravioletas.

Forma L estable o fija de *Agrobacterium tumefaciens* obtenida por medio de glicocola (LG) (7).

Forma L estable o fija de *Agrobacterium tumefaciens* (8), obtenida por irradiación ultravioleta (LUV) de la manera que se indica seguidamente.

Irradiamos cultivos sincrónicos de *Agrobacterium tumefaciens* en fase logarítmica de crecimiento y con una concentración celular de  $10^9$  células/cm<sup>3</sup>, con una dosis de radiación ultravioleta que mata al 90 % de las células.

La irradiación se efectuó con una cámara con 4 lámparas de mer-

curio, Silvania, de 15 W cada una, con una longitud de onda de 2.537 Å, colocando en una bandeja, a 14,5 cm de distancia del foco de emisión, las placas de Petri, de 5,5 cm de diámetro, conteniendo las células.

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

Inmediatamente después de la irradiación: a) Tomamos muestras y sembramos en agar-koser-suero, obteniendo colonias y formas normales. b) Volvemos a cultivar durante cuatro horas y volvemos a irradiar. Después de la segunda irradiación tomamos muestras y sembramos sobre agar-koser-suero y obtenemos colonias de formas esféricas.

La mutante así obtenida la transferimos de cultivo semanalmente durante dos años, no habiéndose producido reversión a la forma normal.

*Cultivos sincrónicos*

Los cultivos sincrónicos los obtenemos según el método de Scott y Chu (11) y con ellos realizamos todas las experiencias de irradiación.

*Curvas de crecimiento*

Las curvas las obtenemos con el espectrofotómetro de Bausch Lomb (modelo Spectronic 20) y una longitud de onda de 425 mμ.

La figura 1 muestra curvas de crecimiento del *Agrobacterium tumefaciens* y el número de bacterias que corresponde a cada momento de la curva.

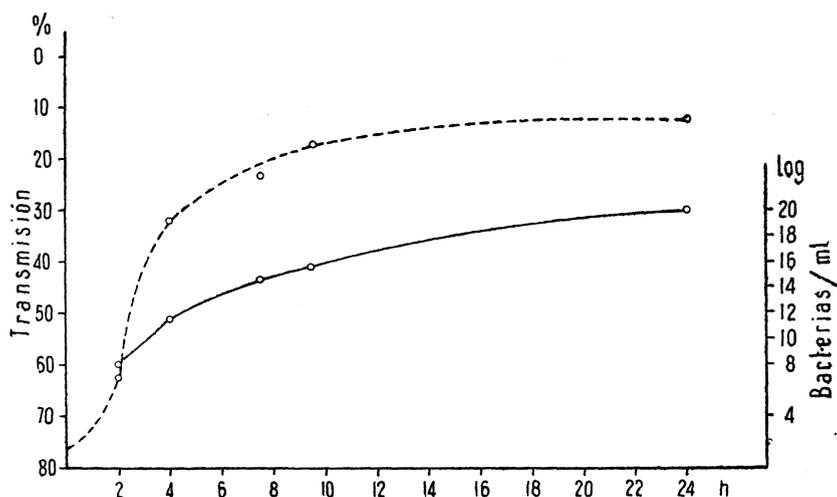


Figura 1. Crecimiento de AT y número de bacterias.

### *Curva de letalidad*

Un cultivo de células en fase logarítmica de crecimiento se centrifuga y se lava varias veces con solución salina, a una concentración aproximada de  $10^9$  células/ml.

En las condiciones habituales ya indicadas se irradian las bacterias de un segundo a sesenta minutos. Inmediatamente y después de hacer las diluciones convenientes, se siembran en placas de agar.

Por el procedimiento del recuento en placa se ve el número de bacterias supervivientes después de cada irradiación.

### *Pruebas bioquímicas*

Para las pruebas de fermentación se inocularon con una gota (0,05 ml de caldo, de cultivo de cuarenta y ocho horas, de las formas L y la forma normal, tubos con 5 ml de medio con 1 % del azúcar a probar, conteniendo 0,002 % de rojo de fenol, incubándose durante siete días, a 23 °C, haciéndose una segunda lectura a los diez y quince días para mayor seguridad.

Una inoculación semejante se realizó en tubos preparados para las reacciones de indol, leche, gelatina, Voges-Proskauer, etc.

### *Obtención de paredes celulares*

Se han empleado los métodos de Cummis y Harris (1) y Salton y Horne (10).

### *Microscopía electrónica*

Partiendo de cultivos en caldo común de los tres tipos de las bacterias estudiadas, se centrifugaron a 5.000 r/m, se lavaron con solución salina y se suspendieron en agua destilada; una gota de esta suspensión se puso sobre las rejillas portaobjetos del microscopio electrónico, previamente recubiertas de una capa fina de formwar y se sombrearon con oro-paladio.

Las preparaciones de paredes, una vez lavadas, se suspendieron en agua destilada y se prepararon como las anteriores, sombreándolas también con oro-paladio. Las rejillas con el material preparado se obser-

varon en un microscopio Elmiskop I Siemens, del Servicio de Microscopía Electrónica, del Centro de Investigaciones Biológicas (C. S. I. C.).

## RESULTADOS

### *Morfología de las colonias*

Las colonias de esferoplastos obtenidas tras la irradiación son blancas, con bordes dentados y tamaño aproximado de 3 mm de diámetro; son de aspecto granujiento, a diferencia de las de la forma bacilar normal, que son redondas y brillantes, y las de la forma L fija obtenida con glicocola, que son brillantes y traslúcidas y también redondas.

Las colonias obtenidas por irradiación con luz ultravioleta están compuestas de elementos esféricos de tamaño muy regular, 0,8  $\mu$ , aunque en cultivos viejos se pueden observar algunas formas de tamaño mayor y más transparentes. Son resistentes al choque osmótico, pudiendo ser suspendidas en agua destilada, sin lisarse.

Al microscopio electrónico, estas formas esféricas aparecen recubiertas de una cápsula, no tan abundante como en las formas obtenidas con glicocola, pero sí mayor que en las formas bacilares normales. Esta cápsula se puede eliminar simplemente por lavados con agua destilada.

Las paredes de estas células esféricas obtenidas por los métodos citados, tienen un aspecto muy frágil comparadas con las de las formas obtenidas por glicocola (*figuras 2-4*), apareciendo en las preparaciones sombreadas con oro-paladio como de un grosor aproximadamente de la mitad de aquéllas.

### *Comportamiento bioquímico*

En el *cuadro 1* vemos el comportamiento bioquímico de las tres formas de *Agrobacterium tumefaciens* frente a treinta y nueve medios de cultivo.

Así como la forma normal y la forma L obtenida por glicocola se diferencian en muy pocas reacciones, la forma LUV apenas fermenta más que 5 de los 28 carbohidratos probados; sin embargo, en las demás pruebas se comporta aproximadamente como la forma normal bacilar, excepto en el ataque a la albúmina.

*Cuadro 1*

Medio de cultivo	AT	LG	LUV
Arabinosa	+	+	+
Ramnosa	+	+	—
Xilosa	+	+	+
Glucosa	+	+	—
Fructosa	+	+	+
Galactosa	+	+	—
Manosa	+	+	+
Lactosa	+	+	—
Sacarosa	+	+	—
Maltosa	+	+	—
Trealosa	+	+	—
Melibiosa	+	—	+
Celobiosa	+	+	—
Rafinosa	—	+	—
Melicitosa	+	—	—
Almidón	—	+	—
Inulina	—	+	—
Glucógeno	+	+	—
Glicerina	—	+	—
Eritrita	—	—	—
Adonita	+	+	—
Manita	+	+	—
Sorbita	+	+	—
Dulcita	+	+	—
Salicina	+	+	—
Esculina	—	+	—
L-m-glucósido	+	+	—
Inosita	+	+	—
Dextrina	+	+	—
Gelatina	—	+	—
Agar + peptona	—	+	—
Caldo + 1 % de NO <sub>3</sub> K	+	+	+
Caldo + urea	+	+	+
Koser	+	+	+
Voges-Proskauer	±	+	±
Leche tornasolada	±	+	±
Acetato de plomo	—	+	—
Albúmina	+	+	—
Caldo	+	+	+
Caldo + ClNa	+	+	+



Figura 2. Paredes celulares de AT



*Figura 3. Envoltura celular de esferoplastos de LC*



*Figura 4. Envoltura celular de esferoplastos de LUV*

Curvas de crecimiento

La influencia del tipo de cultivo se refleja muy ostensiblemente en la curva de crecimiento. Cuando el cultivo es estático, el crecimiento es lento y no muy abundante, mientras que con agitación, el crecimiento es rápido y abundante (figuras 5-6).

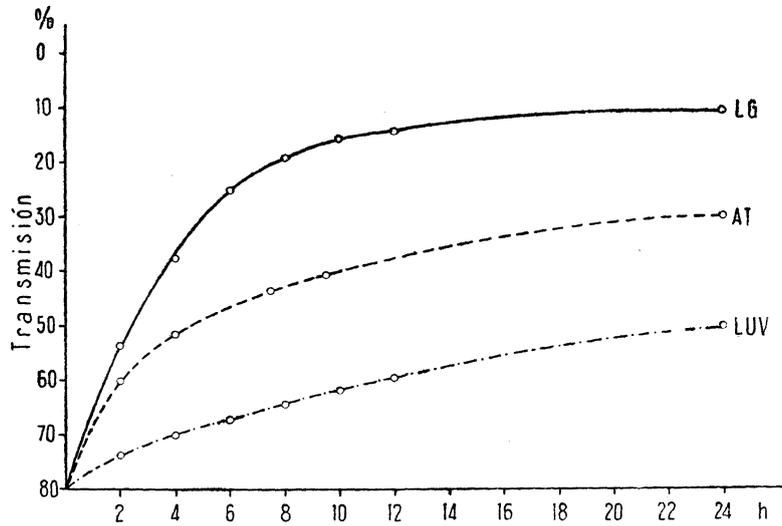


Figura 5. Crecimiento de AT, LG y LUV, en cultivo estático

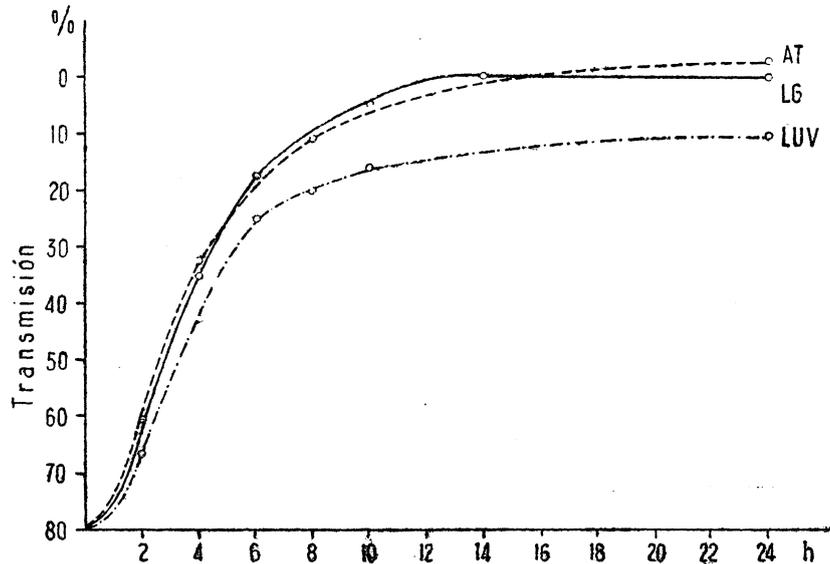


Figura 6. Crecimiento de AT, LG y LUV, en cultivo con agitación

### Curva de letalidad

La sensibilidad a la luz ultravioleta de la forma LUV es muy superior a la de las otras estirpes, como se puede observar en la figura 7.

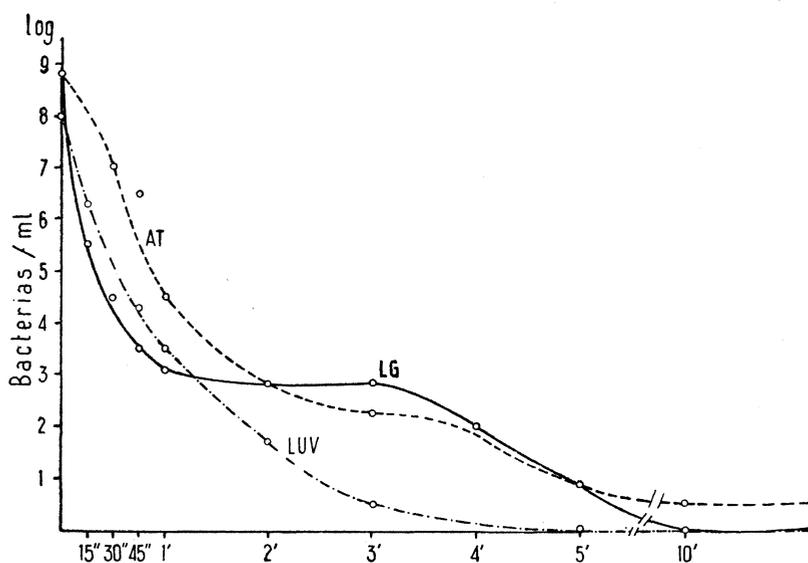


Figura 7. Letalidad de AT, LG y LUV

### Patogenia

Hemos inoculado plantas de *Phaseolus vulgaris* con cultivos recientes de LUV, siempre con resultados negativos.

### DISCUSION

El estudio de los resultados obtenidos y expuestos, en su mayor parte, en las gráficas y cuadros que se acompañan, nos indican que así como existe un gran parecido en el comportamiento bioquímico y sus curvas de crecimiento y resistencia a la radiación ultravioleta, entre las formas bacilares normales de *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas LG o esferoplastos obtenidos por glicocola, las inducidas por irradiación ultravioleta poseen propiedades bastante diferentes de las anteriores; esto

se manifiesta principalmente en su poca capacidad para fermentar hidratos de carbono, pues de los numerosos probados, entre ellos glucosa y lactosa, sólo fermenta arabinosa, xilosa, fructosa, manosa y melibiosa y, sobre todo, su menor resistencia a la radiación ultravioleta, que parece contradecirse con su manera de obtención, ya que, lógicamente, estos esferoplastos han sido seleccionados, de la forma normal bacilar, tras una dosis de radiación muy fuerte. Naturalmente, la modificación se produce tras la irradiación al multiplicarse en el medio de cultivo las células irradiadas, que presentan ya nuevas características.

Por todo lo anterior vemos que las formas LUV se comportan como una estirpe diferente de la original y de la obtenida por glicocola.

La acción de los rayos ultravioletas sobre las bacterias se traduce en una rápida inhibición de la formación de enzimas por éstas; los puntos atacados se cree que radican en los ácidos nucleicos, tanto en el ADN como en el ARN, pues son ambos los que se necesitan para la síntesis de proteínas (6). Los mecanismos celulares para reparación de los daños resultantes de la irradiación, a veces no consiguen su objetivo y se producen células defectuosas, generalmente, traduciéndose esta falta en incapacidad de tipo fisiológico, sin alterar la morfología celular, aunque en algunas excepciones aparecen también modificaciones morfológicas, como, por ejemplo, la formación de largos filamentos (2). En nuestro caso, además de la inhibición de una serie de enzimas necesarias para la fermentación de diversos hidratos de carbono, la radiación ha debido inhibir también alguna de las necesarias para la formación de la parte de pared celular que le da su rigidez. Ultimamente, Heberlein y Lippincott (4) han inducido una mayor infectividad en células de *Agrobacterium tumefaciens* por medio de la radiación ultravioleta, interpretando el fenómeno, no por una mutación, sino, más bien, por una selección de células con mayor poder de infección.

Después de las experiencias con glicocola sobre numerosas estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*, en las que su comportamiento ante diferentes concentraciones del aminoácido presentaba grandes variaciones, hemos visto que la estirpe de que se parte es de fundamental importancia. Así, con la estirpe V, de la que hemos obtenido con relativa facilidad esferoplastos no reversibles a la forma normal con glicocola, obtenemos también esferoplastos con radiaciones ultravioletas, aunque

con propiedades diferentes, indicando una tendencia muy marcada en esta estirpe a la formación de esferoplastos.

#### RESUMEN

Se ha realizado un estudio comparativo entre las capacidades de fermentación de hidratos de carbono y otras pruebas bioquímicas de las formas L fijadas obtenidas por glicocola (LG), las formas L fijadas obtenidas por radiación ultravioleta (LUV) y la estirpe original de forma bacilar normal (AT) (R. Beltrá).

La estirpe original y la LG se comportaron de una manera muy semejante en todos los casos.

La estirpe LUV, sin embargo, mostró mucha menor capacidad de fermentación, falta de patogenicidad para *Phaseolus vulgaris* y crecimiento más lento.

Al microscopio electrónico se pudo observar que las paredes celulares de los esferoplastos LUV eran mucho más delgadas que las de la forma LG y, naturalmente, ambas diferentes de las de la forma normal.

En la discusión se hace hincapié en la importancia de la estirpe original en la inducción de esferoplastos no reversibles por diversos medios.

#### SUMMARY

Fermentation of carbohydrates, indol, Voges-Proskauer, litmus milk and other tests were comparatively studied in fixed L forms induced by glycine, fixed L forms induced by ultraviolet light and the parental *Agrobacterium tumefaciens* (V. Beltrá- strain).

Both the parental strain and the spheroplasts induced by glycine had very similar characteristics with some small differences. Whereas the UV induced L forms had much less capacity for sugar fermentation, less resistance to UV light and the growth in liquid media slower and less abundant. The UV induced L forms were non pathogenic for *Phaseolus vulgaris* whereas the parental and glycine induced L forms were able to form tumors.

Electron microscopy of the external envelope of the spheroplasts induced by glycine showed that they were thicker than the ones from UVL induced spheroplasts.

In the discussion we emphasized the importance of the parental strain in the obtention of spheroplasts by different means.

#### BIBLIOGRAFIA

1. CUMMIS, C. S., y HARRIS, H. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 173.
2. CHALLICE, C. E., y CORRIL, R. H. 1954. *Biochim. Biophys. Acta*, 14, 482.
3. GERONIMUS, L. H., y COHEN, S. 1957. *J. Bacteriol.*, 73, 28-34.
4. HEBERLEIN, S. T., y LIPPINCOT, J. A. 1967. *J. Bacteriol.*, 93, 1.246.
5. NOVICK, R. P. 1962. *Biochem. J.*, 83, 229.
6. PARDEE, A. B., y PRESTIDGE, L. S. 1967. *J. Bacteriol.*, 93, 1.210.
7. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. *Nature*, 195, 101.
8. RUBIO-HUERTOS, M., y CABEZAS-DE-HERRERA, E. 1966. *Nature*, 209, 1.262.
9. RUBIO-HUERTOS, M., y DESJARDINS, P. R. 1956. *Microbiol. Españ.*, 9, 375.
10. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 177.
11. SCOTT, McN., y CHU, E. 1958. *Exptl. Cell Res.*, 14, 166.

FACULTAD DE MEDICINA DE CADIZ  
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA,  
HIGIENE Y SANIDAD

## INOCULACION EXPERIMENTAL DEL EMBRION DE POLLO CON MICOBACTERIAS

por

J. DEL REY, R. GARRIDO y J. A. MIRA

### INTRODUCCION

Los tipos *humanos* de micobacterias se caracterizaban por su alta patogenicidad para el cobayo y baja patogenicidad para el conejo. El tipo aviar consigue una alta patogenicidad para el conejo y para las aves y muy baja para el cobayo. La inyección intravenosa en el conejo de un tipo de micobacterias, bovino o aviar, produce una enfermedad rápidamente mortal, de carácter septicémico, con formación de nódulos tuberculosos generalizados. Las cepas bovinas producen una virulencia alta, tanto para el cobayo como para el conejo. A veces, por pases sucesivos, las cepas bovinas pueden presentar cierto grado de atenuación de su patogenicidad para el conejo y por este hecho confundirse con las cepas humanas.

Tanto las cepas humana como bovina se pueden distinguir en su primer aislamiento por el diferente comportamiento frente a los medios habituales, ya que el bacilo bovino es disgónico cuando se cultiva en medios con glicerina al 0,75%. En cambio, el tipo humano crece muy bien en este medio, por lo que se denomina eugónico.

Las colonias eugónicas son grandes y rugosas, en cambio, las disgónicas son muy pequeñas, aplanadas y lisas. Cuando se dan varios pases en medios artificiales, estas características pueden cambiar.

El tipo *bovino* infecta todavía una notable parte de los bóvidos, dependiendo de la fase de erradicación, y parece ser que puede persistir en la leche pasteurizada fosfatasonegativa, como ha demostrado recientemente Steinbech, en 1960.

En España, a partir del año 1953, en que por la Dirección General de Ganadería se inició la lucha contra la tuberculosis bovina, se ha notado un descenso muy considerable de la enfermedad. En ocho provincias del Norte de la península se han sometido a pruebas tuberculínicas un total de 209.155 reses, correspondientes a 419 municipios, habiéndose obtenido resultados positivos en las pruebas de 25.880, y 4.727 dudosas, por lo que se ha llegado a la conclusión de que el 12,3 % de nuestro efectivo vacuno del norte resulta positivo a la prueba de la tuberculina.

A medida que se ha logrado la erradicación de la tuberculosis en los bóvidos, siguiendo el plan de Bang de eliminar a los reactores positivos, se han logrado ver reinfecciones por el bacilo aviar en estos ganados.

El tipo *aviario* aislado de las aves o de los cerdos, crece dando colonias lisas, esféricas en los medios con huevo. Tienden éstas a crecer un tanto más dispersas que las colonias de los bacilos de mamíferos en la profundidad de los medios líquidos, aunque se han descrito variantes similares a la humana. Nunca llegan a ser patógenos para el cobayo.

El bacilo aviar también se diferencia, según Furth (20), de los bacilos de los mamíferos por métodos serológicos, ya que sus antígenos diferirían de éstos así como de los del *Mycobacterium fortuitum*, *M. ulcerans* y *M. balnei*.

Las tuberculinas obtenidas de los distintos gérmenes también son diferentes, aunque las cepas humanas y bovinas producen una tuberculina similar, a pesar de existir diferencias en cuanto a las fracciones proteínicas de las mismas, como se puede reconocer por métodos serológicos (39).

Los estudios realizados por Larson (25) con diferentes tuberculinas obtenidas de los cuatro grupos sugeridos por Runyon (38) de micobacterias atípicas muestran un grado de reactividad distinta, ya que se necesita incrementar la cantidad de microgramos de nitrógeno de las proteínas presentes en la tuberculina para obtener una reacción posi-

tiva cuando la tuberculina es de una especie de micobacterias distinta a la que produce la infección en el animal.

Las *micobacterias atípicas* se han clasificado en cuatro grupos:

- Grupo I. Fotocromógenos.
- Grupo II. Escotocromógenos.
- Grupo III. No fotocromógenos.
- Grupo IV. Gérmenes de crecimiento rápido.

Los más patógenos para el hombre pertenecen a los grupos I y III.

Los del grupo I, también llamados «bacilos amarillos», por su pigmentación, constituyen un grupo bien definido, fuertemente ácido, alcohol-resistente, incluso más que el bacilo humano y bovino y que producen lesiones pulmonares. Sobre todo se ha encontrado en lesiones pulmonares de trabajadores, en ambiente de polvo (minas del Rhur), etc. Forman colonias de tipo «S» o «R», en medio con albúmina y ácido oléico y el carácter más notable y diferencial es la producción de pigmento amarillo solamente cuando se expone a la luz. Es decir, si envolvemos un tubo en un papel negro y otro mismo cultivo lo dejamos a la luz, solamente aparecerá la coloración en éste. Dentro de este grupo, el principal protagonista es el *Mycobacterium kansasii*.

Según la clasificación de Timpe y Runyon, en el grupo II se incluyen los escotocromógenos; en el grupo III, el *Mycobacterium battey*, denominado así por haber sido aislado en el «Battey State Hospital», de Roma (Ga, E. U.), en pacientes con diferentes lesiones pulmonares, y en el grupo IV se incluyen los de crecimiento rápido, siendo uno de los representantes más característicos el *M. fortuitum*.

Tanto las cepas no cromógenas como las escotocromógenas, es decir, las que producen pigmento aún en la oscuridad, se cultivan fácilmente en los medios habituales a 37 °C. Según Schaefer (39), estos distintos grupos podrían reconocerse serológicamente.

Los escotocromógenos del grupo II se caracterizan patógenamente porque producen lesiones escrofulosas que afectan a los ganglios linfáticos, sobre todo en los niños. Los del grupo III, o tipo Battey, producen lesiones de tuberculosis pulmonar (Runyon). En cambio, los del grupo IV, raramente están implicados en las infecciones humanas y se pueden distinguir por su virulencia para el ratón cuando se infectan con

dosis masivas de los mismos, por vía intravenosa (22-24 y 42). Estas micobacterias de rápido crecimiento, en los bóvidos, producen reacciones locales que se acompañan de respuestas positivas a la tuberculina de carácter pasajero. Penso y Schliesser consiguen producir en la ternera adenopatías intestinales con inyecciones intravenosas de los mismos. Minetti, en Inglaterra, ha descrito una enfermedad espontánea por el *Mycobacterium minetti*, en los ganglios linfáticos intestinales. También se ha podido observar el paso de estos bacilos a la leche.

El *Mycobacterium kansasii* se ha encontrado en la leche y lesiones de las vacas infectadas en Sudáfrica, y también por Schliesser en Alemania y por Chapman en Norteamérica. Parece más bien que daría focos locales que fases de diseminación.

Los ratones campestres sufren de una tuberculosis natural producida por el *Mycobacterium microti*, que tiene poca patogenicidad para el cobayo y conejo, pero con gran patogenicidad para el ratón. Estas cepas murinas crecen en los medios con huevo y son inhibidas por la adición de glicerina, aunque serológicamente no se distinguen de las cepas humanas y bovinas, por lo que fueron empleadas con propósito de vacunación.

Se han aislado bacteriófagos frente a las bacterias soprofitas y patógenas del género *Mycobacterium* y su estructura específica frente a los mismos se ha sugerido como medio de futuras clasificaciones (19, 21 y 37).

La patogenicidad para el hombre es diferente según las micobacterias, siendo el mayor número de casos de tuberculosis humanas la de las cepas bovinas y pulmonar. La mayoría de los casos de tuberculosis pulmonar es debida al *Mycobacterium* humano, y los casos de tuberculosis ósea, articular y linfadenitis de los niños son producidos por el *Mycobacterium* bovino. Esta aparente diferencia puede en parte explicarse por la diferente puerta de entrada, ya que las infecciones por inhalación tienden a producir tuberculosis pulmonar, mientras que las infecciones gastrointestinales por leche contaminada facilitan un mayor aumento de los casos de tuberculosis extrapulmonares.

Casos de tuberculosis aviaria, muy raros, han sido descritos por Bradbury y Young (5), Feldman (15), etc. Beithke (14) hasta 1953 recogió unos 45 casos; Meissner (27-28) da un porcentaje de infecciones de 0,027 %.

Hoy la importancia del *Mycobacterium* aviar en la patología hu-

mana se ha resaltado por Nassal (33-36), que estima en un 7,6% los casos de infecciones pulmonares y 26% de las extrapulmonares. Esto sería debido al empleo de un medio especial de cultivo, según este mismo autor. Para Forschbach (17) sería de un 2% en el hombre y para Meissner (27-28), de *Mycobacterium aviar* y *M. avium similis*, de un 4%.

La tuberculosis aviar afecta principalmente a las gallinas viejas, que las convierte en no ponedoras y puede pasar al huevo en un 1% de los casos.

El *Mycobacterium aviar* afecta en una gran proporción al cerdo, provocando este bacilo el 90% de las tuberculosis de este animal (33). En Alemania se estima el número total de cerdos infectados en 1%.

Los *Mycobacterium* del grupo I de Runyon, tipo del *Mycobacterium kansasii*, producen cuadros fundamentalmente pulmonares, siendo un factor facilitante el respirar una atmósfera de polvo que produce microtraumas o favorecen la entrada del germen.

El grupo III, o tipo Battey, también produce lesiones pulmonares y, en cambio, los del grupo II, o escotocromógenos, predominan en las lesiones ganglionares, sobre todo en los niños.

La relación entre la patogenicidad y la formación del «cord factor» se ha establecido como índice de la virulencia del bacilo.

El «cord factor» se forma por una acumulación de material lipóide que protege el bacilo de la acción de los leucocitos, tanto *in vitro* como *in vivo* (1, 26 y 29). Los bacilos tuberculosos virulentos y los productos obtenidos del cultivo ejercen un efecto tóxico sobre los macrófagos, produciendo una degeneración de los leucocitos (16 y 41). En cambio, las micobacterias que no son capaces de producir ese «cord factor» carecen de esta capacidad de alterar los leucocitos. Según Husseini y Eldberg, la sustancia que se muestra verdaderamente activa evitando la fagocitosis de los leucocitos es un ácido graso trimetilado de 27 carbonos, el ácido tienoico. Se puede extraer por el éter de petróleo y parece ser que tendría relación el «cord factor» con el dimicolato-6-6-trealosa, según ciertos estudios (2-3 y 40). Diversas sustancias entrarían en la formación del «cord factor» y un sulfolípidio recientemente descubierto jugaría un importante papel como factor de virulencia.

Existe un cierto grado de equilibrio entre la patogenicidad del germen desempeñada por su factor de virulencia y las defensas del organismo, de tal manera que la inyección de cortisona, ACTH u otras drogas debe alterar los signos clínicos de la enfermedad, al menos tem-

poralmente, y también abolir en cierto modo la hipersensibilidad a la tuberculina.

Parece ser que los bacilos que llegan al tracto respiratorio son detenidos detrás de la barrera del epitelio ciliar por fagocitos mononucleares fijos en el conducto alveolar, y allí es donde comienza intracelularmente la primera multiplicación del germen, como se ha podido demostrar por estudio histológicos y bacteriológicos del pulmón; posteriormente se encontraría en los nódulos linfáticos del mediastino, etc., a diferentes tiempos de intervalo después de la infección por aerosol de los animales de laboratorio. Al menos durante las primeras semanas, la infección acaece en este punto y posteriormente puede extenderse el proceso de generación o generalización, ya que cuando el número de bacterias intracelulares del fagocito llega a ser excesivo se produce un estallido de éste y nuevos fagocitos acuden, progresando la multiplicación de los gérmenes logarímicamente.

En el cobayo no se observa y no es visible hasta más tarde de los catorce días; sin embargo, cuando se inyecta antígeno suficiente, es capaz de sensibilizar el organismo a las proteínas dentro de las tres o cuatro semanas y realizar un proceso agudo inflamatorio con un área de necrosis cuando se inyecta un millón de bacilos aproximadamente en el cobayo.

En la fase prealérgica, casi todos los bacilos son fagocitados desde el foco primario hacia los nódulos linfáticos. En el cobayo, el tiempo medio de incubación necesario, para que se establezcan los fenómenos de hipersensibilidad es de unos veintiún días; en cambio, en el hombre viene a ser de unos cuarenta días.

Parece ser que ciertas clases de polvo, como el de sílice ( $\text{SiO}_2$ ), disminuyen un tanto la resistencia a ciertas infecciones por micobacterias, como señalábamos en especial al describir el grupo del *Mycobacterium kansasii*. No conocemos enteramente cuál es la intimidad de este mecanismo, aunque para algunos autores sería el que la sílice interferiría un tanto la acción fagocítica de las células mononucleares inmunes.

Por tanto, hay factores de patogenicidad intrínsecos en los propios *Mycobacterium* y factores de susceptibilidad del huésped, que se ven favorecidos por diversas circunstancias exógenas que favorecen la facilidad de penetración del germen. En este sentido se estudian las características más llamativas de la capacidad de agresión del germen al embrión de pollo. Hemos conseguido distintos tipos de micobacte-

rias que clásicamente provocan infecciones en el hombre, y otras tales como el B. C. G., y otros *Mycobacterium* saprofitos, para observar el distinto comportamiento de los mismos al incidir sobre estos embriones, fáciles a la multiplicación bacteriana.

### MATERIAL Y METODOLOGIA

Se ha procedido al estudio experimental en el embrión de pollo, de diez días, en una cantidad de inóculo de 0,1 cm<sup>3</sup>, suspendidas en solución salina tamponada, de las siguientes cepas de micobacterias:

Cepa H37 Rv.

*Mycobacterium bovis*

B. C. G.

Cepa aviar (una aislada del caballo y otra, del cerdo)

Micobacterias atípicas del grupo I. *M. kansasii*

Grupo II. Escotocromógenos

Grupo III. *M. battey*

Grupo IV. *M. minetti (fortuitum)*

*M. balnei*

*M. cheloni*

*M. ulcerans*

*M. johnei*

*M. microti*

*M. phlei*

*M. smegmatis*

*M. aquae* I, II y III

Se estudian seis embriones por cada cepa con patología reconocida para la especie humana y cuatro para los saprofitos. Observándose en el ovoscopio la vitalidad de los mismos después de inoculados. En un estudio seriado se observan las lesiones encontradas en las distintas vísceras y las alteraciones hematológicas experimentadas, mediante tomas de sangre obtenidas del embrión. El estudio histopatológico se realiza previa fijación en bouin, inclusión en parafina, para proceder al estudio organográfico de las diferentes vísceras, a diferentes tiempos de la inoculación con cada uno de estos gérmenes.

La temperatura de incubación de los huevos es de 37 °C, excepto para los del *Mycobacterium balnei*, *M. cheloni*, *M. ulcerans* y *M. aquae*, que se han incubado a 30 °C.

## RESULTADOS OBTENIDOS

A continuación establecemos los resultados que se han obtenido con cada una de las cepas en los embriones de pollo.

### 1) Ceba H37 Rv

Esta cepa es tolerada en los embriones perfectamente durante la primera semana, a partir de los diez días empieza la mortalidad, que llega a ser a los doce días de un 64 %. En los embriones de mayor tiempo de inoculación se observa en la sangre una reticulocitosis intensiva.

Los bacilos ácido-alcohol-resistentes se pueden observar muy escasamente, preferentemente en el vitelo.

El hígado es una de las vísceras más afectadas; se observan infiltrados linfoides o de células redondas; también se pueden encontrar infiltrados en el parénquima renal en los embriones de mayor tiempo de evolución.

En el sistema nervioso, tejido muscular, cartilaginoso y óseo, no hemos encontrado ninguna alteración apreciable.

### 2) *Mycobacterium bovis*

La mortalidad de los embriones es baja; a los doce días es de 50 %. La multiplicación de los bacilos es lenta, siendo difícil encontrarlos en las estructuras embrionarias y en el vitelo.

Se encuentra una reticulocitosis discreta, no afectándose apenas la maduración de la serie roja y blanca en los embriones inoculados.

Los infiltrados discretos de tipo linfoide se pueden encontrar en el hígado y en el parénquima renal y en algunos embriones (16 %) afectan también al sistema nervioso y a las envolturas meníngeas, donde se pueden presentar discretas infiltraciones de células redondas con cierto componente hemorrágico.

3) *B. C. G.*

Los embriones inoculados presentan una mortalidad a los diez días, del 64 %. La multiplicación de los bacilos es rápida, ya que el menor tiempo se encuentran bacilos con intensidad de crecimiento más acentuada que las otras cepas inoculadas, quizá dependiendo de la mejor adaptación.

El estudio hematológico demuestra una tendencia hacia la reticulocitosis con fenómenos discretos de inmadurez de la serie roja, del tipo de la eritroblastosis, observándose también en algunos embriones sombras de Gumprecht.

El estudio histológico de las vísceras revela en el tejido hepático una serie de microabcesos, nódulos linfoides a partir de los espacios de Disse y células de Küpffer vacuoladas. Como expresión de la fagocitosis bacilar que experimentaban es posible encontrar los sinusoides rodeados de células redondas.

El tejido renal también se ve afectado por dichos nódulos de células redondas.

En los tejidos cartilaginoso y óseo se observan espacios claros rellenos con infiltrados de células linfoides.

En algunos embriones (33 %) es posible observar después del nacimiento ligeras infiltraciones hemorrágicas en las meninges.

4) *Mycobacterium aviar*

La mortalidad de los embriones inoculados con *Mycobacterium aviar* a los doce días, es de 81 % de las cepas que provienen del caballo, y de 100 % a los catorce días, de las cepas aisladas del cerdo.

Se observa en el estudio hematológico una intensa reticulocitosis, así como una ligera eritroblastosis que muestra un defecto en la maduración de la serie roja.

Se puede observar una abundante multiplicación de los bacilos, más intensa para las cepas humanas y *B. C. G.* y algo menos intensa para los *Mycobacterium* de crecimiento rápido. Se produce también una coagulación del vitelo.

Las lesiones encontradas se extienden a un gran número de vísceras.

En el hígado podemos observar células de Küpffer vacuoladas y

envueltas por infiltrados de células redondas con un cierto componente hemorrágico, observándose microabscesos por todo el parénquima. Dichos infiltrados rompen la estructura normal del hepatocito.

El tejido renal se ve también afectado por infiltrados de células redondas, observándose también una cierta edematización de los *tubuli*.

El tejido óseo presenta también zonas claras rellenas por infiltraciones de células redondas.

#### 5) Grupo I de micobacterias atípicas. *Mycobacterium kansasii*

La mortalidad de los embriones a los doce días es del 65%.

El estudio histopatológico revela una intensa reticulocitosis y una ligera inmadurez de la serie roja.

En el hígado, a partir de los espacios de Disse, se encuentran infiltrados de células redondas con algunas células de Kupffer vacuoladas y pequeños microabscesos extendidos por todo el parénquima.

El tejido cartilaginoso y el tejido óseo se encuentran también alterados por algunos microabscesos en los que predominan las células redondas.

#### 6) Grupo II. Escotocromógenos

La mortalidad es del 65% a los catorce días. La tasa de multiplicación de bacilos es baja, observándose con dificultad en el vitelo.

El estudio hematológico revela una ligera reticulocitosis con inmadurez de la serie roja y sombras de Gumprecht.

En las vísceras es posible encontrar en el hígado infiltrados linfoides y algunas células de Küpffer vacuoladas.

#### 7) Grupo III. *Mycobacterium battey*

La mortalidad de los embriones es de 65% a los doce días. La tasa de multiplicación de los bacilos está lentificada en un comienzo, pero en los estadios finales es análoga a las cepas aviarias. El cuadro de lesiones es similar a aquellas y el número de bacilos es mayor en la corioalantoides.

El estudio hematológico revela una extraordinaria reticulocitosis con linfocitos, un cierto grado de inmadurez en la serie roja, en la que

predominan los eritroblastos, así como la presencia de sombras de Gumprecht.

El hígado, macroscópicamente, presenta color amarillento, observándose infiltrados linfoides discretos, diseminados a través de los espacios de Disse, en el que se observan algunas células de Küpffer vacuoladas y macrófagos formando pequeños nódulos de células redondas diseminadas por el parénquima.

El parénquima renal también se ve afectado por microabscesos y en el tejido óseo también se encuentran espacios claros con nódulos de células redondas.

#### 8) *Grupo IV. Mycobacterium minetti (fortuitum)*

Estos bacilos se caracterizan por un crecimiento rápido con intensa multiplicación en corioalantoides y saco vitelino, pero que también es posible encontrarlos en la sangre y otras vísceras.

La mortalidad es alta, siendo de 81 % a los doce días.

En la sangre predominan más los fenómenos hemolíticos que la reticulocitosis. Hay una ligera inmadurez de las formas de la serie roja, encontrándose campos de ligero predominio de sombras de Gumprecht.

Los gérmenes toman un aspecto de formas filamentosas que recuerdan un tanto a los *Actynomices*, lo que es posible observar en las preparaciones sanguíneas.

El hígado presenta un aspecto un tanto decolorado macroscópicamente y en el estudio histopatológico se observan infiltraciones en las que abundan los macrófagos con predominio en los espacios de Disse, entre las células endoteliales y las células de Küpffer, donde es posible observarlos también por las tinciones especiales de dichas micobacterias.

En el tejido renal se encuentran edemas de los *tubuli*, así como infiltrados en los que predominan los macrófagos, polinucleares y algunas células redondas.

En el tejido óseo no se encuentra ninguna alteración.

#### 9) *Mycobacterium balnei*

Los embriones de pollo inoculados con este germen son puestos a una temperatura de 30 °C de incubación.

La mortalidad de los embriones viene a ser de un 50 % a los doce días.

La capacidad de multiplicación de los bacilos es intermedia entre los *Mycobacterium* de crecimiento rápido y las cepas humana y bovina. Es posible encontrar bacilos en la corioalantoides y en las vísceras.

En la sangre predomina una manifiesta reticulocitosis, observándose también ligera inmadurez de la serie roja y sombras de Gumprecht.

En el hígado encontramos formaciones linfoides en las que es posible observar algunos macrófagos constituyendo nódulos diseminados discretamente por todo el parénquima.

El parénquima renal se encuentra también afectado, con ligeras infiltraciones de células redondas.

El tejido muscular denota un ligero edema, no encontrándose fenómenos específicos de infiltración más caracterizada.

En el sistema nervioso se encuentran fenómenos congestivos en las meninges, donde es posible observar algunos infiltrados de células redondas.

#### 10) *Mycobacterium chelonii*

Estos *Mycobacterium* también se incuban a 30 °C. La mortalidad es débil: a los doce días presenta un 32 %. La tasa de multiplicación es muy discreta; es difícil encontrar los bacilos ácido-alcohol-resistentes, a no ser en las estructuras del vitelo.

En la sangre se observa una cierta tendencia a la reticulocitosis, siendo ésta muy ligera y discreta, observándose también una cierta lentificación en la madurez de la serie roja. En algunos campos se presentan sombras de Gumprecht.

Ligeros infiltrados de células redondas se suelen encontrar en el parénquima hepático, pero estos son relativamente raros en el mismo.

Afecta también esta micobacteria al tejido óseo, apareciendo zonas claras ocupadas por células redondas.

#### 11) *Mycobacterium ulcerans*

Estos embriones inoculados con dichos *Mycobacterium* se incuban a 30 °C. La mortalidad de los mismos es reducida, siendo a los catorce días del 50 %. La multiplicación es reducida.

En la sangre se observa una eritroblastosis muy marcada, más incluso que la reticulocitosis. Es decir, predomina la inmadurez de la serie roja. También se observan algunas sombras de Gumprecht.

En el parénquima hepático se observan infiltraciones de células linfoides y redondas a partir de los espacios de Disse.

En el tejido renal se observan también infiltrados de células redondas.

En el tejido óseo se observan algunas infiltraciones de células redondas que invaden también las estructuras adyacentes.

### 12) *Mycobacterium johnei*

En los embriones inoculados por este germen la mortalidad es baja, del 50 % a los doce días. La capacidad de multiplicación está lentificada.

En la sangre se encuentra una reticulocitosis muy discreta y una cierta inmadurez en la serie roja, así como sombras de Gumprecht.

En el tejido hepático encontramos infiltrados de células redondas y se pueden observar también algunas células vacuoladas de Küpffer.

En el parénquima renal pueden observarse algunos *tubuli* edematosos congestionados, y algún infiltrado de células redondas.

En el tejido muscular es posible observar un ligero edema y en el cartilaginoso y óseo se hallan zonas claras ocupadas por infiltrados de células redondas.

### 13) *Mycobacterium microti*

La mortalidad de los embriones es a los doce días, del 65 % y el grado de multiplicación es de tipo medio comparativamente con los otros *Mycobacterium*, pudiendo encontrar el germen en la corioalantoides, vitelo y algunas vísceras.

En la sangre se observa ligera reticulocitosis y cierta lentificación en la madurez de la serie roja.

En el tejido hepático se observan típicos infiltrados de tipo tuberculoides con elementos de células gigantes y linfocitos en los pollos inoculados de mayor tiempo de evolución.

El tejido renal se encuentra afectado de infiltración de células redondas.

En el tejido muscular hay zonas edematosas muy ligeras.

En los tejidos cartilaginoso y óseo también es posible observar infiltraciones de células redondas y linfoides.

#### 14) *Mycobacterium phlei*

La mortalidad es baja, ya que viene a ser del 32,5% a los doce días. La capacidad de multiplicación es de tipo intermedio; se encuentra en la sangre manifiesta reticulocitosis con inmadurez de la serie roja y sombras de Gumprecht. Las manifestaciones en sangre son mucho más llamativas que las que aparecen en las vísceras, siendo el fenómeno de la reticulocitosis el más resaltante.

En el hígado y en el parénquima renal difícilmente se observan infiltrados linfoides y en el resto de las vísceras no se observa ninguna anomalía.

#### 15) *Mycobacterium smegmatis*

Mortalidad muy baja, 16,2% a los doce días. La tasa de multiplicación es extraordinariamente baja.

Las lesiones en las vísceras y en el tejido hepático no tienen significación manifiesta, pudiendo decir que este germen es incapaz de establecer un cuadro lesional para el embrión con el inóculo efectuado comparativamente con otras micobacterias, ya que para obtener algunos efectos manifiestos es necesario emplear grandes cantidades de inóculo.

#### 16) *Mycobacterium aquae* I, II y III

Estos embriones se incuban a 30 °C. La capacidad de los mismos en cuanto a la patogenicidad es extraordinariamente reducida, ya que se ha de forzar la dosis del inóculo para obtener efecto lesional o para que actúen los bacilos como cuerpo extraño y puedan obtenerse algunas manifestaciones típicas.

La mortalidad es muy baja, del 16,2% a los doce días. La multiplicación es discreta, encontrándose fundamentalmente en el saco vitelino los bacils.

En la sangre se encuentra cierta reticulocitosis con eritroblastosis discreta y algunas sombras de Gumprecht, siendo esta variable para las tres cepas encontradas, ya que la cepa II es la que presenta mayor grado de reticulocitosis, muy poco la cepa I y ninguno la cepa III.

El cuadro lesional en las vísceras se manifiesta por pequeños infil-

trados linfoides que afectan al hígado y al parénquima renal, aunque estos son muy limitados y escasos. En las otras vísceras no se observan anomalías.

#### RESUMEN FINAL

Se ha estudiado la inoculación experimental del embrión de pollo de diez días de incubación con las siguientes cepas de micobacterias:

Cepa H 37 Rv

*Mycobacterium bovis*

B. C. G.

Cepa aviar (una aislada del caballo y otra, del cerdo).

Micobacterias atípicas del Grupo I. *M. kansasii*.

Grupo II. Escotocromógenos.

Grupo III. *M. battey*.

Grupo IV. *M. minetti (fortuitum)*.

*M. balnei*.

*M. cheloni*.

*M. ulcerans*.

*M. johnei*.

*M. microti*.

*M. phlei*.

*M. smegmatis*.

*M. aquae* I, II y III.

estudiándose la capacidad de multiplicación de las mismas en el embrión, así como las lesiones histopatológicas encontradas en las distintas vísceras.

El grado de mortalidad de los embriones nos indica también la agresividad del bacilo y no va paralela siempre a la capacidad de multiplicación del mismo en el embrión; así pues, el *Mycobacterium minetti (fortuitum)* tiene una gran capacidad de multiplicación y, en cambio, la agresión visceral es menor que las producidas por otras cepas más patógenas.

Dentro de las cepas de mayor patogenicidad se encuentran los *Mycobacterium* aviaries, siendo más patógenas las cepas obtenidas del cerdo que las del caballo, siendo las lesiones viscerales más llamativas. Sigue

a continuación el *M. battey* que se comporta en el cuadro lesional de idéntica manera que las cepas de tipo aviar.

El *Mycobacterium* B. C. G. tiene una gran capacidad de crecimiento y su grado de agresividad es intermedio, aunque menor que los tipos aviar y *battey*.

Los *Mycobacterium lovis* no adaptados, es decir, recién extraídos de su ambiente patógeno, producen muy pocas lesiones en el embrión de pollo, quizás porque su capacidad de multiplicación está muy lentificada.

Mayor capacidad de multiplicación tienen las cepas humanas H37 Rv, siendo el cuadro lesional también más manifiesto.

Dentro de los *Mycobacterium* atípicos, el más patógeno y de mayor capacidad de multiplicación corresponde al de los grupos I y III, aunque el crecimiento dentro del embrión es siempre menor que el del grupo IV, pero en éstos, el cuadro de patogenicidad no corre paralelo con el de la multiplicación dentro del mismo. También se caracteriza por una intensa multiplicación de los bacilos el *Mycobacterium minetti*.

En los otros *Mycobacterium* saprofitos su capacidad de multiplicación es discreta.

Las lesiones en la sangre se caracterizan fundamentalmente por una reticulocitosis manifiesta y, con menor intensidad, una lentificación de la maduración de la serie roja con una discreta eritroblastosis y aparición de sombras de Gumprecht. Provocan una reticulocitosis manifiesta el *Mycobacterium* aviar, la cepa *battey*, *M. kansasii*, *M. balnei* y *M. aquae* II.

Las lesiones histopatológicas que se observan con mayor frecuencia corresponden al hígado y al parénquima renal, provocando nódulos infiltrativos de células redondas con algunas células de Kupffer vacuoladas, donde es posible por tinciones especiales observar la presencia de bacilos.

Podemos decir que en casi todas las micobacterias patógenas este cuadro lesional es análogo.

También afectan al tejido óseo ciertas micobacterias, tales como la aviar *battey*, *kansasii*, *chelomatis*, *ulcerans*, *johnnei* y *microti*. A las meninges afectan el *bovis*, B. C. G. y *balnei*, entre los más destacados.

Es de destacar que no aparecen lesiones en el pulmón en ninguno de los embriones, quizás por no estar en función los mismos.

## SUMMARY

Seven years old chicken embryos are inoculated experimentally with different types of Mycobacteria: mammalian strain (human and bovine), avian type bacilli, yellow bacilli, scotochromogens, «Battey» strains, rapid growers, etc. Their spread of tubercle bacilli in this host, and their pathogenic effect in the kidney, liver, spleen, bone and other organs and the consequence of blood invasion are observed.

The pathogenic properties of the different Mycobacteria is established and the similar pathogenic effect with the different types of these Mycobacteria is discussed as well.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALLGOWER, M., y BLOCH, H. 1949. The effect of tubercle bacilli on the migration of phagocytes *in vitro*. Am. Rev. Tuberc., 59, 562-66.
2. ASSELINEAU, J. 1952. Lipides du bacille tuberculeux. Advan. Tuberc. Res., 5, 1-44.
3. ASSELINEAU, J. 1956. Sur les lipides de la souche humaine avirulente H37Ra de *Mycobacterium tuberculosis*. Bull. Soc. Chim. Biol., 38, 1.397-12.
4. BEITZKE, H. 1953. La infección humana por el bacilo aviario. Ergeb. Tuberk. Forsch., X, 201.
5. BRADBURY, F. C. S., y YOUNG, J. A. 1946. Human pulmonary tuberculosis due to avian tubercle bacilli. Report of a case. Lancet, 1, 89-91.
6. DUBOS, R. J. 1950. Biologic and immunologic properties of tubercle bacilli, Am. J. Med. Sci., 9, 573-90.
7. DUBOS, R. J. Effect of metabolic factors on the susceptibility of albino mice to experimental tuberculosis. J. Exptl. Med., 101, 59-84.
8. DUBOS, R. J., y DAVIS, B. D. 1946. Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media. J. Exptl. Med., 83, 409-23.
9. DUBOS, R. J., y MIDDLEBROOK, G. 1947. Media for tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc., 56, 334-45.
10. DUBOS, R. J., y MIDDLEBROOK, G. 1948. Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc., 58, 698-99.
11. DUBOS, R. J., y PIERCE, C. H. 1957. Tice strain of BCG. Am. Rev. Respirat. Diseases, 75, 692.
12. DUBOS, R. J.; PIERCE, C. H., y SCHAEFFER, W. B. 1956. Differential characteristics *in vitro* and *in vivo* of several substrains of BCG. Am. Rev. Tuberc., 74, 655-717.
13. DUBOS, R. J.; PIERCE, C. H., y SCHAEFFER, W. B. Antituberculous immunity in mice vaccinated with killed tubercle bacilli, J. Exptl. Med., 97, 221-33.

14. ELBERG, S. S.; SCHNEIDER, P., y FONG, J. 1957. Cross-immunity between *Brucella melitensis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Intracellular behavior of *Brucella melitensis* in monocytes from vaccinated animals. J. Exptl. Med., 106, 545-54.
15. FELDMAN, W. H. 1938. Avian tuberculosis infections, 357-410. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
16. FONG, J.; SCHNEIDER, P., y ELDBERG, S. S. Studies on tubercle bacillus monocyte relationship. II. Induction of monocyte degeneration by bacteria and culture filtrate: Specificity of serum and monocyte effects on resistance to degeneration. J. Exptl. Med., 105, 25-37.
17. FORSCHBACH y colaboradores. 1965. Juicio crítico acerca del hallazgo de *Mycobacterium bovis* en material de observación procedente del hombre. Praxis Pneumol., 19, 204.
18. FROMAN, S., y BOGEN, E. 1953. Mycobacteriophage. Trans. 49th Ann. Meeting Natl. Tuberc. Assoc., 76.
19. FROMAN, S.; WILL, D. W., y BOGEN, E. 1954. Bacteriophage active against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. I. Isolation and activity. Am. J. Public Health, 44, 1.326-33.
20. FURTH, J. 1926. On the serological relationship of acid-fast-bacteria. J. Immunol., 12, 273-92.
21. GARDNER, G. M., y WEISER, R. S. 1947. A bacteriophage for *Mycobacterium smegmatis*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 66, 205-6.
22. GORDON, R. E., y SMITH, M. M. 1953. Rapidly growing, acid-fast bacteria. I. Species description of *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehman and Neumann and *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann. J. Bacteriol., 66, 41-48.
23. GORDON, R. E., y SMITH, M. M. Rapidly growing, acid-fast bacteria. II. Species description of *Mycobacterium fortuitum* CREUZ, J. Bacteriol., 69, 502-7.
24. KUSHNER, D. S.; McMILLEN, S., y SENDERI, M. 1957. Atypical acid-fast bacilli. II. *Mycobacterium fortuitum*: Bacteriologic characteristics and pathogenicity for laboratory animals, Am. Rev. Tuberc., 76, 108-22.
25. LARSON, C. L., y WICHT, W. C. 1963. Resistance to infection with virulent tubercle bacilli in mice immunized with viable *Mycobacterium balnei* and unclassified mycobacteria administered aerogenically. Am. Rev. Respirat. Diseases, 88, 456-61.
26. MARTIN, S. P.; PIERCE, C. H.; MIDDLEBROOK, G., y DUBOS, R. J. 1950. The effect of tubercle bacilli on the polymorphonuclear leucocytes of normal animals. J. Exptl. Med., 91, 381-92.
27. MEISSNER, G. 1962. La epidemiología de la tuberculosis bovina y aviaria. Tuberkulosearzt, 16, 243.
28. MEISSNER, G. 1959. Bacterias tuberculosas de tipo bovino en el hombre, en los años 1953-1957. Tuberkulosearzt, 13, 74.
29. MIDDLEBROOK, G. 1950. The experimental analysis of virulence of tubercle bacilli. Bull. N. Y. Acad. Med., 26, 498-506.
30. MIDDLEBROOK, G., y COHN, M. L. 1958. Bacteriology of tuberculosis: Laboratory methods. Am. J. Public. Health, 48, 844-53.

31. MIDDLEBROOK, G., y DUBOS, R. J. 1948. Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J. Exptl. Med.*, 88, 521-28.
32. MIDDLEBROOK, G.; DUBOS, R. J., y PIERCE, C. 1947. Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J. Exptl. Med.*, 86, 175-84.
33. NASSAL, J. 1961. Papel de la variedad bovina y aviaria en la epidemiología y etiología de la tuberculosis humana. *Deut. Med. Wochschr.*, 86, 1.855.
34. NASSAL, J. 1961. El papel etiológico y epidemiológico del tipo aviario y bovino en la tuberculosis del hombre. *Deut. Med. Wochschr.*, 86, 1.855.
35. NASSAL, J. 1963. La tuberculosis de las aves y su significación para hombres y animales. *Tuberkulosearzt*, 17, 187.
36. NASSAL, J. 1964. Causas y peligros de nuevas infecciones a rebaños libres de tuberculosis y su significación para la sanidad oficial. *Tuberkulosearzt*, 78, 651.
37. REDMOND, W. B. 1963. Bacteriophages of the mycobacteria. A review. *Advan. Tuberc. Res.*, 12, 191-229.
38. RUNYON, E. H. 1955. Veterans Administration National Tuberculosis Association cooperative study of mycobacteria. *Am. Rev. Tuberc.*, 72, 866-68.
39. SCHAEFER, W. 1947. Identification serologique des bacilles tuberculeux du type bovin. *Ann. Inst. Pasteur*, 73, 1.157-58.
40. SPITZNAGEL, J. K., y DUBOS, R. J. 1955. A fraction of tubercle bacilli possessing primary toxicity. *J. Exptl. Med.*, 101, 291-311.
41. SUTER, W. E., y DUBOS, R. J. 1951. Variability of BCG strains (bacillus Calmette-Guerin). *J. Exptl. Med.*, 93, 559-72.
42. WELLS, A. A.; AGIUS, E., y SMITH, N. 1955. *Mycobacterium fortuitum*. *Am. Rev. Tuberc.*, 72, 53-63.

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

## COMPORTAMIENTO DE ALGUNAS ESPECIES DE AZOTOBACTERIACEAS FRENTE A LOS ANTIBIOTICOS

por

R. LÓPEZ

### INTRODUCCION

Dado que la acción de las sustancias antibacterianas, cuando se conocen sus mecanismos biológicos, puede constituir una magnífica herramienta para explicar determinados procesos bioquímicos de los microorganismos, hemos orientado parte de nuestros trabajos al estudio del papel que los antibióticos ejercen sobre las Azotobacteriaceas y, en particular, sobre su producción de polisacáridos.

Al revisar la bibliografía nos encontramos que es poco lo realizado en este campo, pese a lo apasionante del tema, aunque sólo sea por el aspecto ecológico de la cuestión, ya que el factor «antibiosis» ha de ser uno de los más importantes en habitats naturales. Los trabajos encontrados se limitan al de Bershova (2) que en 1949 comprueba ciertos cambios morfológicos y fisiológicos en *Azotobacter*, en presencia de sustancias antibióticas, y a los de Depoux (4) y Afikyan y Arutgvan (1). El primero de ellos estudia la antibioticosensibilidad de diversas variedades de *Azotobacter*, y los segundos investigan el efecto de la penicilina, estreptomycinina y gramidicina sobre *Azotobacter chroococcus* y *A. agile*. También algún autor ruso citado por Rubenchick (13) ha trabajado sobre especies de *Azotobacter* en relación con penicilina, cloranfenicol, estreptomycinina y tetraciclina (6 y 15). Según ellos,

estas sustancias inhiben la producción de polisacáridos en *A. chroococcus* y *A. agile*, únicas especies ensayadas.

## MATERIAL

### *Bacterias*

Las bacterias utilizadas fueron diversas estirpes de *Azotobacter* (\*) seleccionadas de forma que entre las distintas especies hubiera marcada diferencia en la capacidad de producción de polisacáridos. De estas estirpes normales se obtuvieron, mediante adaptación *in vitro*, diversas estirpes antibioticorresistentes que nos permitieron hacer un perfecto estudio comparativo.

Las bacterias originales fueron:

*Beijerinckia indica*, variedad Hawai 2, cepa normal con elevada capacidad de producción de polisacáridos, aislada de suelos húmicos de lactosol (pH = 5,2), en Oahu (Kaneohe), en las Islas Hawai.

*Azotobacter vinelandii*, cepa 4, aislada de lodos marítimos (pH = 9), en Surabaia (Java), en Indonesia; cepa normal, con una producción mediana de polisacáridos.

*Azotobacter chroococcus*, cepa 21, que fue aislada en tierras de jardín (pH = 7,5), en Wageningen (Holanda); cepa normal, que en medio líquido apenas produce polisacáridos.

### *Antibióticos*

Se emplearon dieciséis antibióticos: penicilina, estreptomina, tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, eritromicina, polimixina, neomicina, kanamicina, colimicina, paromomicina y aminosidina.

Con ellos se prepararon soluciones patrón de 1.000 a 5.000  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  (según los casos), a partir de las cuales se obtenían las distintas soluciones de trabajo para las cuales se obtenían las distintas soluciones de trabajo para las pruebas de adaptación y para las determinaciones

---

(\*) Los microorganismos fueron amablemente cedidos por el Dr. J. H. Becking, del Laboratorio de Microbiología de Wageningen (Holanda).

de antibioticosensibilidad. Estas soluciones patrón se esterilizaron por filtración y se conservaron de acuerdo con la pauta señalada por Grove y Randall (5) para cada antibiótico.

#### *Medios de cultivo*

La composición de los medios de cultivo fue muy semejante en las diversas facetas de nuestro trabajo, aunque con ligeras modificaciones según se trate de medios de mantenimiento de las estirpes, de adaptación a la antibioticorresistencia o de producción de polisacáridos. Todos ellos fueron totalmente carentes de sales nitrogenadas que pudiesen provocar interferencias en la capacidad fijadora del nitrógeno atmosférico.

El medio A) para *Beijerinckia indica*, contiene: glucosa (Difco), 20 g; fosfato monopotásico (Merck), 0,2 g; fosfato bipotásico (Merck), 0,8 g; sulfato magnésico, 7 H<sub>2</sub>O (Merck), 0,5 g; cloruro férrico, 6 H<sub>2</sub>O (Merck), 0,025 g; molibdato sódico, 2H<sub>2</sub>O (Merck), 0,005 g; agua destilada c. s. p. 1 l.

El medio B) para *Azotobacter* tiene la misma composición que el anterior, pero fue suplementado con 0,1 g/l, de cloruro cálcico.

Los medios sólidos para el mantenimiento de las estirpes, se prepararon añadiendo a las anteriores agar al 1,25%.

### TECNICAS

#### *1) Estudio de la antibioticosensibilidad en distintos estados del crecimiento bacteriano y de la aparición de resistencias cruzadas*

El procedimiento seguido es muy similar en ambos casos. El primero de ellos nos permite conocer el grado de sensibilidad frente a los dieciséis antibióticos empleados y comprobar, asimismo, si la edad del cultivo bacteriano influía en su comportamiento frente a estos antibióticos.

En ambos casos la técnica empleada consistió en hacer determinaciones de concentración mínima inhibidora (C. M. I.) sobre medio líquido, con un indicador de variaciones de potencial redox, todo ello según técnica ya habitual en nuestro laboratorio (11-12). Los resultados se leían al cabo de cuarenta y ocho a setenta y dos horas y para

obtener valores comparables se controlaron exactamente los inóculos a una misma densidad óptica, medida a 600 m $\mu$ .

### *II) Obtención de estirpes antibioticorresistentes por adaptación en medio líquido*

La técnica seguida para la obtención de estirpes antibioticorresistentes es una variante sobre la anterior (10), que consiste en determinar la C. M. I. del germen a tratar y, a continuación, en erlenmeyer de 100 cm<sup>3</sup>, con 20 cm<sup>3</sup> de medio líquido, que lleva una dosis sub-inhibidora del antibiótico (C. M. I.  $\times$  0,80 cm<sup>3</sup>) se siembra 1 cm<sup>3</sup> del cultivo inicial. En estas condiciones se mantiene el cultivo agitado a 28 °C durante cuatro, seis u ocho días, según la rapidez de crecimiento del germen.

Cuando ha transcurrido la mitad de este intervalo de cultivo se hace la determinación de la C. M. I. y este dato se emplea para preparar la concentración antibiótica del nuevo medio, que se inocula con 1 cm<sup>3</sup> a partir del matraz anterior. Así, sucesivamente, se van haciendo resiembras en concentraciones crecientes de antibióticos, cuyas dosis están perfectamente controladas para que no haya inhibición de cultivo, hasta que se ve que no hay variación del nivel de antibióticorresistencia alcanzado.

### *III) Aislamiento de los polisacáridos*

Los polisacáridos producidos por estos microorganismos, bien como polisacáridos libres en el medio o formando cápsulas, se obtuvieron siguiendo las técnicas descritas por Cohen y Jonhstone (3) y adaptadas por nosotros, al igual que el procedimiento de purificación de los mismos, como hemos descrito anteriormente.

## RESULTADOS

### *I) La sensibilidad a los antibióticos y sus variaciones en función de la edad del cultivo*

Las variaciones de sensibilidad en función de la edad del cultivo, aparecen en el *cuadro 1*.

Cuadro 1. Variaciones en la antibióticosenibilidad de *B. indica*, *A. vinelandii* y *A. chroococcus*. C. M. I. en microgramos/cm<sup>3</sup> de medio líquido

Antibióticos	<i>A. vinelandii</i>			<i>B. indica</i>			<i>A. chroococcus</i>		
	Cultivos de 2 días	Cultivos de 6 días	Cultivos de 9 días	Cultivos de 3 días	Cultivos de 9 días	Cultivos de 12 días	Cultivos de 2 días	Cultivos de 4 días	Cultivos de 6 días
	Penicilina	7,81	5,85	23,43	31,25	23,43	73,75	2,92	2,92
Streptomycin	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Cloranfenicol	46,87	62,50	73,75	125,00	125,00	250,00	31,25	31,25	46,87
Tetraciclina	1,46	1,95	5,85	1,95	5,85	11,71	0,26	0,48	1,46
Clorotetraciclina	2,92	0,73	5,58	1,95	5,85	11,71	0,26	0,48	1,46
Oxitetraciclina	0,73	0,73	2,92	1,95	5,85	11,71	0,26	0,48	1,46
Kanamicina	0,13	0,13	0,13	5,85	5,85	5,85	0,48	0,48	0,48
Polimixina	0,73	0,73	0,73	1,95	1,95	1,95	0,52	0,52	0,52
Neomicina	0,73	0,52	0,97	1,95	1,95	2,92	0,48	0,26	0,52
Novobiocina	11,71	19,62	38,25	125,00	125,00	187,50	125,00	125,00	125,00
Colimicina	0,52	1,46	5,85	5,85	7,81	7,81	1,46	1,95	3,90
Paromomicina	0,48	0,48	0,73	1,95	1,95	3,90	0,97	0,97	1,46
Aminosidina	0,26	0,26	0,97	1,95	1,95	1,95	0,97	0,97	1,46
Oleandomicina	2,92	1,95	3,90	31,25	23,43	46,87	15,62	15,62	23,43
Ristocetina	11,71	11,71	11,71	23,43	23,43	46,87	15,62	15,62	23,43
Eritromicina	38,25	38,25	46,87	31,25	46,87	62,50	46,87	46,87	62,50

*Cuadro 2. Resultados de la adaptación a la resistencia de células de A. vinelandii frente a cinco antibióticos distintos*

Resiembras efectuadas cada 4 días	Variaciones en la C. M. I. frente a				
	Penicilina U. I./cm <sup>3</sup>	Estrepto- micina µg/cm <sup>3</sup>	Cloran- fenicol µg/cm <sup>3</sup>	Tetraciclina µg/cm <sup>3</sup>	Polimixina µg/cm <sup>3</sup>
Inicial	7,81	0,130	46,87	1,46	0,73
1. <sup>a</sup>	18,50	0,062	67,50	5,85	0,73
2. <sup>a</sup>	23,43	0,130	46,87	5,85	0,73
3. <sup>a</sup>	23,43	0,062	67,50	5,85	0,97
4. <sup>a</sup>	46,87	0,062	73,75	5,85	0,97
5. <sup>a</sup>	68,50	0,062	67,50	3,90	0,97
6. <sup>a</sup>	46,87	0,062	130,00	5,85	0,97
7. <sup>a</sup>	46,87	0,062	130,00	11,71	0,97
8. <sup>a</sup>	46,87	0,062	187,50	23,43	0,97
9. <sup>a</sup>	46,87	0,062	187,50	23,43	2,92
10. <sup>a</sup>	46,87	0,062	187,50	27,43	2,92
11. <sup>a</sup>	46,87	0,062	187,50	27,43	5,85
12. <sup>a</sup>	46,87	0,062	187,50	27,43	5,85
13. <sup>a</sup>	46,87	0,062	187,50	27,43	5,85
14. <sup>a</sup>	46,87	0,062	187,50	27,43	5,85
15. <sup>a</sup>	46,87	0,062	187,50	27,43	5,85

Cuadro 3. Resultados de la adaptación a la resistencia de células de *A. chroococcus* frente a cinco antibióticos distintos

Resiembras efectuadas cada 2 días	Variaciones en la C. M. I. frente a				
	Penicilina U. I./cm <sup>3</sup>	Estreptomicina µg/cm <sup>3</sup>	Cloranfenicol µg/cm <sup>3</sup>	Tetraciclina µg/cm <sup>3</sup>	Polimixina µg/cm <sup>3</sup>
Inicial	2,92	0,13	31,25	0,26	0,52
1. <sup>a</sup>	2,92	0,13	46,87	0,24	0,52
2. <sup>a</sup>	3,90	0,13	46,87	0,26	0,73
3. <sup>a</sup>	2,92	0,24	62,50	0,73	2,92
4. <sup>a</sup>	6,50	0,13	73,75	0,97	3,90
5. <sup>a</sup>	6,50	0,13	187,50	0,97	3,90
6. <sup>a</sup>	7,81	0,13	250,00	1,46	11,71
7. <sup>a</sup>	6,50	0,13	250,00	1,46	11,71
8. <sup>a</sup>	7,81	0,13	250,00	1,46	11,71
9. <sup>a</sup>	7,81	0,13	250,00	1,46	11,71
10. <sup>a</sup>	7,81	0,13	250,00	1,46	11,71
11. <sup>a</sup>	7,81	0,13	250,00	1,46	11,71
12. <sup>a</sup>	7,81	0,13	250,00	1,46	11,71

Cuadro 4. Resultados de la adaptación a la resistencia de células de *B. indica* frente a cinco antibióticos distintos

Resiembras efectuadas cada 6 días	Variaciones en la C. M. I. frente a				
	Penicilina U. I./cm <sup>3</sup>	Estreptomicina µg/cm <sup>3</sup>	Cloranfenicol µg/cm <sup>3</sup>	Tetraciclina µg/cm <sup>3</sup>	Polimixina µg/cm <sup>3</sup>
Inicial	31,25	0,13	125,00	1,95	1,95
1. <sup>a</sup>	31,25	0,13	187,50	1,95	3,90
2. <sup>a</sup>	31,25	0,13	187,50	1,46	3,90
3. <sup>a</sup>	46,87	0,13	250,00	1,95	5,85
4. <sup>a</sup>	31,25	0,13	250,00	2,92	11,70
5. <sup>a</sup>	62,50	0,13	250,00	3,90	46,87
6. <sup>a</sup>	73,75	0,13	250,00	5,85	125,00
7. <sup>a</sup>	187,50	0,24	250,00	3,90	125,00
8. <sup>a</sup>	250,00	0,13	250,00	5,85	125,00
9. <sup>a</sup>	250,00	0,13	250,00	7,81	125,00
10. <sup>a</sup>	250,00	0,13	250,00	7,81	125,00

*Cuadro 5. Variaciones en el comportamiento frente a los antibióticos de estirpes normales y resistentes de A. vinelandii. C. M. I.*

Antibióticos	Cepa normal	Cepa penicilin-resistente	Cepa tetraciclín-resistente	Cepa polimixín-resistente
Penicilina	7,81	46,87	23,43	11,71
Estreptomina	0,13	0,13	0,24	0,13
Cloranfenicol	46,87	46,87	73,75	46,87
Tetraciclina	1,46	1,46	27,43	1,46
Clorotetraciclina	2,92	2,92	23,43	1,46
Oxitetraciclina	0,73	0,73	23,43	0,97
Kanamicina	0,13	0,13	1,46	0,13
Polimixina	0,73	3,90	0,73	5,85
Neomicina	0,73	0,73	0,97	0,73
Novobiocina	11,71	125,00	125,00	73,75
Colimicina	0,52	5,85	0,52	11,71
Paromomicina	0,48	0,52	0,52	0,52
Aminosidina	0,26	0,26	0,48	0,48
Oleandomicina	2,92	7,81	2,92	5,85
Ristocetina	11,71	15,62	11,71	11,71
Eritromicina	38,25	38,25	46,87	46,87

Cuadro 6. Variaciones en el comportamiento frente a los antibióticos de estirpes normales y resistentes de *A. chroococcus*. C. M. I.

Antibióticos	Cepa normal	Cepa penicilin-resistente	Cepa tetraciclín-resistente	Cepa polimixín-resistente
Penicilina	2,92	7,81	3,90	5,85
Estreptomina	0,13	0,13	0,13	0,13
Cloranfenicol	31,25	31,25	73,75	31,25
Tetraciclina	0,26	0,26	250,00	0,26
Clorotetraciclina	0,26	0,26	187,50	0,26
Oxitetraciclina	0,26	0,26	187,50	0,26
Kanamicina	0,48	0,48	0,97	0,48
Polimixina	0,52	0,48	0,52	11,71
Neomicina	0,48	0,48	0,52	0,48
Novobiocina	125,00	187,50	187,50	125,00
Colimicina	1,46	0,97	1,46	7,81
Paromomicina	0,97	0,97	0,97	0,97
Aminosidina	0,97	0,97	0,97	0,97
Oleandomicina	15,62	23,43	15,62	15,62
Ristocetina	15,62	15,62	15,62	15,62
Eritromicina	46,87	46,87	62,50	46,87

*Cuadro 7. Variaciones en el comportamiento frente a los antibióticos de estirpes normales y resistentes de B. indica. C. M. I.*

Antibióticos	Cepa normal	Cepa penicilin-resistente	Cepa tetraciclín-resistente	Cepa polimixín-resistente
Penicilina	31,25	250,00	62,50	46,87
Estreptomina	0,13	0,13	0,24	0,13
Cloranfenicol	125,00	187,50	250,00	250,00
Tetraciclina	1,95	1,95	7,81	1,95
Clorotetraciclina	1,95	1,95	7,81	1,95
Oxitetraciclina	1,95	1,95	7,81	1,95
Kanamicina	5,85	7,81	11,71	5,85
Polimixina	1,95	11,71	1,95	125,00
Neomicina	1,95	2,92	2,92	1,95
Novobiocina	125,00	187,50	187,50	187,50
Colimicina	5,85	5,85	5,85	62,50
Paromomicina	1,95	2,92	2,92	2,92
Aminosidina	1,95	1,95	1,95	2,92
Oleandomicina	31,25	46,87	31,25	46,87
Ristocetina	23,43	31,25	23,43	23,43
Eritromicina	31,25	31,25	46,87	46,87

## II) Estudio de la adaptación a la antibióticorresistencia

Los resultados obtenidos se recogen en los cuadros 2-4.

## III) Estudio de la aparición de resistencias cruzadas

Este estudio se realizó como complemento a los anteriores, para conocer exactamente las características de su resistencia a los antibióticos antes de continuar nuestras experiencias sobre la formación y acumulación de polisacáridos. Sin embargo, este apartado alcanza tan sólo a las cepas penicilin tetraciclín y polimixin-resistentes, que son las que utilizamos en nuestro estudios sobre la producción y acumulación de polisacáridos, esto es, tres antibióticos que ofrecen diferentes mecanismos de acción y frente a los cuales las dosis alcanzadas fueron, en muchos casos, muy considerables, como se puede apreciar en el cuadro 8. Los resultados obtenidos en el estudio de la aparición de resistencias cruzadas pueden verse de un modo tabulado en los cuadros 5-7.

## IV) Variaciones en la producción de polisacáridos en estirpes antibióticorresistentes

Las dosis de antibióticos utilizadas en nuestras experiencias de producción de polisacáridos fueron las reseñadas en el cuadro 8, y las producciones máximas de polisacáridos en estirpes antibióticorresistentes aparecen en el cuadro 9, en el cual figuran, asimismo, las producciones máximas en cepas normales. Entre paréntesis se reseñan los días de crecimiento transcurridos cuando acontece la producción máxima de polisacáridos.

## V) Alteraciones morfológicas provocadas por algunos antibióticos

Existe clara evidencia de las alteraciones morfológicas que los antibióticos producen en las bacterias. Los *Azotobacter* no podían ser una excepción y por ello quisimos completar este estudio examinando los distintos tipos de alteraciones morfológicas que las células de *Azotobacter* sufren en presencia de sustancias antibióticas.

Aunque Scanga (14), por una parte, y Matsumae y Hata (9), por otra, intentan hacer una clasificación de alteraciones de este tipo, consideramos que son tan variables las observadas por nosotros en la ya

Cuadro 8. Dosis antibióticas utilizadas en microorganismos resistentes

Microorganismos resistentes	Dosis antibióticas en el medio		
	Penicilina U. I./cm <sup>3</sup>	Tetraciclina µg/cm <sup>3</sup>	Polimixina µg/cm <sup>3</sup>
<i>A. vinelandii</i>	40	20	6
<i>B. indica</i>	250	5	100
<i>A. chroococcus</i>	6	1	8

Cuadro 9. Producciones máximas de polisacáridos en estirpes normales y antibióticorresistentes, en miligramos/100 cm<sup>3</sup>

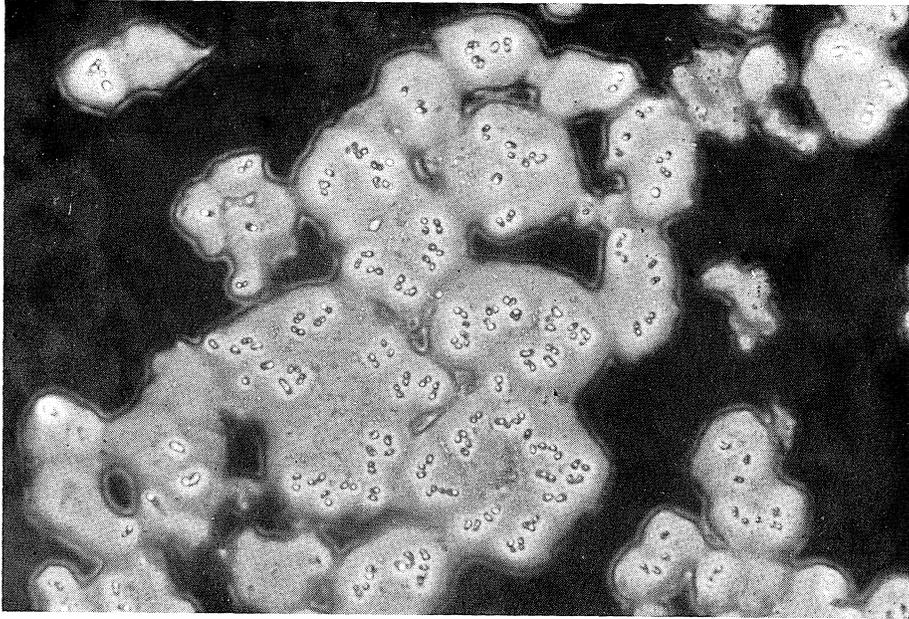
Microorganismos	Estirpe normal	Estirpe penicilin-resistente	Estirpe tetraciclín-resistente	Estirpe polimixín-resistente
<i>B. indica</i>	532 (9 días)	57,2 (15 días)	104 (15 días)	198,5 (15 días)
<i>A. vinelandii</i>	92 (5 días)	95 (12 días)		
<i>A. chroococcus</i>	32 (4 días)	25 (9 días)	23 (9 días)	8,25 (12 días)

bastante compleja biología del género que estudiamos, que nos limitaremos a una somera descripción de la que darán constancia las fotografías que se acompañan en este trabajo.

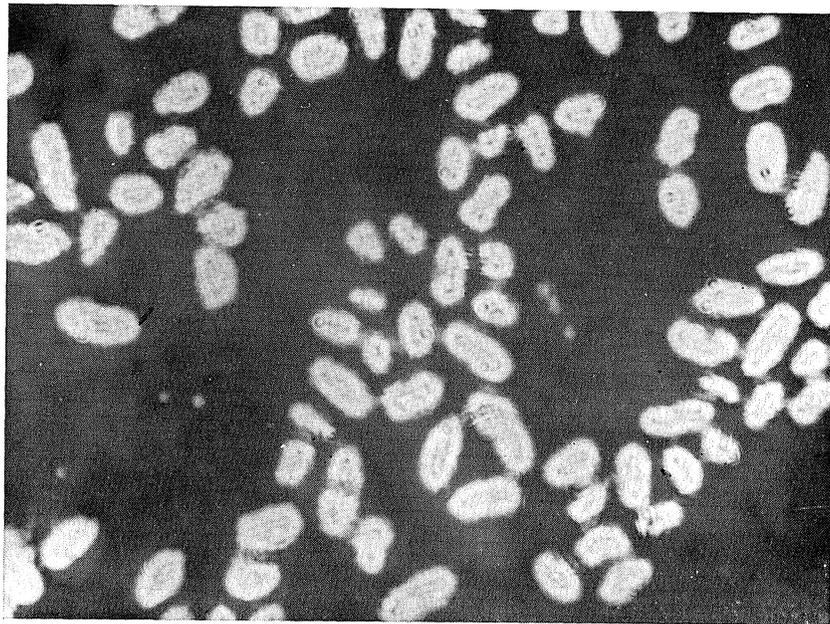
En cuanto a los detalles técnicos se limitan a hacer preparaciones, teñir con tinta china y al método de Gram o simplemente a realizar observaciones con contraste de fases.

Las figuras 1-2 dan una idea de las células normales de *Beijerinckia* y *Azotobacter vinelandii*, teñidas con tinta china y en las cuales se pueden apreciar los polisacáridos capsulares.

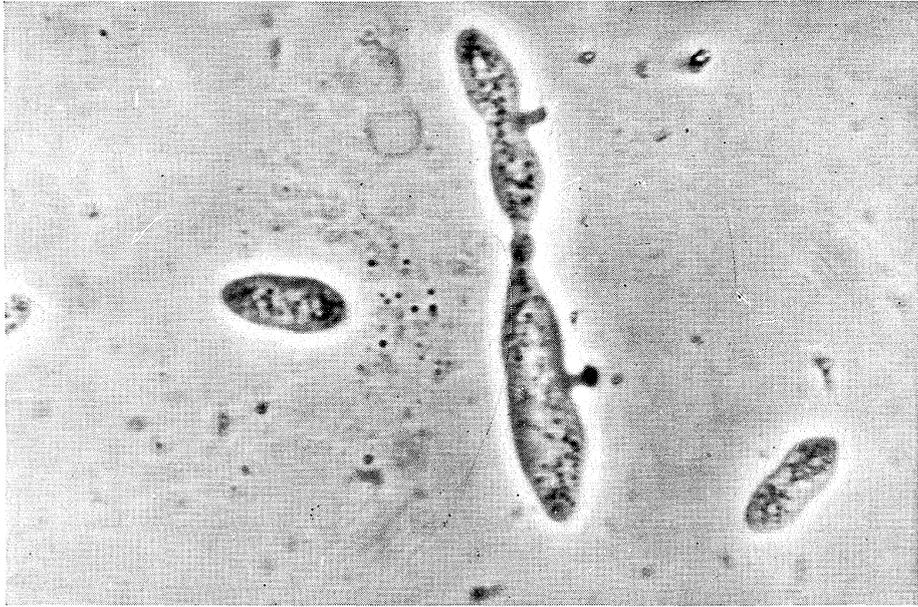
En las figuras 3-4 se observa en fresco, mediante contraste de fases cómo la penicilina, en dosis de 40 U.I./cm<sup>3</sup>, influye en la modalidad



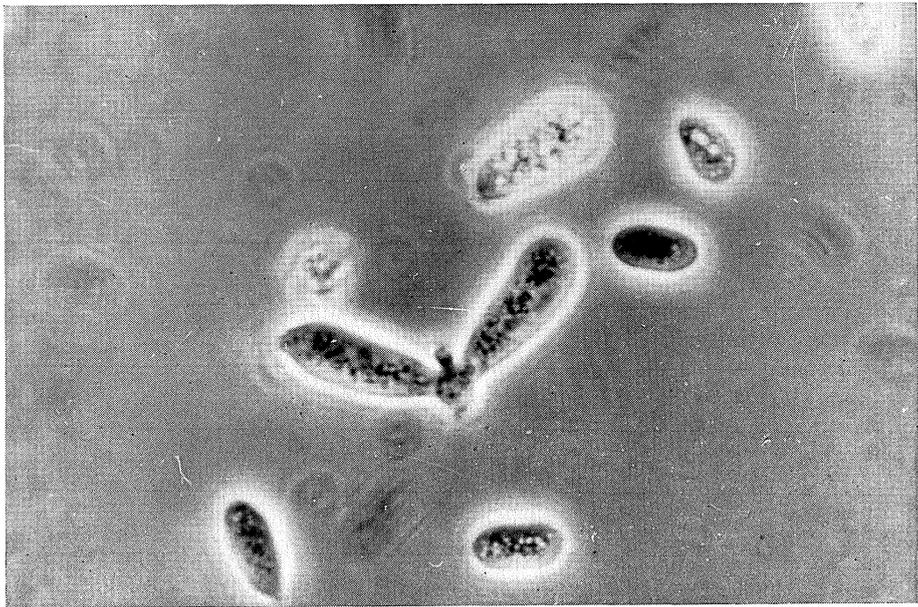
*Figura 1*



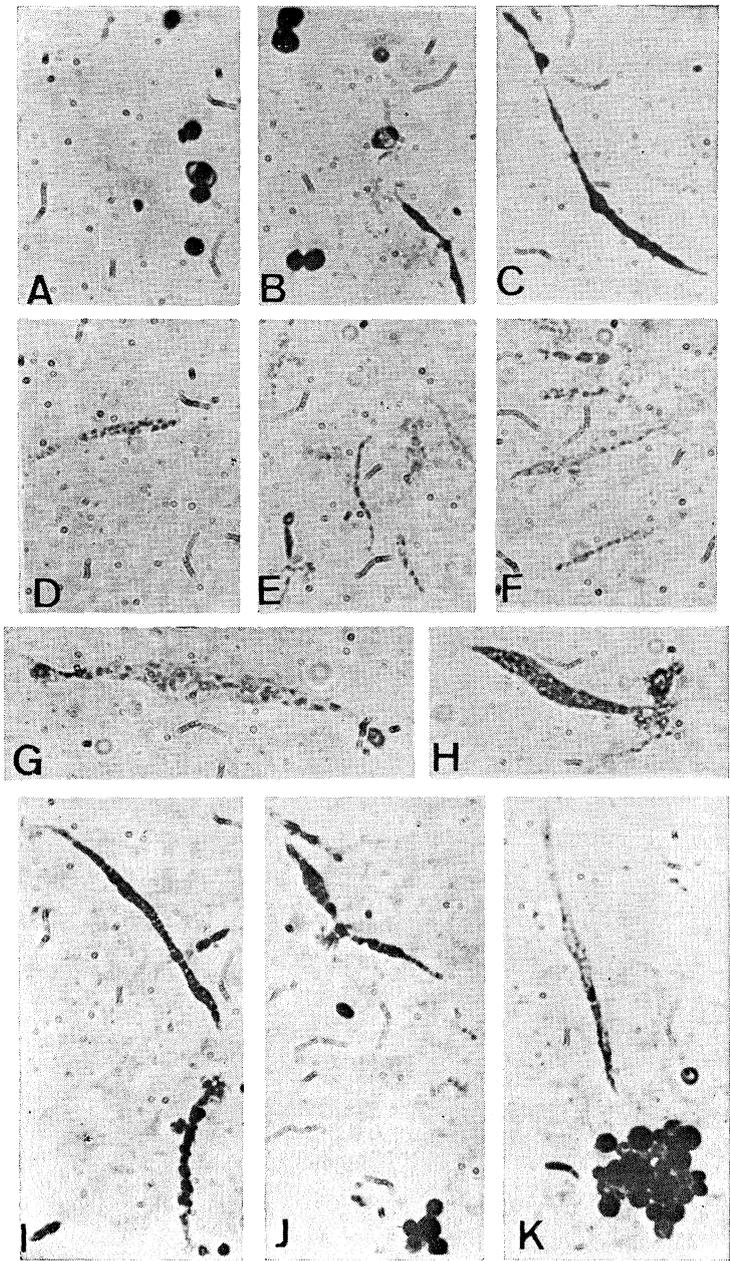
*Figura 2*



*Figura 3*



*Figura 4*



*Figura 5*

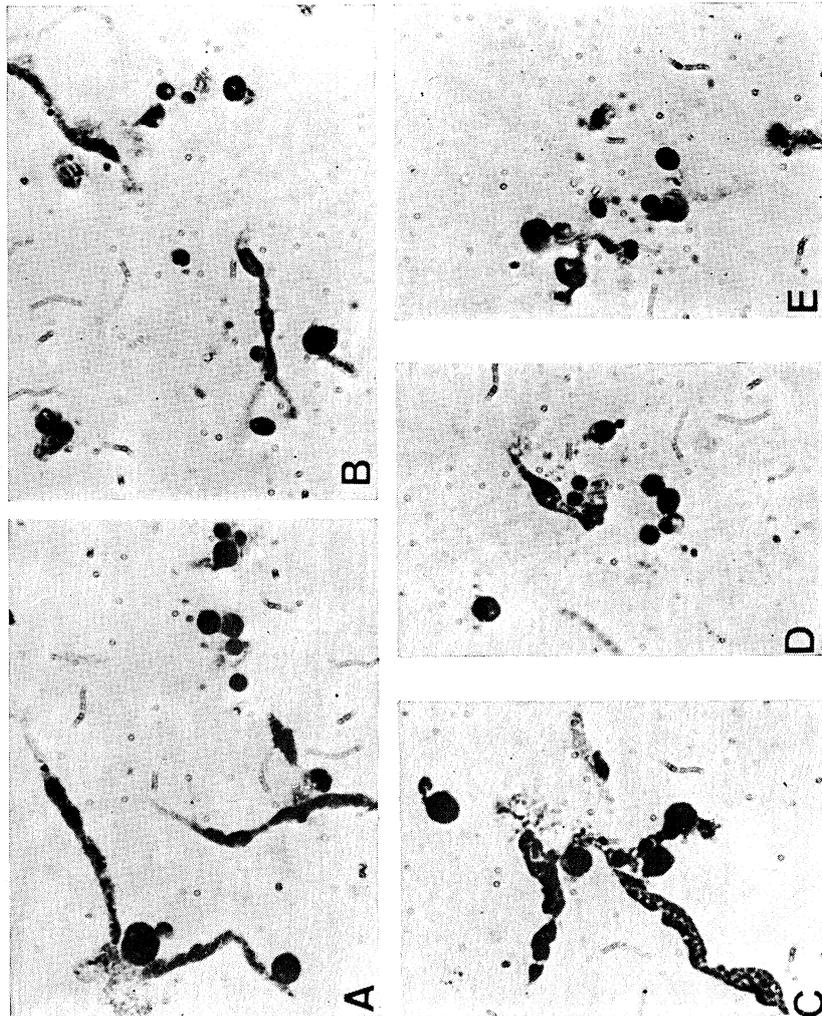
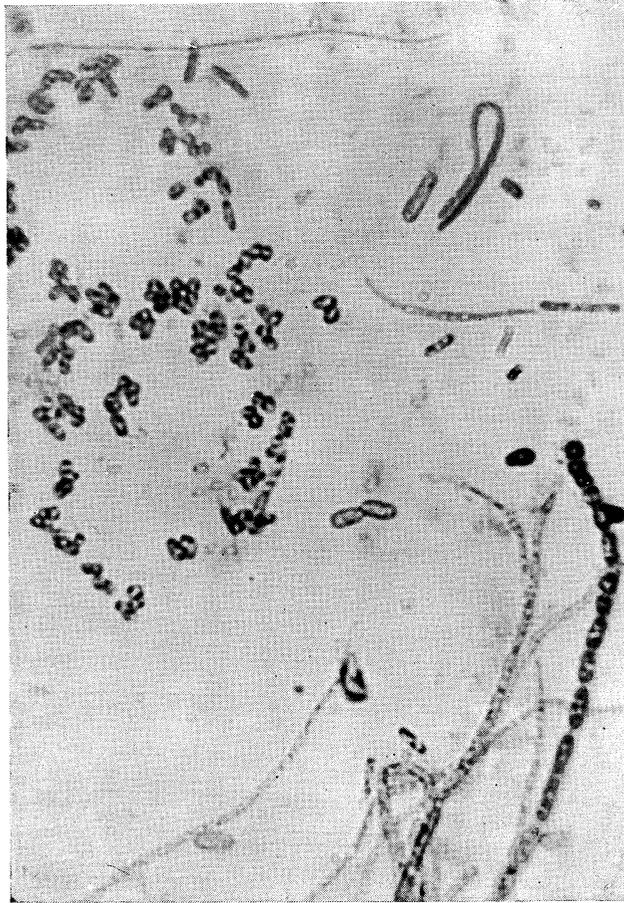


Figura 6



*Figura 7*

de multiplicación del *Azotobacter vinelandii*, favoreciendo los procesos de conjugación y de gemación.

Sin embargo, son las *figuras* 5-6 las que nos ilustran más claramente sobre las variaciones morfológicas que acontecen durante el proceso de adaptación a los antibióticos; así, en las imágenes *a, b* y *c* de la *figura* 5, que corresponden a los tres días de cultivo, se observa cómo las células tienden a la forma filamentosas, cosa que se hace más patente a los seis días del crecimiento en esta concentración antibiótica de 40 U.I./cm<sup>3</sup> (*d, e, f, g, h*); durante este período las células pasan por una crisis biológica intentando superar las condiciones hostiles del medio; ya a los nueve días se ve cómo superan la acción antibiótica por la aparición de formas ovoideas o levaduriformes intensamente gram-positivas (*i, j, k*); y, finalmente, en la *figura* 6 se ve cómo se han multiplicado estas formas a los doce días, momento en el cual ya proliferan en el medio antibiótico y producen polisacáridos.

En *Azotobacter chroococcus* el fenómeno es, si cabe, aún más acusado, y así la *figura* 7 nos ofrece la oportunidad de ver reunidas las distintas fases de evolución hacia la penicilin-resistencia en un frotis de cultivo de doce días en medio con 5 U.I./cm<sup>3</sup>, de penicilina. A partir de este momento aparecerán formas normales, en su mayoría capaces de producir polisacáridos.

Finalmente, diremos que en *Beijerinckia indica*, donde, como puede ver en el *cuadro* 8, se obtiene una antibióticorresistencia muy elevada, no hubo alteraciones de tipo filamentosas y sólo aparece un ligero engrosamiento de las paredes celulares y algunas formas enanas altamente penicilin-resistentes.

## CONCLUSIONES

De las pruebas de sensibilidad frente a dieciséis antibióticos en función de la edad de cultivo (*cuadro* 1) se puede deducir una marcada sensibilidad frente a drogas de tipo oligosacárido (estreptomina, neomicina, paromomicina, aminosidina y kanamicina), a polimixina y colimicina y a sustancias de tipo tetraciclínico, en tanto que se aprecia una acusada resistencia frente a cloranfenicol y a algunos antibióticos de tipo macrólico (oleandomicina, eritromicina, ristocetina y novobiocina), y una sensibilidad variable frente a penicilina. Salvo para algunos

antibióticos de tipo oligosacárido y polimixina, la antibióticosensibilidad va decreciendo a medida que las células van envejeciendo. Por último, la sensibilidad a la estreptomycin es de tal naturaleza que no logramos adaptar las bacterias a este antibiótico.

Esta diversidad de comportamientos se puede interpretar de la forma siguiente: la presencia de radicales glucídicos en las drogas oligosacáridas podría dar origen a un mecanismo de acción semejante al de los antimetabolitos con similitud estructural; en tanto que la polimixina y la colimicina actúan sobre el mecanismo de permeabilidad, que en estas células ha de ser muy delicado por su posible intervención en la síntesis y degradación de polisacáridos.

La penicilina, está claro que actúa sobre la formación de tabiques que preceden a la multiplicación celular, lo cual aparece confirmado por las fotomicrografías que hemos obtenido; en cuanto a las tetraciclinas, según es sabido, inhiben la síntesis proteica, lo que ocasiona la aparición de las «formas enanas» citadas por Rubenchick (13).

Por otro lado, se comprende que sustancias de gran volumen y complejidad molecular no tengan oportunidad de ejercer su actividad por dificultades de acceso al íntimo quimismo celular. Quizá la resistencia al cloranfenicol sea debida a que presenta algunas analogías de actividad con la eritromicina y, posiblemente, un mismo sistema de transporte de droga.

En general, la antibióticorresistencia encontrada parece guardar relación con la capacidad de producción de polisacáridos; así, las especies de *Beijerinckia indica* fueron las más resistentes y el *Azotobacter chroococcus* el más sensible, y este comportamiento se hace también patente en las experiencias de adaptación; donde, por otra parte, la facilidad para conseguir el estado de resistencia sigue el orden decreciente de cloranfenicol, penicilina, polimixina, tetraciclina y estreptomycin (*cuadros 2-4*), pudiendo decirse que en esta última droga no se logra una verdadera implantación de estreptomycin-resistencia.

En cuanto a la aparición de resistencias cruzadas (*cuadros 6-8*) hay que tener en cuenta que en estas bacterias, capaces de sintetizar y utilizar polisacáridos, intervienen complejos mecanismos enzimáticos y por ello, en la aparición de resistencias cruzadas hay que tener en cuenta tanto el parentesco estructural de los antibióticos como el factor de actividad fisiológica del microorganismo. Cepas que son capaces de producir polisacáridos capsulares y extracelulares en presencia de polimi-

xina y de penicilina adquieren fácilmente la resistencia a otros antibióticos con distinto mecanismo de acción; ello ha de tener una gran significación ecológica en los procesos de antibiosis natural.

Aunque los rusos Khudyankova (6) y Weinberg (15) en sus estudios sobre *Azotobacter chroococcus* y *A. agile*, afirman que las sustancias antibióticas inhiben la producción de polisacáridos, nosotros hemos tenido ocasión de demostrar lo contrario. A nuestro juicio, esto era tan sólo una inhibición del crecimiento bacteriano y, por tanto, de todas sus expresiones vitales; por ello, al trabajar con células de *Azotobacter* previamente adaptadas a la antibióticorresistencia pudimos obtener, en la mayoría de los casos, heteroglucanos de *Azotobacter* en presencia de distintos antibióticos, con variaciones semejantes, a veces, a las que se producen en ausencia de estos antibacterianos.

En todos los casos, excepto en estirpes penicilin-resistentes de *Azotobacter vinelandii*, se obtuvieron (en presencia de antibióticos) menores concentraciones de polisacáridos que cuando se trataba del cultivo normal, según se puede ver en el cuadro 9; y asimismo, se retrasa el momento de máxima producción de estos polisacáridos, quizá debido a que pueda afectarse el mecanismo de fosforilación, acarreando un incremento del nitrógeno celular, como si las deficiencias en el metabolismo hidrocarbonado fueran compensadas por una aceleración del metabolismo nitrogenado.

Del examen de las alteraciones morfológicas provocadas por los antibióticos de distinto mecanismo de acción (penicilina, tetraciclina y polimixina) es posible deducir (figuras 3-5) que las sustancias antibióticas influyen extraordinariamente en el ciclo biológico de estas especies bacterianas: suponemos que la penicilina, concretamente, al impedir la multiplicación por inhibir la tabicación, aparte de dar origen a algunas formas semejantes a las precursoras de las formas L, induce a la formación de yemas e incluso a la conjugación; aunque según el criterio de Neumayer no existe reproducción sexual en *Azotobacter*, en contra de la opinión de Lohnis y Smith (7) que sí admiten esta conjugación.

Asimismo, es posible identificar la presencia de formas filamentosas en presencia de penicilina, en *Azotobacter vinelandii* (figura 5) y *A. chroococcus* (figura 7) y formas bastante más cortas, con polimixina. Por otra parte, en el caso de *Beijerinckia indica*, más resistente a los antibióticos señalados, las formas filamentosas apenas hacen su apari-

ción, convirtiéndose simplemente en formas ligeramente alargadas frente a la penicilina, y formas globosas, con tetraciclina y polimixina.

### RESUMEN

Se realizó un estudio acerca de la antibióticosensibilidad de ciertas especies de *Azotobacter*, frente a dieciséis antibióticos y se controló la aparición de resistencias cruzadas en estirpes previamente adaptadas a la penicilina, tetraciclina y polimixina, al mismo tiempo que se estudian las alteraciones morfológicas de las distintas especies adaptadas a los antibióticos.

Por otra parte, se hace un examen comparativo de las variaciones en la producción de polisacáridos según el estado de antibióticorresistencia.

En los resultados obtenidos se hace patente una marcada sensibilidad frente a drogas de tipo oligosacárido, polimixina y sustancias de tipo tetraciclínico, mientras que apareció una marcada resistencia frente a cloranfenicol y drogas de naturaleza macrólida. La sensibilidad fue variable en el caso de la penicilina.

La aparición de resistencias cruzadas fue muy marcada. Las estirpes antibióticorresistentes producen polisacáridos, aunque, por lo general, en cantidades algo inferiores con respecto a las normales. Asimismo, la antibióticorresistencia parece guardar relación con la capacidad de producción de polisacáridos.

### SUMMARY

A study on antibiotic-sensitivity, cross-resistance against 16 antibiotics for several strains of *Azotobacter* was carried out.

Moreover the variations on polysaccharide production in antibiotic-resistance strains in comparison with native one's were studied. Finally, we present a morphological study of antibiotic-resistant strains.

We found a high sensitivity against oligosaccharide-like drugs, polymyxin and tetracyclin and a high resistance against chloranphenicol and drugs with a larger molecule. Sensitivity against peniciline was variable.

Antibiotic-resistance appears to have a close relationship with polysaccharide production. Cross-resistance values were very high. Antibiotic-resistance strains can produce polysaccharides although in slightly lower amounts than in native ones.

### BIBLIOGRAFIA

1. AFIKYAN, E. K., y ARUTYVUYAN, R. 1953. Mikrobiol. Zh. Akad. Nauk. Ukr. RSR, 1 (7).
2. BERSHOVA, O. I. 1949. Mikrobiol. Zh. Akad. Nauk. Ukr. RSR, 4, 11.
3. COHEN, G. H., y JOHNSTONE, D. R. 1964. J. Bacteriol. 88, 1.695.
4. DEPOUX, R. 1953. Ann. Inst. Pasteur, 84, 645.
5. GROVE, D. O., y RANDALL, W. A. 1965. Assay methods of antibiotics. Medical Encyclopedia Inc., Nueva York.
6. KHUDYANKOVA, Y. A. 1950. Author's summary of thesis, Moscú.
7. LOHNIS, F., y SMITH, N. R. 1923. J. Agr. Res., 23, 401.
8. LÓPEZ, R. 1966. Producción de polisacáridos en Azotobacteriáceas y sus variaciones frente a antibióticos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Madrid.
9. MATSUMAE, A., y HATA, T. 1964. J. Antibiotics, Ser. A, 17, 164.
10. PÉREZ-UREÑA, M.<sup>a</sup> T. 1962. Las asociaciones de antibióticos y su influencia sobre la antibiótico-resistencia bacteriana. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Madrid.
11. PORTOLÉS, A. 1960. Laboratorio, 29, 21.
12. PORTOLÉS, A. 1961. Microbiol. Españ., 14, 17.
13. RUBENCHICK, L. I. 1963. *Azotobacter* and its use in Agriculture. Jerusalem.
14. SCANGA, F. 1959. La célula bacteriana. Editorial Aguilar, Madrid.
15. WEINBERG, E. D. 1957. Ref.: Rubenchick.

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

## VARIACIONES EN LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS EN ESPECIES DE AZOTOBACTERIACEAS ANTIBIOTICORRESISTENTES

por

R. LÓPEZ, E. RONDA y A. PORTOLÉS

### INTRODUCCION

Después de estudiar el comportamiento de diferentes especies de Azotobacteriáceas sobre dieciséis sustancias antibióticas (2), hemos creído de interés realizar el estudio de las posibles modificaciones en la composición de aminoácidos de cepa de *Azotobacter* antibióticorresistente, obtenidos después de un largo proceso de adaptación.

Como antecedentes tenemos los estudios de Belozerskii y colaboradores en 1958 (1) en relación con la tasa de proteínas en células de *Azotobacter* en diferentes fases de crecimiento. Así, tuvieron ocasión de comprobar que el contenido en proteínas era prácticamente invariable durante la fase logarítmica, decreció un poco al principio de la estacionaria para aumentar rápidamente y de un modo definitivo en esta fase. Ello induce a pensar que en la fase estacionaria se acumulan proteínas de reserva.

También Zaitseva y Belozerskii (13) mediante técnicas de cromatografía sobre papel hicieron un estudio cualitativo de los aminoácidos integrantes de las proteínas de distintas especies de *Azotobacter*, encontrando en ellas un bajo contenido de aminoácidos básicos, en contra de la opinión de Belozerskii y colaboradores (1) que, al encontrar grandes concentraciones de arginina, lisina e histidina en las proteínas de

*Azotobacter*, piensan que se trata de proteínas básicas del tipo de las histonas o protaminas; según estos últimos investigadores, las especies de *Azotobacter vinelandii* y *A. agile* tienen una composición cualitativa de aminoácidos muy similar.

Resumiendo, podemos decir que los estudios realizados sobre la composición de aminoácidos son tan sólo de tipo cualitativo y en ellos parece existir divergencia de opiniones.

## MATERIAL Y METODOS

### *Bacterias y antibióticos*

Los microorganismos utilizados en las experiencias que a continuación aparecen, así como los antibióticos frente a los cuales fueron adaptados ya han sido citados precedentemente (3).

Asimismo, en estas experiencias se emplearon bacterias mantenidas en fase exponencial de crecimiento durante más de veinte días, en un aparato de cultivo continuo semejante al de Rosemberger y Elsdén (11), pero con algunas modificaciones que permiten la adición simultánea de dos líquidos (8) con el fin de estudiar el crecimiento en presencia de antibióticos. Todo ello nos permitió realizar un estudio comparativo sobre la composición en aminoácidos en fase exponencial y en ausencia o en presencia de antibióticos de las células de *Azotobacter vinelandii*, que fue el microorganismo elegido para nuestros trabajos en cultivo continuo por ser el más idóneo entre los tres a los que se refiere el presente trabajo, según hemos demostrado anteriormente (2).

### *Técnicas*

Para la obtención de estirpes antibióticorresistentes seguimos la metodología realizada por Pérez-Ureña (7) y que hemos descrito anteriormente.

En la preparación de las muestras, tanto en células normales como en resistentes, se precisaba conseguir una gran masa de bacterias que nos permitiera realizar los análisis que a continuación se indican. Con este fin, una vez conseguido un grado óptimo de crecimiento, se separaron las células mediante centrifugación en una centrífuga Servall, a 23.000 g, durante veinte minutos, se lavaron con tampón de fosfato a

pH 7,2 y finalmente fueron resuspendidas en este tampón para realizar su análisis cromatográfico.

La hidrólisis ácida se llevó a cabo según hemos descrito anteriormente (2 y 9).

Y, por último, la cromatografía en columna, se efectuó de acuerdo con los métodos postulados por Moore y colaboradores (5) para la separación de aminoácidos, y por el método de Moore (4) para la cistina. En ellos se utilizan resinas sintéticas del tipo Amberlite IR-120; y para la elución de la gran columna se utilizó la modificación introducida por Ronda y colaboradores (9).

Los aminoácidos se recogieron en un colector de fracciones modelo L.K.B.-60 y posteriormente revelados según la técnica de Moore y Stein (6), con ninhidrina disuelta al 2% en metilglicol en presencia de cloruro estannoso. Para las lecturas se empleó un espectrofotómetro Coleman junior, diluyendo previamente las fracciones con 5 cm<sup>3</sup> de alcohol + agua (v/v) y comparándolas frente a una curva patrón de leucina obtenida con una longitud de onda de 570 m $\mu$ . Para la prolina, excepcionalmente se emplea 440 m $\mu$ .

## RESULTADOS

En la *figura 1* se representa gráficamente la localización de cada aminoácido, de acuerdo con el orden de aparición de los mismos. En abscisas aparecen los números de los tubos y en ordenadas los valores de los aminoácidos expresados en micromoles de leucina para una muestra tipo de harina de pescado.

Los resultados analíticos obtenidos en nuestras muestras problemas aparecen en forma de histogramas en las *figuras 2-9*. En las *figuras 2-3* aparecen los correspondientes a *Azotobacter vinelandii* en fase exponencial de crecimiento, tanto en presencia como en ausencia de antibiótico.

## CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

Los resultados expuestos muestran una gran complejidad y como consecuencia una difícil interpretación, ya que la literatura existente, hasta la actualidad, explica muy poco en relación con las vías metabólicas que utilizan estos microorganismos para su síntesis proteica.

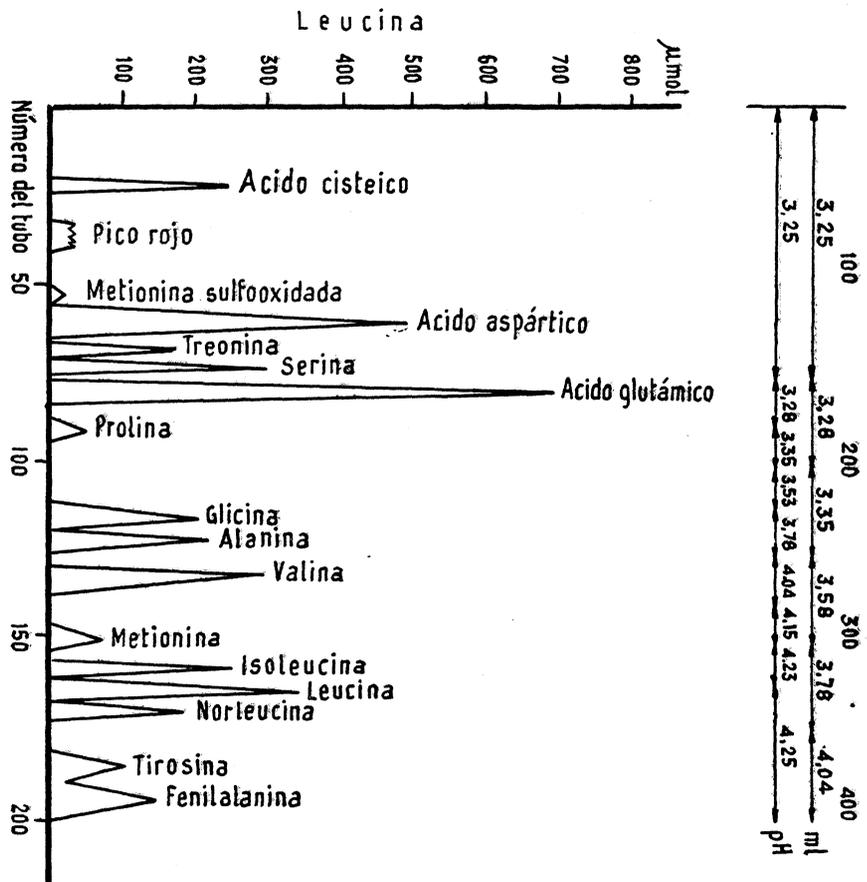


Figura 1

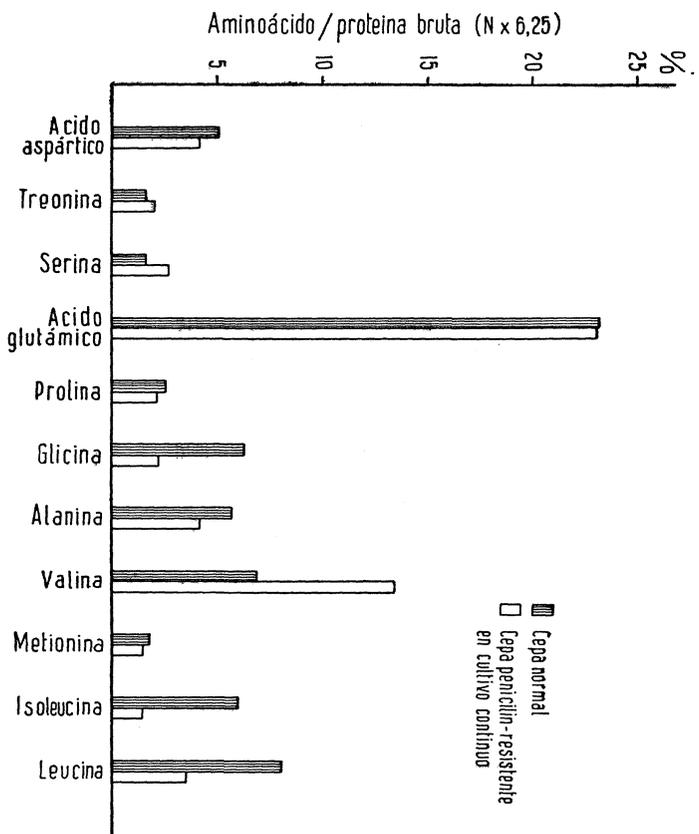


Figura 2

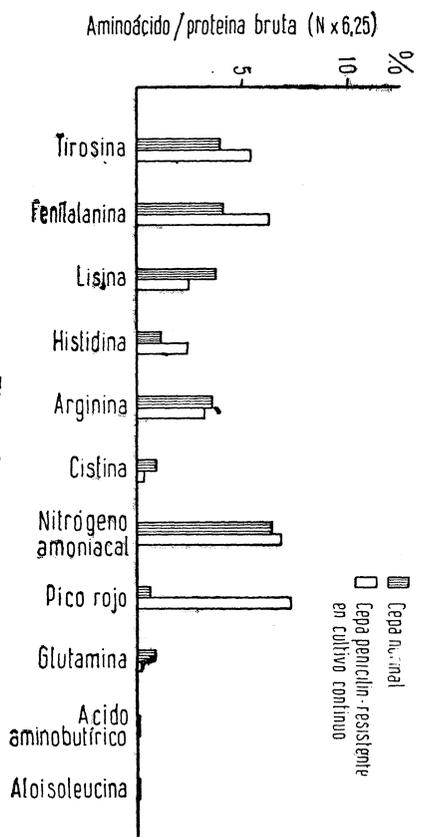


Figura 3

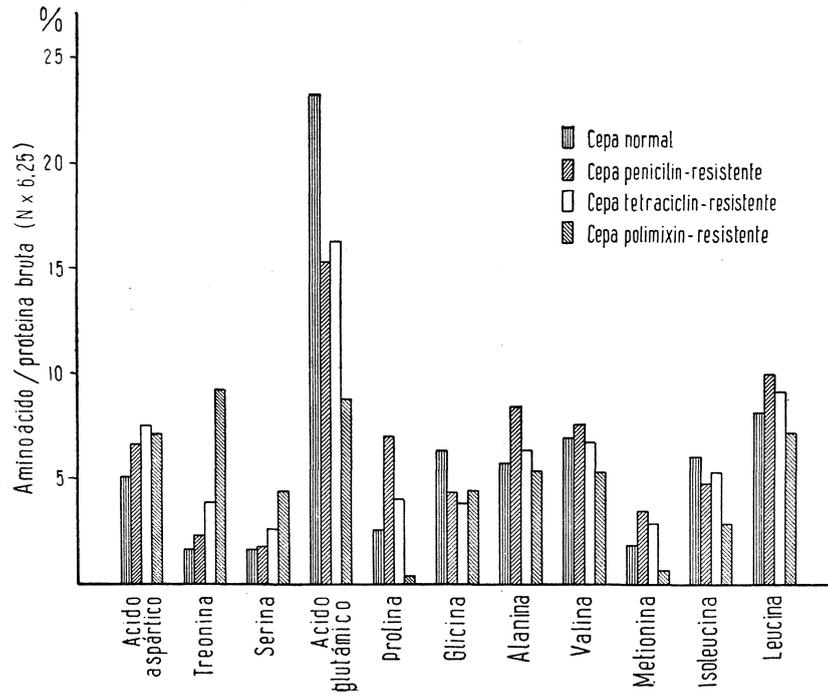


Figura 4

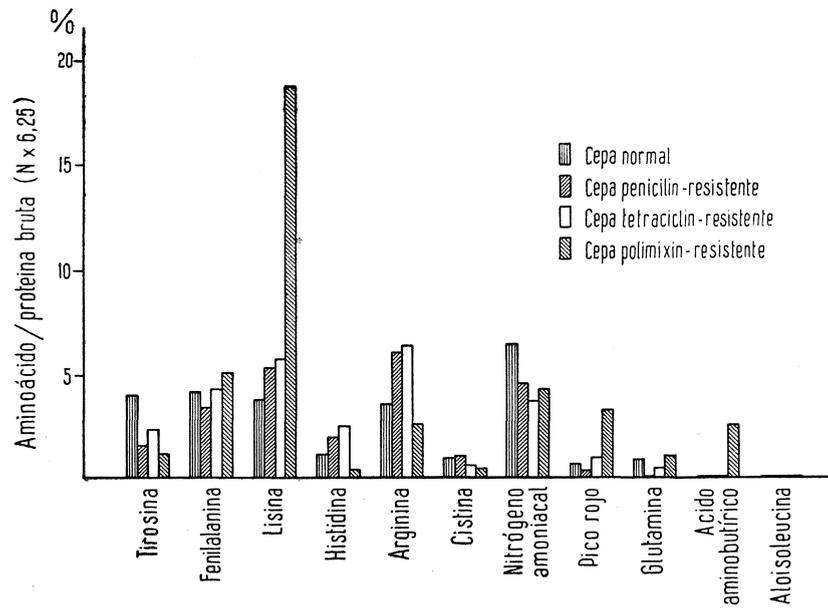


Figura 5

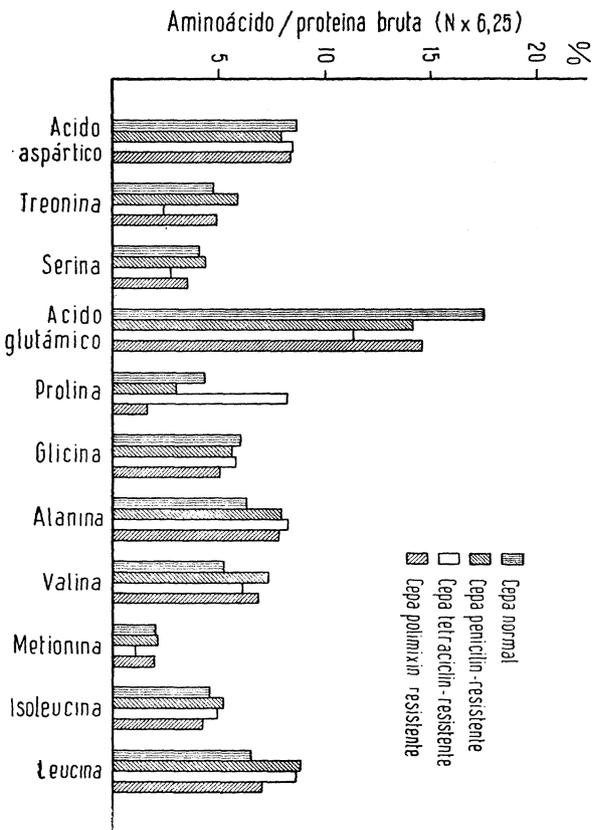


Figura 6

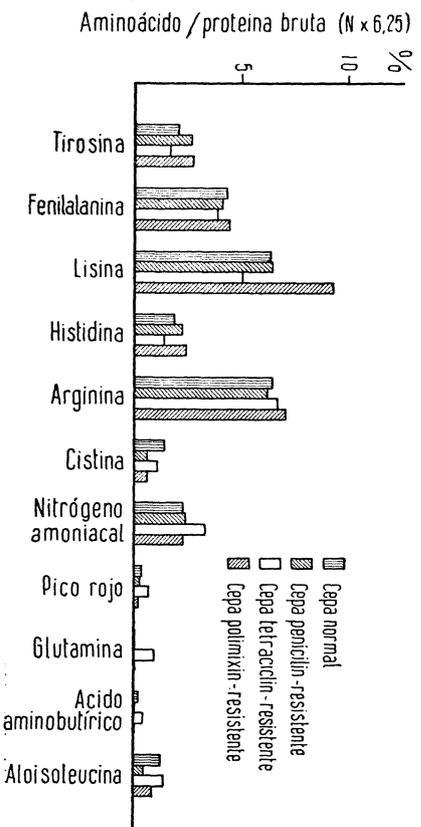


Figura 7

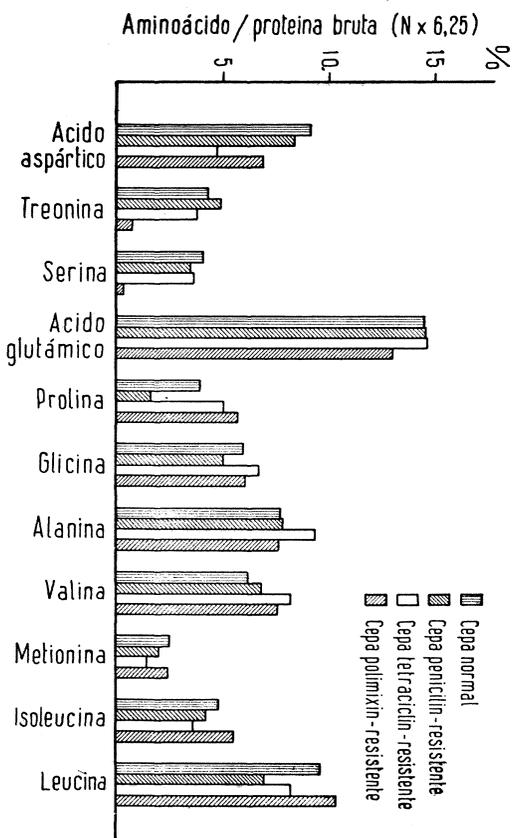


Figura 8

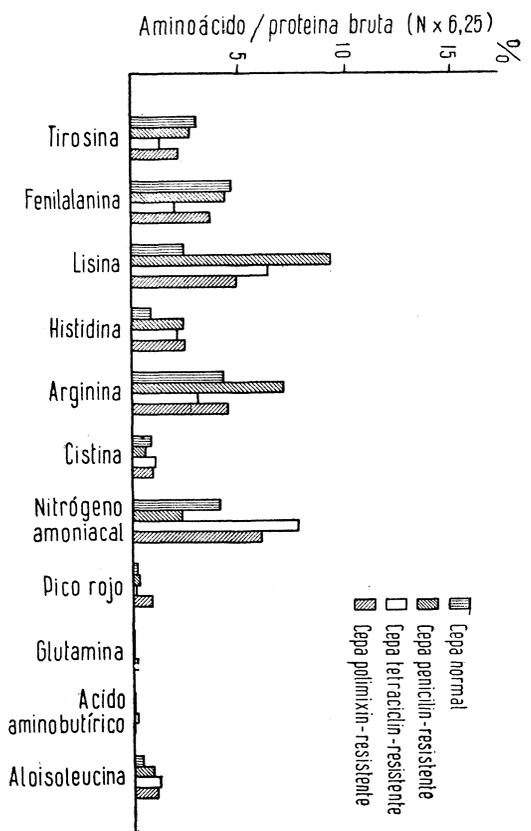


Figura 9

La primera conclusión arranca del hecho de que en todos los cromatogramas, las cepas normales presentan una composición en aminoácidos muy diferente a la de aquellas cepas estudiadas en cultivo continuo (figuras 2-3) o tratadas con antibióticos, previa adaptación a los mismos (figuras 4-9).

En primer lugar, es preciso destacar que por nuestro método ha sido posible detectar la presencia de metionina en *Azotobacter vinelandii* y *A. chroococcus*, tanto en células sensibles como resistentes, pese a los resultados señalados por Rubenchick (12). Por otra parte, es preciso destacar también, como diferencia con los antecedentes de la bibliografía, que hemos encontrado glutamina en cepas de *A. vinelandii* (excepto en las penicilin-resistentes) y en *A. chroococcus* polimixin-resistentes y *Beijerinckia indica* tetraciclín-resistentes, así como aloisoleucina en todas las cepas de *A. chroococcus* y *B. indica*; sin embargo, hemos encontrado variaciones en cuanto a la presencia de ácido aminobutírico, el cual no nos fue posible identificar en las cepas normales, tetraciclín y penicilin-resistentes de *A. vinelandii*, ni en las penicilin y tetraciclín-resistentes de *A. chroococcus*.

Asimismo, de la comparación de las tres estirpes normales de las tres especies estudiadas con sus correspondientes cepas sometidas a acciones antibióticas, cabe destacar que las bacterias marcadamente productoras de polisacáridos (*Beijerinckia indica*), que además son, como puede verse en nuestro trabajo anterior (3), las que alcanzan cifras muy elevadas de resistencia frente a los antibióticos, presentan una menor variación en su composición porcentual que aquéllas (*Azotobacter vinelandii* y *A. chroococcus*) que elaboran cantidades sensiblemente menores de heteroglucanos; lo que podría interpretarse, una vez más, como un efecto protector del polisacárido pericelular a la acción perturbadora del antibiótico sobre el metabolismo proteico.

Finalmente, son de señalar las variaciones siguientes:

*Azotobacter vinelandii*. Aparecen aumentados los valores del ácido aspártico en las cepas antibióticorresistentes, contrariamente a lo que ocurre en la cepa normal con el ácido glutámico; hecho interesante de destacar si consideramos que estos dos aminoácidos juegan papeles importantes en los fenómenos de transaminación, y este último se considera, en las células vegetales, como la sustancia en la cual se acumula el amoníaco. Los aminoalcoholes (treonina y serina) aumentan en las

cepas tratadas con antibióticos y en la estudiada sobre cultivo continuo en fase exponencial.

Existen variaciones sensibles para los aminoácidos de cadena lineal (glicina, alanina, valina, isoleucina y leucina) al igual que para los azufrados (cistina y metionina); y, asimismo, dentro de los aminoácidos básicos (lisina, histidina y arginina), las variaciones son profundamente marcadas y dependen, por otra parte, del antibiótico utilizado.

También se encuentran alteraciones en los aminoácidos cíclicos (tirosina, fenilalanina y prolina) apareciendo el ácido aminobutírico solamente en la estirpe tratada con polimixina; mientras que la glutamina no parece existir en la cepa penicilin-resistente, y la aloisoleucina no es detectada en esta especie.

*Beijerinckia indica*. Según se destaca anteriormente fue la que ofreció una menor variabilidad en sus aminoácidos, destacando la aparición de aloisoleucina, tanto en la cepa normal como en las tratadas con antibióticos, y detectándose, asimismo, glutamina en la cepa tetraciclín-resistente y aminobutírico en la cepa normal y en la tetraciclín-resistente. Las mayores oscilaciones en esta especie las ofrece el ácido glutámico, la prolina y la lisina.

*Azotobacter chroococcus*. Existen oscilaciones tan marcadas como en el caso de *A. vinelandii*, particularmente en lo que se refiere al ácido aspártico, los aminoalcoholes y los aminoácidos básicos, y en menor intensidad los aminoácidos de cadena lineal; otro tanto sucede con los azufrados y con los aminoácidos cíclicos. El nitrógeno amoniacal presenta oscilaciones sensibles, la glutamina aparece sólo en la cepa polimixín-resistente y el aminobutírico, en la tratada con tetraciclina.

## RESUMEN

Fueron adaptadas tres especies de Azotobacteriáceas frente a antibióticos con diferente mecanismo de acción, para después estudiar las variaciones en la composición cuantitativa de sus aminoácidos mediante técnicas de cromatografía en columna.

Además, una de las tres especies (*Azotobacter vinelandii*) se mantuvo durante más de veinte días en fase exponencial de crecimiento mediante cultivo continuo, para estudiar de este modo las variaciones

en la composición de aminoácidos, con y sin antibióticos, en su fase exponencial.

Se encontró que las cepas normales presentan una composición en aminoácidos muy diferente de aquellas otras adaptadas a los antibióticos. También se han podido identificar y valorar cuantitativamente metionina, glutamina y aloisoleucina, y las variaciones del ácido aminobutírico, en oposición a los datos que aparecen en la literatura.

Es de destacar que las bacterias marcadamente productoras de polisacáridos presentan una menor variación en su composición de aminoácidos que aquellos *Azotobacter* que los producen en pequeña cantidad. Esto podría interpretarse como un efecto protector del polisacárido capsular, frente a la acción del antibiótico, sobre el metabolismo protéico.

#### SUMMARY

Three *Azotobacter* strains became resistant towards 3 antibiotics with different specific actions, and their aminoacid compositions were studied on ion-change resin columns in comparison with normal strains.

In addition, one of the strains was grown for more than 20 days in continuous-culture and their aminoacid composition studied, with and without antibiotics, as above.

We found that native strains have a very different composition from antibiotic-resistant ones. Methionin, glutamin and alloisoleucin were found in spite of Belozerskii's work.

High polysaccharide producing bacteria show lower variations in aminoacid composition than slight polysaccharide producing ones. It may be due to a protective action of the capsular polysaccharides towards the antibiotic actions on the protein metabolic pathway.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BELOZERSKII, A. N.; ZAITSEVA, L. P.; GAVRILOVA, L. P., y MINEEVA, A. V. 1957. Mikrobiol. Zh. Akad. Nauk. Ukr. RSR, 26 (4).
2. LÓPEZ, R. 1966. Producción de polisacáridos en Azotobacteriáceas y sus variaciones en presencia de antibióticos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Madrid.

3. LÓPEZ, R. 1967. *Microbiol. Españ.*, 20.
4. MOORE, S. 1953. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-80.
5. MOORE, S.; SPACKMAN, D., y STEIN, W. 1958. *Anal. Chem.*, 30, 1.185-90.
6. MOORE, S., y STEIN, W. 1954. *J. Biol. Chem.*, 211, 907.
7. PÉREZ-UREÑA, M.<sup>a</sup> T. 1962. Las asociaciones de antibióticos y su influencia sobre la antibiótico-resistencia bacteriana. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Madrid.
8. PORTOLÉS, A. 1966. Comunicación personal.
9. RONDA, E., y LÓPEZ, R. 1964. *Anales Bromatol.*, 16, 367-75.
10. RONDA, E.; SOTO, E., y RODRÍGUEZ, D. 1966. *Anales Bromatol.*, 18, 105-10.
11. ROSEMBERGER y ELSDEN. 1960. *J. Gen. Microbiol.*, 22, 726-39.
12. RUBENCHICK, L. I. 1963. *Azotobacter* and its use in Agriculture. Israel Program for Scientific translation, Jerusalem.
18. ZAITSEVA, G. M., y BELOZERSKII, A. N. 1957. *Mikrobiol. Zh. Akad. Nauk. Ukr. RSR*, 29 (5).

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

## STUDY OF A HEMAGGLUTINATION INHIBITOR FROM HELA CELLS (\*)

by

A. GARCIA-GANCEDO, E. RONDA, M.<sup>a</sup> LUISA ALONSO and PILAR VILAS

### INTRODUCTION

In a previous note (8) we have exposed the phenomenon of loss of hemagglutinating capacity by fowl-plague virus, when cultivated in the HeLa cells employed by us in this work, whereas it conserves that capacity when cultivated in chick embryo cells. This phenomenon has been remarked by other authors in different types of cells and viruses: some strains of ECHO virus cultivated in HeLa cells (6); Coxsackie A-21 virus in HeLa and KB cells (3); vaccinal virus in L and ascitic tumor cells (1); Columbia SK virus in sarcoma 180 ascitic cells (2).

### MATERIALS AND METHODS

#### *Virus*

Fowl-plague virus (FPV), Rostock strain (KP virus, Klassischen Pest). Received from Dr. W. Schäffer (Max-Planck Institut für Virusforschung, Tübingen). Fresh stock virus obtained by passage of diluted virus in 10-days embryonated eggs by allantoic route, collecting their

(\*) This work was supported by research grant N.º FG-Sp-122 from the U. S. Department of Agriculture.

allantoic fluid 2 days after. This allantoic fluid served as inoculum in the several kinds of cells studied.

#### *Cells*

Chick embryo cells obtained by trypsinization (Trypsin Difco 1:250) at 37 °C from 10-days-old embryos.

HeLa cells obtained from Italdiagnostic Laboratories, Rome (Italy).

#### *Culture media*

Medium for HeLa cells: Hanks solution, 75 %; lactalbumin hydrolysate (in solution 5 %), 10 %; human serum, 15 %; phenol red (in solution 0,2 %), 1 %; penicillin, 100 I.U./ml; streptomycin, 100 µg/ml; nystatin, 20 I.U./ml. Sodium bicarbonate was added in order to adjust the pH to 7.2.

Medium for chick embryo cells: Hanks solution, 75 %; lactalbumin hydrolysate (in solution 5 %), 10 %; calf serum, 14 %; penicillin, streptomycin, nystatin, phenol red, sodium bicarbonate as above pH 7,2.

Maintenance medium for both types of cells: Hanks solution 85 %; lactalbumin hydrolysate (in solution 5 %), 10 %; calf serum, 3 %; antibiotics, phenol red and sodium bicarbonate as above. pH 7.2.

#### *Hemagglutination test*

Chicken's red blood cells: Once obtained by intracardiac puncture, the blood is added to the same quantity of Alserver's solution and washed thrice with Veronal buffer solution, centrifuging for 5 minutes at 1000 r/m. Erythrocytes are stored at 4 °C and used diluted to 0.25 % in Veronal buffer solution. For testing we employ plaques of excavated perspex, making twofold dilutions of virus and inhibitor in Veronal buffer solution. The reading was made after 1 hour at 37 °C or after 18 hours at 4 °C. All the titers are expressed as the reciprocal of the final dilution of the original suspension.

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

### *Procedure to obtain the cellular extract from HeLa cells*

Starting from cell cultures, a pellet of the cells is obtained by trypsinization and centrifugation at 4 °C and 1000 r/m during 5 minutes. The pellet is washed in a saline solution (pH 7.2). A dense suspension of the cells in that solution is subjected to quick congelation by dry ice and alcohol and subsequent thawing by warm water at 37 °C. This procedure is repeated 6 times; the suspension is then centrifuged at 3,000 r/m during 15 minutes, in order to separate cell debris. The supernatant substance contains the inhibitor agent.

#### *1) Purification and concentration of cells extract*

a) Centrifugation: Several centrifugations at diverse speeds have been tried with Spinco model L ultracentrifuge, in order to separate inert substances, so attaining purification of the agent. b) Adsorption and elution: Adsorption takes place on kaolin, mixed with an equal portion of the extract. The mixture is placed in incubator for 30 minutes at 4 °C, frequently stirring. Elution is done by alkalizing to pH 9. c) Dialysis: it is performed in accordance with the common technique, treating the supernatant and sediments at 4 °C during 48 hours.

#### *2) Demonstration of the inhibitory action*

It has been performed mixing hemagglutinant-virus (fowl-plague virus cultivated in chick embryo cells) and inhibitor, incubating for 30 minutes at laboratory temperature and adding the erythrocytes in order to make the hemagglutination test. Two different procedures are employed; either maintaining constant the virus dilution and varying the dilution of the cellular extract, or conversely. Controls are always employed, in which the normal diluent replaces the extract.

#### *Action of chemical agents upon the extract containing the inhibitor*

a) Treatment with mixture acetone-ether, keeping the extract with the mentioned mixture for 30 minutes at 3 °C and stirring frequently.  
b) Treatment with trichloroacetic acid: a 0.25 M solution of this subs-

tance is prepared and mixed to the same volume of the cellular extract; the mixture is placed at 4 °C for 30 minutes and centrifuged afterward for 30 minutes at 35,000 r/m in Spinco model L centrifuge. Sediment and supernatant are separately collected and the former treated with a 10N solution of NaOH in an equivalent volume, in order to redissolve the precipitate obtained; finally, both the supernatant proceeding from centrifugation and the re-dissolved precipitate are tested as to their inhibitory power after adjusting the pH to the indicated for the hemagglutination test. c) Perchloric acid: the same above mentioned experiment is performed with 0.6M acid. d) Ammonium sulphate: a saturated solution of this substance is prepared and mixed with cellular extract in twofold proportions: 1/1 volume of each, and in the relation ammonium sulphate/cellular extract 1/2; the mixtures are centrifuged at 35,000 r/m in Spinco model L centrifuge; the sediment is separated from the supernatant and treated with phosphate buffer solution, pH 7.5; the pH of both the supernatant and the re-dissolved sediment are afterwards adjusted, testing their hemagglutinating and inhibitory power. e) Urea: a 8M solution of this substances is mixed to the same volume of the cellular extract, incubated for 30 minutes and tested as to its hemagglutinating especificity. f) Sodium periodate: a 10M solution of NaIO<sub>4</sub> is added to the same volume of glucose solution at 40 %, testing afterward the hemagglutinating power. g) Trypsin, in accordance with Tsilinsky's method (10), 9 ml of Earle's solution and 0.5 ml of trypsin 1:250 at 1 % were mixed with 0.5 ml of HeLa inhibitor; after incubating the mixture during 3 hours at 37 °C, 0.5 ml of a 1 % solution of soy bean trypsin inhibitor were added, adjusting the volume at 16 ml with Earle's solution and determining the activity of the HeLa inhibitor by means of the hemagglutination test with hemagglutinant virus.

#### *Action of temperature at 100 °C and 56 °C*

Extract of HeLa cells placed in sealed tubes so as to prevent evaporation is subjected for 30 minutes at a temperature of 100 °C in water bath. Other tubes are subjected at 56 °C for 30 minutes, 1 hour and 2 hours. These extracts are forthwith tested in an effort to determining the existence of inhibitory power.

*Determination of the possible action of the inhibitory agent and its incorporation to cells*

In order to study whether the inhibitory agent was adsorbed and incorporated to the cells, so interfering the production of hemagglutinin when infected by the virus, different chick embryo cells cultures are subjected to action of the inhibitory agent during 4 hours at 37 °C; the agent is afterwards eliminated by washing the cultures with Hanks solution; the culture medium is added and the virus inoculated. Evolution of treated and infected cultures is observed, comparing with infected non-treated cultures and determining the hemagglutinin titer.

*Determination of the possible action of the inhibitory agent upon formation of plaques in tissue culture*

Mixtures of inhibitory agent and virus, incubated for 30 minutes at room temperature, are inoculated in Erlenmeyer flasks containing a monolayer of chick embryo cells; adsorption is allowed for 4 hours; the culture is afterwards washed, adding agar in accordance with Dulbecco's plaques method. The apparition of plaques is studied.

*Determination of the possible action of the inhibitory agent upon erythrocytes*

From results of the experiments performed it can be deduced that the agent has an effect upon virus. However, we have carried out this test, with a view to determining whether it also acts upon erythrocytes. In this respect, chick embryo erythrocytes are subjected for 30 minutes to action of the inhibitory agent; a portion of this mixture is tested in front of the virus as to its hemagglutinating power; another portion of the mixture erythrocytes-inhibitory agent is centrifuged at 2,000 r/m, and thrice washed in order to eliminated the agent; it is has not been adsorbed by erythrocytes; the mixture is then tested as to its hemagglutinating power in front of the virus. We also perform the hemagglutination test with virus and erythrocytes, adding afterward the inhibitory agent.

*Determination of the inhibitory effect of the agent, using several types of erythrocytes*

This effect has been studied following the method already indicated, upon chicken, human (O group), guinea pig, horse, rabbit, and sheep erythrocytes.

*Relation between virus and inhibitor*

In order to study the complex virus-inhibitor, mixtures of virus and extracts, previously incubated for 30 minutes at room temperature, have been subjected to centrifugation and adsorption on kaolin with the intent of separating both components of the complex.

With the same purpose, we have tested the action of sodium periodate upon the complex virus-inhibitor, subjecting said complex to the above treatment.

*Determination of the possible existence of inhibitor in the extract of HeLa cells infected with the virus*

An extract of infected HeLa cells is concentrated by centrifugation in Spinco at 10,000 g. As usual, pellet and supernatant are incubated with hemagglutinant virus, afterwards adding the erythrocytes.

*Determination of infectiveness and lethality of the complexes erythrocytes-hemagglutinant virus and inhibitor-hemagglutinant virus*

Doses of hemagglutinant virus in the amounts of 2, 4 and 8 hemagglutinant doses are mixed with the same volumes of the standard suspension of erythrocytes in the first case and inhibitor in the second case. Suitable controls are also made by replacing in the mixtures the virus and the inhibitor, respectively, by a saline solution.

The mixtures are kept in contact during 1 hour; each mixture is inoculated by amniotic way to a group of 5 chick embryos (10 days old) in the dose of 0.1 ml.

## RESULTS

### *Centrifugation*

With Spinco ultracentrifuge it is possible to obtain fractions of HeLa cells extract, which have been tested as to their inhibitory power toward hemagglutination of FPV virus. The results obtained are indicated in *table 1*.

Moreover, extracts of cultivated chick embryo cells are centrifugated in Spinco centrifuge. The results are recorded on *table 2*.

### *Adsorption of the inhibitor on kaolin and elution*

After settling by centrifugation at low speed when the adsorption period is over, a negative result has been obtained when investigating the existence of inhibitor in the supernatant. This experiment has been performed 10 times. The elution of the adsorbed inhibitor has been thrice endeavoured by adding diluent (pH 9) to the sediment. Two of the attempts have been successful.

### *Dialysis*

Four experiments have been performed with the same result: the inhibitor is not dialysable.

### *Action of chemical agents upon the extract containing the inhibitor*

a) Acetone-ether; the inhibitor disappears, as verified through four experiments. b) Trichloroacetic acid; acts upon the cellular extracts originating a fine precipitate which dissolves totally in NaOH; from activity tests performed, it results that the inhibitory power passes on the precipitate, dissolving in the NaOH with a slight decrease of titer. c) Perchloric acid: with this acid, the extract forms a granulous precipitate which partly dissolves in NaOH; the inhibitory action passes onto the sediment which dissolves with a slight loss of titer. d) Ammonium sulphate; also forms a precipitate with the cellular extract; however, in this case the inhibitory activity disappears in the supernatant as well as in the precipitate. e) Urea does not have any effect. f) Sodium per-

iodate; the extract becomes very turbid and its inhibitory capacity disappears. g) Trypsin; the inhibitory agent suffers a slight loss in its inhibitory capacity.

*Table 1 (\*)*

Centrifugation g	Inhibitory power of sediment (average value)	Inhibitory power of supernatant (average value)	Number of experiments
3,000	— 5	— 3	1
10,000	— 4	— 1	7
20,000	— 2	— 1	1
110,000	— 3	— 0	3

(\*) The above numbers indicate the difference between the hemagglutinating titer of the virus when mixed with the inhibitor, and the hemagglutinating titer of the virus when the diluent is employed as control without inhibitor. Each unit means the difference between twofold dilutions, respectively.

*Table 2*

Centrifugation g	Inhibitory power of sediment (average value)	Inhibitory power of supernatant (average value)	Number of experiments
10,000	0	0	4

*Determination of the possible adsorption and incorporation to chick embryo cells of the inhibitory agent*

The inhibitory agent is neither adsorbed nor incorporated to cells when placed in contact with them, since it is removed when the culture is washed. The production of hemagglutinin by infected cells does not suffer alteration, as the hemagglutinant titer of cultures infected with virus and treated with the inhibitory agent is the same.

*Determination of the possible action of the inhibitory agent upon the infectivity of the virus measured by Dulbecco's plaque technique*

The results achieved are the same in controls inoculated with the virus as in cultures inoculated with a mixture of virus-inhibitory agent. The virus originates plaques in both cases; consequently, no action of the inhibitory agent is to be observed.

*Determination of the possible action of the inhibitory agent upon erythrocytes*

Erythrocytes, mixed and incubated with inhibitory agent, do not present hemagglutination reaction with hemagglutinant virus, due to the presence of the inhibitor which is neither fixed nor altered by erythrocytes. The latter, mixed and incubated with the inhibitory agent, are centrifuged taking afterward the liquid-free erythrocytes sediment and making a suspension of these erythrocytes in the buffer solution used for hemagglutination; this reaction is performed in front of hemagglutinant virus and give a positive result, which indicates that the inhibitory agent has neither fixed the erythrocytes nor altered them. Moreover, if we perform a test of normal hemagglutination between erythrocytes and virus, adding the inhibitory agent when the reaction has taken place, the latter suffers no alteration.

*Determination of the inhibitory affect of the agent, using several types of erythrocytes*

The inhibitory phenomenon takes place, with slight differences, in all types of erythrocytes which have been tested; this fact proves once more that the inhibitory agent does not act upon erythrocytes.

*Relation between virus and inhibitor*

When the complex inhibitor-virus is subjected, after incubated, to the action of kaolin and acetone-ether, the inhibitor does not separate and the hemagglutinating power remains inhibited. Furthermore, a negative result is obtained both for the sediment and the supernatant when testing centrifuged (10,000 r/m) mixtures of virus and inhibitor

as to their hemagglutinating power. When sodium periodate acts upon the complex, it nullifies the action of the inhibitor; so, hemagglutination takes place.

*Determination of the possible existence of inhibitor in the extract of HeLa cells infected with the virus*

This experiment is carried out in order to determine whether infected HeLa cells contain inhibitor of the hemagglutinant virus. Following the aforementioned technique, it is possible to observe the absence of inhibitor in the sediment as well as in the supernatant obtained at 10,000 r/m since the hemagglutination is not inhibited.

*Determination of infectiveness and lethality of the complexes erythrocytes-hemagglutinant virus and inhibitor-hemagglutinant virus*

Death of the embryos of the groups inoculated with the mixtures erythrocytes-virus, inhibitor-virus and virus-saline solution, as well as survival of the ones inoculated with the mixture erythrocytes-saline solution, indicate that the complexes under study do not lose their infective and lethal capacity.

## DISCUSSION

We have already reported (8), the lose of the hemagglutinating capacity of fowl-plague virus (Rostock strain). However, we summarize here the data which support the existence of said phenomenon. Twenty passages were made with the mentioned virus on chick embryo cells, determining the hemagglutinating titer and lethal dose 50 % (ELD<sub>50</sub>) of each of them. A quick adaptation of the virus to the cellular culture was observed, with stabilization of the evolutive period of the infection and apparition of cytopathic effects between 24 and 48 hours after inoculation of the virus. The hemagglutinating titer decreases during the first of the fourth passages; its value increases afterward up to a considerable titer which is stable with slight oscillations. The ELD<sub>50</sub> varies slightly along the experiment, its evolution being similar as the above. 14 passages were parallely performed with the mentioned virus on HeLa cells; in each one samples were taken from the culture medium all

along the duration of the passage in order to achieve a most circums-tanced study; hemagglutinating titer and ELD<sub>50</sub> were determined. Adap-tation of the virus was slower in this case than in the precedent; the evolutive period of the infection became stable, although it was longer and cytopathic effects appeared later. The hemagglutinating titer de-creases rapidly disappearing about the third passage. The ELD<sub>50</sub> de-creases parallelly, being practically naught on the fourth passage. Cyto-pathic effects continue however to appear in the cells during the subsequent passages. Observed by electronic microscopy, virus released by HeLa cells has been detected in the culture medium; its morphologic aspect is similar to that of the virus cultivated on chick embryo cells. Complement fixation tests, performed with sera obtained in rabbits by means of their inoculation with virus proceeding from culture in HeLa cells, have a positive reaction in front of antigens obtained with virus cultivated in chick embryos, chick embryo cells and HeLa cells. It was determined that virus cultivated in chick embryo cells hemagglutinates chick, human (O group) guinea pig, horse, rabbit and sheep erythrocytes, whereas virus cultivated in HeLa cells does not hemagglutinate any one of the types of erythrocytes mentioned.

Moscovici and La Placca (6) deduce that the lost of the hemagglu-tinating capacity phenomenon discovered by them is due to an un-known virus modifying factor present in the human tumor cells released at the time of infection, which causes a permanent modification of the virus surface. Johnson (3) suggests the possibility that this phenomenon might be a not uncommon one among human enteroviruses and that loss of hemagglutinating capacity is due to the presence of two types of in-fectious virus particles: hemagglutinant positive (HA +) and hemag-glutinant negative (HA —) a selection place when cultivated on malig-nant cells which favour propagation of HA — particles; whereas on non-malignant cells the selection takes place inversely. Cassel and col. (1) find an unspecific hemagglutination inhibitor (5) (see 2). They also indicate (7) that a (IHD-T) strain of vaccine virus, which lacks both the hemagglutinant and hemagglutination inhibitory properties is obtained by action of the inhibitor.

Furusawa and Cutting (2) obtain attenuation of Columbia SK virus by cultivating it in sarcoma 180 ascites cells during 30 serial, passages; it loses its neurotropic virulence and hemagglutinating capacity; howe-ver, it seems that the hemagglutination inhibitor has act an important

action upon induction of HA negative virus in this case. They also suggest a possible relation between hemagglutinating capacity and virulence for the central nervous system.

For our part, we have made experiments with a view to determining the possible existence of an hemagglutination inhibitory factor produced by HeLa cells. After eliminating the possible influence of the serum contained in the maintenance medium (3% calf serum), as said medium is the same utilized for both types of cells (HeLa and chick embryo). This factor is contained in HeLa cells extracts; it is known because of its hemagglutination inhibitory action in front of titrable hemagglutinant virus; it is active at such dilutions as 1/64, and has a series of characteristics which we have determined during this work and briefly summarized hereafter; it is partially sedimentable at 3,000, 10,000 and 20,000 g, and totally at 110,000 g; its acts at a comparatively high dilution; it is adsorbable on kaolin and its elution is possible by changing to pH 9, it is not dialysable, it is destroyed by acetone-ether; with trichloroacetic acid, a fine precipitate is formed which contains the inhibitor totally soluble in NaOH with a slight loss of inhibitory capacity; with perchloric acid, a granulous precipitate appears containing the inhibitor partly soluble in NaOH and causes a slight loss of its inhibitory power; with ammonium sulfate the precipitate obtained is soluble in a buffer at pH 7.5 with total loss of inhibitory power; sodium periodate also destroys the inhibitory power, whereas trypsin only causes a slight decrease, of said power; it is thermolabile at 100 °C and thermostable at 56 °C, practically during 2 hours; it is neither adsorbable nor incorporable to chick embryo cells, nor neutralizes it the power of the virus to produce plaques in cultures of chick embryo cells; the action of the inhibitory agent takes place upon the virus, not upon the erythrocytes; it forms a virus-inhibitor complex, not separable either by kaolin or acetone-ether. The periodate destroys the inhibitor in this complex, infected HeLa cells lack inhibitor; it does not neutralize the lethal and infective power of the virus.

Attentively studying these results, we can deduce that perhaps there are diverse elements to which the inhibitory action is due separable by centrifugation at diverse speeds; some one of them is not precipitable by means of trichloroacetic and perchloric acids, which could account for the loss it undergoes when treated with said acids.

On the other hand, the inhibitor acts upon the virus, exclusively upon

its hemagglutinating capacity. This fact distinguishes it from the diverse inhibitors able to inactivate the virulence which have been discovered by several authors and are mentioned hereafter.

Quersin-Thiry (7) finds that several viruses are inactivated by action of HeLa cells extracts; three different active substances seem to exist in them; one, acting upon polioviruses is thermolabile and destroyable by sound waves and trypsin; other, acting upon the virus of Western Equine Encephalitis (WEE), is thermolabile, resistant to trypsin, sound waves and lypase; the third one, acting upon NDV virus and inactivating it, is thermostable, destroyable by trypsin, modified by metaperiodate and inactivated by living PR8 virus. The substance which inactivates Coxsackie B1 and B4 viruses seems to be very similar to the inactivator of NDV virus. Concentrated virus stocks, from which cellular debris has not been eliminated, display antiviral activity against certain other diluted viruses, e. g., some thermostable inhibitor of NDV and Coxsackie B and B4 viruses is present in poliovirus stocks, as well as in WEE stocks; a thermolabile inhibitor of poliovirus can be found in NDV stocks. It is suggested that these inhibitors are cellular inactivators, corresponding to one type of virus, which have resisted the damage suffered by the cells during the growth of another virus.

Mc Laren and col. (5) have also found that cell debris inactivate several viruses. The activity of these cell debris is sedimentable at 10,000 g for 20 minutes, but not at 1,000 g during the same time; the activity disappears by action of heat (56 °C for 15 minutes and 37 °C for 24 hours), ether, chloroform, trypsin and sound; it is not affected by periodate, lypase or RDE. The viruses tested (polio and Coxsackie), associate with cell debris, could not be recovered by dilution, freezing and subsequent thawing, or sonic treatment. However, with Coxsackie A-9 virus, infectious virus could be dissociated from cell debris at pH 4,5. Treatment of poliovirus-cells debris with urea, sodium dodecyl sulfate and sodium deoxycholate results in dissociation of poliovirus. They believe that the active substance is of proteinic nature.

Kaverin (4) has discovered that cellular lipoproteins obtained from cells by hipertonic saline solution adsorb the WEE virus and the herpes simplex. The formes adheres firmly to the lipoprotein; the latter adheres weakly, rapidly dissociating itself.

Tsilinsky (10) finds that culture fluid and cellular extracts from culture of HEP-2ERK, Detroit-6, CMH, HeLa, KB and amniotic FL cells

were able to protect the same stable cells from the cytopathic effect of poliovirus (types 1 and 3), and primary culture of *Macacus rhesus* monkey kidney cells from the effect of ECHO virus (types 7, 9 and 19). The inhibitor of the cytopathic effect was accompanied by the inhibition of proliferation of the same viruses. Tsilinsky says that this effect was due to the presence in the cellular extracts, of a factor which was called «inhibitor of viral activity» inhibitor was not obtained from a stable line of malignant cells derived from kidney A/Sn mice or from primary rabbit and monkey kidney and human, mouse, chick and pig embryo fibroblast cell cultures. He says also that the presence of the inhibitor in the different cell strains led to believe that said presence was not determined by genetic properties of the cells, but dependent on temporary reasons.

For all these reasons, we observe that in a certain number of stable cells strains there exist agents which act upon diverse viruses, neutralizing their virulence. It is difficult to determine their relations with other hemagglutination inhibitors, but a fact seems to be the existence of a series of factors inside cells, chiefly in the ones of a malignant origin or in stable lines which, although not being of malignant origin, get the characteristics after culture, these factors act upon virus synthesis altering its normal development. All these factors seem to have some common characteristics and others which differentiate them, whether they proceed from the same cell strain or have been obtained from diverse strains.

The above factors clearly differ from the interferon as, leaving aside other differences, they exist in non-infected cells. Tsilinsky excludes the possibility of an interference caused by a contaminant of the type PPLO.

Szanto and col. (9) establish four lines of latently infected HeLa cells with two strains of Newcastle disease virus (NDV). During the first passages, they demonstrated the presence of infectious NDV, but in later passages the results are negative and no hemagglutinins were detected. However, the presence of NDV in the cells is proved by several techniques. No interferon-like substance was observed in HeLa (NDV) cultures. This phenomenon, very similar to the one observed by us in HeLa (FPV), has possibly the same cause.

We believe that it is necessary to elucidate the nature of all these inhibitors, their formation, their mutual relations and the possible influence of the origin of cells upon their existence. The fact that the

existence of said agents predominates in cells of a malignant origin, would make this study an extraordinarily interesting one.

#### SUMMARY

The existence of an hemagglutination-inhibitor produced by HeLa cells in front of the fowl-plague virus (FPV) has been determined. Some chemical and physical characteristics has been established. This hemagglutination-inhibitor is not adsorbable by chick embryo cells; it does not act upon erythrocytes; the complex virus-inhibitor is not infective and not separable. The inhibitory phenomenon takes place with several types of erythrocytes; it is specific by normal HeLa cells.

#### RESUMEN

Se ha comprobado la existencia de un hibidor de la hemaglutinación producido por células HeLa que actúa contra la actividad hemaglutinante del virus de la peste aviar clásica (FPV). Se han establecido algunas características físicas y químicas de este inhibidor. No se adsorbe por las células del embrión de pollo; no actúa sobre los hematíes. El complejo virus-inhibidor no es infectivo y resulta irreversible. El fenómeno de la inhibición de la hemaglutinación aparece frente a hematíes de diferentes especies animales y es específico de las células HeLa normales.

#### REFERENCES

1. CASSEL, W. A.; BLAIT, W. L., and CASSET, B. F. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 110, 89.
2. FURUSAWA, E., and CUTTING, W. 1962. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 109, 417.
3. JOHNSON, E. M., and LANG, D. J. 1962. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 110, 653.
4. KAVARIN, N. V. 1963. Vopr. Virusol., 1, 40.
5. MC. LAREN, L. C.; HOLLAND, J. J., and SYVERTON, J. T. 1962. Natl. Cancer Inst. Monograph, 7, 273.
6. MOSCOVICI, C., and LA PLACCA, M. 1961. Arch. Ges. Virusforsch., 11, 209.
7. QUERSIN-THIRY, L., and NIHOUL, E. 1961. Acta Virol., 5, 283.
8. RONDA, E.; GARCÍA-GANCEDO, A.; ALONSO, M. L.; VILAS, P., and GALLARDO, E. 1963. Nature, 197, 926.
9. SZANTO, J.; ALBRECHT, P., and VILCOX, J. 1963. Acta Virol., 7, 297.
10. TSILINSKY, Ys. 1963. Acta Virol., 7 (I, 350; II, 437; III, 542).

C. S. I. C.  
INSTITUTO DE BIOLOGIA CELULAR

PRODUCCION Y ULTRAESTRUCTURA  
DEL SEUDOMICELIO DE *SACCHAROMYCES*  
*FRAGILIS*

por

E. DE URUBURU y J. MONREAL

INTRODUCCION

Observando en el microscopio electrónico cortes finos de la levadura *Saccharomyces fragilis*, nos encontramos que, junto a las células que presentaban un aspecto normal, existían otras cuyas características las asemejaban más a las de los hongos filamentosos. Tras las pruebas que se describirán a continuación, hemos concluido que las células son las formadoras del seudomicelio de *Sac. fragilis*, haciéndose también un estudio de su ultraestructura puesto que creemos no se ha descrito todavía la de ningún seudomicelio.

Una de las propiedades que se considera típica para diferenciar las levaduras de los demás hongos es que normalmente crecen en forma de células aisladas. Sin embargo, no es raro encontrar algunas especies que bajo determinadas condiciones presentan un dimorfismo acusado, pudiendo crecer formando filamentos o cadenas de células más o menos largas, que se han llamado seudomicelio. Alexopoulos (1), Burdon y Williams (2) y Hawker (5) lo definen como células gemantes, alargadas, de medidas irregulares, unidas débilmente formando una cadena.

Fue Reess (10) el primero que lo observó en 1870 y a partir de entonces se estudiaron los factores que intervenían en el dimorfismo celular de levaduras, encontrándose que la aparición de formas largas o

en cadena estaba favorecida por la penicilina e iones cobalto (9), el almidón (8), las temperaturas bajas y la riqueza en oxígeno (6), el crecimiento en medios pobres (5) y las deficiencias en magnesio (3), señalando también algunos de estos autores cuáles eran las condiciones que favorecían la forma celular aislada. Por último, Scherr y Weaver (12) recopilaron todo lo que se conocía sobre esta cuestión.

## MATERIAL Y METODOS

### *Origen del microorganismo*

Todas las pruebas se realizaron usando la levadura *Saccharomyces fragilis* 1.207 suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo.

### *Condiciones de cultivo*

El cultivo en medios líquidos se realizó sembrando el microorganismo en matraces de 500 cm<sup>3</sup> que contenían 100 ml de los diferentes medios. Cuando no se especifique lo contrario, la incubación se llevó a cabo a 28 °C, en agitación.

### *Aislamiento de colonias*

Se aislaron colonias, sembrando por estría, distintas diluciones de suspensiones de células de levaduras en placas que contenían medio GAE.

### *Medios de cultivo*

*Medio GAE.* Compuesto de dos soluciones. La solución A consta de: glucosa, 10 g; asparagina, 1 g; extracto de levadura, 0,5 g; agua destilada, 500 ml. Se esteriliza en corriente de vapor, durante treinta minutos, a lo largo de tres días.

La solución B lleva PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>, 0,05 g; SO<sub>4</sub>Mg · 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g; SO<sub>4</sub>Fe, 0,01 g; agua destilada, 500 ml. Esta solución se esteriliza a 120 °C, durante treinta minutos.

Una vez esterilizadas se mezclan ambas soluciones.

*Medio de Hansen.* Sacarosa, 5 g; peptona, 1 g; PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>, 0,5 g; SO<sub>4</sub>Mg · 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g; agua destilada, 100 ml. Se esteriliza a 110 °C, durante veinte minutos.

*Medio de Winge.* Extracto de levadura, 3 g; glucosa, 20 g; agua destilada, 1.000 ml. Se esteriliza a 110 °C, durante veinte minutos.

*Medio agar-extracto de malta, de Blakeslee.* Extracto de malta, 20 ml; peptona, 1 g; glucosa, 20 g; agua destilada, 1.000 ml. Se esteriliza a 110 °C, durante veinte minutos.

*Medio pobre A.* Glucosa, 2 g;  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , 0,2 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g; agua destilada, 100 ml. Se esteriliza a 110 °C, durante veinte minutos.

*Medio pobre B.* Glucosa, 1 g;  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , 0,2 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g; agua destilada, 100 ml. Se esteriliza a 100 °C, durante veinte minutos.

*Medio pobre C.* Glucosa, 1 g; asparagina, 0,05 g;  $\text{CO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g; agua destilada, 100 ml. Se esteriliza a 110 °C, durante veinte minutos.

Cuando interesó solidificar alguno de estos medios, se añadió un 2 % de agar.

#### *Observación de la producción de pseudomicelio*

Se llevó a cabo por el método de Rivalier y Seydel (11). Se extendió el medio de cultivo sobre un portaobjetos estéril, procurando que la capa fuese lo más fina posible. Se sembró el organismo con un aguja, haciendo una raya horizontal y dos verticales al lado mayor del portaobjetos, y se incubó dentro de una placa a 27 °C. Una vez crecido, se observó el mismo portaobjetos directamente, en un microscopio de fases Zeiss.

#### *Microscopía electrónica*

Las células crecidas en los diferentes medios se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua destilada. Las crecidas en la superficie de medios sólidos se recogieron raspando la superficie con un asa, resuspendiéndolas en agua destilada y lavándolas tres veces.

A continuación se fijaron con solución de  $\text{MnO}_4\text{K}$  al 5 %, en agua destilada, durante dos horas, a la temperatura ambiente; se deshidrataron por pases sucesivos en acetona del 25, 50, 75 y 100 % y se incluyeron en la resina Durcupan ACM, de Fluka. Durante la deshidratación se les dio contraste, manteniéndolas durante toda la noche en

una solución de acetato de uranilo al 2% en acetona del 75% y a la temperatura ambiente. Los cortes se hicieron en un ultramicrotomo LKB Nife 4804 A, del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas (C. S. I. C.), usando cuchillas de vidrio, y se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM 9. Las fotografías se tomaron con Scientia Gevaert Films, a aumentos iniciales de 6.000. que se ampliaron posteriormente al hacer las positivas.

### RESULTADOS Y DISCUSION

Se descartó la posibilidad de que las células distintas a las normales que se observaron en los cortes finos procedieran de una contaminación debido al hecho de que en algunas fotos se ven pegadas entre sí (*figuras 3-4*).

Lodder y Kreger-Van Rij (7) observan que la especie *Saccharomyces fragilis* posee dos cepas, rugosa y lisa, y también que fácilmente forma seudomicelio. Con la idea de aclarar si estas diferencias morfológicas se debían a la primera posibilidad, aislamos colonias a partir de un cultivo en tubo inclinado, puesto que, aunque aparentemente presentaba un crecimiento uniforme, pudieran haberse producido mutaciones de algunas células, que al principio pertenecían a una sola cepa. Pero las colonias que se obtuvieron fueron todas iguales y todas las demás pruebas se hicieron a partir de una de estas colonias, encontrándose también ambos tipos de células.

Consideramos entonces que se trataba del seudomicelio de *Saccharomyces fragilis*. La posibilidad de una conjugación de dos células parecida a la que describen Conti y Brock (4) en *Hansenula wingei*, se descartó porque no se encontraron los típicos alargamientos y emisión de tubos que preceden al proceso y porque los dos conjugantes no son morfológicamente iguales. Además, en el microscopio de contraste de fases se vio que en vez de dos células emparejadas, existían cortas cadenas celulares (*figura 1*).

Para confirmar esta hipótesis, hicimos cultivos en portaobjetos por el método de Rivalier y Seydel (11), con medios de Blakeslee y Hansen. En ambos medios se encontró que de los bordes de la superficie de crecimiento salían largas células encadenadas con apariencia de típico seudomicelio (*figura 2*).

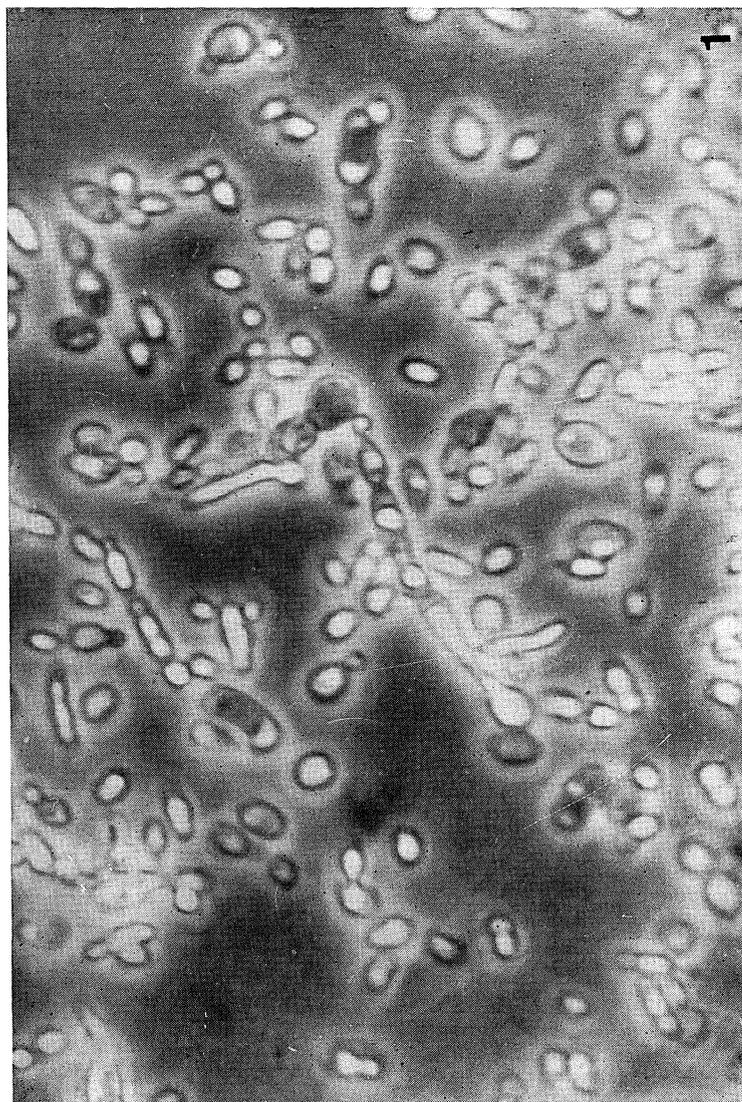


Figura 1. Células de *Saccharomyces fragilis* crecidas en medio de *Blakeslee*. En la parte central se observan células alargadas encadenadas.  $\times 2.000$

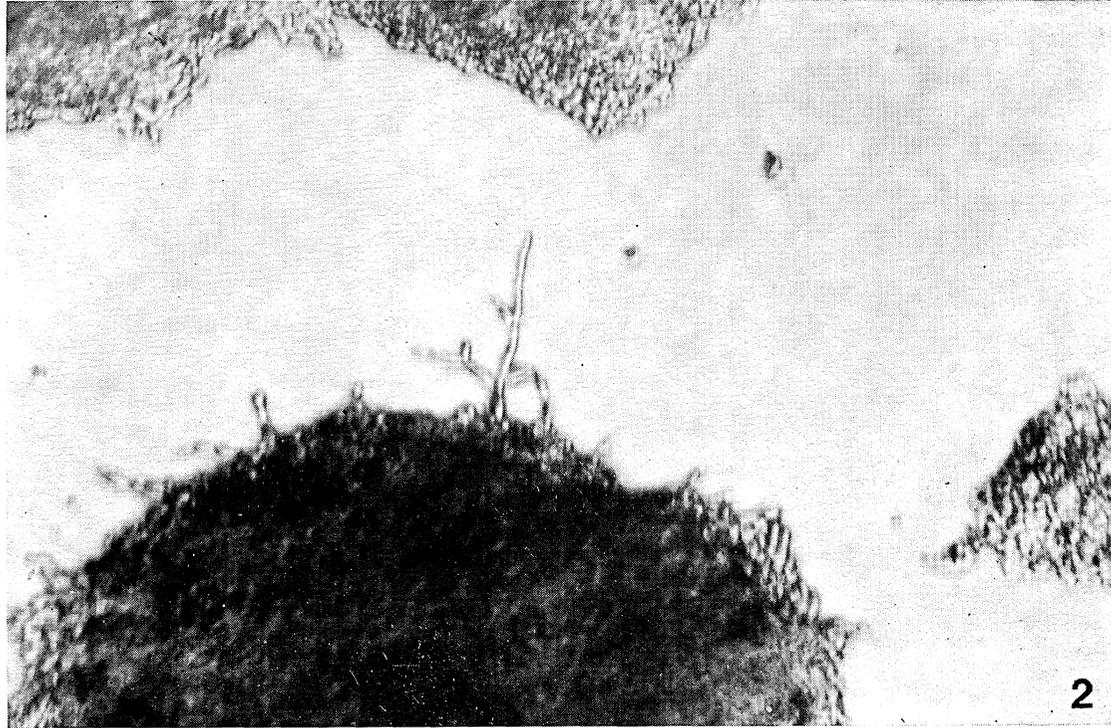


Figura 2. Colonia de *Sac. fragilis* crecida en portaobjetos con medio de Blakeslee. Obsérvese el pseudocelio que surge del borde de la colonia.  $\times 1.000$

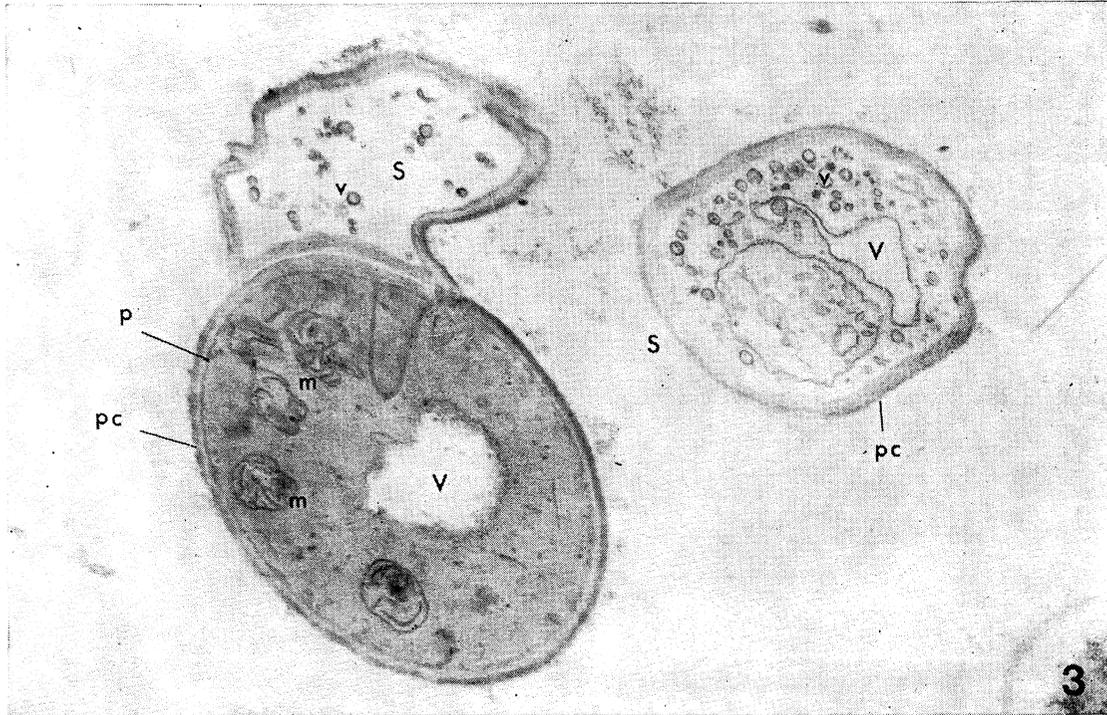


Figura 3. Corte fino de células de *Sac. fragilis* mostrando el pseudomicelio que surge de una célula y otra célula pseudomicelial. pc: pared celular; p: plasmalema; V: vacuola; m: mitocondrias; v: vesículas; n: núcleo; S: pseudomicelio.  $\times 19.800$

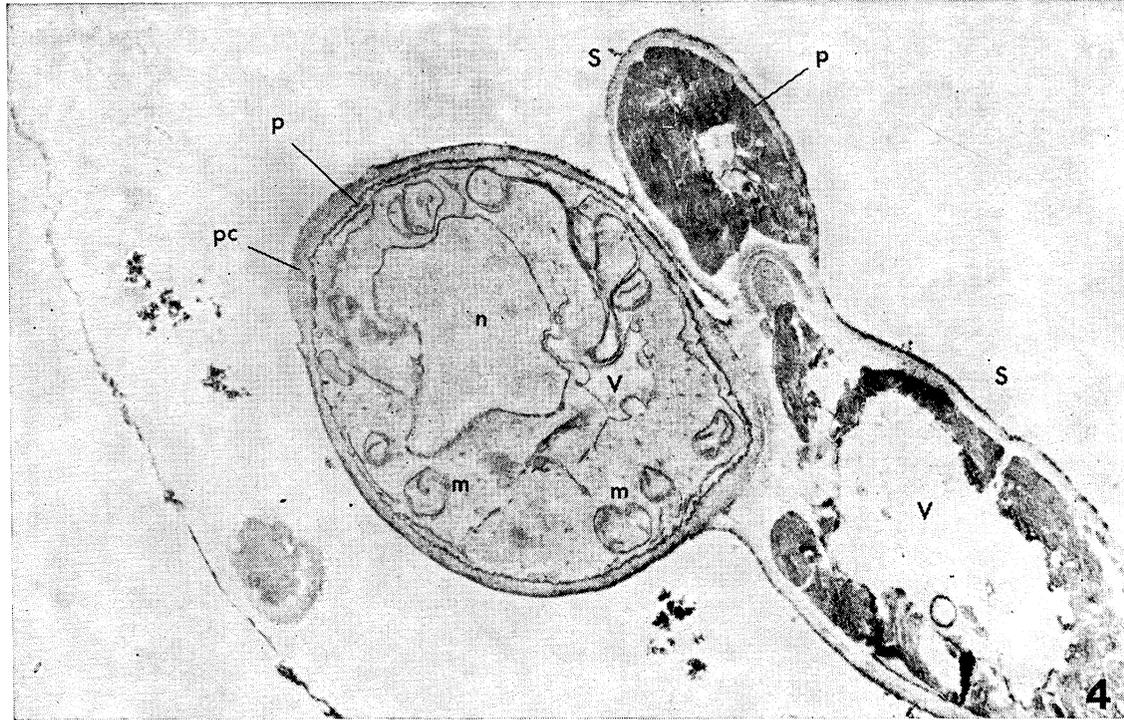


Figura 4. Corte fino de una célula de *Sac. fragilis* de la cual surge el seudomicelio. pc: pared celular; p: plasmalema; m: mitocondrias; V: vacuola; n: núcleo; S: seudomicelio.  $\times 16.800$

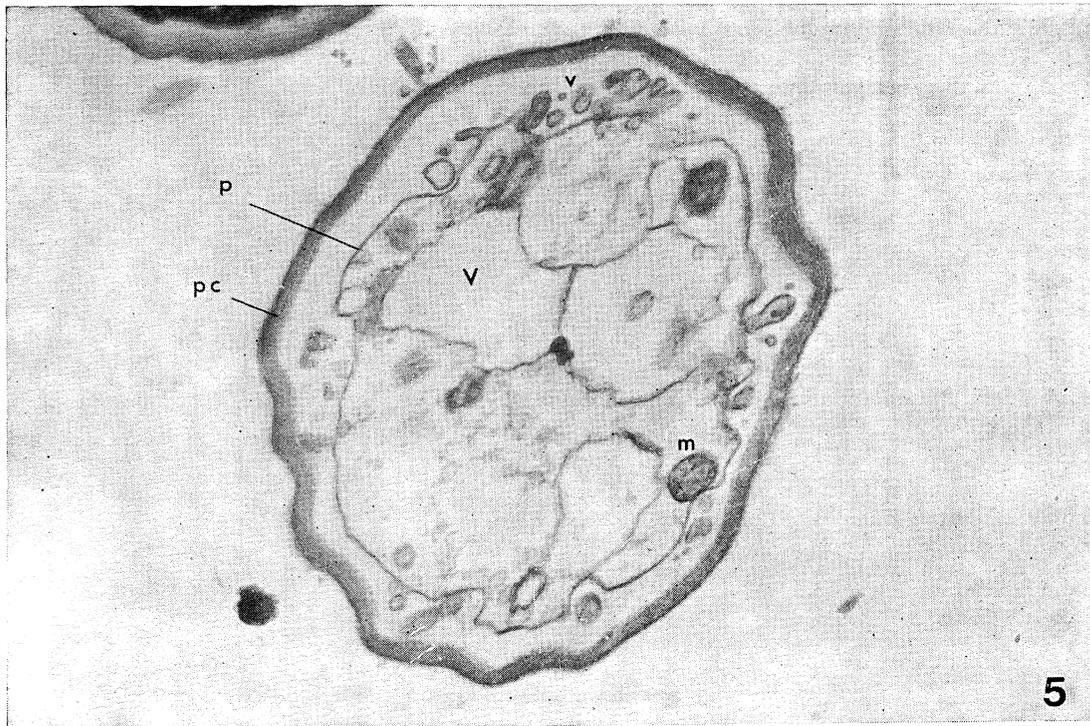


Figura 5. Corte fino del pseudomicelio de *Sac. fragilis*. pc: pared celular; p: plasmalema; m: mitocondrias; V: vacuola; v: vesículas.  $\times 19.800$

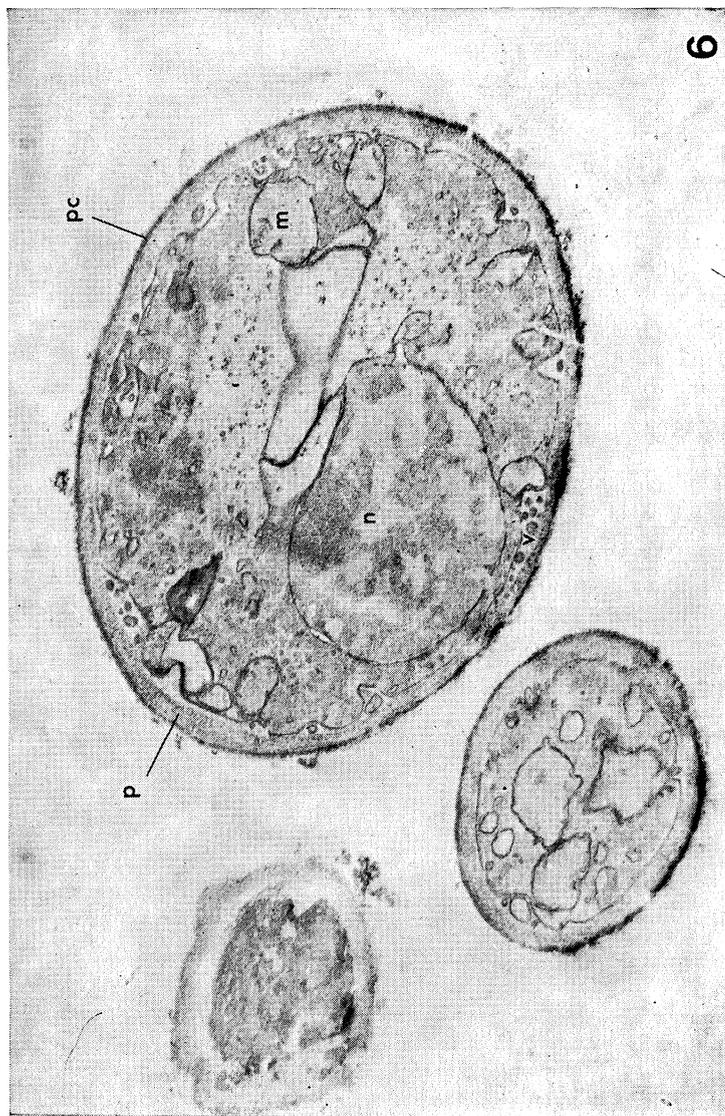


Figura 6. Corte fino del pseudomicelio de *Sac. fragilis*. pc: pared celular; p: plasmalema; m: mitocondrias; n: núcleo; v: vesículas.  $\times 21.800$

A continuación hicimos una observación, paralelamente con el microscopio óptico y electrónico, de las células de *Saccharomyces fragilis* crecidas en diferentes medios de cultivo y con diferentes condiciones, con objeto de ver si existía alguna característica morfológica exterior en las células que en cortes mostraban un protoplasma tan diferente.

Cultivamos en medios de Blakeslee, GAE, de Winge y de Hansen por ser los de uso corriente en el cultivo de levaduras. Además, apoyándonos en la observación publicada por Hawker (5) de que en medios pobres se favorece la producción de seudomicelio, cultivamos el microorganismo en los medios que bautizamos como medios pobres A, B y C, en los que la fuente hidrocarbonada está disminuida. También cultivamos las células en matraces con medio de Blakeslee, sin agitación y a temperatura relativamente baja (15 °C), basándonos en la afirmación de que las bajas temperaturas favorecen la producción de seudomicelio.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: A las quince horas es en el medio de Blakeslee donde se encuentran mayor número de células alargadas o formando cadenas (*figura 1*), siendo en los restantes medios (GAE, Winge y Hansen) mucho menor su proporción. En los medios pobres crecen las células muy difícilmente y las pocas que vimos eran normales, y lo mismo encontramos en el medio de Blakeslee a baja temperatura. Los resultados con los cortes finos confirman que son las células alargadas las que tienen este protoplasma típico, pues un 5% de las células encontradas en cortes de las crecidas en Blakeslee, tenían un protoplasma distinto, mientras que en los cortes de las crecidas en los demás medios es raro encontrar estas células. Además, en los cortes de células crecidas en el portaobjetos por el método de Rivalier y Seydel, casi el 95% de las encontradas son de este tipo, lo cual nos confirma plenamente que las formas encontradas corresponden al seudomicelio de *Saccharomyces fragilis*.

#### *Ultraestructura del seudomicelio de Saccharomyces fragilis*

Las *figuras 3-6* muestran algunos cortes finos del seudomicelio de *Saccharomyces fragilis*. En la *figura 3* se aprecia cómo el seudomicelio surge de una célula, y la gran diferencia que existe entre las dos. Mientras la célula normal posee un citoplasma denso, homogéneo, en el cual se ven mitocondrias, el del seudomicelio es transparente, vacío, conteniendo únicamente pequeñas vesículas. Estas vesículas son típicas en

casi todas las células y son más abundantes en la de la parte superior, en la que existen también zonas claras parecidas a vacuolas y otra zona de igual densidad que el citoplasma que, dado que está rodeada por una doble membrana, puede tratarse de un núcleo.

En la *figura 4* también surge un pseudomicelio de una célula. Claramente se comprende que el proceso de preparación para la inclusión ha afectado a la parte correspondiente al pseudomicelio, mientras que la célula normal está más intacta. Todo esto, unido al aspecto del pseudomicelio de la *figura 5* nos hace suponer que es muy rico en lípidos y que, como ellos son los mayores responsables de los daños que se producen durante la inclusión, dado que se extraen y se hinchan con facilidad, es difícil encontrar células pseudomiceliales intactas. Por ello algunas veces no se ve el plasmalema, como ocurre en la *figura 3*, o bien está contraído, como se ve en la *figura 5*, apareciendo incluso fuera de él una serie de vesículas. En algunas fotos se han encontrado mitocondrias en las que difícilmente se aprecian crestas mitocondriales, debido seguramente a que se han hinchado.

El protoplasma está encerrado por una pared más gruesa que la de las células (10.000 Å), que posee una capa exterior fina y densa y otra interior gruesa y menos densa. La densidad a los electrones de esta última capa es más acusada que la correspondiente de las células normales.

Se encontraron también células que por su aspecto parecen ser intermedias entre las pseudomiceliales y las levaduriformes. Sin embargo, no creemos que el paso de un tipo a otro se verifique de una manera gradual, pues las *figuras 3-4* demuestran lo contrario. Seguramente algunas poseen menor contenido lipídico, por lo que se afectan menos, y eso es lo que ha ocurrido en la célula de la *figura 6*. En ella ya se aprecia claramente el núcleo, rodeado de doble membrana, con poros y con diferencias en la densidad electrónica en el nucleoplasma que pueden interpretarse como diferencias en la localización del material cromatínico. En las mitocondrias se ven restos de crestas. Pero lo más característico para poder considerarla una célula pseudomicelial es la aparición de las pequeñas vesículas fuera del plasmalema.

Resumiendo, el pseudomicelio de *Saccharomyces fragilis* presenta una estructura típica de células en reposo de poca actividad metabólica con un alto contenido en lípidos de reserva.

## RESUMEN

Se ha estudiado la producción de pseudomicelio por la levadura *Saccharomyces fragilis*. Cuando se la cultivó en portaobjetos se observaron cadenas de células alargadas que surgían del borde de la colonia formando un pseudomicelio. La composición del medio de cultivo no influye en su producción. Se ha estudiado la ultraestructura del pseudomicelio por cortes finos, encontrándose que es la típica de células poco activas, ricas en lípidos.

Deseamos manifestar nuestro agradecimiento al Servicio de Microscopía Electrónica del Instituto «Santiago Ramón y Cajal» por las facilidades dadas para usar el microscopio electrónico.

## SUMMARY

The production of pseudomycelium by the yeast *Saccharomyces fragilis* has been studied. Chains of elongated cells emerging from the colonies on a slide culture were seen. The production of pseudomycelium is not dependant on the culture media. The ultrastructure of the pseudomycelial cells is discussed. A large amount of lipids and vesicles was found in the cytoplasm of the cells, what appears to be related to their low metabolic activity.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALEXOPOULOS, C. J. 1952. Introductory mycology. John Wiley and Sons Inc., Nueva York. Chapman and Hall Limited, Londres.
2. BURDON, K. L., y WILLIAMS, R. P. 1964. Microbiology. The MacMillan Company, Nueva York. Collier-MacMillan Limited, Londres.
3. COCHRANE, V. W. 1958. Physiology of fungi. John Wiley and Sons Inc., Nueva York. Chapman and Hall Limited, Londres.
4. CONTI, S. F., y BROCK, T. D. 1965. Electron microscopy of cell fusion in conjugating *Hansenula wingei*. J. Bacteriol., 90, 524-33.
5. HAWKER, L. E. 1957. The physiology of reproduction in fungi. Cambridge University Press.
6. LILLY, G. V., y BARNETT, H. L. 1951. Physiology of the fungi. Mc Graw-Hill Book Company Inc.

7. LODDER, S., y KREGER-VAN RIJ, N. J. W. 1952. The yeast, a taxonomic study. North Holland Publishing Company, Amsterdam. Interscience Publishers Inc., Nueva York.
8. NICKERSON, W. J. 1950. Role of nutrition in the morphogenesis of yeasts. Intern. Congr. Microbiol. 5th Rio de Janeiro, 1950.
9. NICKERSON, W. J., y VAN RIJ, N. J. W. 1949. The effect of sulfhidryl compounds penicillin and cobalt on the cell division mechanism of yeast. Biochim. Biophys. Acta, 3, 461-75.
10. REESS, M. 1870. Botanische Untersuchungen über die Alkoholgahrungspilze. Verlag von Arthur Felix, Leipzig.
11. RIVALIER, E., y SEYDEL, S. 1932. Cultures minces sur lames géloseés, colorées et examinées *in situ* en préparations définitives pour l'étude des cryptogames microscopiques. Compt. Rend. Soc. Biol., 110, 181-84.
12. SCHERR, G. H., y WEAVER, R. H. 1953. The dimorphism phenomenon in yeast. Bacteriol. Rev., 17, 51-92.

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

## PRODUCCION DE ENZIMAS PECTOLITICAS EN CULTIVO CONTINUO

por

GENOVEVA TEJERINA, A. PORTOLÉS y EULALIA CABEZAS DE HERRERA

### INTRODUCCION

El interés del género *Erwinia* como patógeno de plantas nos ha sugerido realizar un estudio de la especie *Erwinia carotovora* desarrollada en cultivo continuo, con el fin de conocer algunos de los factores que son capaces de limitar o estimular, tanto su crecimiento como su capacidad productora de enzimas pectolíticas.

Las exigencias nutritivas de *Erwinia carotovora*, cultivada en condiciones ordinarias de crecimiento, ya han sido consideradas por algunos autores (2, 8 y 14-15) que también, en ocasiones, se han ocupado de sus enzimas pectolíticas (1, 5-7, 11-13 y 16). Pero si tenemos en cuenta que la producción enzimática empieza a manifestarse en la fase logarítmica del crecimiento, el estudio de factores que puedan intervenir directamente en esta fase nos permitirá conocer su posible influencia en la formación de la enzima. Por ello, hemos efectuado un estudio en cultivo continuo, de *E. carotovora*, a fin de disponer de la bacteria en su fase logarítmica, durante un período suficientemente largo que nos permita controlar las distintas modificaciones que puedan intervenir de un modo decisivo en su producción celular y enzimática.

En la primera parte del trabajo se estudian diversas constantes de

crecimiento, necesarias para un correcto planteamiento experimental del cultivo continuo de *Erwinia carotovora*; mientras que en la segunda, observamos el comportamiento de la bacteria y sus respuestas específicas a los cambios operados en las condiciones de cultivo sobre quimiostato.

## MATERIAL Y METODOS

*Erwinia carotovora* 312 (NCPBB) de la Colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas, de Harpenden (Inglaterra), fue la especie bacteriana objeto de este estudio.

Como medio base hemos empleado el indicado por Smith (12-13) para el cultivo de esta bacteria; en él hemos modificado las fuentes carbonadas, así como las proporciones de nitrógeno (orgánico e inorgánico) y de fósforo, con el fin de fijar una serie de factores que nos permitan el planteamiento del cultivo continuo.

Los ensayos previos se efectúan en matraces de Monod, de 100 cm<sup>3</sup>, con un volumen de 10 cm<sup>3</sup> del medio, que se inoculan con 0,1 cm<sup>3</sup> de una suspensión de un cultivo de *Erwinia* (dieciocho horas) cuya densidad óptica a 600 m $\mu$  es de 0,31. Los matraces así inoculados se incuban a 27 °C durante tiempos variables.

La determinación del crecimiento bacteriano se realiza mediante lectura de la densidad óptica del cultivo a 600 m $\mu$ , en un espectrocolorímetro de Bausch-Lomb (modelo Spectronic 20), así como en función del residuo obtenido por desecación a 80°-100 °C, hasta peso constante.

La producción enzimática fue controlada por valoración de grupos reductores, según la técnica de Jansen (4). La proporción del substrato inductor (pectina), se modificó entre los límites 0,2-0,01 % para observar la dependencia existente entre el desarrollo de la bacteria y su capacidad de producción de la enzima poligalacturonasa (PG).

Siendo un factor importante en el medio la presencia de fósforo, no solamente en cuanto a que forma parte de las sales que proporcionan el pH conveniente, sino también como elemento preciso para el crecimiento celular, hemos querido conocer los valores que determinan el óptimo desarrollo de la bacteria, haciendo que su proporción en el medio oscile entre 0 y 14,56 mg/cm<sup>3</sup>. También puede ser decisiva en el medio la relación N/P y para comprobarla fijamos los valores de

0,306 a 4,12, observándose las respuestas de *Erwinia* para la zona comprendida entre ambos límites. Así determinada la relación óptima entre dichos factores, se mantiene constante y se modifica en ella la proporción del nitrógeno orgánico respecto al de aporte inorgánico, ya que es distinto el aprovechamiento que de ambos efectúa la bacteria.

De acuerdo con todos los datos obtenidos por las experiencias hasta aquí efectuadas, se procede a fijar las características del cultivo continuo de *Erwinia carotovora*.

El dispositivo de cultivo continuo empleado es análogo al diseñado por Rosenberger y Elsdén (10), con ligeras modificaciones (9) a fin de poder emplear simultáneamente dos factores limitantes diferentes. El recipiente de incubación tiene una capacidad de 1 l, en el que se disponen 300 cm<sup>3</sup> del medio de cultivo con una aireación de 1 l/h, aproximadamente. La razón de dilución del factor que se ensaya como limitante se calcula según las fórmulas de Herbert (3) de la siguiente forma:

$$D = \frac{f}{v} = \frac{0,03}{0,3} = 0,1$$

en la que  $f$  es la velocidad de entrada del medio y  $v$  el volumen de trabajo del quimiostato (en litros/hora).

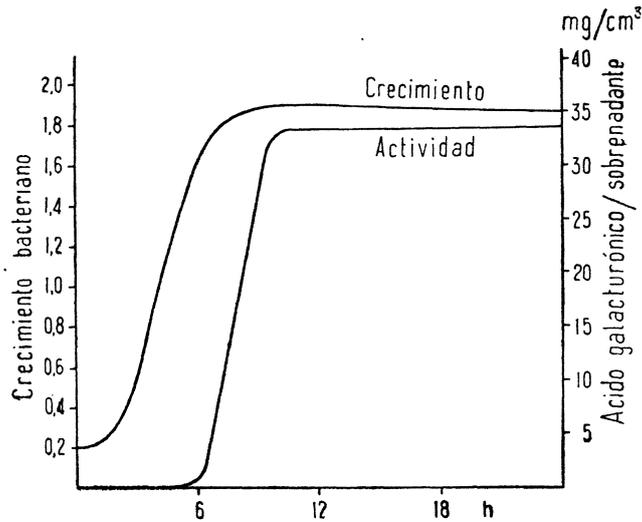
Como inóculo se emplean 3 cm<sup>3</sup> de una suspensión de densidad óptica 0,31, de *Erwinia carotovora* procedente de un cultivo de dieciocho horas, y la incubación se mantiene a 27 °C. Periódicamente se toman muestras de 12 cm<sup>3</sup> en las que se determinan producción celular y PG.

Asimismo, fue estudiado el carácter inducible de esta enzima, interrumpiendo el aporte de pectina y reemplazándole por glucosa a la misma razón de dilución; y determinando actividad enzimática en muestras desarrolladas en concentraciones decrecientes de pectina y crecientes de glucosa. También se observó la producción celular durante todo este proceso.

## RESULTADOS

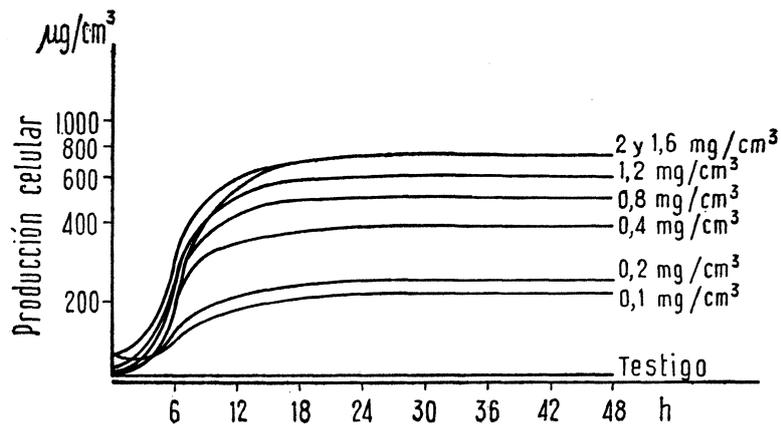
A continuación se indican los resultados obtenidos en las distintas experiencias, siguiendo el mismo orden que en nuestro protocolo de trabajo. Así, en primer lugar vemos las variaciones del crecimiento bac-

teriano y actividad enzimática en un medio normal con 0,2% de pectina (*figura 1*), donde puede verse que la síntesis enzimática se efectúa en la fase activa del crecimiento.



*Figura 1*

En la *figura 2* se representan las variaciones de producción celular que corresponden a distintas concentraciones de pectina en el medio. Asimismo, la actividad enzimática guarda una íntima relación con la



*Figura 2*

concentración del sustrato, aumentando progresivamente a medida que lo hace la proporción de pectina (figura 3).

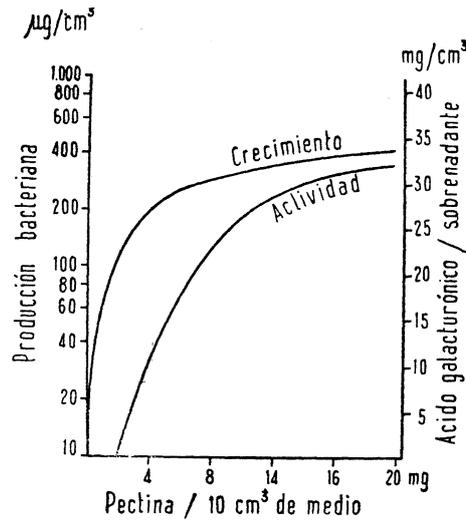


Figura 3

De acuerdo con ello se toma como concentración de pectina en el medio la de 0,2% y sobre este sustrato se modifican las concentraciones de otros componentes.

En primer lugar, estudiamos las variaciones condicionadas a la pre-

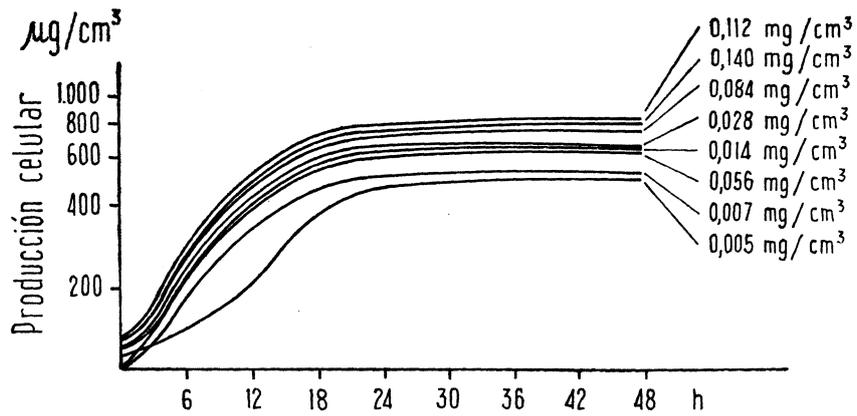


Figura 4

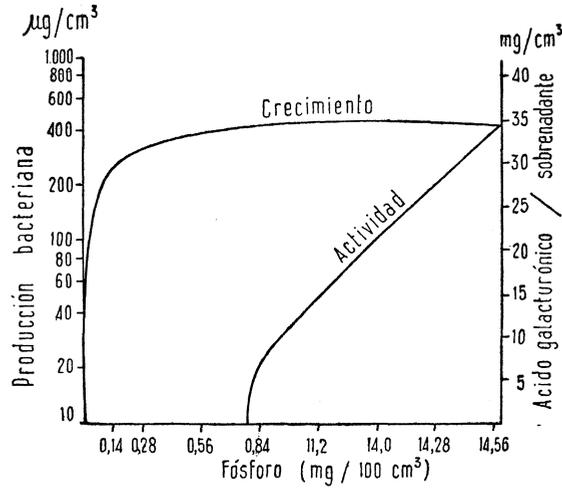


Figura 5

sencia del fósforo inorgánico, manteniendo constante el pH del medio (figura 4). Así, vemos que bastan muy pequeñas concentraciones de

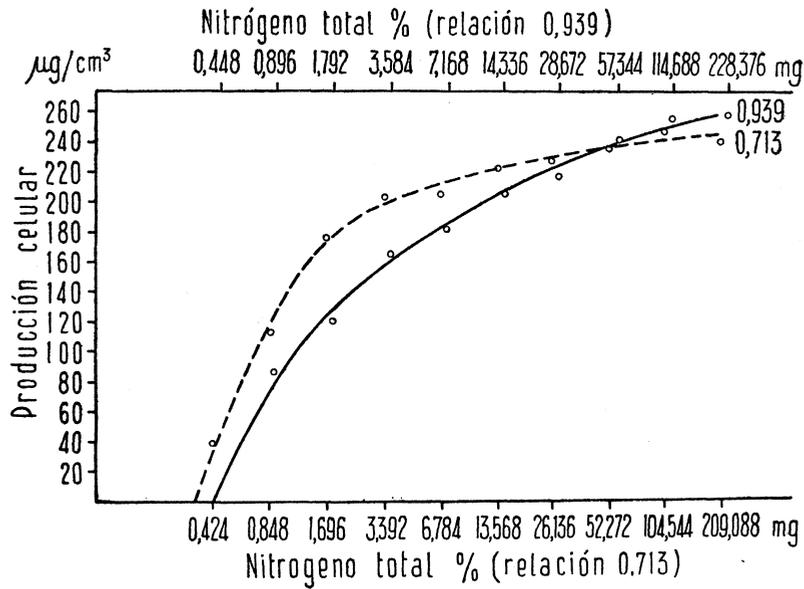


Figura 6

fósforo para producir un buen crecimiento de *Erwinia carotovora*, mientras que para que sea posible la síntesis enzimática se precisan concentraciones mucho más elevadas (figura 5).

Después, mediante curvas de crecimiento sobre medio líquido, se estudia la producción celular en función de distintas relaciones de N/P que oscilan desde 0,306 hasta 4,12 y se observan dos óptimos, que corresponden a 0,713 y 0,939. Entonces, en dos grupos de ensayos, se estudia la influencia de la concentración del nitrógeno total, manteniendo constantes estas dos relaciones (figura 6). Puede verse que el crecimiento es semejante para ambas y que la zona más adecuada está comprendida entre los valores 13,5 y 52,2. Aunque las diferencias de crecimiento para estas relaciones N/P son similares, seguimos empleándolas con el fin de estudiar en ellas los cambios que puedan aparecer al establecer distintas relaciones entre nitrógeno orgánico e inorgánico (figura 7).

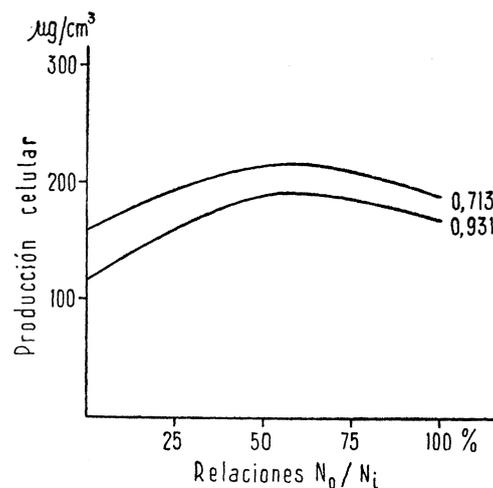


Figura 7

Como ello deducimos la fórmula más adecuada para nuestras experiencias de cultivo continuo: se mantiene la concentración 0,2 % del substrato inductor y se establece la relación 0,713 para N total/P, correspondiendo un 50 % del aporte nitrogenado a la forma orgánica.

Por otra parte, en las experiencias precedentes obtuvimos los datos necesarios para calcular las constantes de crecimiento que corresponden

a los distintos componentes si se utilizaran como factor limitante en un cultivo continuo (*cuadro 1*).

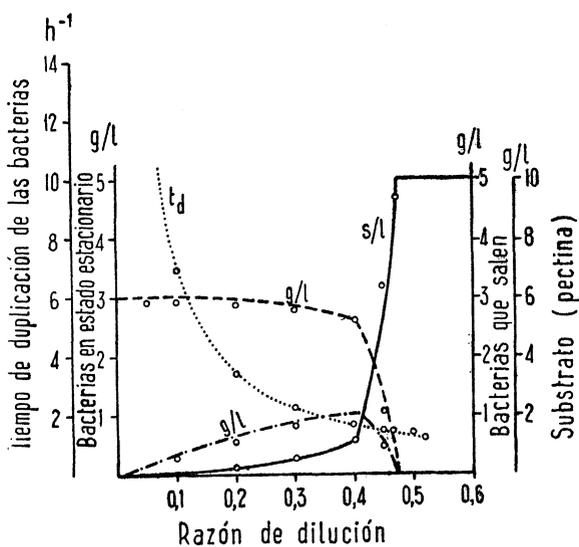
*Cuadro 1*

Factor limitante	Constantes (*)		
	$\mu_m$	Y	$K_s$
Pectina	0,52	0,296	0,035
Nitrógeno	0,67	0,196	0,085
Fósforo	0,76	0,85	0,055

(\*)  $\mu_m$  = constante de máxima multiplicación. Y = constante de producción.  $K_s$  = constante de saturación del medio.

Con estos datos se establecieron las distintas relaciones teóricas para las variables de un cultivo en quimiostato, utilizando pectina como factor limitante, ya que es el único aconsejable de acuerdo con las constantes obtenidas, como se ve en la *figura 8*.

En esta figura se determina que la máxima constante de dilución



*Figura 8*

que se podría utilizar es  $D = 0,4$ , siendo aconsejable el empleo de una baja razón de dilución ( $D = 0,1$ ) para lograr un mayor tiempo de residencia media de las bacterias en el quimiostato, ya que en estas condiciones, la *Erwinia carotovora* se duplica a la razón de  $6,93 \text{ h}^{-1}$  en presencia de 0,5 por ciento de pectina para lograr una producción de unos  $650 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

En estas condiciones se realizaron experiencias sobre quimiostato, en el que se estudiaron las variaciones de producción celular y actividad enzimática en presencia de cantidades variables de pectina, de glucosa y de una mezcla de ambos substratos carbonados, para una misma razón de dilución. De los resultados obtenidos da idea la *figura 9*. En ella se puede observar la dependencia de la producción celular en cuanto a la concentración del substrato carbonado, comprobándose una marcada disminución de la concentración bacteriana en el quimiostato cuando después de lograr un estado estacionario para la concentración de 0,5 % de pectina se pone en funcionamiento el dispositivo que aporta el medio con 0,2 % de pectina, apareciendo un nuevo estado estacionario cuando el cultivo alcanza esta concentración de 0,2 %.

Si en estas condiciones se sustituye el substrato pectina por glucosa a la misma concentración se aprecia, después de algunas oscilaciones, una nueva fase de equilibrio en el cultivo, cuya densidad de crecimiento es ligeramente superior a la apreciada en la fase previa con pectina. Lo cual parece indicar que la producción celular está relacionada—en estos casos—más con la concentración del substrato carbonado que con su naturaleza.

Determinaciones de actividad enzimática a lo largo de estas experiencias indican, por el contrario, que la enzima es sintetizada solamente en presencia de pectina, desapareciendo en el medio por aporte continuado de glucosa.

Al considerar la producción enzimática en función de la población bacteriana desarrollada sobre 0,5 y 0,2 % de pectina, nos encontramos que no existe una relación proporcional entre el aumento de actividad y el del substrato cuando éste se hace 1,5 veces superior.

En el cultivo continuo no es imprescindible una elevada densidad de crecimiento bacteriano para lograr una acusada síntesis enzimática, ya que el grado de selección conseguido en poblaciones reducidas permite una capacidad de síntesis más elevada por unidad de masa (peso

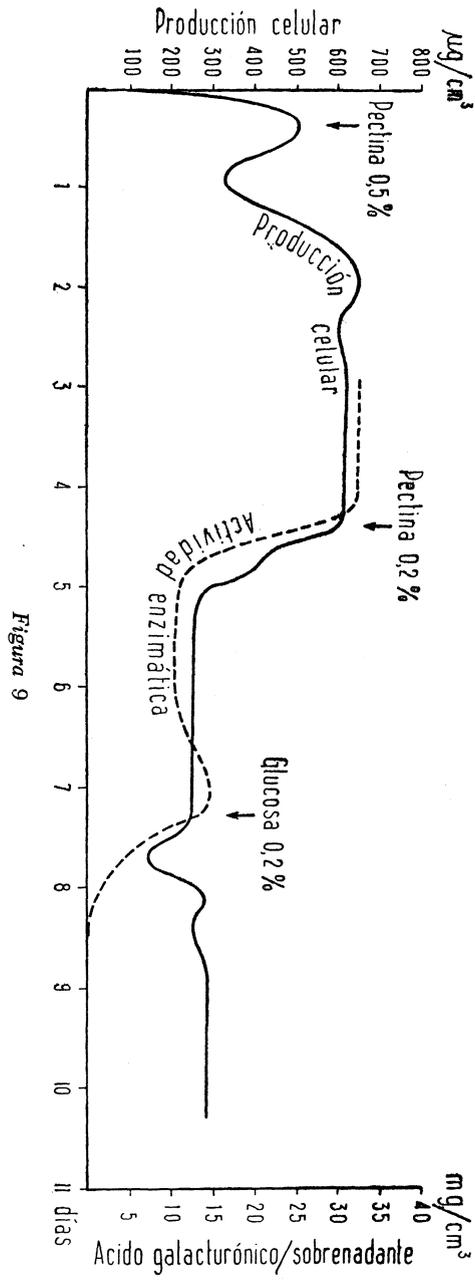


Figura 9

seco), conservando el carácter inducible en cualquier caso, puesto que no se efectúa esta síntesis en ausencia de pectina.

### RESUMEN

Se ha efectuado un estudio de los factores capaces de estimular o limitar el crecimiento y la capacidad productora de enzimas pectolíticas en *Erwinia carotovora*. Los factores considerados son: el sustrato inductor pectina, nitrógeno orgánico e inorgánico, fósforo y relación N/P.

Se ha encontrado que la síntesis enzimática se efectúa en la fase activa de crecimiento y cuando disminuye en el medio la concentración de pectina por debajo de 2 mg/cm<sup>3</sup> lo hace también la producción enzimática.

Bastan pequeñas cantidades de fósforo para producir un buen crecimiento de *Erwinia carotovora*, mientras que si su concentración en el medio va decreciendo a partir de 0,14 mg/cm<sup>3</sup> la producción de enzima baja notablemente, hasta desaparecer por debajo de 85 µg/cm<sup>3</sup>.

La relación N/P no es muy estricta por manifestarse en ella dos óptimos correspondientes a los valores 0,713 y 0,939. El nitrógeno total en el medio es aconsejable proceda en un 50% de fuente inorgánica y el resto, orgánica.

Con estos datos se han establecido las constantes precisas para el estudio de *Erwinia carotovora* en cultivo continuo, observándose la producción enzimática en función de la producción bacteriana desarrollada en quimiostato. Dicha producción depende más de la selectividad de la población que de la concentración de sustrato en el medio, y desaparece cuando lo hace también la pectina por conservar en todo momento su carácter inducible.

### SUMMARY

The growth and PG production by *Erwinia carotovora* in continuous culture have been studied, so as the changes caused on both by different compounds in the medium.

Under the conditions of growth, the production of polygalacturonase enzyme in continuous culture depends on the high degree of selectivity in the bacterial population more than on the concentration of the sub-

trate in the medium, but in any case the synthesis ceases when the pectine is replaced by glucose.

#### BIBLIOGRAFIA

1. DEUEL, H., y STUTZ, E. 1958. *Advan. Enzymol.*, 20, 341-82.
2. DOWSON, W. J. 1939. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II*, 100, 177-93. Ref : 1950. *J. Bacteriol.*, 60, 669-72.
3. HERBERT, D.; ELSWORTH, R., y TELLING, R. C. 1956. *J. Gen. Microbiol.*, 14, 601-22.
4. JANSEN, E. F., y MACDONNELL, L. R. 1945. *Arch Biochem.*, 8, 97-112.
5. KERTESZ, Z. I. 1951. *Enzymes*, 1, 746.
6. KRAGIT, A. J., y STARR, M. P. 1958. *Arch. Biochem.*, 42, 271-77.
7. LINEWEAVER, H., y JANSEN, E. F. 1951. *Advan. Enzymol.*, 11, 267-95.
8. PETERSON, W. H., y PETERSON, M. W. 1945. *Bacteriol. Rev.*, 9, 49.
9. PORTOLÉS, A. 1966. *Anales Real Acad. Farm.*, 32, 425-63.
10. ROSENBERGER, R. F., y ELSDEN, S. R. 1960. *J. Gen. Microbiol.*, 22, 726-39.
11. SCHUBERT. 1959. *Helv. Chim. Acta*, 37, 691.
12. SMITH, W. K. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 33-41.
13. SMITH, W. K. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 42-47.
14. STARR, M. P., y MANDEL, M. 1950. *J. Bacteriol.*, 60, 669-72.
15. VOETS, J. P., y CONNICK, G. 1963. *Ann. Inst. Pasteur.*, 105, 401-8.
16. WOOD, R. S. 1955. *Ann. Botany (London)*, 19, 1-27.

CIUDAD SANITARIA «FRANCISCO FRANCO»,  
DE LA SEGURIDAD SOCIAL. BARCELONA  
SERVICIO DE BACTERIOLOGIA Y SEROLOGIA

## NOTA SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBIOTICA DEL COMPUESTO DAN - 352 (\*)

por

L. ARCALÍS y J. CALDÉS

### INTRODUCCION

Hemos dispuesto de un producto de investigación, denominado DAN-352, en el que se hallan combinadas una molécula de sulfametoxipiridazina con una de propionileritromicina, formando un nuevo compuesto con el que se ha conseguido retardar la permanencia en sangre de la eritromicina, obteniéndose de esta manera una clara ventaja sobre lo que representaría una asociación aditiva.

El objeto del ensayo ha sido el comprobar que la eritromicina combinada con la sulfametoxipiridazina, tal como se presenta en el DAN-352, no sufre alteración de su actividad y espectro bacteriano, asegurando de esta manera el que las ventajas del nuevo compuesto no queden mermadas en el sentido citado.

Primeramente, el producto había sido valorado con patrón de propionileritromicina, frente a *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Bacillus pumilus* NCTC 8241, *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 9634, *B. subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* ATCC 6538, *Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830, estableciéndose para el preparado una potencia de

---

(\*) Síntesis Dr. Andréu, patente núm. 31.890.

533  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , actividad correspondiente al contenido molecular en eritromicina base (\*).

### MATERIAL Y METODOS

Las pruebas se han llevado a cabo sobre 18 cepas de estafilococos procedentes de diversos procesos clínicos, y cuya sensibilidad o resistencia a la eritromicina ya era conocida (*cuadro 1*).

*Cuadro 1*

Cepa	Origen	Sensibilidad a la eritromicina
66	Fístula articular	Muy sensible
139 B	Exudado faríngeo	Resistente
297	Empiema	Muy sensible
314	Osteomielitis	Muy sensible
315	Pus de herida	Muy sensible
525	Supuración	Sensible
316 H <sub>2</sub>	Líquido pleural	Sensible
518	Supuración	Muy sensible
540/1	Supuración	Sensible
647	Pus de absceso craneal	Muy sensible
927	Pus de absceso cerebral	Sensible
904	Pus de herida	Ligeramente sensible
933 D	Exudado ótico	Ligeramente sensible
944 D	Exudado ótico	Resistente
994	Pus de absceso	Muy sensible
986 I	Exudado ótico	Resistente
899 D A	Exudado ótico	Resistente
955	Pus de absceso	Resistente

El procedimiento seguido en la determinación comparativa del poder antibiótico del DAN-352 con respecto a la eritromicina se ha basado esencialmente en la preparación de los clásicos discos absorbentes impregnados con una cantidad conocida del antibiótico y que, depo-

(\*) Experiencias realizadas en el Departamento de Investigaciones Farmacológicas del Laboratorio «Dr. Andreu» (Barcelona).

sitados sobre un cultivo en superficie del germen a ensayar, inducen, después de veinticuatro horas de incubación, a 37 °C, la aparición de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos. El diámetro de dicho halo nos da una idea cuantitativa de la sensibilidad del germen al antibiótico o producto ensayado.

Para la preparación de los discos se ha utilizado papel de filtro grueso cortado mediante troquel, a fin de uniformar los diámetros.

Una vez cortados, los discos han sido esterilizados al autoclave (120 °C, treinta minutos). La utilización de discos de control (sin impregnar) ha permitido comprobar que el papel empleado no produce *per se* inhibición del crecimiento bacteriano.

Se ha preparado una solución alcohólica de DAN-352 de 100 mg/ml, de tal forma que 3  $\lambda$  contengan 3  $\mu$ g de DAN-352. Asimismo se ha preparado una solución de eritromicina de 53,3 mg/100 ml (equivalente teórico de eritromicina base existente en la solución antes indicada de DAN-352).

La impregnación de los discos se ha llevado a cabo mediante pipetas de Lang-Levy, estériles, de 3  $\lambda$ .

Una vez impregnados, los discos han sido colocados, en placas de Petri estériles, en la estufa, a 37 °C, a fin de lograr la total evaporación del alcohol, y utilizados inmediatamente.

Conjuntamente se han utilizado discos patrón de eritromicina, DIFCO, como control de la sensibilidad del germen.

Los ensayos se han realizado sobre medio de Müller-Hinton, utilizando una suspensión de gérmenes preparada a partir de un cultivo de veinticuatro horas.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos se recogen en el *cuadro 2*.

Cuadro 2

Cepa	Halo de inhibición, en milímetros	
	DAN-352, 3 µg	Eritromicina equivalente a 3 µg de DAN-352
66	20	20
139 B	0	0
297	23	22
314	22	22
315	23	24
525	18	18
316 H <sub>2</sub>	19	18
518	22	23
540/1	17	17
647	25	24
927	19	19
904	15	15
933 D	17	16
944 D	0	0
994	24	24
986 I	0	0
899 D A	0	0
955	0	0

## CONCLUSION

La eritromicina combinada presente en el DAN-352 no pierde su actividad antibiótica y corresponde exactamente a 533 µg/mg de DAN 352.

El espectro de acción del DAN-352 corresponde al de una asociación de eritromicina y sulfametoxipiridazina sin ningún efecto inhibitorio recíproco, con la consiguiente efectividad sobre un amplio grupo de gérmenes gram-positivos y gram-negativos.

### RESUMEN

Se ha realizado un estudio de la sensibilidad de dieciocho cepas de gérmenes patógenos al producto de investigación DAN-352, combinación molecular de sulfametoxipiridazina con propionileritromicina, comprobándose que la actividad y el espectro de éste se hallan inalterados, con la consiguiente efectividad sobre un amplio grupo de gérmenes gram-positivos y gram-negativos.

### SUMMARY

It has been made an inquiry into the sensitivity of eighteen strains of pathogenic germs, to the investigation product DAN-352, molecular combination of sulfamethoxypyridazine with propionylerythromycin, and it has been verified that its activity and spectrum remain unaltered, with the correspondent effectiveness on a large group of Gram positive germs and Gram negative germs.

Depósito legal: M. 702. - 1958

---

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15. Madrid