
VOLUMEN 21. 1968

ENERO - JUNIO. NUMEROS 1 - 2

Microbiología Española

Revista

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

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



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

Vicedirectores: Dr. Gonzalo Urquiza, 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.

Í N D I C E

Página

Ultraestructura de células de <i>Dianthus caryophyllus</i> infectadas por dos virus al mismo tiempo, por M. Rubio-Huertos, Serafina Castro, R. Moreno y D. López-Abella	1
Estudio de un virus de la alfalfa y ultraestructura de las hojas infectadas, por M. Rubio-Huertos y R. Moreno	13
La solubilización de fosfatos por hongos del suelo, por A. Ramos, V. Callao y P. C. T. de Carvalho	23
Valoración de ácido fusídico con <i>Bacillus licheniformis</i> , por F. Fernández y M. Piña	39
Efecto <i>in vitro</i> de diferentes antibióticos y sustancias químicas sobre 90 cepas de <i>Pseudomonas savastanoi</i> , por P. Romero y V. Callao	45
Polysaccharide production by <i>Beijerinckia</i> and <i>Azotobacter</i> , by R. López and J. H. Becking	53
The growth of <i>Candida albicans</i> and <i>Salmonella typhimurium</i> in mixed culture, by C. Ramírez and J. P. Ransom ...	77
The <i>in vivo</i> interaction of <i>Candida albicans</i> and <i>Salmonella typhimurium</i> , by C. Ramírez, J. P. Ransom and D. H. Pitkin	89
Influencia de la respiración endógena en la oxidación de aminoácidos por <i>Debaryomyces kloeckeri</i> , por J. L. Fernández-Puentes y D. Rodríguez	93
Ochenta cumpleaños del Dr. Waksman	101
Bibliografía, por J. Pérez-Silva y A. Portolés ...	105

Microbiol. Espa n., 20 (1967).

Errores advertidos

Página	Línea	Se lee		Debe leerse	
208	18	10,000		110,000	
210	Table 1	3,000	—5	30,000	—1
		10,000	—4	40,000	—2
		20,000	—2	80,000	—4
		110,000	—3	110,000	—5
»	Table 2	10,000		110,000	
212	10	10,000		110,000	
»	11	r/m		g	
214	14	3,000	10,000	30,000	40,000
»	15	20,000		80,000	
217	9	is not		is	
»	13	hibidor		inhibidor	
»	18	no es		es	
»	18	irreversible		no separable	

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGÍA
SECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

ULTRAESTRUCTURA DE CELULAS DE
DIANTHUS CARYOPHYLLUS INFECTADAS POR
DOS VIRUS AL MISMO TIEMPO

por

M. RUBIO-HUERTOS, SERAFINA CASTRO, R. MORENO y D. LOPEZ-ABELLA

INTRODUCCION

El estudio de la ultraestructura de las células infectadas por virus empleando las técnicas de secciones ultrafinas está cada día más extendido para averiguar las interacciones entre las plantas y los virus que las atacan, especialmente para saber la localización de los virus en las células y las reacciones de los diferentes orgánulos celulares a la infección, y en el caso de tratarse de virus que inducen la formación de inclusiones intracelulares visibles al microscopio de luz, el conocer la ultraestructura de estas inclusiones. En el presente trabajo describimos una doble infección en el mismo huésped por virus de muy distintas características, así como una estructura cristalina que aparece tanto en los núcleos de hojas de *Dianthus caryophyllus* infectados por virus como en los de tejidos de *D. caryophyllus* sin infectar (3).

MATERIALES Y METODOS

Dianthus caryophyllus infectado, procedente de una muestra comercial de cultivo de La Maresma (Barcelona). Las flores presentaban un

color rojo sucio, con algunas vetas más claras, y las puntas, decoloradas. En las hojas no se apreciaba ningún síntoma de virosis.

Las inoculaciones se hicieron con savia de plantas infectadas, usando celita como abrasivo, en *Dianthus caryophyllus* y *D. barbatus* (obtenidas a partir de semillas) y en *Vicia faba* L. y *Nicotiana tabacum* var. White Burley, *Chenopodium amaranticolor* y *Brassica pekinensis*, cultivadas en invernadero.

Citología

Se hicieron arrancamientos de epidermis, tanto de hoja como de pétalos, tiñéndose con floxina al 1% en agua.

Microscopía electrónica

Se fijaron pequeños trozos de hojas y pétalos de las plantas infectadas en tetraóxido de osmio al 1%, con tampón de acetato de veronal, de Palade, a pH = 6,9, durante dos horas, a 4 °C; se deshidrataron en una serie progresiva de acetona en la que se las tuvo doce horas, en acetona al 70% con solución saturada de acetato de uranilo, terminando después de la deshidratación en las siguientes concentraciones de acetonas; por último, se incluyeron en durcupan, efectuándose la polimerización en estufa a 60 °C. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo LKB, empleando cuchillas de vidrio, y una vez montados los cortes en las rejillas-soporte para el microscopio se tiñeron con citrato de plomo. Las observaciones se hicieron con un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas.

La misma técnica anterior se empleó para la observación de cortes obtenidos de *Dianthus caryophyllus* sanos cultivados a partir de semilla.

La tinción negativa se realizó a partir de una suspensión de virus purificado en agua destilada y ácido fosfatúngstico, al 2% y también por el método de corta inmersión de Brandes (1) combinado con ácido fosfatúngstico.

Purificación

Se realizó a partir de plantas de *Dianthus caryophyllus* infectadas, por el método de butanol-cloroformo, de Steere (5).

RESULTADOS

Las inoculaciones fueron positivas en *Dianthus caryophyllus* y *D. barbatus* y negativas en las demás especies probadas, excepto en *Nicotiana tabacum*, en donde se observaron lesiones necróticas pequeñas en las hojas inoculadas.

Tanto en las células epidérmicas de los pétalos como en las de las hojas de las plantas infectadas se observaron numerosas inclusiones intracelulares del tipo amorfo o cuerpo X, formadas por una matriz granular en la que se destacaban agujas y puntos o concentraciones más refringentes y teñidas de un color más fuerte con floxina; estas inclusiones suelen encontrarse cerca de los núcleos y son de un tamaño un poco mayor que éstos.

Las observaciones de cortes ultrafinos de hojas infectadas al microscopio electrónico nos mostraron las estructuras que se detallan a continuación.

Los cuerpos X se encuentran formados por material citoplasmático conteniendo ribosomas, retículo endoplasmático, mitocondrias, algún cloroplasto y esferosomas. En esta masa de citoplasma, proyectada al interior de la vacuola central celular y rodeada de tonoplasma, se encuentran dos tipos de partículas de tipo vírico: unas, alargadas, flexuosas, y otras, esféricas o isométricas, con un centro claro; ambos tipos de partículas forman agrupaciones características (*figura 1*).

Las partículas alargadas están distribuidas de tres maneras: a) partículas sueltas, esparcidas por el citoplasma, mezcladas con los ribosomas de una manera anárquica (*figura 1*); b) partículas paralelas formando haces, y c) bandas estrechas, opacas a los electrones, probablemente constituidas por partículas alargadas formando un cuerpo compacto (*figura 4*).

Las partículas esféricas se encuentran generalmente agrupadas formando un cuerpo esférico u ovoide bastante compacto, con bordes bien delimitados (*figuras 1-2*), pero a veces se pueden observar pequeños grupos de partículas que todavía no llegan a formar el cuerpo compacto descrito anteriormente.

Las modificaciones que hemos observado en los orgánulos celulares son de dos clases: una, en las mitocondrias que se encuentran cerca de las inclusiones, formadas por partículas esféricas, en las que se puede apreciar un hinchamiento lateral, formándose una vacuola dentro de la mitocondria (*figura 1*), teniendo aspecto completamente normal las mitocondrias que se encuentran alejadas de las inclusiones ovoideas; y otra, la presencia de inclusiones cristalinas en gran número de los núcleos de las plantas infectadas y también de las plantas empleadas como testigo, los cristales parecen estar formados por bandas o líneas oscuras y claras con un espaciamiento perfectamente regular; estas inclusiones se encuentran generalmente cerca del nucleolo y son algunas de tamaño bastante grande, $2\text{-}5 \mu$ (*figuras 5-7*).

En las preparaciones directas de hojas sobre ácido fosfotungstico por el método de Brandes se observaron solamente partículas alargadas y en la purificación por el método butanol-cloroformo, de Steere, sólo pudimos obtener también un sedimento de partículas alargadas de las que una mayoría medían $660 \text{ m}\mu$, otras $1.300\text{-}1.600 \text{ m}\mu$ y algunas, bastante escasas, llegaban a $2.000 \text{ m}\mu$. Estos resultados hacen pensar que la unidad sea la de $660 \text{ m}\mu$, siendo las demás diferentes estados de agrupación (*figura 3*).

El tamaño de las partículas esféricas medidas en cortes ultrafinos es muy constante, de $30,8 \text{ m}\mu$ de diámetro, salvo el error debido a la técnica de los cortes ultrafinos.

DISCUSION

La presencia en los tejidos infectados de *Dianthus caryophyllus* de dos tipos de partículas de morfología vírica y su ausencia en los tejidos de *D. caryophyllus* sano, junto con su transmisión por la savia de plantas infectadas, son datos que nos hacen estar seguros de que se trata de dos virus, y esto también lo confirma el hecho de que en el caso de las partículas alargadas, éstas hayan podido ser purificadas por los métodos generales de purificación de virus y correspondan en tamaño a las observadas en las células.

En el caso de las partículas esféricas, recientemente, Fujisawa y colaboradores (2) y Rubio-Huertos y colaboradores (4) han descrito un tipo

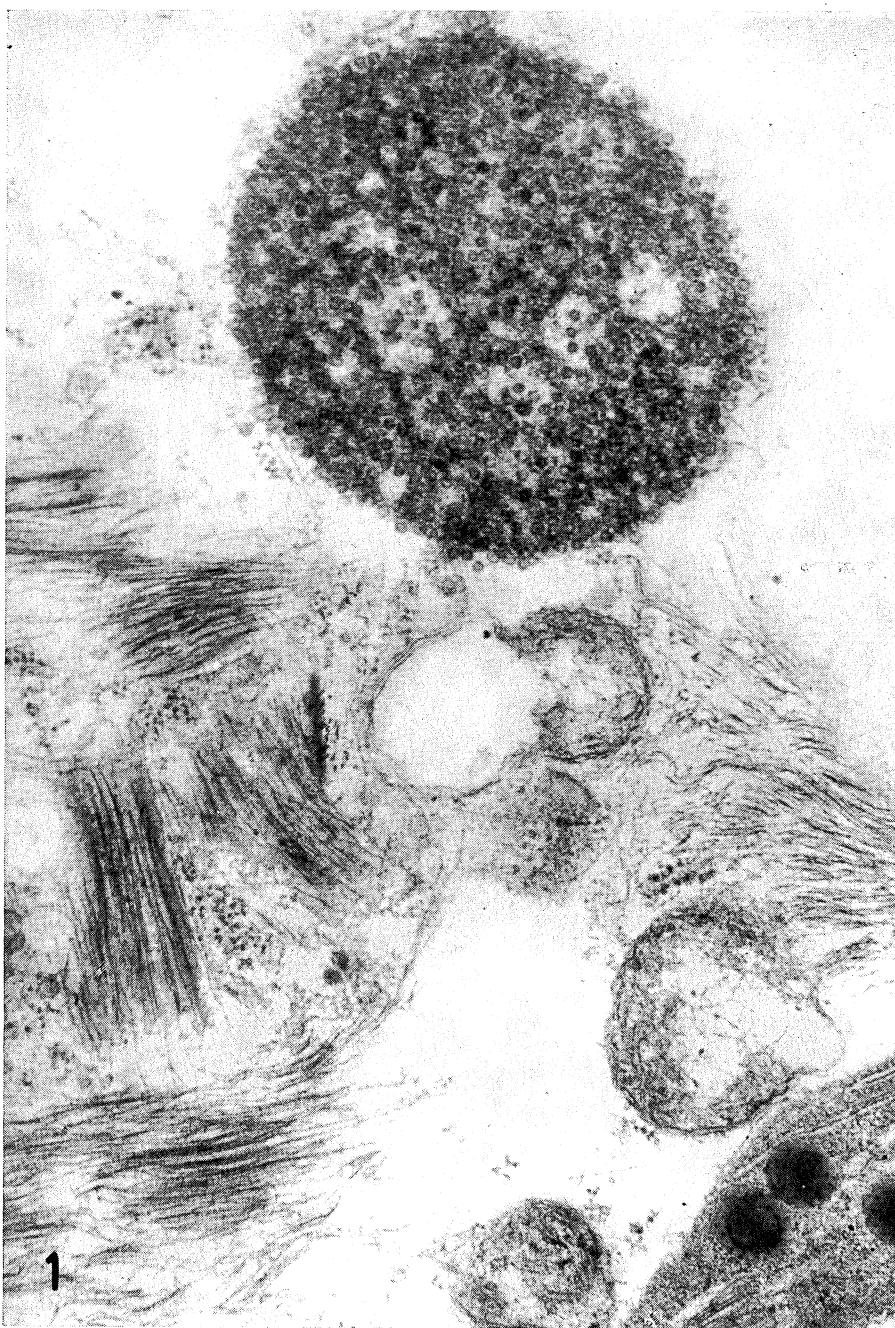
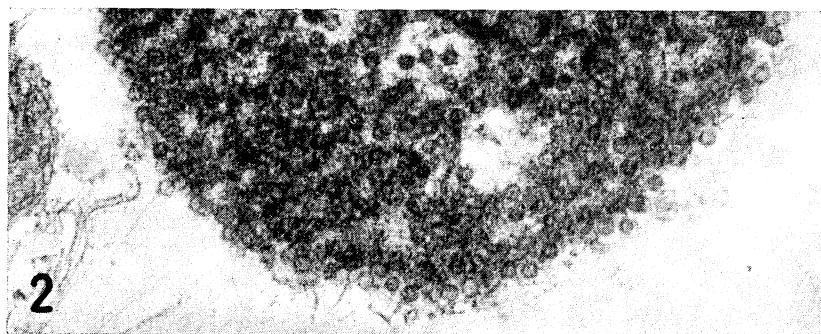


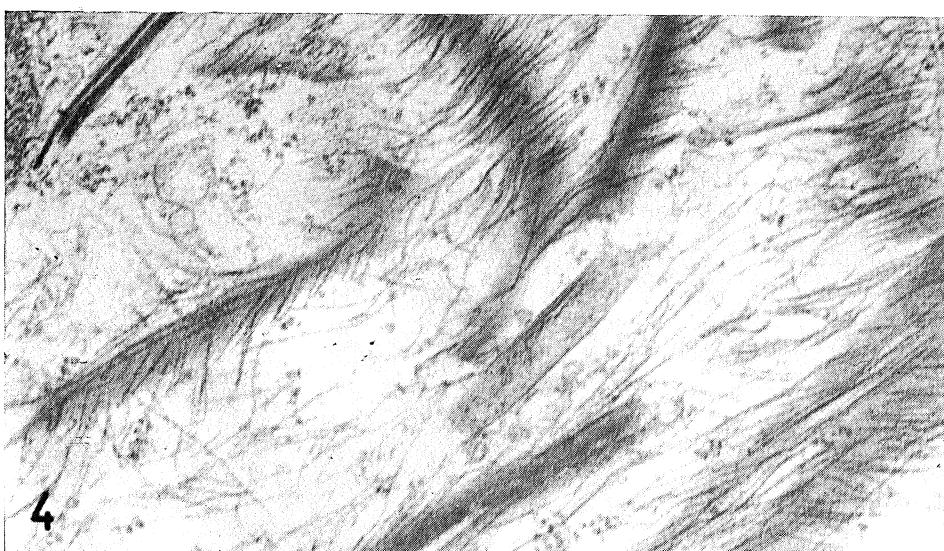
Figura 1



2

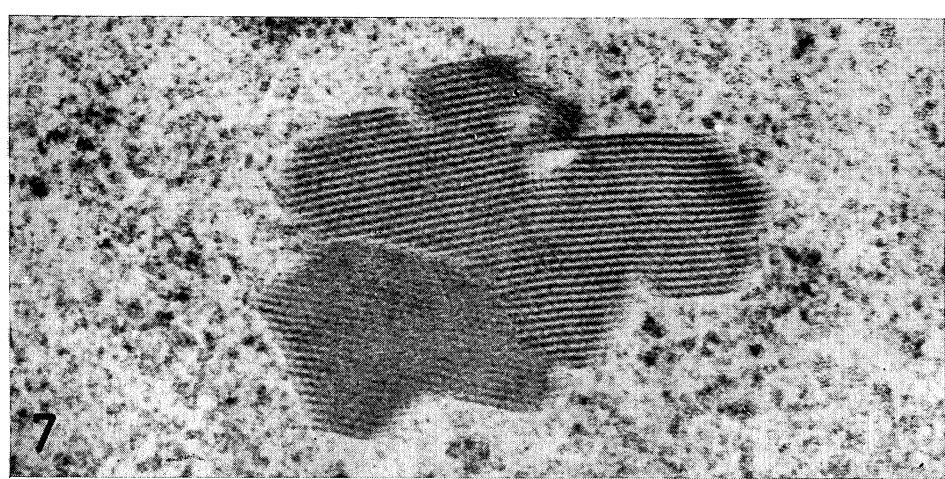
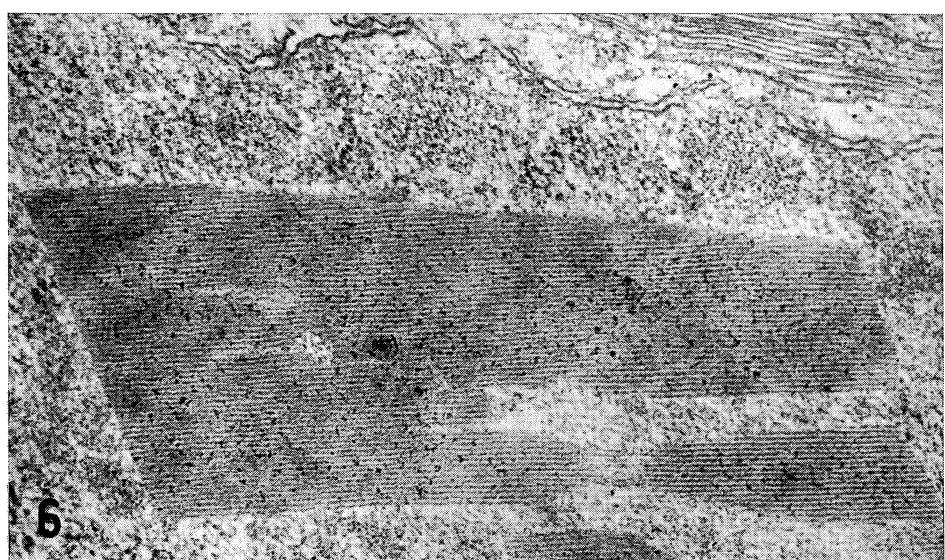


3



4

Figuras 2-4



Figuras 5-7

de inclusiones intracelulares de morfología similar, en cortes ultrafinos de *Brassica pekinensis* infectada con el virus Brassica 3, a las masas de partículas de forma ovoidea observadas en este trabajo; también en el caso del virus Brassica 3 es muy difícil el poder observar las partículas de virus fuera de la célula y ha sido purificado por un método especial. Es tan grande el parecido entre las partículas y la inclusión formada por ellos en ambos virus, Brassica 3 y el que estudiamos, que se hicieron inoculaciones a *B. pekinensis* para ver si se trataba de un virus análogo, pues su tamaño es algo menor, pero estas pruebas repetidas varias veces resultaron negativas; por lo tanto, es lo más probable que se trate de un virus específico del clavel. Ambos virus, tanto el de partículas alargadas como el esférico, no han sido descritos nunca, que nosotros sepamos, como virus del clavel.

Al observar las inclusiones cristalinas en los núcleos de las plantas infectadas creímos que se trataba de inclusiones producidas por la infección de alguno de los dos virus o por la acción conjunta de ellos, pero el haberlas encontrado también en plantas sanas, crecidas en nuestro invernadero a partir de semillas, nos hace pensar que son inclusiones que aparecen en *Dianthus caryophyllus* normalmente y no tienen nada que ver con la infección y es interesante desde el punto de vista citológico, pues existen pocos casos descritos de inclusiones de este tipo en núcleos de células vegetales.

La distribución en la célula y las características de los dos virus parecen indicar que ambos se multiplican sin interferencias e independientemente en la misma célula.

RESUMEN

Cortes ultrafinos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) con síntomas de infección por virus que se describen, virus capaz de ser transmitido a *D. caryophyllus* y *D. barbatus*, mostraron al microscopio electrónico que era una infección producida por dos tipos de partículas de virus, una, alargada, midiendo aproximadamente 660 m μ de longitud, y otra, esférica, de 30,8 m μ de diámetro; ambos tipos de partículas parece que se multiplican en la célula independientemente y formando inclusiones específicas. Estos dos tipos de virus no han sido nunca descritos como patógenos para el clavel.

Tanto los núcleos de *Dianthus caryophyllus* de las células infectadas por los dos virus como los de las plantas de *D. caryophyllus* sanas testigo, presentan inclusiones cristalinas muy típicas, con un espaciado regular y parecen estar formadas por partículas rígidas alargadas.

SUMMARY

Ultrathin sections of *Dianthus caryophyllus* showing symptoms of virus infection transmissible by mechanical inoculation of the sap to *D. caryophyllus* and *D. barbatus*, were observed at the electron microscope, showing two different types of virus particles in the same cells. One, elongated, flexuous, 660 m μ long easily extracted from the cell by «Dip» method or purification by butanol-chloroform method and the other one spherical, 30,8 m μ diameter approximately forming inclusions bodies similar to those induced by *Brassica* virus 3, and very difficult to get out of the cell.

The mitochondria near the inclusion bodies formed by the spherical virus were swollen in one side, chloroplasts were normal and we observed crystalline inclusions in the nuclei of some cells but they were also present in the cells of healthy plants of *Dianthus caryophyllus*. These inclusions were formed by striated material with very regular spacing.

BIBLIOGRAFIA

1. BRANDES, J. 1957. Eine elektronenmikroskopische Schnell-methode zum Nachweis faden und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. Nachrbl. Deut. Pflanzenschutzdienstes Braunschweig, 9, 151-52.
2. FUJISAWA, I.; RUBIO-HUERTOS, M.; MATSUI, C., y YAMAGUCHI, A. 1967. Intracellular appearance of cauliflower mosaic virus particles. Phytopathology, 57, 1.130-33.
3. RUBIO-HUERTOS, M. 1959. Inclusiones intracelulares producidas por diferentes virus del clavel (*Dianthus caryophyllus*). Microbiol. Espan., 12, 331-38.
4. RUBIO-HUERTOS, M.; MATSUI, C.; YAMAGUCHI, A., y KAMEI, T. 1968. Electron microscopy of X-body formation in cells infected with *Brassica* virus 3. Phytopathology, 58, 548-49.
5. STEERE, R. L. 1958. The purification of plant viruses. Advan. Virus Res., 6, 1-73.

Nota

Cuando este trabajo estaba en la imprenta hemos tenido noticias de la descripción de inclusiones cristalinas en plantas sanas de *Dianthus barbatus* y *D. chinensis*, en el trabajo de:

WEINTRAUB, M.; RAGETLI, H. W. J., y VETO, M. 1968. Fine structure of nuclear crystals in leaves of two *Dianthus* species. Am. J. Botany, 55, 214-20.

Estos autores no han encontrado inclusiones intranucleares en *Dianthus caryophyllus* ni otras especies de cariofiláceas, pero nuestros hallazgos parecen significar que estos cristales existen probablemente en todas ellas.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

ESTUDIO DE UN VIRUS DE LA ALFALFA Y ULTRAESTRUCTURA DE LAS HOJAS INFECTADAS

por

M. RUBIO-HUERTOS y R. MORENO

Continuando nuestros estudios sobre virosis de leguminosas (6), en el presente trabajo describimos un virus encontrado en alfalfa y que presenta características bastante diferentes de los virus conocidos en este grupo de virosis.

MATERIAL Y METODOS

En la primavera de 1967 pudimos observar en unas plantaciones de alfalfa, en las afueras de Talavera de la Reina (Toledo) síntomas claros de virosis en más de un 80 % de las plantas. Tomadas muestras de alguna de estas plantas, se hicieron inoculaciones con savia de dichas muestras a las siguientes plantas testigo: *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Cucumis sativus* y *Brassica pekinensis*.

El virus se ha conservado sobre plantas de *Nicotiana tabacum* y *N. glutinosa*, en invernadero.

Examen citológico

Se hicieron arrancamientos de epidermis de hojas de alfalfa *Nicotiana tabacum* y *N. glutinosa*, infectadas con el virus en diferentes tiem-

pos, durante la infección y se tiñeron con floxina al 0,5 % en agua; las preparaciones fueron observadas en un microscopio Zeiss.

Microscopia electrónica

Pequeños trozos de hojas de *Nicotiana tabacum* y *N. glutinosa* que presentaban fuertes síntomas de mosaico, se fijaron en 1 % de tetraóxido de osmio, en tampón de veronal, de Palade, a pH 6,8, durante dos horas, a 4 °C y se deshidrataron en una serie progresiva de mezclas de acetona y agua, dándose los últimos pasos en acetona anhidra, tras lo que los trozos fijados y deshidratados se incluyeron en durcupan; las secciones se hicieron con un ultramicrotomo LKB, se extendieron con vapores de cloroformo y se tiñeron con citrato de plomo, realizándose las observaciones en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas.

RESULTADOS

De las plantas testigo inoculadas dieron síntomas de infección: *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa* y *Phaseolus vulgaris*; no presentaron síntomas de infección: *Vicia faba*, *Cucumis sativus* y *Brassica pekinensis*.

Sintomatología

En *Medicago sativa*, en infección natural se presenta un mosaico fuerte con zonas cloróticas amarillas y enanismo; las hojas de *Phaseolus vulgaris*, a los cinco-seis días de la inoculación presentan lesiones necróticas locales de color rojizo y tamaño mediano; en *Nicotiana tabacum* se pudo apreciar al cabo de unos quince días después de la inoculación, la aparición de mosaico fuerte, anillos cloróticos y, en las plantas infectadas durante más de un mes, deformación de las hojas jóvenes (ahilamiento) y enanismo. En *N. glutinosa* las hojas jóvenes presentan mosaico suave, con algún aclaramiento de las venas y reducción del tamaño de las plantas.

Citología

Examinadas al microscopio tiras de epidermis de hojas de los diversos tipos de plantas infectadas no se encontraron inclusiones intracelulares.



Figura 1. Parte del citoplasma de una célula de hoja de *Nicotiana glutinosa* infectada, mostrando partículas alargadas de virus.
 $\times 36.000$

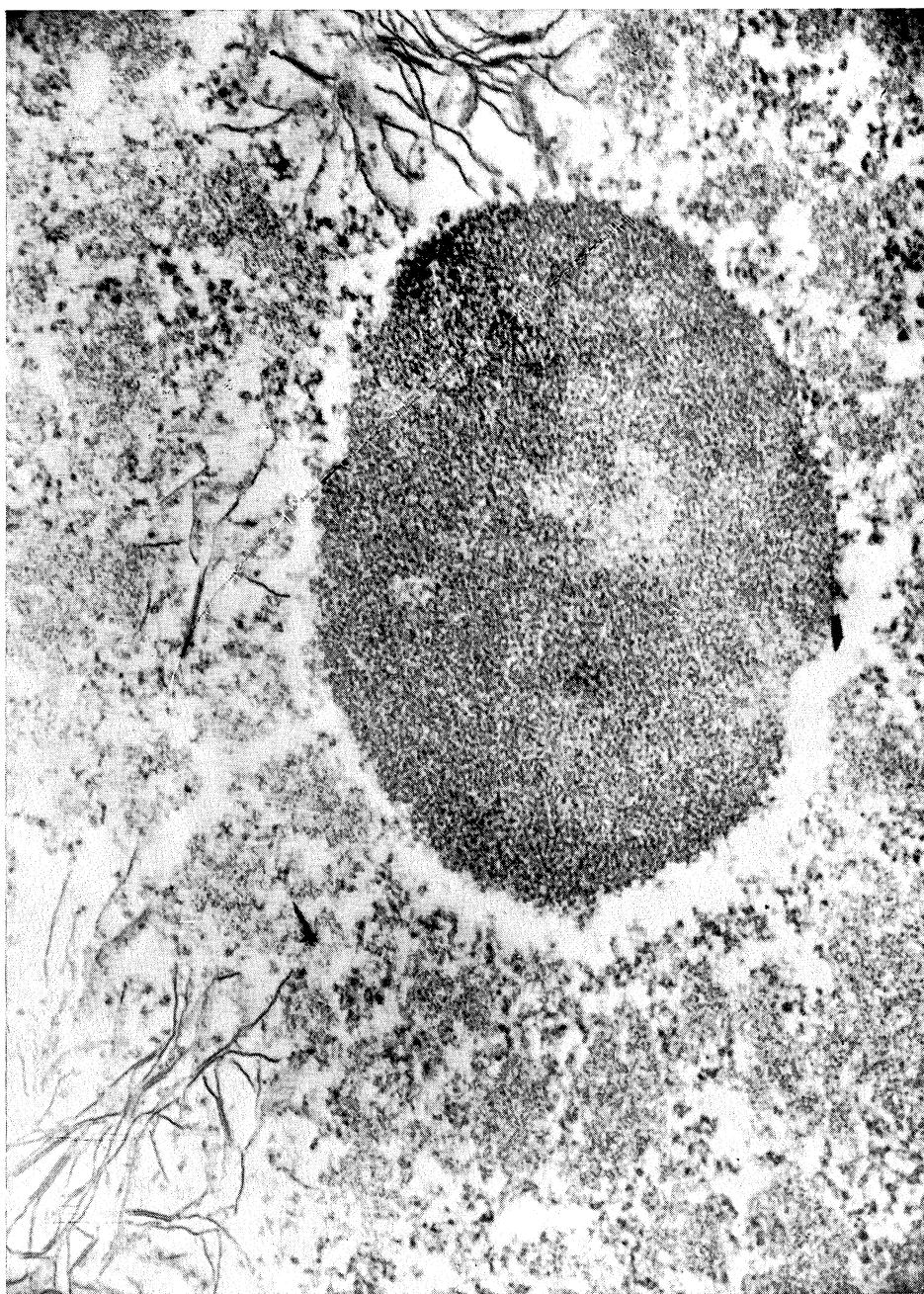


Figura 2. Nucleolo y parte del nucleoplasma de una célula de hoja de *N. glutinosa* infectada, mostrando partículas alargadas semejantes a las de la figura anterior. $\times 43.000$

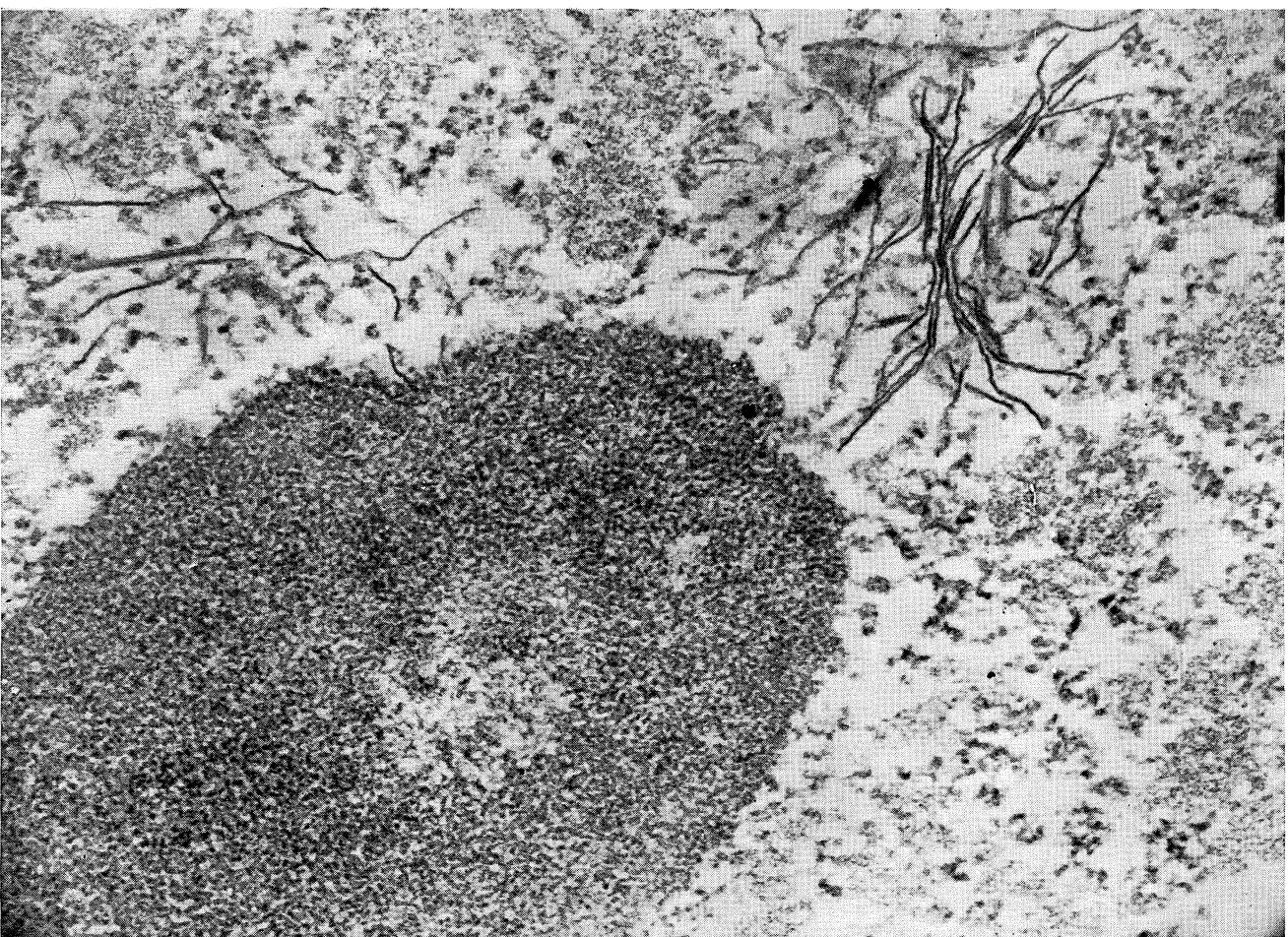


Figura 3. Parte de un nucleolo y nucleoplasma, como en la figura anterior, en las que se ven las partículas, posiblemente de virus, y dos de ellas unidas al nucleolo. $\times 46.000$

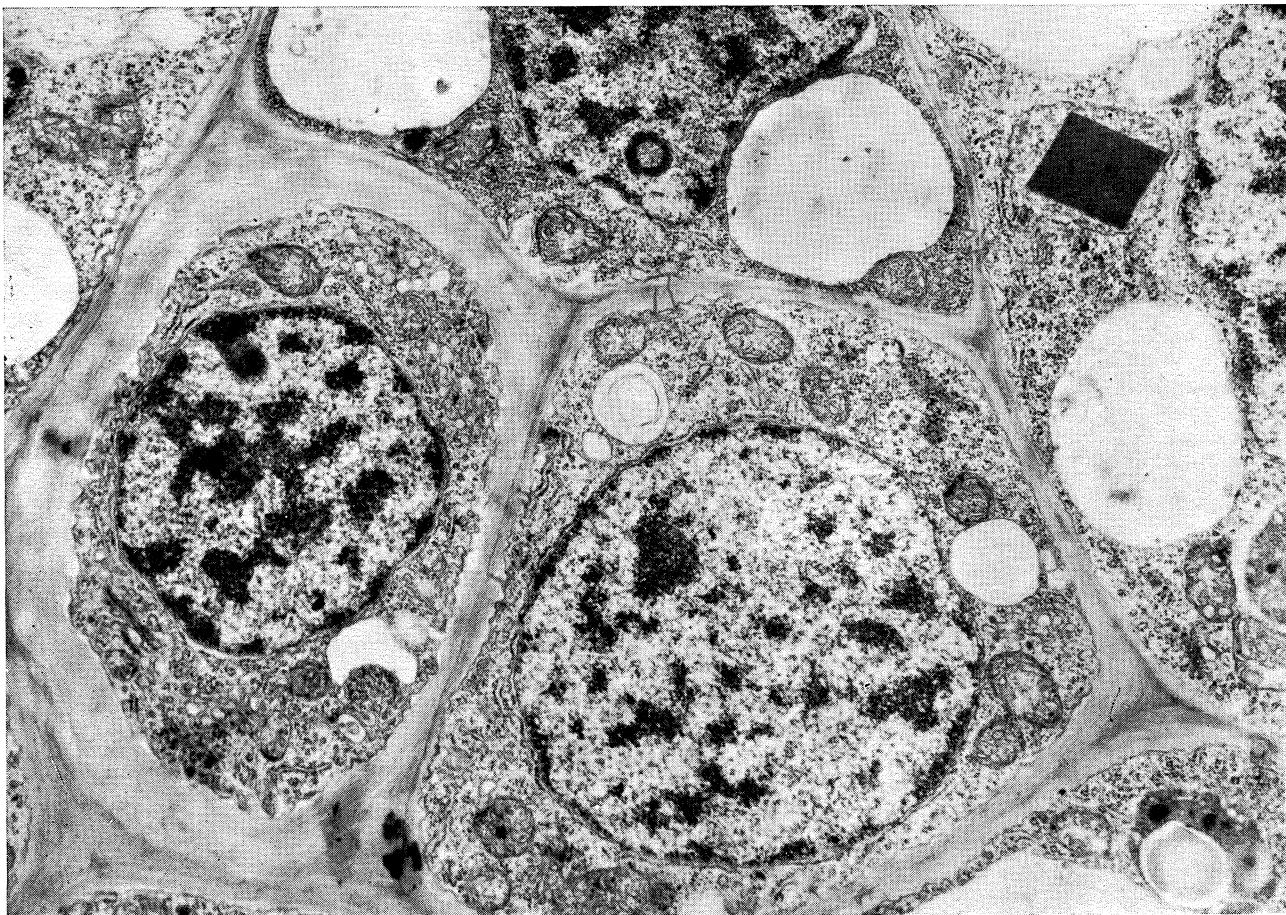


Figura 4. *N. glutinosa*. Grupo de células «primitivas», mostrando en la parte superior derecha un cristaloide. $\times 16.800$

Microscopía electrónica

En tinción negativa por el método de corta inmersión de Brandes sobre una gota de ácido fosfotungstico, al 2 %, no hemos podido observar partículas de virus.

En cortes ultrafinos de hojas de *Nicotiana tabacum* y *N. glutinosa* infectadas pudimos observar al microscopio electrónico las siguientes características:

Las secciones a través de las células del mesofilo mostraron células normales en las cuales, aunque en escaso número de ellas, se pudo observar en el citoplasma partículas alargadas de virus (*figura 1*) y en algunos de los núcleos, en el nucleoplasma, cerca del nucleolo también se pudo observar la presencia de partículas alargadas, de morfología similar a las encontradas en el citoplasma, probablemente de virus (*figuras 2-3*). Al mismo nivel de estas células aparecen grupos pequeños de células de tipo primitivo con grandes núcleos, un reducido citoplasma sin cloroplastos y comienzos de formación de vacuolas; en ellas no hemos encontrado partículas de virus (*figura 4*).

En todas las células de las hojas infectadas, incluso en las de estructura primitiva (*figura 4*) se encuentran en abundancia cristales con estructura semejante a los de proteínas encontrados por diferentes autores, tanto en plantas infectadas por virus como sanas. Estos cristales están generalmente dentro de un orgánulo limitado por una membrana que probablemente corresponde a un esferosoma.

En algunas células de hojas infectadas de *Nicotiana glutinosa* se han podido observar unos cuerpos situados en la vacuola central y rodeados de tonoplasma, formados por ribosomas y partículas esféricas dispuestas en forma cristalina.

En el virus que estudiamos, las partículas que aparecen en el núcleo son idénticas morfológicamente a las observadas en el citoplasma; su cantidad es escasa en ambos lugares y por ello no forman inclusiones visibles al microscopio de luz. Debido a la posible agregación de partículas no hemos podido medir exactamente éstas, pero una media de la medida de 46 partículas aisladas nos da una longitud de 400-420 m μ y un grueso de 18-20 m μ . En los núcleos es donde las partículas parecen encontrarse en mayor estado de agregación.

DISCUSION

Este virus aislado de la alfalfa, por su sintomatología daba la impresión de ser el virus mosaico de la alfalfa descrito en varios países y relacionado serológicamente con el virus Mosaico del tabaco, siendo sus principales características comunes la infección de solanáceas, muy poco corriente en otros virus de leguminosas, y el dar lesiones locales necróticas, rojizas, en *Phaseolus vulgaris*; sin embargo, la observación de cortes ultrafinos de hojas infectadas con este virus muestra partículas finas, alargadas, de tipo muy diferente del referido virus Mosaico de la alfalfa.

Existen pocas referencias de virus de plantas en los que se haya detectado claramente partículas de virus dentro de los núcleos. Goldin y Fedotina (3) pudieron observar partículas de la estirpe Kazakhstan del virus Mosaico del tabaco en los núcleos de células de hojas infectadas con esta estirpe; Rubio-Huertos y García-Hidalgo (4) encontraron cristales y partículas alargadas, morfológicamente iguales a las de virus halladas en citoplasma, en núcleos de plantas infectadas con el virus «Severe etch» (grabado intenso del tabaco). Cronshaw y colaboradores (2) observaron grupos de partículas del virus «Sugar beet yellow» (amarillo de la remolacha) en los núcleos de las células de las hojas de *Beta vulgaris* infectadas con dichos virus. En virus de tipo isométrico, solamente en el «Pea enation mosaic» (virus del mosaico y excrecencias del guisante), se encontró gran acumulación de partículas en los núcleos de las células infectadas. Recientemente, Arnott y Smith (1) han encontrado partículas de un virus no clasificado en núcleos de plantas infectadas con dicho virus, presentando formas helicoidales de gran interés. En general, los virus de plantas aparecen en el citoplasma de las células infectadas formando inclusiones que son características para ciertos grupos de virus; incluso en algunos de los virus citados anteriormente, como el «Severe etch», se piensa que las partículas observadas y las inclusiones cristalinas intranucleares están formadas solamente por la proteína que constituye la cápsida de los viriones sin nucleoide, es decir, les falta el ácido ribonucleico y no son

infectivas. Esto ocurre también en el caso de las inclusiones cristalinas producidas por el virus *Phaseolus 2* (7).

En el virus que estudiamos, la morfología de las partículas que se observan en el núcleo es idéntica a las encontradas en el citoplasma, pero hasta no obtener núcleos aislados y probar la infectividad de estas partículas no podemos decir que sean nucleocápsidas o viriones completos.

Otra característica interesante es la formación de grupos de células pequeñas, de aspecto primitivo, en las hojas infectadas por este virus, que se pueden comparar a pequeños esbozos de tumores. En realidad, otros virus de leguminosas producen excreciones en las hojas, como el virus «Pea enation mosaic» (virus del mosaico y excrecencias del guisante) llamadas «enations», pero están formadas por células normales; es posible que estos pequeños grupos de células primitivas sean el comienzo, que se queda paralizado, de alguna excrecencia o «enation», que no se hace visible macroscópicamente.

En resumen, vemos que las características de este virus difieren bastante de las de la mayoría de los conocidos infectando leguminosas. La escasez o débil concentración de virus en las plantas infectadas hace que sea tarea difícil su purificación y el poder emplear métodos sencillos, como el de corta inmersión de Brandes, para poder estudiar las partículas fuera de las células, en tinción negativa. Estudio que, buscando nuevos métodos, será objeto de un próximo trabajo.

RESUMEN

Un virus aislado de alfalfa, *Medicago sativa*, presenta las siguientes características: infecta *Nicotiana tabacum* y *N. glutinosa* produciendo mosaico y enanismos en ellas; infecta sólo localmente *Phaseolus vulgaris*, dando manchas necróticas, y no infecta *Vicia faba*, *Cucumis sativus* y *Brassica pekinensis*. El virus tiene forma de bastoncillo alargado de unos 400-420 $m\mu$ de largo y 18-20 $m\mu$ de grueso, aproximadamente. En secciones ultrafinas de hojas infectadas se observan partículas de estas dimensiones, tanto en el citoplasma como en los núcleos, aunque en es-

casa cantidad. Estas características no se asemejan a los virus ya conocidos que infectan plantas de leguminosas.

SUMMARY

A virus isolated from spontaneous infected *Medicago sativa* plants was able to infect sistemically *Nicotiana glutinosa* and *N. tabacum* it also induced local, necrotic lesions on the inoculated leaves of *Phaseolus vulgaris* it was unable to infect *Vicia faba*, *Cucumis sativus* and *Bassica* tely, mesured in ultrathin sections of infected *N. glutinosa* and *N. tabacum* leaves. The rod shaped particles were present in the cytoplasm of some cells and in the nuclei as well. Other features of ultrastructure of infected leaves are described.

BIBLIOGRAFIA

1. ARNOTT, H. J., y SMITH, K. M. 1968. Electron microscopic observations of the apparent replication *in vivo* of a plant virus. Virology, 34, 25-35.
2. CRONSHAW, J.; HOEFERT, L. L., y ESAU, K. 1966. Ultrastructural features of *Beta* leaves infected with beet yellows virus. J. Cell Biol., 31, 429-43.
3. GOLDIN, M. I., y FEDOTINA, V. L. 1962. Virus inclusions in the plant cells and the nature of viruses. Proc. Conf. Czechoslovak Plant Virologists, 5th Prague, 114-19.
4. RUBIO-HUERTOS, M., y GARCÍA-HIDALGO, F. 1964. Ultrathin sections of intra-nuclear and intracytoplasmic inclusions induced by Severe etch virus. Virology, 24, 84-90.
5. RUBIO-HUERTOS, M.; SANTAOLALLA, M., y MORENO, R. 1967. Clasificación y distribución de algunos virus de leguminosas en España. Anales Edafol. Agrobiol, XXVI, 763-79.
6. SHIKATA, E., y MARAMOROSCH, K. 1966. Electron microscopy of pea enation mosaic virus in plant cell nuclei. Virology, 30, 439-54.
7. WEINTRAUB, M., y RACETLI, H. W. J. 1966. Fine structure of inclusions and organelles in *Vicia faba* infected with bean yellow mosaic virus. Virology, 28, 290-302.

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

LA SOLUBILIZACION DE FOSFATOS POR HONGOS DEL SUELO

por

A. RAMOS, V. CALLAO y P. C. T. de CARVALHO (*)

INTRODUCCION

Cada día son mayores las publicaciones que vienen realizándose sobre los microorganismos movilizadores de los fosfatos (6, 9 y 14), principalmente con gérmenes aislados de la rizosfera o raíces de los vegetales (3 y 18), sugiriéndose, incluso, que tales seres microbianos juegan un papel importante en la nutrición de los vegetales.

La importancia de la investigación de estos microorganismos solubilizadores de fosfatos es enorme; pues a su posible aplicación directa como fertilizantes microbianos en el suelo (12 y 15), debe unirse el interés científico que presenta, como, por ejemplo, el estudio de los mecanismos bioquímicos por los que se realiza la solubilización de los fosfatos (5 y 7), que pese a lo mucho estudiado sigue discutiéndose y sin aclararse totalmente; así como los intentos de aplicación de la técnica de la solubilización de los fosfatos, ensayada por nosotros mismos, como de interés en la diferenciación de ciertos microorganismos (10).

A parte de las anteriores consideraciones, debemos destacar los escasos trabajos realizados correspondientes al análisis de la flora fúngica existente en los suelos de España, lo que creemos puede ser de significante interés para la realización del trabajo.

(*) Departamento de Fitopatología e Microbiología da Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», Universidade de São Paulo.

MATERIAL Y METODO

Se han examinado dieciocho muestras de suelo pertenecientes a varias zonas agrícolas de Andalucía (España). Las muestras eran recogidas en bolsas de plástico y de esta forma transportadas al laboratorio. Por el procedimiento de rutina de las diluciones seriadas, se preparaban suspensiones de suelo sembrando las correspondientes a las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .

Para realizar el aislamiento de los hongos empleamos el medio de Martín, glucosa (10 g), peptona (5 g), $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (1 g), SO_4Mg (0,5 g), rosa de bengala (1 : 30.000), agar (20 g), solución de estreptomicina al 10^{-2} (3 ml) y agua destilada (c. s. p. 1.000 ml); en la preparación del medio seguimos la técnica descrita por Allen (1).

Una porción alícuota (1 ml) de la dilución del suelo era colocada en una placa a la que se le agregaba 12 ml del medio de Martín, agitando bien para facilitar la homogenización. A continuación, las placas eran incubadas a 28 °C durante cuarenta y ocho horas, momento en el que realizábamos el recuento de las colonias.

Para investigar los hongos solubilizadores de los fosfatos se tomaban al azar veinticinco colonias, que eran resembradas en un medio de extracto de levadura (0,2 %) y agar (2 %), al que se agregaba, con las debidas precauciones de esterilidad, 1 ml de solución de glucosa al 20 % y 1 ml de suspensión de fosfato dicálcico al 1 %, para cada 12 ml de medio de cultivo, de acuerdo con el procedimiento descrito por nosotros (10-11) y con las observaciones realizadas por Webley (16).

Las placas eran incubadas a 28 °C y las lecturas realizadas a las setenta y dos horas; antes de transcurrido ese tiempo, en numerosos casos también aparecía solubilización, pero el esperar este intervalo era para hacer más uniforme el criterio de solubilización. Cuando ésta se producía (a partir del fosfato dicálcico), podía fácilmente apreciarse la formación de un halo alrededor de la colonia. Estas colonias eran resembradas en tubos para su examen e identificación.

Las estirpes aisladas que mostraban actividad eran posteriormente examinadas frente a otros fosfatos como apatito, fosforita blanca, fosforita negra, fosfato tricálcico, fosfato alumínico y también sobre el glice-

rofosfato cálcico empleando la misma técnica descrita en el estudio de la solubilización del fosfato dicálcico.

Con el fin de observar las posibles diferencias de operar con los fosfatos o con el medio alcalinizado, efectuamos las experiencias en ambas condiciones; es decir, en unos casos usamos un medio de cultivo a un pH = 8 y la solución de fosfatos sin neutralizar, y en el otro utilizábamos medio de cultivo a pH = 7,2 y el fosfato alcalinizado a pH = 8, antes de esterilizar.

RESULTADOS

Van todos ellos recopilados en los cuadros que acompañan el trabajo. En el *cuadro 1* señalamos la incidencia de la flora fúngica del suelo, y el tanto por ciento de los solubilizadores de fosfatos; en el *cuadro 2* agrupamos los hongos solubilizadores aislados; en los *cuadros 3-4* se exponen los resultados de la solubilización en placa de diversos fosfatos en condiciones distintas; en el *cuadro 5* se agrupan los resultados obtenidos con el *Aspergillus niger*. Finalmente, el *cuadro 6* indica el poder de solubilización de los distintos hongos aislados.

DISCUSION

La mayoría de las muestras se recogieron en terrenos dedicados al cultivo del olivo; tres de ellas en terrenos con alfalfa; y una fue recogida en tierra de jardín; sin que pueda decirse existan diferencias en la población fúngica del suelo, ni en la proporción de los solubilizadores de fosfatos. El tanto por ciento final encontrado para los hongos solubilizadores fue aproximadamente un 11 %, como fácilmente puede deducirse del *cuadro 1*.

Quizá a modo de generalización, podemos establecer un predominio de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, predominio que se hace más patente en primavera, apareciendo como verdaderos solubilizadores, mientras que en invierno la proporción de tales hongos era relativamente inferior respecto a la existencia de otros. Las cifras de hongos solubilizadores no muestran diferencias apreciables con los resultados encontrados en la semilla y en las raíces de las plantas por otros autores (6).

Cuadro 1. Población fúngica del suelo

Muestra		Procedencia		Número de hongos/g de suelo			Naturaleza del cultivo
Número	Fecha	Ciudad	Provincia	Total	Solubilizadores	Porcentaje	
S-1	12-66	Granada	Granada				Alfalfa
S-2	1-67	Granada	Granada	26.500	4.200	15,9	Jardín
S-3	1-67	Granada	Granadá	53.300	8.800	15,9	Alfalfa
S-4	1-67	Granada	Granada	31.000	3.700	12,0	Alfalfa
S-5	1-67	Concejal	Sevilla	96.500			Olivo
S-6	1-67	Montes de San Miguel	Córdoba	53.500	4.300	8,0	Olivo
S-7	1-67	Antequera	Málaga	48.800			Olivo
S-8	2-67	Antequera	Málaga	86.000	13.800	16,0	Olivo
S-9	2-67	Villanueva, Algaida	Málaga	60.000	4.800	8,0	Olivo
S-10	2-67	Linares	Jaén	102.000	12.200	12,0	Olivo
S-11	2-67	Sierra Nevada	Granada	88.000	3.900	4,4	Olivo
S-12 (*)	4-67	Linares	Jaén	7.300	800	10,9	Olivo
S-13 (*)	4-67	Linares	Jaén	82.000	19.700	24,0	Olivo
S-14 (*)	4-67	Linares	Jaén	8.500	3.400	40,0	Olivo
S-15 (*)	4-67	Linares	Jaén	5.000	800	16,0	Olivo
S-16 (*)	4-67	Villanueva, Algaida	Málaga	4.900	800	16,3	Olivo
S-17 (*)	4-67	Linares	Jaén	22.000	6.200	28,1	Olivo
S-18 (*)	4-67	Linares	Jaén	9.800	1.200	12,2	Olivo
Valor medio				46.300	5.200	11,2	

(*) Por dificultades del laboratorio se demoró el aislamiento; posible explicación de que la cifra vaya reducida.

Nuestros resultados fueron en cierto aspecto similares a los descritos por la mayoría, que destaca a los *Penicillium* y *Aspergillus* como los principales solubilizadores (6 y 9). El *Rhizopus*, también citado, aunque muy frecuentemente aislado en los suelos andaluces no presentó propiedades solubilizadoras (*cuadro 2*), observando que Henderson y Duff (4), en un trabajo sobre la solubilización de minerales y silicatos por hongos del suelo, tampoco mencionan la solubilización por especies del género *Rhizopus*. Diferencias parciales se han encontrado respecto a ciertos géneros solubilizadores; describiéndose distintos tipos de hongos, entre los que no existe conexión de unas a otras publicaciones; en parte es explicable admitiendo que tal tipo de microorganismos son específicos de determinados suelos, en los que se encuentran de forma normal, pero no muy abundantes.

Cuadro 2. Hongos solubilizadores aislados

Especie	Frecuencia
<i>Aspergillus</i> (total: 26)	
<i>A. niger</i>	16
<i>A. candidus</i>	1
<i>A. clavatus</i>	1
<i>A. fumigatus</i>	1
<i>Aspergillus</i> spp.	7
<i>Penicillium</i> (total: 29)	
Serie <i>Monoverticillata</i>	12
Serie <i>Biverticillata-symmetrica</i>	3
Serie <i>Asymmetrica</i>	9
Serie <i>Polyverticillata-symmetrica</i>	5
<i>Fusarium</i> spp.	2
<i>Mucor</i> sp.	1
<i>Coniothyrium fuckelii</i>	1
<i>Thielavia (?)</i> sp.	1
<i>Chaetomium</i> sp.	1
F-6 (extraviado)	1
Total	62

Cuadro 3. Acción de hongos del suelo sobre fosfatos sin neutralizar

Estirpe	Fosfato tricálcico	Fosfato aluminíco	Fosforita blanca	Fosforita negra	Apatito	Glicero-fosfato
<i>Aspergillus</i>						
<i>A. niger</i> , blanca (F2)	++	*	*	*	*	*
<i>A. niger</i> , amarilla (F28)	*	*		*	*	
<i>A. candidus</i> (F15)	++	+			+	
<i>A. clavatus</i> (F23)	++					
<i>A. fumigatus</i> (F35)	+					
<i>Aspergillus</i> sp. (F8)	+					
<i>Aspergillus</i> sp. (F21)	+					
<i>Aspergillus</i> sp. (F25)	++					
<i>Aspergillus</i> sp. (F54)	+					
<i>Aspergillus</i> sp. (F56)	++					
<i>Aspergillus</i> sp. (F62)	++					
<i>Penicillium</i>						
Serie <i>monoverticillata</i>						
<i>Penicillium</i> sp. (F1)	+					
<i>Penicillium</i> sp. (F36)	+					
<i>Penicillium</i> sp. (F39)	+					
<i>Penicillium</i> sp. (F48)	+					
<i>Penicillium</i> sp. (F57)	++					
<i>Penicillium</i> sp. (F59)	+					

Cuadro 3 (conclusión)

Estirpe	Fosfato tricálcico	Fosfato aluminico	Fosforita blanca	Fosforita negra	Apatito	Glicero-fosfato
<i>Serie biverticillata-symmetrica</i>						
<i>Penicillium</i> sp. (F4)	+	—	—	++	—	—
<i>Penicillium</i> sp. (F32)	++	+	—	++	—	+
<i>Penicillium</i> sp. (F38)	++	—	—	++	—	—
<i>Serie asymmetrica</i>						
<i>Penicillium</i> sp. (F17)	+	×	—	×	×	—
<i>Penicillium</i> sp. (F24)	++	+	—	++	—	+
<i>Penicillium</i> sp. (F45)	+	—	—	++	—	—
<i>Penicillium</i> sp. (F49)	+	—	—	++	—	—
<i>Serie polyverticillata-symmetrica</i>						
<i>Penicillium</i> sp. (F13)	+	—	—	—	+	—
<i>Penicillium</i> sp. (F26)	+	—	—	++	—	—
<i>Penicillium</i> sp. (F46)	+	—	—	++	—	—
<i>Penicillium</i> sp. (F47)	+	—	—	++	—	—
<i>Fusarium roseum</i> (F11)	+	—	—	—	—	—
<i>Fusarium</i> sp. (F3)	+	—	—	—	—	—
<i>Coniothyrium fuckelii</i> (F9)	++	—	—	—	—	—
<i>Mucor</i> sp. (F5)	+	—	—	—	—	—
<i>Thielavia</i> (?) sp. (F18)	++	—	—	—	++	—
<i>Chaetomium</i> sp.	+	+	×	—	—	+
Total	34	8	9	24	7	10
Porcentaje		23,5	26,4	70,5	20,5	29,4

Clave: ++, solubilización muy intensa; ×, solubilización dudosa; *, solubilización y precipitación; +, solubilización manifiesta; —, ausencia de solubilización.

Cuadro 4. Acción solubilizadora de hongos del suelo sobre fosfatos (alcalinizados)

Estirpe	Fosfato dicálcico	Fosfato alumínico	Fosforita blanca	Fosforita negra	Apatito	Glicero-fosfato
<i>Aspergillus</i>						
<i>A. niger</i> , blanca (F2)	*	*	*	*	*	* + + x +
<i>A. niger</i> , amarilla (F28)	*	++	*	*		+ + x
<i>A. candidus</i> (F15)	—	—	—	—		
<i>A. clavatus</i> (F23)	—	—	—	—		
<i>A. fumigatus</i> (F35)	—	—	—	—		
<i>Aspergillus</i> sp. (F8)	—	—	—	—		
<i>Aspergillus</i> sp. (F21)	—	—	—	—		
<i>Aspergillus</i> sp. (F25)	—	—	—	—		
<i>Aspergillus</i> sp. (F54)	—	—	—	—		
<i>Aspergillus</i> sp. (F56)	—	—	—	—		
<i>Aspergillus</i> sp. (F62)	—	—	—	—		
<i>Penicillium</i> spp.						
Serie monoverticillata						
<i>Penicillium</i> sp. (F1)	—	—	—	—		
<i>Penicillium</i> sp. (F36)	—	—	—	—		
<i>Penicillium</i> sp. (F39)	—	—	—	—		
<i>Penicillium</i> sp. (F48)	—	—	—	—		
<i>Penicillium</i> sp. (F57)	—	—	—	—		
<i>Penicillium</i> sp. (F59)	—	—	—	—		

Cuadro 4 (conclusión)

Estirpe	Fosfato dicálcico	Fosfato aluminico	Fosforita blanca	Fosforita negra	Apatito	Glicero-fosfato
<i>Serie biverticillata-symmetrica</i>						
<i>Penicillium</i> sp. (F4)	++	—	—	++	—	—
<i>Penicillium</i> sp. (F32)	+	—	—	++	—	—
<i>Penicillium</i> sp. (F38)	++	—	—	++	—	—
<i>Serie asymmetrica</i>						
<i>Penicillium</i> sp. (F17)	+++	—	—	++	—	++
<i>Penicillium</i> sp. (F24)	+++	—	—	++	—	++
<i>Penicillium</i> sp. (F45)	++	—	—	++	—	++
<i>Penicillium</i> sp. (F49)	++	—	—	++	—	++
<i>Serie polyverticillata-symmetrica</i>						
<i>Penicillium</i> sp. (F13)	—	—	—	++	—	—
<i>Penicillium</i> sp. (F26)	—	—	—	++	—	—
<i>Penicillium</i> sp. (F46)	—	—	—	++	—	—
<i>Penicillium</i> sp. (F47)	—	—	—	++	—	—
<i>Fusarium roseum</i> (F11)	—	—	—	—	—	—
<i>Fusarium</i> sp. (F3)	—	—	—	—	—	—
<i>Coniothyrium fuscum</i> (F9)	—	—	—	—	—	—
<i>Mucor</i> sp. (F5)	—	—	—	—	—	—
<i>Thielavia</i> (?) sp. (F18)	—	—	—	—	—	—
<i>Chaetomium</i> (F16)	—	—	—	—	—	—
Total	18	4	2	19	2	15
Porcentaje	52,9	11,7	5,8	55,9	5,8	44,1

Cuadro 5. Variación entre los Aspergillus niger aislados, en relación con la solubilización de los fosfatos

Características del micelio	Estirpe	Fosfato dicálcico	Fosfato alumínico	Fosforita blanca	Fosforita negra	Apatito	Glicero-fosfato
Blanco	F-2	++	++	*	*	*	*
Blanco	F-7	++	-	*	*	*	*
Blanco	F-10	++	+	*	*	*	*
Blanco	F-12	++	*	*	*	*	*
Blanco	F-14	++	*	*	*	*	*
Amarillo	F-28	*	*	-	*	*	-
Blanco	F-29	*	*	*	*	*	*
Blanco	F-30	*	*	*	*	*	*
Amarillo	F-31	*	*	*	-	*	*
Amarillo	F-33	*	+	*	*	*	*
Amarillo	F-34	*	+	-	*	*	*
Amarillo	F-53	*	*	+	*	*	*
Blanco	F-55	*	*	-	-	+	-
Amarillo	F-58	*	-	-	-	+	-
Amarillo	F-60	*	-	-	-	+	-
Amarillo	F-61	*	+	*	-	+	-

Los hongos de menor frecuencia fueron diversas especies del género *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. clavatus* y *A. fumigatus*), dos especies no identificadas del género *Fusarium*, una del *Mucor*; el *Coniothyrium fuckelii*, que tiene interés por no haber sido descrito como solubilizador, y con la peculiaridad de ser muy solubilizador del fosfato dicálcico, y débil de otros fosfatos o no solubilizador; también creemos interesante un hongo no identificado perteneciente a *Chaetomium*; y la existencia de un ascomiceto, posiblemente del género *Thielavia*, como solubilizador de fosfatos.

Los hongos mayormente solubilizadores fueron, sin duda de ninguna clase, los correspondientes al *Aspergillus niger*; en ellos apreciamos una señalada diferencia en el color del micelio, describiendo dos tipos, uno que denominamos blanco o raza de micelio blanco y el otro tipo que denominamos amarillo, o raza de micelio amarillo, de acuerdo con Gilman (2); fue verdaderamente significativo el encontrar semejanzas en la solubilización de las razas blancas, por un lado, y de las amarillas, por otro; así la solubilización del apatito se realizó por la variedad blanca y no por la amarilla. Existieron algunas excepciones en ese similar comportamiento de las distintas razas, siendo más acusadas las discrepancias en la variedad de micelio amarillo (*cuadro 5*).

También se apreciaron semejanzas en otros casos, por ejemplo, distintas especies de *Penicillium* pertenecientes a la serie *monoverticillata*, tuvieron ciertas analogías; más acentuadas, si cabe, en la serie *biverticillata-symmetrica*. Debemos señalar a este respecto que todas las especies descritas fueron aisladas como diferentes por rasgos de tipo morfológico (primer criterio que se tiene presente en la clasificación de los hongos), por lo que resulta aún más interesante esta posible agrupación fisiológica.

Además apreciamos claras diferencias en el comportamiento de los diferentes hongos aislados en relación con la solubilización del fosfato. La observación de casos de interferencia y líneas de precipitación fue también frecuente, así como la forma de solubilización, apareciendo en algunos casos una reprecipitación, en otros, una solubilización manifiesta, y en otros, solubilizaciones francamente dudosas. Todo ello nos sugiere la posibilidad de utilizar la técnica de solubilización de fosfatos en placa como carácter de interés sistemático en la diferenciación o agrupamiento de las diferentes razas de hongos. Es indudable que las diferencias apreciadas por nosotros corresponden a un comportamiento fisiológico

distinto en los hongos ensayados, por lo que al existir tales diferencias o semejanzas nos ofrece la posibilidad de separar y reagrupar a los diferentes hongos esta técnica empleándola con carácter sistemático. La posibilidad de aplicación de tal técnica ya fue sugerida por nosotros en un trabajo anterior, aunque entonces nos refiriéramos a otro tipo de microorganismos (las bacterias) (10).

Poco comentario ofrece la solubilización cualitativa de los distintos fosfatos utilizados, que va detallada en los cuadros 3-4; podemos destacar la observación de claras diferencias al trabajar de una u otra manera; sin embargo, el grupo de hongos que consideramos como fuertemente sulubilizadores persistían en su capacidad de solubilización, tanto se operase con una u otra técnica, siendo normalmente más variables aquellos en los que la solubilización muchas veces no era completamente manifiesta. El fosfato dicálcico fue el más solubilizado, aunque debamos señalar que fue el elegido para determinar si un hongo era o no solubilizador de los fosfatos; es posible que de haber empleado otro tipo de fosfato en el aislamiento no se hubiera producido solubilización en todos los casos. Le siguió como fosfato solubilizado la fosforita negra. Detalle interesante fue la solubilización del fosfato de aluminio, normalmente difícil de realizar, siendo tan sólo solubilizado por los *Aspergillus* en los fosfatos previamente neutralizados (alcalinizados), y por algunos *Penicillium*; aparte de otros *Aspergillus* en los fosfatos sin neutralizar. Con simple carácter diferencial expusimos las semejanzas y diferencias referentes a un fosfato orgánico, utilizando el glicerofosfato cálcico para poder apreciar la solubilización del mismo, teniendo en cuenta que cuando se produce solubilización del glicerofosfato no quiere decir que deba producirse liberación de fosfato inorgánico, sino simplemente que se aprecia una solubilización. Para determinar la liberación de fósforo tendríamos que acudir a una valoración (12).

Hecho observado fue la precipitación manifiesta en placa, que se apreció de forma más acusada en el género *Aspergillus*, aunque también se produjera en otros hongos (*Penicillium*). La investigación del precipitado nos llevó a la conclusión de que se trataba de oxalato cálcico, originado como consecuencia de la formación de ácido oxálico por los *Aspergillus*. Los cristales podían fácilmente observarse microscópicamente—apreciándose también cristales en otros hongos como el *Conio-*

thyrium fuckelii—, aunque para mayor seguridad lo investigáramos cromatográficamente por el procedimiento de Paskova y Munk (8).

Finalmente realizamos una agrupación de los hongos aislados, de acuerdo con su poder de solubilización de los fosfatos. Establecimos cuatro grupos (*cuadro 6*), siendo el *Aspergillus niger* el hongo que produjo una mayor solubilización, seguido en su poder de solubilización por otros *Aspergillus* no identificados y por diferentes especies del género *Penicillium*.

Cuadro 6 Distribución de los hongos de acuerdo con su poder de solubilización

Característica de la solubilización	Hongos solubilizadores
Fuertemente solubilizadores	<i>Aspergillus niger</i> (todas las estirpes)
Solubilizadores	<i>Aspergillus</i> spp. (F21 y F56) <i>Penicillium</i> spp. (F24, F46, F49 y F59)
Débilmente solubilizadores	<i>Penicillium</i> spp. (F1, F4, F36, F39, F45 y F47) <i>Aspergillus</i> spp. (F8, F25, F54 y F62) <i>A. clavatus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>Fusarium</i> sp. (F3) <i>Mucor</i> sp. (F5) <i>Coniothyrium fuckelii</i> <i>Thielavia</i> (?) sp.
Solubilización variable	<i>Penicillium</i> spp. (F13, F17, F26, F32, F38, F48 y F57) <i>Aspergillus candidus</i> <i>Fusarium roseum</i> <i>Chaetomium</i> sp.

RESUMEN

Los autores estudian la solubilización de fosfatos por varios hongos aislados del suelo en diferentes regiones andaluzas. En las estirpes aisladas se estudia su poder solubilizador frente a los fosfatos dicálcico, tri-

cálcico y alumínico, fosforita negra y blanca, apatito y glicerofosfato cálcico; con el empleo de la técnica de solubilización de fosfatos en placas.

Especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* fueron las más frecuentemente aisladas, y, al mismo tiempo, las que presentaban mayor poder de solubilización. También se aislaron otros hongos particularmente interesantes como *Conyothirium fuckelii*, *Fusarium* spp., *Mucor* sp., *Thielavia* (?) sp, y un hongo perteneciente a *Chaetomium*.

Entre todos los hongos aislados, el *Aspergillus niger* fue el más frecuente y el más solubilizador; siendo posible apreciar la existencia de dos razas distintas y diferenciarlas, no sólo por las características morfológicas (color del micelio blanco o amarillo), sino también por las diferencias encontradas en su poder solubilizador frente a los diferentes fosfatos. Sugiriéndose la posibilidad de utilizar tal técnica en la diferenciación de otras razas.

Entre los fosfatos ensayados, el dicálcico y la fosforita negra fueron los de más fácil solubilización.

SUMMARY

The authors studied phosphate solubilization by means of soil fungi isolated from different regions of Andalucia (Spain). The isolates were studied by their ability to dissolve dicalcium phosphate, tricalcium phosphate, aluminium phosphate, black phosphorite, white phosphorite, apatite, and calcium glycerophosphate; by using a plate technique.

The phosphate-dissolving fungi isolated most frequently were species of *Penicillium* and *Aspergillus*; in addition *Conyothirium fuckelii*, *Fusarium* spp., *Mucor* sp., *Thielavia* (?) sp., and a non-identified *Chaetomium* sp. were also isolated.

Aspergillus niger was most frequent and active. It was possible to appreciate two different strains of *A. niger*, quite different not only due to their morphological characteristics but also on account of differences of their ability to phosphate solubilization. The authors suggest to use this technique in the identification of other fungi strains.

Dicalcium phosphate and black phosphorite were the phosphates easiest to solubilize.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, O. N. 1951. Experiments in Soil Bacteriology. Burgess Publishing Co., Minneapolis 15, Minnesota.
2. GILMAN, J. C. 1957. A Manual of Soil Fungi. The Iowa State College Press., Ames, Iowa.
3. GREAVES, M. P., y WEBLEY, D. M. 1965. A study of the breakdown of organic phosphates by microorganisms from the root region of certain pasture grasses. *J. Appl. Bacteriol.*, 28, 454-65.
4. HENDERSON, M. E. K., y DUFF, R. B. 1963. The release of metallic and silicate ions from minerals, rocks and soils by fungal activity. *J. Soil Sci.*, 14, 236-46.
5. HOFMANN, E. 1958. Die Bedeutung der Phosphorsäure beim Rotteprozess ihre Festlegung und Lösung durch biologische Faktoren. *Phosphorsäure*, 18, 172-76. [Soils Fertilizers, 21, 379 (2.212)].
6. KATZNELSON, H.; PETERSON, E. A., y ROUATT, J. W. 1962. Phosphatedissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Can. J. Botany*, 40, 1.181-86.
7. Louw, H. A., y WEBLEY, D. M. 1959. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. *J. Appl. Bacteriol.*, 22, 227-33.
8. PASKOVA, J., y MUNK, V. 1960. A combined detecting reagent for the identification of organic acids on paper chromatograms. *J. Chromatog.*, 4, 241-43.
9. RAGHU, K., y MACRAE, I. C. 1966. Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. *J. Appl. Botany*, 29, 582.
10. RAMOS, A., y CALLAO, V. 1967. El empleo de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana. *Microbiol. Español*, 20, 1-12.
11. RAMOS, A.; DÍAZ, R. M., y CALLAO, V. 1967. Comparación de diversos métodos rápidos y sencillos en la investigación de la acción microbiana sobre los carbohidratos. *Ars Pharm.*, 8, 175-80.
12. RAMOS, A.; OLIVER, J., y CALLAO, V. 1966. Estudio de la acción de una nueva forma de fosfobacterina (comprimidos de *Bacillus megatherium*) sobre el glicerofosfato cálcico. *Ars Pharm.*, 7, 329-35.
13. SUBBA-RAO, H. S., y BAGPAI, P. D. 1965. Fungi on the surface of legume root nodules and phosphate solubilization. *Experientia*, 21, 386.
14. TARDIEUX-ROCHE, A. 1966. Contribution à l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. Thèse, Faculté des Sciences, Université de Paris.
15. UAROVA, V. N. 1956. Bacteria de composing tricalcium phosphate. *Dokl. Akad. Nauk SSSR Ser. Kim.*, 21, 22-26. [Soils Fertilizers, 19, 514].
16. WEBLEY, D. M. 1961. Evaluation of the plate technique in use for studying phosphate-dissolving micro-organisms. *Trans. Intern. Congr. Soil Sci.*, 7th. Madison, Wisc. 1960, 4, 657-63.

**LABORATORIOS ALTER
Y
LABORATORIOS FARMABION**

VALORACION DE ACIDO FUSIDICO CON *BACILLUS LICHENIFORMIS*

por

F. FERNANDEZ y M. PIÑA

INTRODUCCION

El ácido fusídico es un antibiótico producido por el *Fusidium coccineum*. La forma comercial empleada en terapéutica es la sal sódica, que es muy soluble. Su constitución química corresponde a un esteroide sin efecto hormonal. La importancia del ácido fusídico radica en su potente acción sobre los estafilococos resistentes a la penicilina, presentando al mismo tiempo un notable sinergismo con este último antibiótico. Por otro lado, la sal sódica del ácido fusídico es muy poco tóxica y en aplicación local no produce reacciones alérgicas ni sensibilización.

En este trabajo presentamos un procedimiento sencillo para valorar microbiológicamente el ácido fusídico. Dicha técnica la empleamos rutinariamente en nuestros laboratorios.

En dos publicaciones anteriores (3-4) estudiamos la valoración de estreptomicina y de neomicina con *Bacillus licheniformis*, estirpe Alter. Este microorganismo da lugar a un crecimiento perfectamente homogéneo y es muy fácil de manejar, por lo que probamos a valorar el ácido fusídico utilizando dicho organismo como germe de ensayo.

MATERIAL Y METODOS

Los detalles técnicos para la valoración son los mismos que describimos anteriormente (3-4) por lo que se refiere a la preparación de la suspensión de esporas, placas de ensayo, etc. El medio de ensayo es el medio A de la Farmacopea Británica, ajustado a pH = 6,0 y se utiliza en una sola capa. La cantidad de suspensión de esporas que hay que añadir al medio se averigua la primera vez mediante tanteo y esto sirve de orientación para veces sucesivas. El tampón utilizado para efectuar las diluciones fue de fosfatos 0,1 M, pH = 6,0.

Para la curva patrón se usaron cinco concentraciones diferentes, en progresión geométrica, lo cual nos permite el empleo de coeficientes polinominales u ortogonales en el cálculo estadístico. En este caso, la relación entre las concentraciones fue de 1,30, siendo la más pequeña de 31,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ y la mayor de 90,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. El producto empleado fue la sal sódica del ácido fusídico.

El diseño utilizado para distribuir las distintas concentraciones fue en forma de cuadrado latino, con cinco lecturas para cada concentración.

La temperatura de incubación fue de 32 °C durante un período de alrededor de dieciocho horas.

El crecimiento del germen en las placas fue perfectamente homogéneo y los halos de inhibición que se obtuvieron resultaron nítidos y de borde bien definido.

Las lecturas se efectuaron con un calibrador apropiado, obteniéndose en milímetros y décimas de milímetro.

La bibliografía general para este tipo de ensayos puede encontrarse en uno de los trabajos a que aludimos anteriormente (3). Información sobre el ácido fusídico puede encontrarse en trabajos de otros autores (5-7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 pueden verse los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones. Para el cálculo estadístico se emplean los coeficientes polinominales en vez de los logaritmos de las concentraciones.

Cuadro 1

Concentraciones, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	31,5	41,0	53,3	69,2	90
Logaritmos de las concentraciones	1,49848	1,61242	1,72636	1,84030	1,95424
Coeficientes polinomiales, X	- 2	- 1	0	+ 1	+ 2
Resultados en milímetros, Y	20,2 20,0 20,2 20,0 20,0	21,2 21,2 21,0 21,2 21,4	22,2 22,4 22,2 22,0 22,4	23,0 23,2 23,4 23,4 23,2	23,9 24,0 24,2 24,4 24,2
Totales, T	100,4	106,0	111,2	116,2	120,7
Medias, Z	20,08	21,20	22,24	23,24	24,14

Para el estudio estadístico de los resultados empleamos las mismas fórmulas y procedimientos que en trabajos anteriores (2-4).

Cálculo de la línea de regresión

Como ya conocemos, en este caso particular el coeficiente de regresión viene dado por la fórmula

$$b = \frac{S(XZ)}{S(X^2)}$$

El valor calculado para b es de 1,016. Esto quiere decir que la ecuación para la línea de regresión será

$$Z = \bar{Z} + 1,016 X$$

$$Z = 22,18 + 1,016 X$$

En la *figura 1* puede verse la línea de regresión correspondiente a la ecuación anterior.

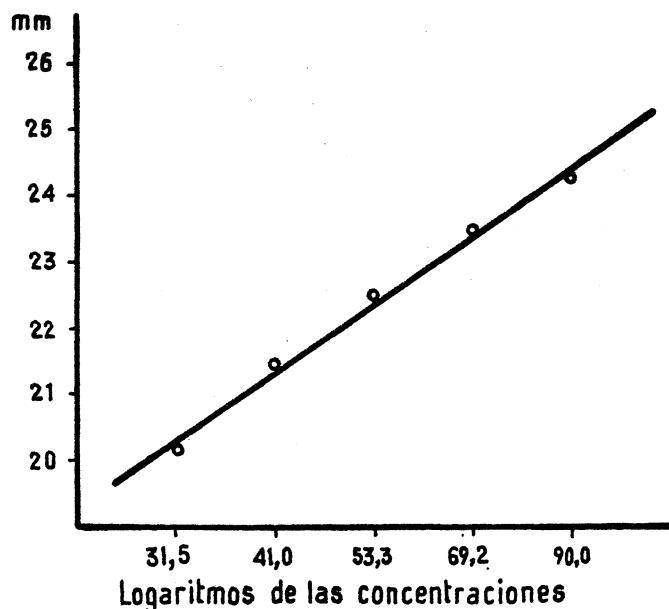


Figura 1

Análisis de la varianza

En el *cuadro 2* se pueden ver los resultados del análisis de varianza, efectuado teniendo en cuenta las fuentes de variación que se reseñan.

Cuadro 2

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Razón de la varianza (F)	
				Calculada	P=0,95
Total	52,2000	24			
Entre concentraciones	51,6960	4	12,924		
Regresión	51,6128	1	51,6128	2,048	4,35
Desviación de la linealidad	0,0832	3	0,0277	1,090	3,10
Error experimental	0,5040	20	0,0252		

Como se ve, la regresión es significativa, ya que el valor calculado para F es bastante mayor que el valor correspondiente en las tablas estadísticas para valores de F. Por otro lado, no hay desviación significativa en la linealidad, ya que el valor de F obtenido es menor que el correspondiente de la tabla.

Comentario final

Para las valoraciones rutinarias, y al igual que en los casos de la estreptomicina y de la neomicina, utilizamos un ensayo del tipo 2×2 . En este caso se han empleado las concentraciones de 35 y $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. En cada placa pueden incluirse varios problemas, que se comparan simultáneamente con el mismo patrón. Para el cálculo de la potencia, prueba de paralelismo y obtención de los límites de error seguimos las fórmulas e indicaciones de la Farmacopea Británica.

CONCLUSIONES

A la vista de lo anteriormente expuesto se deduce que puede valorarse el ácido fusídico con el *Bacillus licheniformis* Alter, ya que:

- 1) El crecimiento del germen en las placas es perfectamente homogéneo.
- 2) Los halos de inhibición que se producen son nítidos, de borde bien definido y de tamaño apropiado.
- 3) La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas es lineal, dentro de límites convenientes.

RECONOCIMIENTO

Nuestro agradecimiento, en primer lugar, a las Direcciones Técnicas de Alter, S. A., y Farmabión, S. A., por las facilidades dadas y al Prof. Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología, por la buena acogida dispensada para la publicación de este trabajo. Agradecemos también la colaboración entusiasta de las Srtas. M.^a Paz Olarte Terrero y M.^a Victoria López de Rego, a cuyo cargo corrió la parte práctica de las experiencias realizadas.

RESUMEN

Se estudia la valoración microbiológica del ácido fusídico con *Bacillus licheniformis* Alter, por el método de difusión en agar y mediante el empleo de pocillos. Se obtuvieron halos de inhibición nítidos, bien definidos y de tamaño apropiado. La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas fue lineal para las concentraciones empleadas. Se describe el análisis estadístico llevado a cabo, que comprende el cálculo de la regresión y el análisis de varianza de los resultados obtenidos.

SUMMARY

The microbiological assay of fusidic acid with *Bacillus licheniformis* Alter is studied by the agar cup diffusion method. Clear, well defined inhibition zones of an appropriate size were obtained. The relationship between the logarithm of the concentration and the response was a linear one for the concentrations used. It is described the statistical analysis made, which includes the regression calculation and the variance analysis of the results obtained.

BIBLIOGRAFIA

1. British Pharmacopoeia. 1963.
2. FERNÁNDEZ, F. 1963. Valoración de formaldehido en placa de agar. Comunicaciones libres y a las ponencias de la II Convención Bienal de la Industria Farmacéutica Nacional, 140.
3. FERNÁNDEZ, F. 1964. Valoración de estreptomicina y derivados con *Bacillus licheniformis* Alter. Microbiol. Espan. 17, 209.
4. FERNÁNDEZ, F. 1966. Valoración de neomicina con *Bacillus licheniformis*. Microbiol. Espan., 19, 281.
5. HILSON, G. R. F. 1962. Bacterial activity of fucidin. Lancet, 1, 1.131.
6. LAMELIN, J. P. 1963. La fucidine, nouvel antibiotique actif par voie buccale. Gaz. Med. Franc., 70, 1.647.
7. STEWART, G. T. 1964. Steroid antibiotiques. Pharmakotherapia, 2, 137.

FACULTAD DE FARMACIA DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

EFFECTO *IN VITRO* DE DIFERENTES ANTIBIOTICOS
Y SUSTANCIAS QUIMICAS SOBRE 90 ESTIRPES DE
PSEUDOMONAS SAVASTANOI

por

P. ROMERO y V. CALLAO

INTRODUCCION

Se han descrito diversas sustancias químicas (ácido fénico 5-6 %, cloruro mercúrico 1 %, caldo bordelés, sulfato ferroso, etc. (1)) para combatir el agente causal de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastoni* (E. F. Smith), Stevens 1913, bacteria perteneciente a la familia Pseudomonaceae, orden Pseudomonales de la clasificación de Bergey (2).

Dichas sustancias se emplean principalmente para desinfectar los utensilios utilizados en la poda, que, como sabemos, es una de las principales vías de propagación de la enfermedad. Nosotros pretendemos investigar la sensibilidad de noventa estirpes de *Pseudomonas savastanoi*, que hemos aislado, frente a diferentes antibióticos y sustancia químicas, a fin de que siendo conocida aquélla se pueda disponer de material más abundante para un posible tratamiento de la misma.

MATERIAL Y METODOS

Disponemos de noventa estirpes de *Pseudomonas savastanoi*, aisladas por nosotros, de distintas zonas olivareras de la geografía española,

a las que sometemos a la acción de distintos antibióticos (*cuadro 1*) (4), catalogando nuestros gérmenes según la denominación propuesta por Nystron (3) como: muy sensibles, +++; sensibles, ++; poco sensibles, +, e insensibles o resistentes, —.

Cuadro 1. Relación de los antibióticos ensayados

Nombre	Sinonimia	Concentración/disco
Clorotetraciclina	Aureomicina, Biomicina	10 γ
Tetraciclina	Bristaciclina, Ciclomina, Acromicina	10 γ
Cloranfenicol	Clorofenicina, Chemicetina, Cloromicetina	10 γ
Eritromicina	Ilotina, Ericina	5 γ
Dihidroestreptomicina		10 γ
Oxitetraciclina	Terramicina, Riomicina, Hidroxietraciclina	10 γ
Kanamicina	Kantrex	50 γ
Oleandomicina	Matromicina, Romicil, Aminicina	10 γ
Oxacilina	Penistafil	10 γ
Penicilina		5 U. I.
Colimicina	Metasulfonato de colistina	5 U. I.
Novobiocina	Albamicina, Catomicina	10 γ

Como término de comparación hemos tomado 1,5 cm de radio del halo de inhibición, designando:

- Muy sensibles, aquellos gérmenes cuyo halo de inhibición posee un radio igual o superior a 1,5 cm (grado III).
- Sensibles, cuando el radio del halo de inhibición está comprendido entre 1 y 1,5 cm (grado II).
- Poco sensibles o ligeramente sensibles, cuando el radio de dicho halo es inferior a 1 cm (grado I).
- Insensibles o resistentes, cuando el antibiótico no ejerció acción alguna sobre ellos, o ésta fue inapreciable (grado 0).

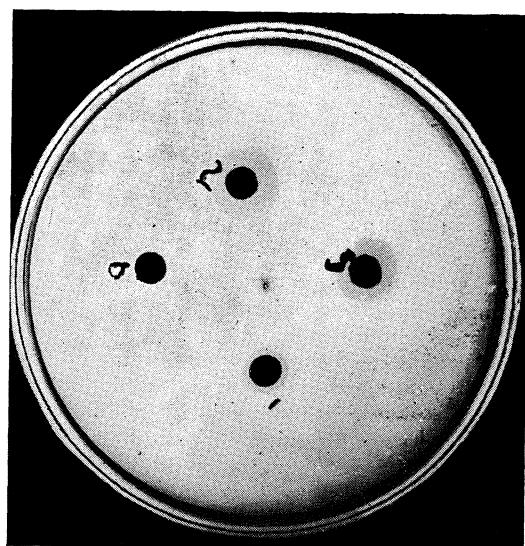


Figura 1. Espectro antibacteriano de la estirpe «M» de *Pseudomonas savastanoi* frente a discos impregnados con solución de sulfato ferroso, a las concentraciones indicadas en el texto. Obsérvese cómo a mayor concentración de la sal ferrosa, aumenta el poder inhibidor (Estirpe cedida por la Dra. R. Beltrá y perteneciente a la Colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas, Escuela de Botánica, Universidad de Cambridge)

La técnica operatoria consiste en adicionar 1 cm³ de suspensión bacteriana de veinticuatro horas, en caldo a 9 cm³ de agar común fundido a 42°-45° C y verter esta mezcla en una caja de Petri. Dejar solidificar el agar y colocar con pinzas estériles cuatro discos de los diferentes antibióticos a ensayar.

También hemos utilizado otra técnica que consiste en realizar la siembra con el hilo de platino radialmente. En este caso, la lectura se realizar en función de la longitud de la inhibición del crecimiento según esa línea. Así logramos un ahorro considerable de material, ya que cada disco nos sirve para tres o cuatro estirpes diferentes.

La lectura se realizó después de setenta y dos horas de incubación a 25° C.

También se ha investigado el poder antibacteriano del sulfato ferroso. Para ello se preparan disoluciones al 1/100, 1/80, 1/50 y 1/20 según la técnica que sigue.

A una serie de tubos de ensayo conteniendo 10 cm³ de agua destilada estéril (regenerada para evitar al máximo la oxidación del sulfato ferroso), se añaden 0,1 g, 0,125 g, 0,2 g y 0,5 g de dicha sal de hierro, con lo que se tienen preparadas las disoluciones a las concentraciones anteriormente indicadas. A continuación, se introducen discos de papel de filtro durante quince minutos. Seguidamente y después de eliminar el exceso de disolución, los depositamos sobre placas de agar común en las que se ha sembrado masivamente el germen. A las setenta y dos horas de incubación, a 25° C, medimos el efecto inhibidor en el crecimiento, siguiendo la misma pauta que la indicada anteriormente (*figura 1*).

DISCUSION Y RESULTADOS

Los resultados obtenidos frente a distintos antibióticos se resumen en el *cuadro 2*.

El 100 % de las estirpes han mostrado una sensibilidad total frente a la kanamicina, predominando los casos de inhibición del crecimiento total o casi total (grados III y II).

Frente a la dihidroestreptomicina hemos obtenido un 94,44 %, predominando los grados II y I.

La oxitetraciclina, un 77,77 %, principalmente de los grados I y II.
 El cloranfenicol, un 67,77 %, en su mayoría de los grados I y II.
 La tetraciclina, un 30 %, predominando el grado I.
 La clorotetraciclina, un 15,55 % (incluyendo las reacciones dudosas de sensibilidades), principalmente de grado I.
 La penicilina, un 11,11 %, solamente del grado I.
 La oleandomicina, un 6,66 %, sólo de grado I.
 La eritromicina, un 4,44 %, la mayoría de ellas dudosas, por lo que consideramos que prácticamente es el germen insensible a este antibiótico.
 Por último, frente a los antibióticos oxacilina, colimicina y novobiocina se ha obtenido una *insensibilidad total* (grado 0).

Cuadro 2. Resumen de la sensibilidad de 90 estirpes de Pseudomonas Savastanoi frente a los antibióticos que se indican ()*

Antibióticos	Número de estirpes sensibles	Porcentaje	Grado
Kanamicina	90	100,00	III-II
Dihidroestreptomicina	85	94,44	II-I
Oxitetraciclina	70	77,77	II-I
Cloranfenicol	62	67,77	I-II
Tetraciclina	27	30,00	I
Clorotetraciclina	14	15,55	I
Penicilina	10	11,11	I
Oleandomicina	6	6,66	I
Eritromicina	4	4,44	
Oxacilina	0	0,00	0
Colimicina	0	0,00	0
Novobiocina	0	0,00	0

(*) Los grados expresados en primer lugar son los predominantes.

Los resultados obtenidos con el sulfato ferroso han demostrado que al aumentar la concentración de la disolución que impregna los discos se intensifica la acción antibacteriana (*figura 1*), no existiendo diferencias apreciables entre las distintas estirpes.

CONCLUSIONES

Se demuestra que los antibióticos más adecuados para inhibir el crecimiento *in vitro* del *Pseudomonas savastanoi* son la kanamicina y la dihidroestreptomicina, si bien el primer antibiótico se señala más eficaz, aspecto que creemos debido a la mayor concentración en que se encuentra dicho antibiótico en nuestras experiencias (50 y 10 μ /disco, respectivamente).

También el sulfato ferroso al 1 % se muestra como un enérgico inhibidor del *Pseudomonas savastanoi*, *in vitro*.

RESUMEN

Se realiza el antibiograma de noventa estirpes de *Pseudomonas savastanoi* aisladas por nosotros de distintas zonas olivareras de la geografía española frente a los antibióticos: cloromicetina, tetraciclina, clorotetraciclina, eritromicina, dihidroestreptomicina, oxitetraciclina, kanamicina, oleandomicina, oxacilina, penicilina, colimicina y novobiocina, demostrándose que los antibióticos más adecuados para inhibir el crecimiento *in vitro* de este germen son la kanamicina y la dihidroestreptomicina.

También se investiga la determinación del poder antibacteriano del sulfato ferroso a distintas concentraciones, observándose que dicho poder aumenta con la concentración.

SUMMARY

The effect of the antibiotics chloromycetin, tetracycline, chlorotetracycline, erythromycin, dihydrostreptomycin, oxytetracycline, kanamycin, oleandomycin, oxacyline, penicillin, colimycin and novobiocine in

front of 90 strains of *Pseudomonas savastanoi* isolated in our laboratory from tumours in olivetrees of different geographic zones of Spain has been tested. We have seen that kanamycine and dihydrostreptomycin are the antibiotics of election to inhibit the growth *in vitro* of this bacteria.

The effect of the ferrous sulfate at several concentration against the growth of the *Pseudomonas savastanoi* has been also studied and it has been found to be an effective inhibitor at 1% concentration.

BIBLIOGRAFIA

1. BELTRÁ, R. 1956. Nueva técnica para la identificación del *Pseudomonas savastanoi*. *Microbiol. EspaÑ.,* 9, 293-314 y 433-504.
2. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
3. NYSTROM, G. 1960. Sensitivity of *Salmonella* bacteria *in vitro* to different antibiotics and chemotherapeutics. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.,* 50, 303-21.
4. PORTOLÉS, A., y BELTRÁ, R. 1964. Antibioterapia de la tuberculosis del olivo *Phyton,* 21, 181-90.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
LABORATORY OF MICROBIOLOGY, AGRICULTURAL UNIVERSITY, WAGENINGEN

POLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *BEIJERINCKIA* AND *AZOTOBACTER*

by

R. LÓPEZ and J. H. BACKING (*)

INTRODUCTION

Beijerinckia and *Azotobacter* strains growing aerobically on a medium without nitrogen can accumulate copious amounts of extracellular polysaccharides.

The polysaccharide production of Azotobacteriaceae has received considerable attention (6-10, 15, 17, 19 and 23), but most of these studies deal only with the composition of the polysaccharide produced.

In the present study and examination was made of the polysaccharide production during the different growth phases of the bacteria. Polysaccharide production by the bacteria was followed in relation to the age of the culture, cell growth (proportional to the nitrogen content of the medium when growing in a nitrogen-free medium), glucose consumption and pH variation during growth.

A qualitative analysis of the polysaccharide was made. In addition, it was investigated whether the polysaccharide can function as reserve material.

The present investigation is a continuation of earlier studies on the geographic distribution, ecology, mineral nutrition (including trace-

(*) Present address: Institut for Atomic Sciences in Agriculture (Association EURATOM-ITAL), Keyenbergseweg 6, Wageningen.

element requirements), and enzymatic properties of *Beijerinckia* and *Azotobacter* (1-5).

MATERIALS AND METHODS

Micro-organisms

Beijerinckia indica str. Hawai-2 isolated from a humic latosol (pH = 5.2) of Oahu (Kaneohe), Hawaii Islands. *Azotobacter vinelandii* str. 4 isolated from a marine mud (pH = 9.0) of Surabaia (Java), Indonesia, and *A. chroococcum* str. 21 isolated from garden soil (pH = 7.5) of Wageningen, The Netherlands, were used.

Media

The bacteria were grown in N-free medium of the following composition: glucose, 20 g; K₂HPO₄, 0.8 g; KH₂PO₄, 0.2 g; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g; FeCl₃·6H₂O, 0.025 g; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.005 g; distilled water, 1,000 ml (pH = 7.2). The *Beijerinckia* cultures do not need calcium, the *Azotobacter* cultures were supplemented with CaCl₂·2H₂O, 0.1 g per liter. Trace elements were present as impurities. The bacteria were inoculated in 100 ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml medium, and incubated on a rotary shaker at 30 °C. As inoculum a suspension of cells from a N-free glucose agar culture, growing in its logarithmic phase, was used.

For obtaining large quantities of polysaccharide the bacteria were grown in 1-liter batches in 2.5-liter Kluyver flasks aerated with compressed air, at 30 °C.

Analytical methods

Polysaccharide

Cells were removed from the medium by centrifugation in a Servall centrifuge at 13,600 r/m (23,630 × g). The extracellular polysaccharide remained in the supernatant, but could be precipitated by adding 2 volumes of cold acidified (with HCl, final concentration 8 %, w/v) ethanol 96 % to one volume supernatant. The gelatinous precipitate was washed with ethanol 96 %, subsequently with ether (absolute), and finally dried over CaCl₂ siccum in a evacuated desiccator. The resulting fibrous material was purified by redissolving it in distilled water, which

was facilitated by stirring with a magnetic stirrer for 12 hr at 4 °C. Then the crude polysaccharide solution was dialysed against running tap water at 4 °C until it was sugar-free, which was after about 24 hr. The finished product still contained some protein (2.6 µg/mg dry weight), as shown by the modified protein determination of Lowry (11).

Capsular polysaccharide, i.e. polysaccharide adhesive to the bacterial cells, was removed from the cells by the procedure of Cohen and Johnstone (6-7). It was isolated and purified according to the methods outlined for the extracellular polysaccharide.

Analysis of components

Quantitative determination of reducing sugars was made by the colorimetric procedure of Nelson (20) and Somogy (24). Glucose was used as a standard for both methods. Extinction was measured with a Beckman DU spectrophotometer (light path 1.0 cm) and a Coleman colorimeter model 9 (light path 1.0 cm).

Specific components were determined by various colorimetric tests. For uronic acids the carbazole test, for galacturonic acid the modified carbazole test, for glucuronic acid in the presence of mannose the test with thioglycolic acid and sulphuric acid, and for methylpentoses the cysteine-HCl test, were followed (12-13).

Enzymatic procedures, i.e. hexokinase (18) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (16) tests were used to determine glucose quantitatively in the presence of other sugars.

For determining the composition of the polysaccharide an acid hydrolysis (1.5 N sulphuric acid) was carried out. The hydrolysis was done in closed glass tubes. The hydrolysis was followed in time by determining the difference in reducing sugars before and after hydrolysis. The hydrolysis was complete after 5 hr at 100 °C. Subsequently, the hydrolysate was neutralized with barium hydroxide and the precipitated BaSO₄ was removed by centrifugation in a Servall centrifuge. The water in the hydrolysates was evaporated under reduced pressure and for purification the polysaccharide was several times redissolved, previous to chromatographic analyses.

The qualitative determination of sugars was made by paper chromatography descending technique using Whatman No. 1 filter paper and the following solvent systems: (a) ethyl acetate—pyridine—water (v/v, 10 : 4 : 3), (b) butanol—ethanol—water (v/v, 4 : 1 : 3), and (c) butanol—acetic acid—water (v/v, 8 : 2 : 2). For detection of the spots the analine hydrogen-phtalate spray of Partridge (21) were used. The unknown samples were compared with known compounds acting as standards applied simultaneously.

Total nitrogen

The nitrogen content of the cells and the medium was determined by the conventional micro-Kjeldahl technique using a Parnas distillation apparatus.

Respiration tests

Respiration experiments were performed to check whether various carbon compounds could be utilized by the bacteria. The ordinary Warburg method was followed (26) and a Braun apparatus (type VL 85) used.

The following carbon sources were tested: glucose and synthetic polysaccharides i.e. precipitated natural polysaccharide redissolve in distilled water. Pro Warburg vessel 0.1 ml 0.1 M glucose (plus 0.4 ml distilled water), or 0.5 ml polysaccharide solution (5 mg dry weight/ml) or 0.5 ml distilled water, 2.0 ml phosphate buffer 0.01 M pH 7.2, and 1.0 ml bacteria suspension (averages: 1.97 mg nitrogen in *Beijerinckia* and 2.01 mg in *Azotobacter*) in the previous mentioned phosphate buffer, were used. The center well contained 0.1 ml 6% KOH (w/v) solution in distilled water. Total volume was 3.6 ml.

Cells of different ages were used and these showed a variable amount of polysaccharide around them. This extracellular polysaccharide could not be removed without affecting the viability of the cells.

In the respiration experiments the cells were separated from the medium by a Servall centrifuge (23,600 × g), and 3-4 times washed with NaCl (0.85 %, w/v) solution until the supernatant was sugar-free according to the Nelson (20) and Somogy (24) tests.

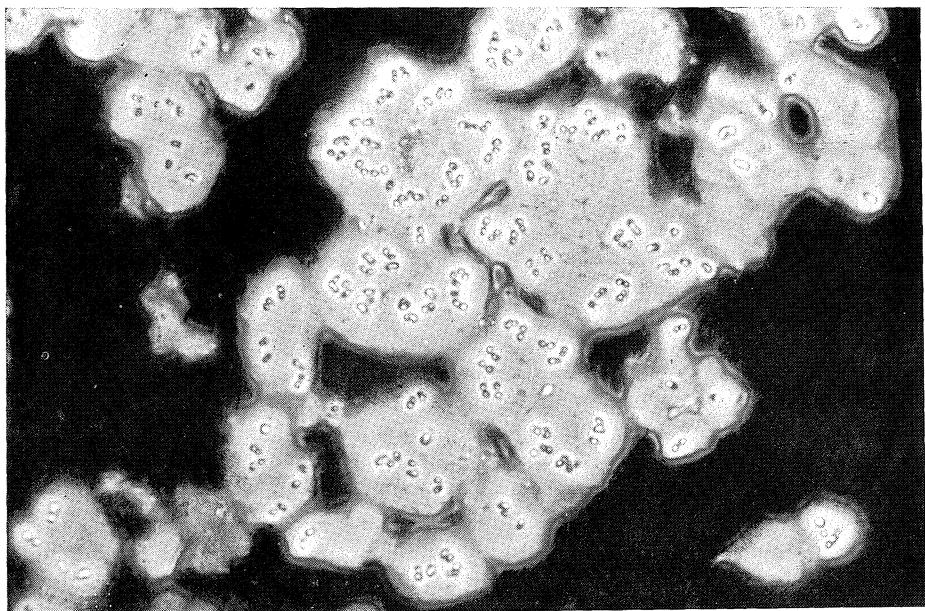


Figure 1. Polysaccharide formation by *Beijerinckia indica* strain Hawai-2; 7-days-old cells grown on a nitrogen-free agar medium (pH 6-8). 1,250 ×



Figure 2. Polysaccharide formation by *Azotobacter chroococcum* strain 21; 3-days-old cells grown on a nitrogen-free agar medium (pH 7.2). 1,000 ×

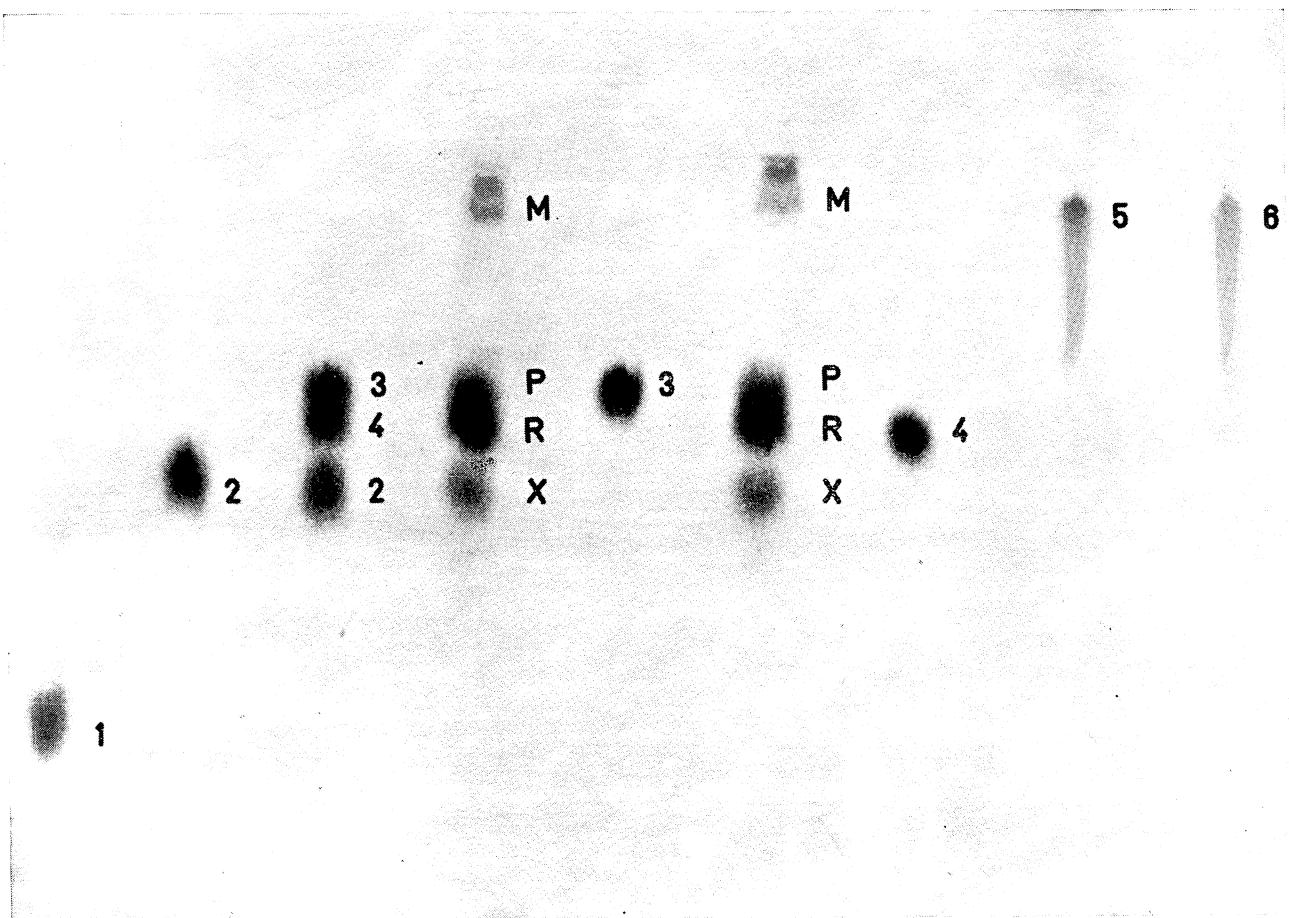


Figure 4. One dimensional paper chromatogram of *Beijerinckia* polysaccharide using a neutral solvent (butanol-ethanol-water = 4 : 1 : 5). Numbers are the pure compounds used as standards; lettering is the *Beijerinckia* polysaccharide. The numbers represent: 1 = rhamnose; 2 = mannose; 3 = galactose; 4 = glucose; 5 = galacturonic acid; and 6 = glucuronic acid. As evident there is a poor separation of galacturonic and glucuronic acid.

RESULTS

The polysaccharide production in *Beijerinckia* is much more copious than in *Azotobacter*. Microscopic observations of 7-days-old cells of *Beijerinckia* on nitrogen-free agar plates (pH 6.8) showed large amounts of polysaccharide around the cells (figure 1). Less pronounced in polysaccharide production in *Azotobacter* (figure 2) as shown in 3-days-old cells on a nitrogen free medium (pH 7.2). Age differences of the pictured cells could not be avoided as *Beijerinckia* grows much slower than *Azotobacter*. In both species polysaccharide production is more abundant on nitrogen-free solid media (agar plates) compared to liquid media of the same composition. But, because of better facilities for chemical analyses in liquid media, throughout the experiments a liquid medium was used.

The results of these experiments are given below for *Beijerinckia* and *Azotobacter*, respectively.

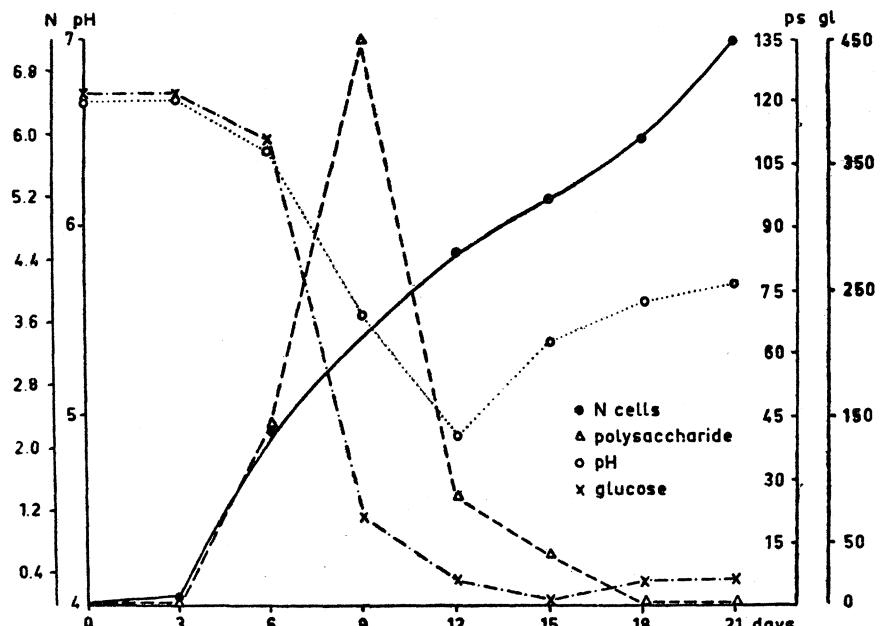


Figure 3. Effect of time of incubation on nitrogen yield cells (mg N cells/25 ml medium), glucose content (mg/25 ml medium) polysaccharide production (mg/25 ml medium) and pH fluctuations in the medium during growth of *B. indica* strain *Hawai-2*

Beijerinckia

Figure 3 represents a typical growth curve (N cells) with simultaneously glucose consumption and polysaccharide production by the cells, and pH variations in the medium during growth. As evident from the figure, the yield of polysaccharide increased until the 9th day. At the same time the glucose was reduced to 16 % of the original amount.

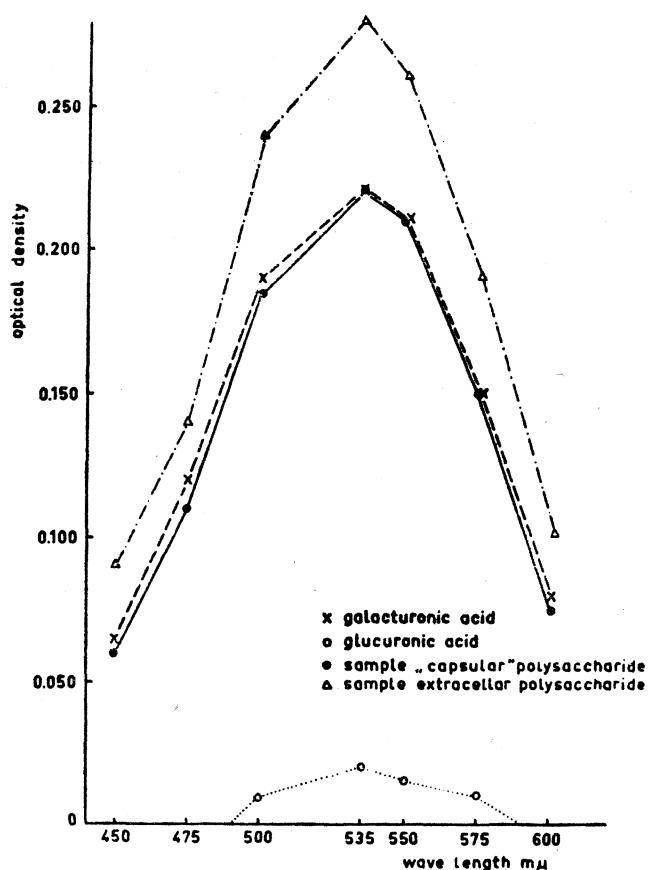


Figure 5. Absorption spectra of hydrolysis products of extracellular and «capsular» polysaccharides of *Beijerinckia* compared with standards of galacturonic and glucuronic acid. Extracellular polysaccharide (500 µg); «capsular» polysaccharide (480 µg); galacturonic acid (400 µg); glucuronic acid (400 µg). (Figures in bracket will show the concentrations used throughout the different colorimetric tests)

Subsequently, the extracellular polysaccharide was consumed as evident by the continuous increase of cell number (N cells). When after 15 days also the amount of polysaccharide was greatly reduced, the cell yield still increased probably by the utilization of intracellular reserve substances (polysaccharide and poly- β hydro-butyric acid).

Paper chromatograms of the acid hydrolysates of the extracellular polysaccharide (*figure 4*) revealed the presence of glucose, galactose, mannose, and glucuronic and galacturonic acids. The separation of glucuronic and galacturonic acids was not possible with simple chromatographic methods, since both have the same Rf-values in most solvents. Their general presence in rather high concentrations was indicated by the colorimetric carbazole tests for hexuronic acids. To distinguish between galacturonic and glucuronic acid two specific colorimetric reactions were used.

The presence of galacturonic acid was established by the modified carbazole test (12) as shown in *figure 5* representing the absorption spectra for the polysaccharide and a sample of pure galacturonic acid. As obvious from this figure, both hydrolysed extracellular polysaccharide

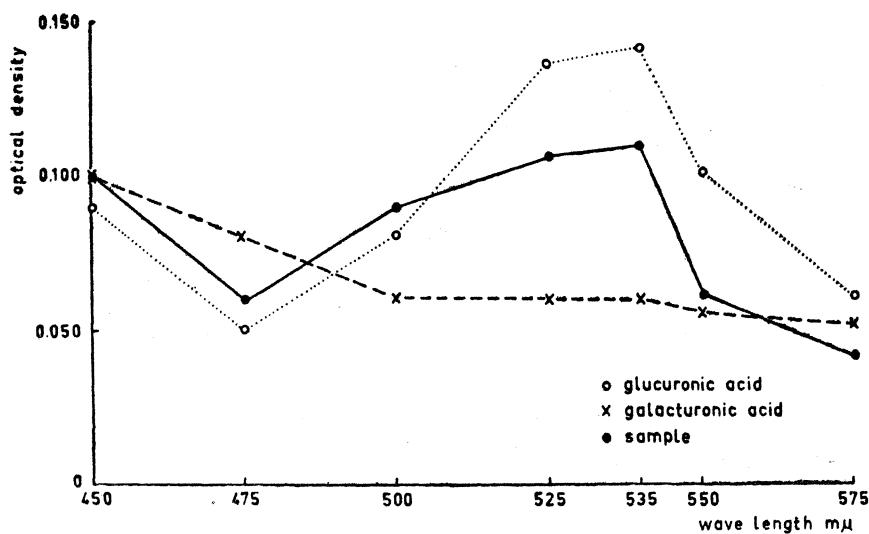


Figure 6. Glucuronic acid assay of the hydrolysed polysaccharide of Beijerinckia. Both extracellular and «capsular» polysaccharides gave the same results. Polysaccharide (51 µg); galacturonic acid (10 µg); glucuronic acid (10 µg)

and «capsular» polysaccharide gave a peak at $535 \text{ m}\mu$ characteristic for galacturonic acid. A sample of pure glucuronic acid, included in this assay as control, showed hardly any absorption at this wave length.

That the hydrolysed polysaccharide contained also glucuronic acid was evident from the thioglycolic acid test for glucuronic acid (13). The hydrolysed extracellular polysaccharide and a pure sample of glucuronic acid tested simultaneously showed the same pattern, i.e. an absorption maximum at $535 \text{ m}\mu$ and a minimum at $475 \text{ m}\mu$, as evident from figure 6.

The so-called «10-minutes» modification of the test for methylpentoses using L-cysteine and sulphuric acid (13) gave a negative outcome. Hence (figure 7), the polysaccharide did not contain rhamnose nor any other methylpentose.

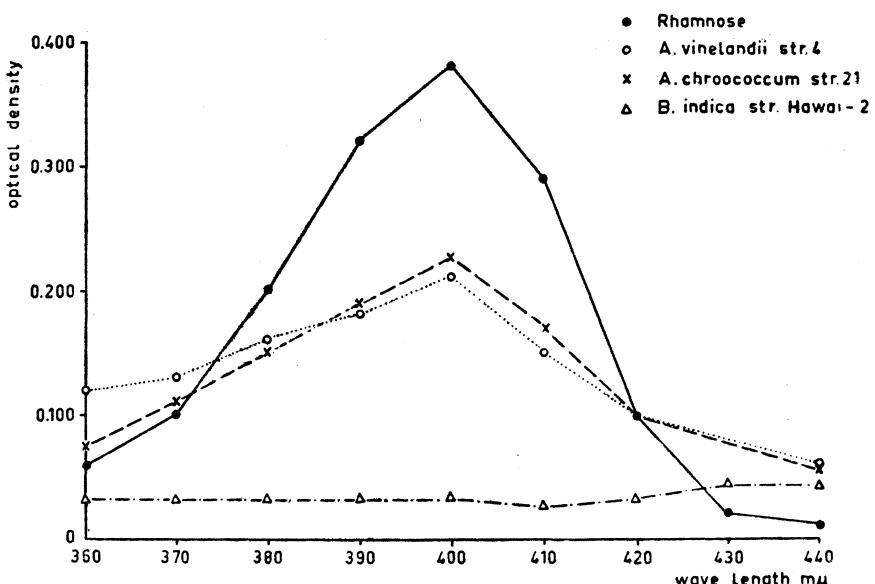


Figure 7. Tests for methylpentose in the hydrolysed polysaccharide of *A. vinelandii* strain 4, *A. chroococcum* strain 21, and *B. indica* strain Hawai-2. *A. vinelandii* strain 4 polysaccharide (300 µg); *A. chroococcum* strain 21 polysaccharide (300 µg); *B. indica* polysaccharide (300 µg); rhamnose (20 µg)

The enzyme assays for the quantitative determination of glucose with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase indicated that 51.8 % of the total amount of the polysaccharide consisted of glucose.

Cells of various ages showed a variable amount of extracellular polysaccharide and this polysaccharide could not be removed from the cells without affecting the viability of the cells. Therefore, in the respiration experiments using washed cells of various ages, the cells contained different amounts of extracellular polysaccharide around the cell. The effects of distilled water, glucose and by chemical procedures isolated polysaccharide on the respiration rates of these cells were tested.

As evident from figure 8, there was in the presence of distilled water a large difference in respiration rates between cells of various ages. In all experiments, the 6-days-old cells showed less respiration than

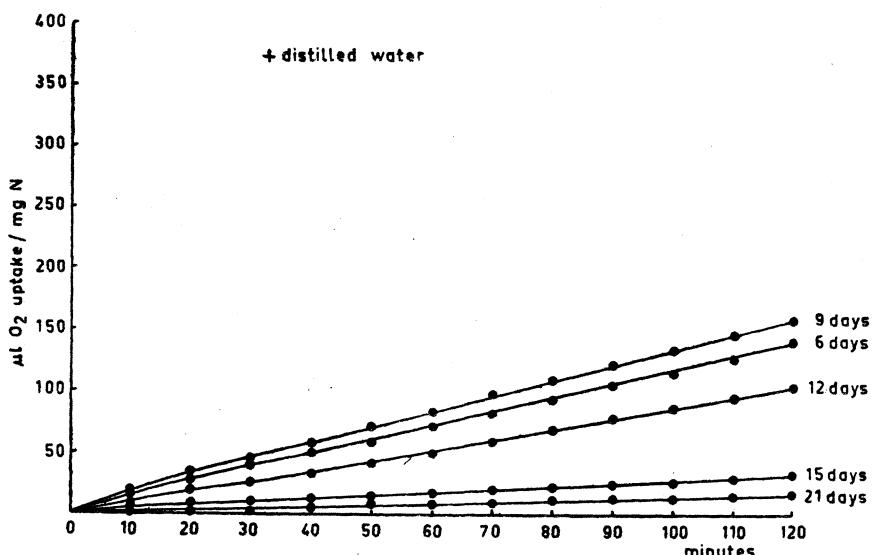


Figure 8. Oxygen uptake of a suspension (1.0 ml) of *B. indica* strain Hawai-2 cells of various ages in phosphate buffer pH 7.2 (2.0 ml), with distilled water (0.5 ml) plus 0.1 ml 6% KOH (w/v) in center well. Total volume was 3.6 ml

the 9-days-old cells, but at further ageing (12, 15 and 21 days) the respiration rates became less and less. The large respiration rate of the 9-days-old *Beijerinckia* cells is due to the thick slime envelope («capsule») around the cells of this age (see figure 3), which layer is thinner in 6, 12, and 15-days-old cells and entirely absent in 21-days-old cells as revealed by microscopical examination and chemical polysaccharide

analyses. Thus, in these series the oxygen uptake does not merely account to «endogenous» respiration of internal reserve substances of the cells, but to a large extent to the utilization of «native» polysaccharide around the cells. Only in the case of 21-days-old cells—which lack the extracellular polysaccharide layer—the respiration rate is due to true «endogenous» respiration.

The addition of glucose (figure 9) stimulated very profoundly the oxygen consumption of the cells, but it did not change the sequence of respiration rates of cells of different ages as found in the experiments with distilled water. In both cases 9-days-old cells showed larger oxygen uptake than younger (6 days) or older (12, 15 and 21 days) cells.

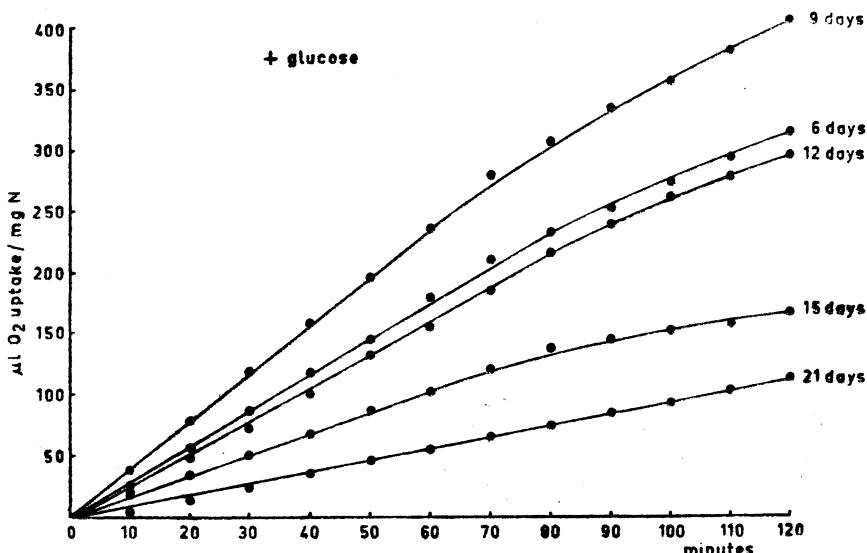


Figure 9. Oxygen uptake of a suspension (1.0 ml) of *B. indica* strain Hawai-2 cells of various ages in phosphate buffer pH 7.2 (2.0 ml) supplied with 1.8 mg glucose (0.1 ml 0.1 M glucose solution) plus 0.1 ml 6% KOH (w/v) were added in center well. Distilled water (0.4 ml). Total volume 3.6 ml

The addition of isolated polysaccharide (figure 10) did not change the respiration rate of 6, 9, 12 and 15-days-old cells as compared to the respiration rates of these cells in distilled water. Therefore, the «synthetic» polysaccharide can either not be utilized by the bacteria, or it is not used in preference to the «native» polysaccharide around the cells.

That the «synthetic» polysaccharide to some extent is used, if no other carbon sources are available, is evident in the 21-days-old cells (which do not have extracellular polysaccharide) showing an increase of respiration over distilled water after synthetic polysaccharide addition.

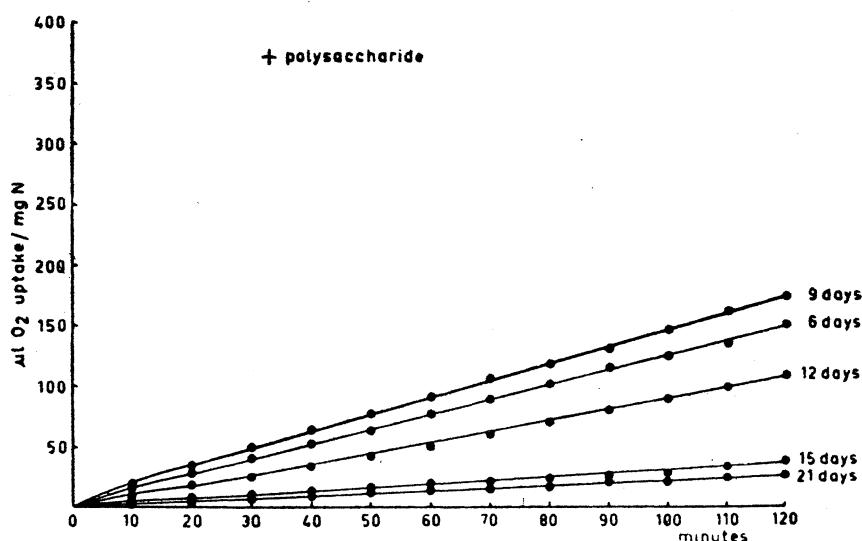


Figure 10. Oxygen uptake of a suspension (1.0 ml) of *B. indica* strain Hawai-2 cells of various ages in phosphate buffer pH 7.2 (2.0 ml) supplied with 2.5 mg polysaccharide (0.5 ml polysaccharide solution) containing 5 mg polysaccharide per ml plus 0.1 ml 6% KOH (w/v) in center well. Total volume 3.6 ml

Azotobacter

The growth curves of *Azotobacter vinelandii* (figure 11) and *A. chroococcum* (figure 12) show clear differences between the two species in polysaccharide production, glucose consumption, nitrogen yield of the cells, and pH variation in the medium.

As evident *Azotobacter vinelandii* str. 4 produced about 3 times more polysaccharide in a liquid medium than *A. chroococcum* str. 21 under similar conditions. In *A. vinelandii* and *A. chroococcum*, optimal polysaccharide content was reached in 3 and 5-6 days, respectively. In *A. vinelandii* there was always a residual amount of glucose (120 mg glucose/25 ml medium) left in the medium after 6 days and this amount even increased to 200 mg glucose/25 ml in 18 days, whereas in

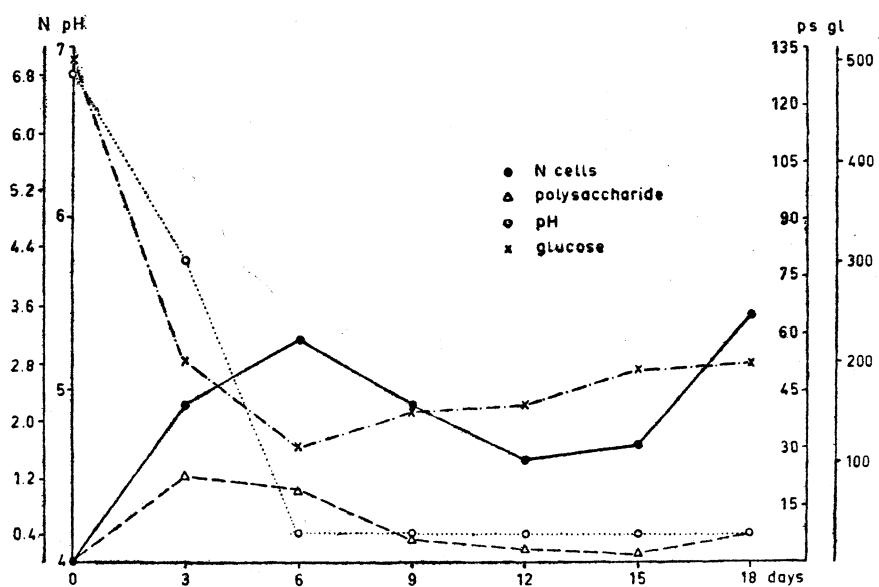


Figure 11. Effect of time of incubation on nitrogen yield cells (mg N cells/25 ml medium), glucose content (mg/25 ml medium), polysaccharide production (mg/25 ml medium), and pH fluctuations during growth in *A. vinelandii* strain 4

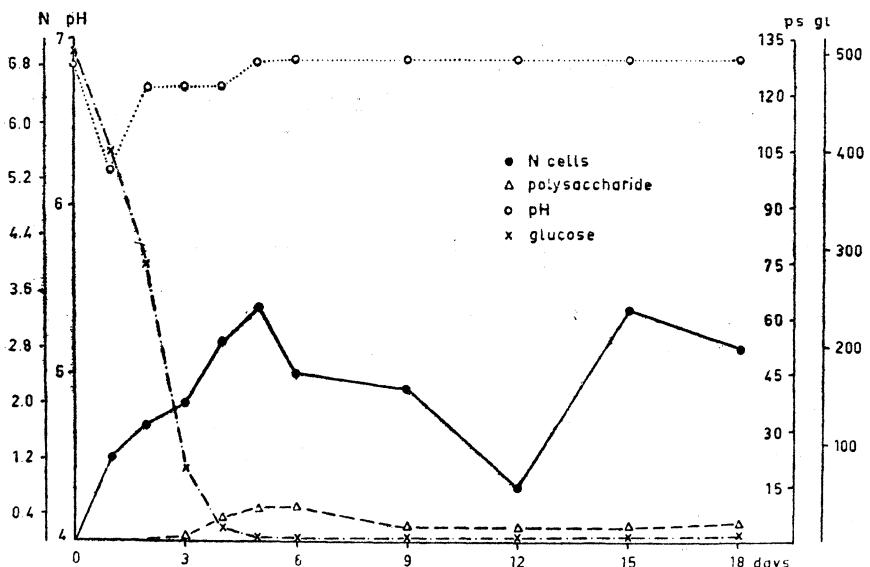
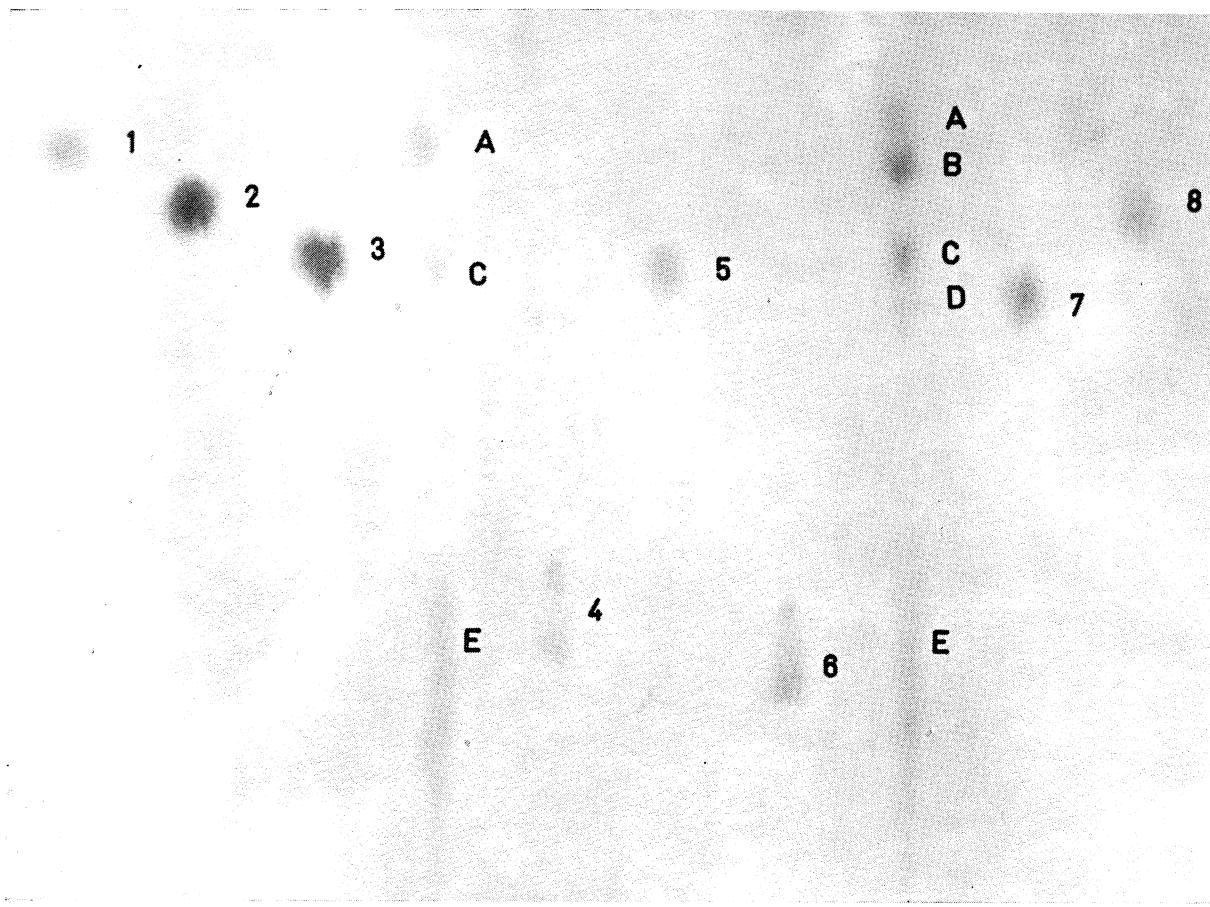


Figure 12. Effect of time of incubation on nitrogen yield cells (mg N cells/25 ml medium), glucose content (mg/25 ml medium), polysaccharide production (mg/25 ml medium) and pH fluctuations in the medium during growth of *A. chroococcum* strain 21



Figures 13. One-dimensional paper chromatograms of Azotobacter polysaccharides using an alkaline solvent (ethylacetate-pyridine-water = 10 : 4 : 3). Numbers represent the pure compounds used as standards; lettering are the Azotobacter polysaccharide i.e. A-C-E *A. vinelandii*, and A-B-C-D-E *A. chroococcum*. The numbers are: 1 = rhamnose; 2 = xylose; 3 = arabinose; 4 = glucuronic acid; 5 = glucose; 6 = galacturonic acid; 7 = galactose and 8 = mannose

A. chroococcum after 4-5 days all glucose present in the medium had been consumed. As there is only a very limited amount of accumulation of polysaccharide in the latter species, the glucose in nearly completely respiration to carbon dioxide and water. In both species there was an increase in cell yield (nitrogen cells) up till 5-6 days. After this point the nitrogen yield of the cells decreased which situation continued in both species until the 12th day, after which there is again a rise in total cell-nitrogen yield (proportional to cell number), reaching a second optimum in *A. chroococcum* and *A. vinelandii* at 15 and 18 days, respectively. During the growth of *A. vinelandii* the original pH 6.8 of the medium dropped to pH 4.2 within 6 days and the pH subsequently remained at this level. In the *A. chroococcum* culture, however, there was a small drop from pH 6.8 to 6.3 during the first day and then the pH reached its original level again. The plotted data in figures 11-12 are the mean values of triplicate cultures. Each experiment, however, gave approximately the same results.

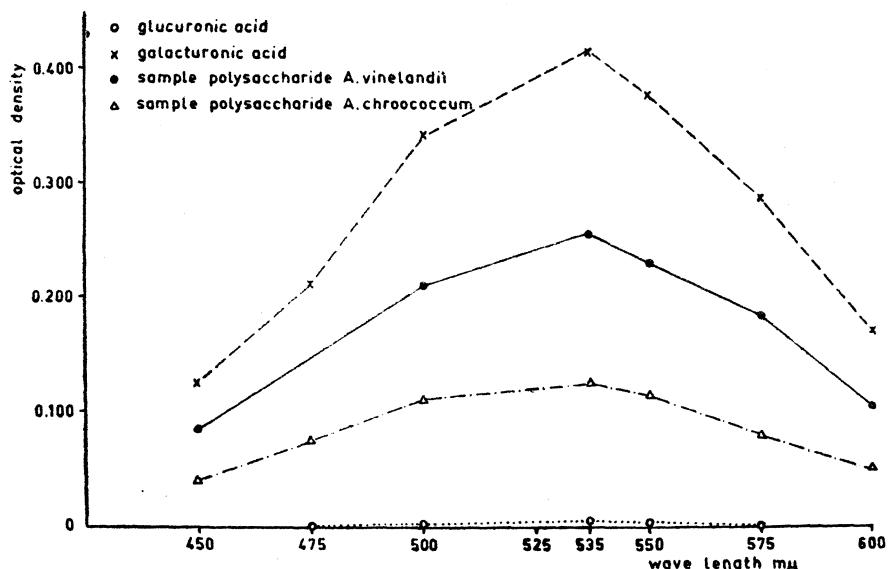


Figure 14. The modified carbazole test for the distinction between galacturonic and glucuronic acid in the hydrolysed polysaccharide of *A. vinelandii* strain 4 and *A. chroococcum* strain 21. *A. vinelandii* polysaccharide (500 µg); *A. chroococcum* polysaccharide (500 µg); galacturonic acid (400 µg); glucuronic acid (400 µg)

Paper chromatograms of the hydrolysed polysaccharides of *Azotobacter vinelandii* and *A. chroococcum* showed a number of sugars. In *A. vinelandii* (figure 13) rhamnose, glucose and a hexuronic acid could be identified. The polysaccharide of *A. chroococcum* showed a more complicated composition as the presence of rhamnose, xylose, glucose, galactose, and a hexuronic acid could be detected.

The colorimetric carbazole test (13) confirmed the presence of a hexuronic acid in the hydrolysed polysaccharide of both *Azotobacter* species. Figure 14 gives the modified carbazole test (13) showing that in both species the hexuronic acid was galacturonic acid whereas glucuronic acid was absent, which was also confirmed by the thioglycolic test (13).

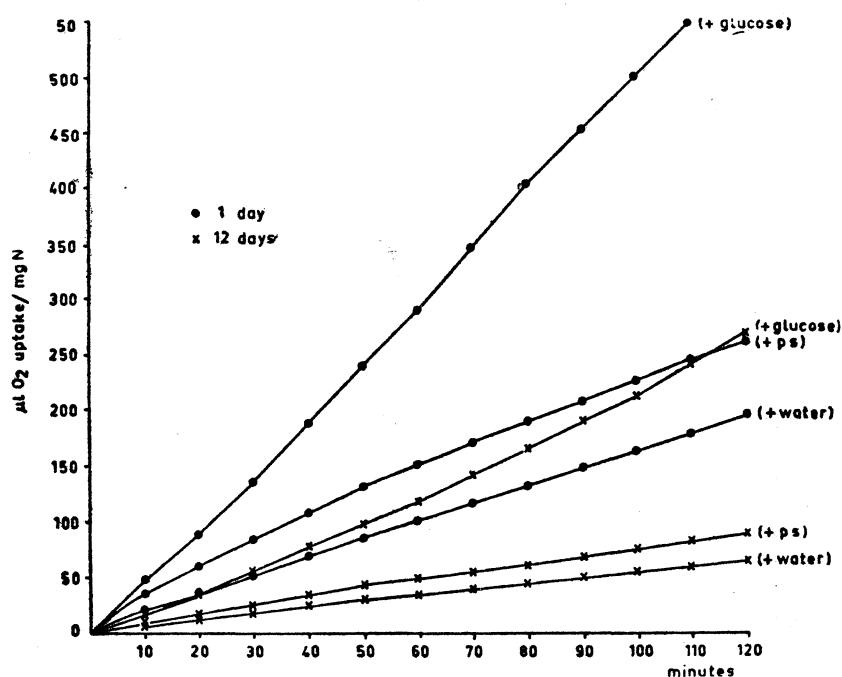


Figure 15. The oxygen uptake of a suspension (1.0 ml) of *A. vinelandii* strain 4 cells at the age of 1 day and 12 days in: a) phosphate buffer pH 7.2 (2.0 ml) with distilled water (0.5 ml); b) 1.8 mg glucose (0.1 ml 0.1 M glucose solution plus 0.4 ml distilled water), and c) polysaccharide 2.5 mg (0.5 ml polysaccharide solution containing 5 mg polysaccharide per ml). ps = polysaccharide. In all experiment 0.1 ml 6% KOH (w/v) were added in center well. Total volume was always 3.6 ml

The respiration experiments indicated that the «endogenous» respiration of one-day-old cells was much larger than that of 6-days-old cells and the latter again larger than that of 12-days-old cells. The same sequence in respiration rates was obtained with cells supplied with glucose or polysaccharide. The increase in respiration rate upon the addition of «synthetic» polysaccharide was much smaller (1.3-1.4 fold compared with distilled water as blank), than that upon addition of glucose (4.0-4.3 fold) as evident from *figure 15*. Thus like in *Beijerinckia*, the precipitated polysaccharide was a much poorer substrate than glucose.

DISCUSSION

The present study deals principally with extracellular polysaccharide, although with the method of Cohen and Johnson (6-7) (1964) a distinction was made between polysaccharide adhering to the cell wall («capsular» polysaccharide) and that free in the medium («slime» polysaccharide).

Polysaccharide production in *Beijerinckia* was much more copious of liquid and plate cultures. It is remarkable that the peak in the amount of synthesized polysaccharide of 9-days-old *Beijerinckia* cells coincide with optimal glucose consumption by these cells. In this respect 9-days-old cells are even more active than 6-days-old cells, which have a smaller polysaccharide layer around the cell. So, either there is a synergistic effect of the «native» polysaccharide on glucose consumption, or the 9-days-old cells are enzymatically more active in the breakdown of glucose. In this respect it is of interest to note that if enzyme production is involved, the 9-days-old cells are also more active in the glucose polymerization to polysaccharide as polymer production is optimal at this growth stage. For future research it is worthwhile to perform enzyme experiments to evaluate enzyme levels at various ages of the cells.

Quinnel and coworkers (23) reported the presence of glucose, glucuronic acid and heptose in the polysaccharide of *Beijerinckia*. In the present study in the slime of this organism the following compounds

were demonstrated: glucose, galactose, mannose, glucuronic acid, and galacturonic acid. Heptose was not found in the polysaccharide of this bacterium neither with colorimetric tests nor with paper chromatography. Glucose was the main component of this polysaccharide as 51.8 % of the total weight consists out of this compound. There is no difference in composition between «capsular» and «free» polysaccharide in *Beijerinckia*. Therefore, it may be that the «capsular» polysaccharide is merely «free» polysaccharide adhering to the cell wall.

The polysaccharide of the two *Azotobacter* species differed from the polysaccharide of *Beijerinckia*, but there was also a difference between the polysaccharide of *A. vinelandii* and that of *A. chroococcum*. In the *A. vinelandii* polysaccharide glucose, rhamnose, and galacturonic acid could be identified. The polysaccharide of *A. chroococcum* contained in addition xylose and galactose. The latter composition corroborates the analyses of *A. chroococcum* polysaccharide made by Stacey and Barker (25). The observation made by Cohen and Johnstone (16) of glucose, rhamnose, and galacturonic acid being present in the «capsular» polysaccharide of *A. vinelandii* is also in agreement with our results.

Dubos (14) suggested that most extracellular polysaccharides produced by bacteria are waste material and are not utilizable by the cells which have produced these substances. However, the growth curves of *Beijerinckia* and *Azotobacter* indicate that the polysaccharide produced by these bacteria is metabolized again when the glucose concentration in the medium becomes limiting. In this respect this polysaccharide is an extracellular store of reserve material. The respiration experiments showed, however, that the polysaccharide isolated by the described precipitation methods is not readily utilized by the bacteria which have produced it. This may be due to the fact that the «native» polysaccharide has been changed in some degree by the isolation procedures as a result of which it has become less available to the bacteria.

However, the large differences in respiration rates between cells of various ages in the presence of distilled water in relation with the amount of capsular polysaccharides could be thought the result of the utilization of «native» polysaccharides around the cells. This results should be in agreement with the works of Proctor (22) on the polysaccharide of *Azotobacter vinelandii*.

Beijerinckia is known to produce acetic acid (2) from glucose. The growth curve of *Beijerinckia* showed a drop of the initial pH 6.7 to pH 4.9 in 12 days and then a rise of pH—probably to acid consumption—to pH 5.7. *Azotobacter* is known not to produce acid from glucose, but in *A. chroococcum* str. 21 dropped to pH 6.3 in the first day, but then rised again to the original pH of 6.8. However, in *A. vinelandii* str. 4 in 6 days the pH dropped from 6.8 to 4.2 and it remained ad this level till 18 days. Thus in this case there is a considerable production of acid.

For one of the authors (R. López), the work reported in this paper was supported in part by a grant from the international interchange between «Consejo Superior de Investigaciones Científicas», Madrid, and the University of Utrecht.

The authors also wish to express their indebtedness to Prof. Dr. E. G. Mulder for valuable criticism and to Dr. J. R. Villanueva for helpful advices.

ABSTRACT

Growth curves of *Beijerinckia* and *Azotobacter* showed the production of polysaccharide in a early growth phase, but this polysaccharide was subsequently consumed by the cells when the glucose became limiting. Consequently, these polysaccharides are true reserve materials. Largest amounts of polysaccharide were found in *Beijerinckia* and *Azotobacter* after 9 and 3-6 days growth at 30 °C, respectively.

Respiration experiments showed that the polysaccharide isolated by precipitation could not be readily utilized by the bacteria which has produced it. This suggests that it has been modified by the isolation procedures. However we found a close relationship between the amount of capsular polysaccharides and respiration rates in the presence of distilled water.

In contrast to *Azotobacter*, *Beijerinckia* is known to be acid-tolerant and to produce acid from carbohydrates. But, the *A. vinelandii* str. 4 produce also acid from glucose bringing the initial pH 6.8 of the medium to pH 4.2.

The polysaccharide of *Beijerinckia* and *Azotobacter* had a different composition. The *Beijerinckia* polysaccharide consisted of glucose, galactose, mannose, glucuronic acid, and galacturonic acid, but no heptose. The main component is glucose giving 51.8 % of the dry weight of the polysaccharide. The polysaccharide of *A. vinelandii* contained rhamnose, glucose, and galacturonic acid. The *A. chroococcum* polysaccharide contained in addition xylose and galactose.

RESUMEN

A lo largo del presente trabajo se ha hecho un estudio sobre la producción de polisacáridos en *Beijerinckia* y *Azotobacter* observándose que cuando la glucosa, única fuente carbonada, había sido consumida en el medio, las cifras de producción de polisacáridos disminuían sensiblemente, por lo que el papel biológico de estos polisacáridos podría ser interpretado como el de servir de materiales de reserva. La mayor producción de polisacáridos para *Beijerinckia* se encontró a los nueve días de crecimiento a 30° C, mientras que para *Azotobacter* el óptimo de producción estaba entre los tres y seis días.

Las experiencias respirométricas demuestran que el polisacárido aislado por precipitación y posteriormente purificado no puede ser utilizado por las bacterias que lo han producido, lo cual podría ser debido a las modificaciones químicas que habría sufrido en el proceso de aislamiento y purificación. Sin embargo, existe una marcada correlación entre el cociente respiratorio y la cantidad de polisacáridos capsulares que poseen células aisladas a lo largo de diferentes días de crecimiento cuando están en ausencia de todo tipo de fuente carbonada.

Beijerinckia, en contraste con *Azotobacter*, es conocida como un microorganismo ácido-tolerante que produce ácido en el medio a expensas de los carbohidratos. Sin embargo, hemos encontrado que *A. vinelandii* st. 4 es capaz, asimismo, de bajar el pH del medio desde 6,8 a 4,2.

Los polisacáridos de *Beijerinckia* y *Azotobacter* poseen una composición química diferente. En el polisacárido de *Beijerinckia* se encontró glucosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico, pero no heptosa, siendo la glucosa el principal componente (51,8 % del peso total del polisacárido). El polisacárido de *A. vinelandii* estaba compuesto

por ramnosa, glucosa y ácido galacturónico, mientras que en *A. chroococcus*, además de estos tres monosacáridos se identificaron la xilosa y la galactosa.

BIBLIOGRAFIA

1. BECKING, J. H. 1959. Plant Soil, 11, 193-205.
2. BECKING, J. H. 1961. Plant Soil, 14, 217-27.
3. BECKING, J. H. 1961. Plant Soil, 14, 297-322.
4. BECKING, J. H. 1962. Plant Soil, 16, 171-201.
5. BECKING, J. H. 1962. Plant Soil, 16, 202-13.
6. COHEN, G. H., and JOHNSTONE, D. B. 1964. J. Bacteriol., 88, 329-38.
7. COHEN, G. H., and JOHNSTONE, D. B. 1964. J. Bacteriol., 88, 1695-99.
8. COOPER, E. A.; DAKER, W. D., and STACEY, M. 1938. Biochem. J., 32, 1752-58.
9. COOPER, E. A., and PRESTON, J. F. 1935. Biochem. J., 29, 2267-77.
10. COOPER, E. A., and PRESTON, J. F. 1937. J. Soc. Chem. Ind., 56, 1T-5T.
11. DEMOSS, R. D., and BARD, R. C. 1957. Physiological and biochemical techniques. In *Manual of Microbiological Methods*. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.
12. DISCHE, Z. 1955. New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. In *Methods in Biochemical Analysis*, II. Interscience Publ. Inc., New York.
13. DISCHE, Z. 1962. Color reactions of carbohydrates. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*, I. Academic Press Inc., New York.
14. DUBOS, R. F. 1945. *The Bacterial Cell*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
15. HAMILTON, W. B. 1931. J. Bacteriol., 22, 249-54.
16. KORNBERG, A., and HORECKER, B. L. 1955. Glucose 6-phosphate dehydrogenase. In *Methods in Enzymology*. I. Academic Press Inc., New York.
17. LAWSON, G. J., and STACEY, M. 1954. J. Chem. Soc., 1925-31.
18. McDONALD, M. R. 1955. Hexokinase. In *Methods in Enzymology*, I. Academic Press Inc., New York.
19. LINKER, A., and JONES, R. S. 1964. Nature, 204, 187-88.
20. NELSON, N. 1944. J. Biol. Chem., 153, 375-80.
21. PARTRIDGE, S. M. 1949. Nature 164, 443.
22. PROCTOR. 1959. Nature, 184, 1934-35.
23. QUINNELL, C. M.; KNIGHT, S. G., and WILSON, P. W. 1957. Can J. Microbiol., 3, 277-88.
24. SOMOGYI, M. 1952. J. Biol. Chem., 195, 19-23.
25. STACEY, M., and BARKER, S. A. 1960. *Polysaccharides of Micro-organisms*. Clarendon Press, Oxford.
26. UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H., and STAUFFER, J. F. 1964. *Manometric Techniques*, Burgess Publ. Co., Minn.
27. WILKINSON, J. F. 1958. Bacteriol. Rev., 22, 46-73.

THE GROWTH OF *CANDIDA ALBICANS*
AND *SALMONELLA TYPHIMURIUM* IN MIXED
CULTURES (*)

by

C. RAMIREZ (**) and J. P. RANSOM (***)

INTRODUCTION

Yeasts of both the ascosporogenous and asporogenous species are ubiquitous (1, 2 and 5). They occur frequently on fruits, vegetables, milk and other products used by man. Yeasts readily survive the acid reaction of the gastric secretions and are found in feces. *Candida albicans*, a potential pathogen, can be cultured from about 40 % of normal individuals. The distribution of this organism in the human intestine and its associations with pathological processes are well known (1). When mice are artificially fed cultures of this organism, it can frequently be recovered from all levels of the intestinal tract, but most frequently from the cecum. In view of the wide distribution of this organism any demonstrable interaction between *C. albicans* and enteric pathogens might be significant with regard to susceptibility to enteric infections.

MATERIAL AND METHODS

Two *Salmonella typhimurium* cultures were used. The SR-11 strain was obtained from Dr. R. E. Chamberlain, Smith, Kline and French

(*) This research was supported by grant number DA-MD-49-193-64-112 from the U. S. Army Medical Research and Development Command.

(**) Present address: Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología del C. S. I. C. Madrid, Spain.

(***) Present address: New England Institute for Medical Research, Ridgefield, Connecticut. U. S. A.

Table 1. Composition of the media used in the experiments (Expressed in mg or g per liter)

Chemicals	Media		
	B-40	B-65	B-66
FeCl ₃	0.01 mg	0.01 mg	0.01 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 mg	0.01 mg	0.01 mg
CuSO ₄	0.01 mg	0.01 mg	0.01 mg
KI	0.40 mg	0.40 mg	0.40 mg
NaCl	0.10 g	0.10 g	0.10 g
Na acetate	3.00 g	3.00 g	3.00 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20 g	0.20 g	0.20 g
KH ₂ PO ₄	1.00 g	1.00 g	1.00 g
Trishydroxy-aminomethane	6.00 g	6.00 g	6.00 g
Phytone (*)	0.10 g		
Casaminoacids (**)	5.00 g		
L-tryptophane	0.05 g		
L-cystine	0.05 g		
β-alanine		10.00 g	
L-tyrosine		1.00 g	
Ammonium chloride			1.00 g
Adenine	0.01 g		
Guanine	0.01 g		
Thymine	0.01 g		
Uracil	0.01 g		
Biotin	0.25 mg	0.25 mg	0.25 mg
Calcium pantothenate		4.00 mg	4.00 mg
Glucose	10.00 g		
Ribose		5.00 g	5.00 g
Sucrose		10.00 g	10.00 g

(*) B. B. L. Papaic digest of soya meal.

(**) Difco.

Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania, was used in most experiments. In few experiments ATCC strain 7823 was used. Two strains of *Candida albicans* were used. Strain NEI was originally obtained from the ATCC as number 10231. Strain H₂V₂ was obtained from Dr. H. Isemberg, Long Island Jewish Hospital, New Hyde Park, N. Y. and was used in a few experiments.

The semi-synthetic medium of Koser and Tribby (4) was used after substituting 0.05 M trishydroxy-aminomethane for the phosphate buffers used by the original authors. Glucose was added at a level of 1.0 % and was limiting to *Candida albicans* growth but not to *Salmonella typhimurium* growth. This medium was called B-40 (*table 1*). Two modifications of medium B-40 were formulated for these experiments (*table 1*): Medium B-65 and Medium B-66. The media without sugars were sterilized in the autoclave at 121 °C, for 15 minutes. The sugars were sterilized separately by filtration through an 0.45 μ millipore filter and aseptically added to the media. The pH was adjusted to 7.2. The growth of microorganisms was measured by plate counts using the technique of Miles and Misra (6), using trypticase soy agar (BBL *) for *S. typhimurium* and mycosel agar (BBL) for *C. albicans*. Microbial growth was removed from staled media by filtration through an 0.45 μ Millipore filter. Several cultural techniques were used. Most experiments were carried out using one of these three techniques: shaken, continuously fed, or dialysis cultures. The shaken cultures contained either 50 ml medium per 250 ml flask or 100 ml medium per 500 ml flask. The flasks were inoculated with 1 % v/v of an adapted once washed culture and incubated for 48 hours in an Eberbach shaking waterbath operating at 36 °C, and shaking at the rate of 110 ± 2 excursions per minute.

Continuously fed cultures were set up using a modification of the apparatus described by Ransom et al (10). The complete device (*figure 1*) consists of four parts: a reservoir of sterile growth medium (a), a peristaltic pump (b) (Sigmamotor, Inc., Middleport, N. Y.), a growth chamber (c), and a variable temperature waterbath (d). The medium passes from the reservoir to the growth chamber by the action of the peristaltic pump on the 1 mm i. d. tygon tubing originating at the bottom of the growth medium reservoir and terminating on a hubless-hypodermic needle (e) inserted through an inverted serum bottle stopper (j)

(*) Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, Maryland.

on one of the three glass tubes in the top of the growth apparatus. The flow rate can be changed by varying the speed of the peristaltic pump. The medium in the growth chamber is mixed by magnetic stirring and the waste is removed by an overflow at the top of the growth tube.

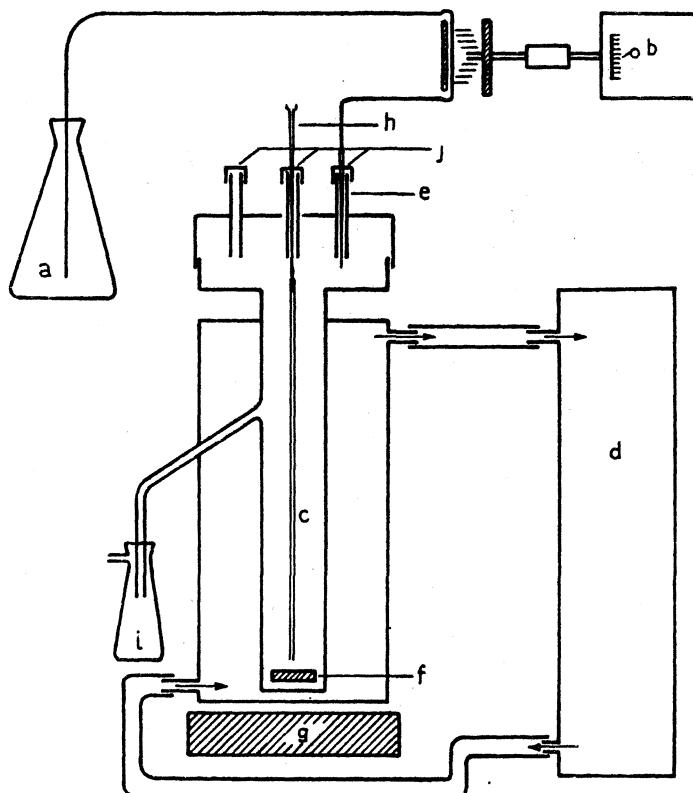


Figure 1. a, Reservoir with sterile growth medium. b, Peristaltic pump. c, Growth chamber. d, Variable temperature water bath. e, Hubless-hypodermic needle. f, Magnetic bar. g, Magnetic stirrer. h, Sample collector. i, Waste collector. j, Inverted serum bottle stoppers

The central tygon tube (h) allows inoculation and sample removal from the bottom of the growth tube and it also aids in culture mixing. In continuously fed cultures, one organism, the resident (*Candida albicans*), is established in static culture for 18 hours and then the flow of the medium is started and allowed to continue for 24 hours allowing establishment of a steady-state population. After a steady-state population is obtained, the second organism, the invader (*Salmonella typhimurium*), is inoculated.

Glucose concentrations were determined using anthrone reagent (9). Cell density was measured with a Klett colorimeter using a blue filter.

RESULTS

A) The possibility that yeast growth produced inhibitory substances as end products of its metabolism was studied using antibiotic assay techniques. No evidence of inhibition of *Salmonella typhimurium* growth was observed in these assays, suggesting that *Candida albicans* does not produce inhibitory substances under our experimental conditions.

B) The possibility that yeast growth produced stimulative substances was investigated by dialysis techniques. We used a length of sealed cellophane dialysis bag containing growth medium, placed in a 500 ml wide mouth pyrex glass container also containing growth medium. A rubber stopper containing tubes allowing forced aeration, sampling and inoculations, and an air exhaust, closed the upper portion of the apparatus. The yeast was grown for 48 hours with forced aeration, one liter per minute, from an aquarium pump in three wide mouth pyrex glass containers as described previously. The three containers used in this experiment were inoculated as follows:

Container A: *Candida albicans* was inoculated outside of the dialysis bag at the level of 5×10^4 cells per ml and incubated for 48 hours at 37 °C; *Salmonella typhimurium* was then inoculated both inside and outside the bag and the culture incubated for 24 hours at 37° C. Container B: was inoculated outside of the bag with *S. typhimurium* as a control. Container C: was inoculated outside of the bag with *C. albicans* (control).

The resulting plate counts showed that the bacteria growing inside the dialysis bag were stimulated and that bacteria growing in mixed culture with the yeast were depressed when compared to the control cultures.

This experiment indicated that *C. albicans* produced some low molecular stimulating substance. The substance has been identified microbiologically as pantothenic acid. Prolonged growth of *C. albicans* in a shaker culture produces measurable quantities of pantothenic acid, nicotinic acid, pyridoxine, cobalamine, and riboflavin. If *S. typhimurium* is grown under strongly aerobic conditions, pantothenic acid was the only tested stimulatory B vitamin. In static media the presence of the vitamin allows an early increase of the bacterial growth but after a short period other factor(s) are limiting the total amount of growth. On the other hand, growth of *S. typhimurium* under microaerophilic conditions is not stimulated by addition of B vitamins to the basal medium.

C) Carbon and nitrogen assimilation tests were made by auxanographic techniques using *Candida albicans* and *Salmonella typhimurium*. These tests were made to find appropriate chemicals allowing independent growth of the two organisms, permitting a study of their mutual influences and eliminating the possibility of interference from competition for nutrients. A wide range of nitrogen sources were assimilated by *C. albicans* (table 2). The range of nitrogen sources used by *S. typhimurium* was more restricted. Several of the nitrogen sources were utilized only after a delay (table 2). The carbon sources are indicated in table 3. Only *S. typhimurium* assimilated ribose or dulcitol while only *C. albicans* assimilated sucrose. These properties were used to formulate medium B-65 (table 1), allowing total nutritionally independent growth of the two microorganisms in mixed cultures.

D) A systematic analysis of the factor(s) that were limiting the total amount of bacterial growth in presence of the yeast, is presented as follows:

a) The effect of the amount of aeration on the yeast-bacterium interaction was studied using flask cultures of *Candida albicans* grown with varying amounts of aeration for 48 hours, removing the growth, restoring the pH and the used glucose and inoculating with *Salmonella typhimurium*. The results indicated that strong aeration was essential for

Table 2. Nitrogen assimilation patterns of *Candida albicans* and of *Salmonella typhimurium* using B-40 carbon basal medium

Nitrogen source	<i>C. albicans</i> growth		<i>S. typhimurium</i> growth	
	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr
Phytone (*)	+	+	+	+
L-arginine	+	+	+	+
L-tryptophane	+	+	—	—
Glycine	+	+	—	—
L-proline	+	+	—	+
L-histidine	—	+	—	—
L-threonine	—	+	—	—
L-lysine	+	+	—	—
L-phenylalanine	—	+	+	+
L-alanine	+	+	—	—
β -alanine	+	+	—	—
Hydroxy-L-proline	—	—	—	—
L-isoleucine	+	+	+	+
L-cystine	—	+	—	—
Cysteine	—	—	—	—
L-tyrosine	—	—	+	+
L-serine	+	+	+	+
L-aspartic acid	+	+	—	—
L-glutamic acid	+	+	+	+
L-leucine	+	+	+	+
L-valine	—	+	—	—
L-methionine	+	+	—	—
Urea	+	+	—	+
Ammonium chloride	+	+	+	+
Ammonium sulphate	+	+	+	+
Sodium nitrate	—	—	—	—
Sodium nitrite	—	—	—	—

(*) Phytone: B. B. L. Papain digest of soya meal.

Table 3. Carbon assimilation patterns of *Candida albicans* and of *Salmonella typhimurium* using B-40 nitrogen basal medium

Carbon source	<i>C. albicans</i> growth		<i>S. typhimurium</i> growth	
	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr
Sucrose	+	+	—	—
Lactose	—	—	—	—
Glucose	+	+	+ (*)	+ (*)
Ribose	—	—	+ (*)	+ (*)
Inositol	—	—	—	—
Xylose	+	+	+ (*)	+ (*)
Arabinose	—	—	—	—
Dulcitol	—	—	+ (*)	+ (*)
Mannose	+	+	+ (*)	+ (*)
Galactose	+	+	+ (*)	+ (*)
Sodium citrate	+	+	+	+
Sodium succinate	—	—	—	—

(*) Inhibitory at high concentrations.

depressing growth of the bacterium, suggesting a more complete use of nutrient sources by the yeast under strongly aerobic conditions.

b) To determine the effect of glucose on the yeast-bacterium interaction experiments were carried out with and without restoration of the glucose utilized by *Candida albicans*. The results indicated that glucose levels, *per se*, play little if any part in depressing growth of *Salmonella typhimurium*, since the bacteria preferentially used the carbon from amino acids.

c) To study the effect of complete nutritional independence on the interaction, experiments were carried out comparing the results obtained in aerobic cultures using B-40 and B-65 media. Medium B-65, with betta-alanine (used only by *Candida albicans*) and tyrosine (used only by *Salmonella typhimurium*) as sole sources of nitrogen, and sucrose (used only by *C. albicans*) and ribose (used by *S. typhimurium*) as sole sources of carbon, was used as a medium allowing complete nutritional inde-

pendence of the two microorganisms under study. Flasks with B-65 medium were staled with *C. albicans* in shaken cultures for 24 and 48 hours at 37 °C. The resulting staled medium was inoculated with *S. typhimurium* and incubated 24 hours at 37 °C. The resulting growth was compared to that obtained in fresh medium. The same steps were followed with medium B-40. Comparing the results obtained using B-40 and B-65 media it was noted that there was depression of *S. typhimurium* in presence of *C. albicans* in medium B-40 while in medium allowing complete nutritional independence (B-65) there was no difference in cell density of the control flask and one staled for 24 or 48 hours. This suggested a possible competition for nutrients as the reason for the observed interaction.

d) The effect of replacing various nutrients after *Candida albicans* staling was studied, as a complement to the previous experiments. Shaken cultures of yeast were incubated for 48 hours in medium B-66. After incubation the cultures were pooled, the growth removed by filtration, the pH adjusted to its original level, and the amount of ammonium chloride remaining determined using Nessler's reagent. The staled medium was divided into 100 ml aliquots and various additions were made to each portion: one received ammonium chloride to a final concentration of 0.1 %, another sucrose and ammonium chloride, and the last received no additions. The resulting media were sterilized by filtration and dispensed in 500 ml flasks. The flasks were inoculated with 1 % v/v of bacterial culture, incubated on a shaker at 37 °C, for 24 hours, and the resulting growth was measured using a Klett colorimeter. The results indicated that the staled medium prevented growth of the bacteria and that addition of sucrose did not affect the results. Addition of ammonium chloride with or without addition of sucrose overcame the prevention of growth in the staled medium, showing clearly that the interaction between *C. albicans* and *S. typhimurium* was a competition for nutrients.

Continuously fed cultures more closely resemble the ecological situation found in the intestine than the batch cultures. The *Candida albicans-Salmonella typhimurium* system was studied using this technique, hoping to more closely approximate conditions found in the intestine. The intestine has a continuous source of nutrients, a continuous effluent removal, and is not nutritionally limited. The value of continuous flow cultural methods for studying microbial interactions was recognized by various

authors (3, 7-8, 10 and 12). By this means interaction between various species of the normal resident flora of the intestine and various enteropathogens can be studied. Continuously fed cultures were operated under several conditions: aerobic; anaerobic (5% carbon dioxide in nitrogen); with and without a reducing agent; and using two media (B-40 and B-65). The method of paired cultures was used in the continuously fed culture studies. In this method the control tube was a pure culture of the test organism while the experimental tube was a mixed culture. The ratio of the population in the mixed culture to that in the pure culture was an index of the stimulation or depression of growth of the experimental culture. A ratio larger than one indicated depression of growth. In aerobic continuously fed culture the results obtained were similar to those obtained using shaker stalled media. In these cultures the ratio of *Salmonella typhimurium* in the presence of *Candida albicans* to that of a pure culture of bacteria (St_{Ca}/St) was uniformly less than one, indicating depression of *S. typhimurium* growth. An opposite effect was noted in the anaerobic cultures: the same ratio (St_{Ca}/St) was uniformly more than one, indicating stimulation of *S. typhimurium* growth. The ratio of *C. albicans* in presence of *S. typhimurium* to that of a pure *C. albicans* culture (Ca_{St}/Ca) was on the other hand less than one, indicating depression of *C. albicans* growth.

DISCUSSION

These experiments have indicated that in mixed cultures there is an interaction between *Candida albicans* and *Salmonella typhimurium*. This observed interaction occurs mainly because of the relative growth rate of the two organisms in the presence of various external conditions. Conditions favoring *S. typhimurium* growth in mixed culture with *C. albicans* are: decreased oxygen concentration, low glucose levels in aerobic cultures, and media containing high levels of nitrogen sources. These conditions do not allow sufficient *C. albicans* growth to exhaust the media of nitrogenous materials utilizable by *S. typhimurium*. On the other hand, strong aeration and high glucose levels during aerobic growth allow sufficient *C. albicans* growth to exhaust the nitrogenous nutrients required by the bacteria.

Under anaerobic conditions it is unlikely that *C. albicans* would suppress *S. typhimurium*, and in fact the pre-establishment of the yeast might be detrimental to hosts infected with salmonellae, due to the production of the stimulating growth factor pantothenic acid by the yeast.

ABSTRACT

An interaction is observed when *Candida albicans* and *Salmonella typhimurium* are grown together. The interaction can result in either depression in aerobiosis or stimulation in anaerobiosis of the bacterium. The type of interaction observed seems to be of competitive nature.

RESUMEN

Se han observado unas interacciones entre la levadura *Candida albicans* y la enterobacteria *Salmonella typhimurium* en cultivos simultáneos. Esta interacción puede manifestarse tanto bajo la forma de una disminución del crecimiento de la bacteria en aerobiosis como por el estímulo del mismo en anaerobiosis. Estas interacciones observadas parecen ser de naturaleza competitiva.

REFERENCES

1. ANDERSON, H. W. 1917. Yeast-like fungi of the human intestinal tract. J. Infect. Diseases, 21, 341-85.
2. Ainsworth, G. C. 1958. The Chemistry and Biology of Yeasts, 587. Ed. A. H. Cook. Academic Press, N. Y.
3. HENTGER, D. J., and FRETER, R. 1962. *In vivo* and *in vitro* antagonism of intestinal bacteria against *Shigella flexneri*. I. Correlation between various tests. J. Infect. Diseases, 110, 30-7.
4. KOSER and TRIBBY. 1961. Response of *Candida albicans* to glutamine and some related compounds. J. Bacteriol., 82, 994-95.
5. LUND, A. 1958. The Chemistry and Biology of Yeasts, 63. Ed. A. H. Cook, Acad. Press, N. Y.
6. MILES, A. A., and MISRA, S. S. 1938. Estimation of the bactericidal power of blood. J. Hyg., 38, 732-49.
7. NORTHRUP, J. H. 1954. Apparatus for maintaining bacterial cultures in the steady state. J. Gen. Physiol., 38, 105-15.

-
8. PARKER, R. B., and SNYDER, M. L. 1961. Interactions of the oral microbiota, I. A system for the defined study of the mixed cultures. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 108, 749-52.
 9. PELCZAR, M. J.; HANSEN, P. A., and KONETZKA, W. A. 1961. Quantitative Bacterial Physiology Laboratory Experiments. Burgess Publishing Co., N. Y.
 10. RANSOM, J. P.; FINKELSTEIN, R. A.; CEDER, R. E., and FORMAL, S. B. 1961. Interaction of *Vibrio cholera*, *Shigella flexneri*, Enterococci and Lactobacilli in continuously fed cultures. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 107, 332-36.
 11. VAN UDEN, N., and SOUSA, L. D. C. 1962. Quantitative aspects of the intestinal yeast flora of swine. J. Gen. Microbiol., 27, 35-40.
 12. ZUBRZYCKI, L., and SPAULDING, E. L. 1958. Studies on the normal human fecal flora. J. Bacteriol., 76, 278-82.

THE *IN VIVO* INTERACTION OF *CANDIDA ALBICANS* AND *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

by

C. RAMIREZ, (*) J. P. RANSOM (**) and D. H. PITKIN (***)

INTRODUCTION

Studies on interactions of the frequently occurring intestinal inhabitant *Candida albicans* and the enteric pathogen *Salmonella typhimurium* indicated that under anaerobic conditions the bacterium was stimulated (1). It is generally agreed that the intestinal tract is predominantly anaerobic, therefore, it was of interest to see if the *in vitro* findings were applicable to the *in vivo* situation.

MATERIAL AND METHODS

Two strains of *Salmonella typhimurium* were used in these experiments: strain «W» was obtained from Dr. T. Digenio, Boston University Medical School, Boston, Massachusetts, while strain SR-11 was obtained from Dr. R. E. Chamberlain, Smith Kline and French Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania. The *Candida albicans* strain used was obtained from the ATCC as number 10231.

The microbial cultures were grown on agar plates at 37 °C, for 24 hours and the resulting growth resuspended in 5 ml of sterile physiological saline. The bacteria were grown on trypticase soy agar (BBL *)

(*) Present address: Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología del C.S.I.C., Madrid, Spain.

(**) Present address: New England Institute for Medical Research, Ridgefield, Connecticut, U.S.A.

(***) Present address: New Jersey, N.J., U.S.A.

while the yeast was grown on mycophil agar (BBL *).

Male Swiss mice weighing 20-25 g were used as test animals. They were obtained from the Blue Spruce Farm, Altamont, New York. The mice were given food pellets and water *ad libitum*. They were fasted for 18 hours before infection and were also pretreated with opium alkaloids (Pantopon, Roche Laboratories) administered intraperitoneally in a dose of 0.5 to 2.0 mg per animal 30 minutes before infection with either organism. The *per os* route of infection was used and the *Candida albicans* were established 48 hours before the *Salmonella typhimurium*.

Fecal cultures were made at intervals after infection to determine the presence or absence of the infecting organisms in the intestinal tract. A fresh fecal pellet was homogenized in saline, for *Salmonella* isolations, and two loopfulls streaked on the surface of a *Salmonella-Shigella* agar plate (BBL *), while the *Candida* were cultured using the remainder of the specimen spread on the surface of a mycosel agar plate (BBL *). All plates were incubated at 37 °C. The isolates were identified by standard bacteriological techniques. Fecal pellets cultured before infection failed to show the presence of either of the two organisms.

RESULTS

It was possible to establish either independent or dual intestinal populations of these organisms. Mice pretreated with opium, but receiving neither organism, showed no mortality while those receiving only the candidae had a 2.86% mortality. Mice receiving only the salmonellae had a 52.2% mortality while those receiving both cultures experienced a 62.1% mortality. The difference in treatment does not become readily apparent until after 15 days (*table 1*).

Table 1. The effect of pre-established Candida albicans on mortality in mice due to per os infection with Salmonella typhimurium

Microorganism	Mortality		Positive cultures, %	
	†/total	%	Salmonella	Candida
<i>Salmonella</i>	37/71	52.2	54.5	0.0
<i>Candida</i>	2/70	2.86	0.0	83.5
<i>Salmonella + Candida</i>	47/66	62.10	64.3	71.4

(*) Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, Maryland.

SUMMARY

Mice orally infected with both *Candida albicans* and *Salmonella typhimurium* experienced a higher level of mortality than did mice infected with only one of the organisms. The results of these experiments seem to be in line with the *in vitro* findings (1) using anaerobic continuously fed cultures. Under that condition the salmonellae in the mixed culture had a larger population than did a pure culture run in parallel.

RESUMEN

Ratones infectados simultáneamente con *Candida albicans* y *Salmonella typhimurium* presentaron más alto nivel de mortandad que los ratones infectados con uno sólo de los microorganismos en cuestión. Los resultados de estos experimentos parecen estar de acuerdo con los experimentos *in vitro* (1) en cultivos continuos bajo anaerobiosis. Bajo dichas condiciones, las salmonelas en cultivos mixtos se desarrollaban más intensamente que en los cultivos puros.

REFERENCES

1. RAMÍREZ, C., and RANSOM, J. P. The growth of *Candida albicans* and *Salmonella typhimurium* in mixed cultures. *Microbiol. Espan.*, 21, 77.

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

INFLUENCIA DE LA RESPIRACION ENDOGENA
EN LA OXIDACION DE AMINOACIDOS
POR *DEBARYOMYCES KLOECKERI*

por

J. L. FERNANDEZ-PUENTES y D. RODRIGUEZ

INTRODUCCION

En una publicación previa (5) se describe el comportamiento de las estirpes 537a y 537b de *Debaryomyces kloeckeri* frente a diferentes aminoácidos como única fuente de carbono.

En el presente trabajo se estudia la influencia de la respiración endógena de células lavadas de *Debaryomyces kloeckeri* sobre la oxidación de aminoácidos.

Clifton y Sobeck (1-2), en estudios realizados sobre la respiración endógena de *Bacillus cereus* comprueban que ésta experimenta una disminución de un 20-40 %, cuando se añade un substrato exógeno adecuado.

Nuestros resultados con *Debaryomyces kloeckeri* parecen indicar un efecto inverso, es decir, inhibición de la oxidación de aminoácidos motivada por la presencia de substrato endógeno.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Se han utilizado las dos estirpes de *Debaryomyces kloeckeri* descritas en un trabajo previo (5), que se conservan en tubos inclinados de agar-Sabouraud-maltosa.

Obtención de células lavadas

Para la obtención de células lavadas se sembraron los microorganismos en agar-Sabouraud-maltosa, y después de cuarenta y ocho horas de incubación a 25 °C se recogieron las células en solución salina al 4 %. La suspensión resultante se centrifugó a 3.000 r/m durante quince minutos; esta operación de lavado y centrifugación se repitió dos veces y, finalmente, se suspendieron las células en amortiguador de fosfatos 0,1 M a pH = 6,5.

Disminución de las reservas celulares

Gran parte de las reservas celulares se eliminan suspendiendo las células lavadas en una solución de la siguiente composición:

SO ₄ (NH ₄) ₂	5 g
PO ₄ H ₂ K	1 g
SO ₄ Mg · 7H ₂ O	0,5 g
Agua destilada	1.000 ml

La concentración de la suspensión de células se ajustó a una densidad óptica equivalente a 0,22-0,23 mg de peso seco/ml y se distribuyó en matraces de 1 l de capacidad, poniendo 200 ml de suspensión en cada uno. Los matraces se someten luego a una agitación de vaivén (60 oscilaciones/min) durante veinticuatro horas, a 26 °C.

Técnicas manométricas

La medida del consumo de oxígeno y desprendimiento de CO₂ se realizó siguiendo las técnicas descritas por Umbreit y colaboradores (13).

RESULTADOS

En un trabajo previo (5) se observó que las estirpes de *Debaryomyces kloeckeri*, especialmente la 537a, pueden desarrollarse en presencia de diferentes aminoácidos como única fuente de carbono. Sin embargo, en experimentos manométricos realizados con células lavadas de estas estirpes puestas en presencia de glutamato, arginina, asparagina, aspártico

y alanina, sólo se observa consumo de oxígeno con este último aminoácido. En el cuadro 1 se expone el consumo de oxígeno en microlitros de una suspensión de células lavadas de la estirpe 537a de *D. kloeckeri*, crecidas durante cuarenta y ocho horas en el medio de agar-Sabouraud-maltosa a 26 °C y puestas frente a los substratos glutamato y alanina.

*Cuadro 1. Microlitros de oxígeno consumidos por una suspensión de células lavadas de *D. kloeckeri* estirpe 537a (10 mg de peso seco) frente a 20 µmol de glutamato y de alanina*

Substrato	Tiempo, en minutos			
	10	20	30	40
Glutamato	23	45	67	85
Alanina	31	59	89	126
Testigo sin substrato	25	47	68	86

Dado el alto consumo de oxígeno que presentan las células en ausencia de substrato externo, se realizaron experimentos manométricos con células lavadas procedentes de cultivos de veinticuatro y cuarenta y ocho horas, para estudiar la influencia de la edad del cultivo sobre la respiración endógena. En el cuadro 2 se indican los microlitros de oxígeno consumidos y de anhídrido carbónico producidos por suspensiones de células de ambos cultivos.

*Cuadro 2. Microlitros de oxígeno consumidos y de anhídrido carbónico producidos en una hora por suspensiones de células lavadas (10 mg de peso seco) de la estirpe 537a de *D. kloeckeri* procedentes de cultivos de veinticuatro y cuarenta y ocho horas*

Edad del cultivo	Oxígeno	Anhídrido carbónico	Cociente respiratorio
24 horas	215	150	0,70
48 horas	112	104	0,93

Teniendo en cuenta estos resultados, en los experimentos siguientes se utilizaron siempre células procedentes de cultivos de cuarenta y ocho horas en agar-Sabouraud-maltosa.

A fin de eliminar la mayor parte del substrato endógeno, se suspendieron las células lavadas en la solución salina ya descrita y se mantuvo luego en agitación a 26 °C durante diferentes intervalos de tiempo. En el respirómetro de Warburg se determinó la variación de la respiración endógena y de la actividad enzimática, tomando como criterio para valorar esta última los microlitros de oxígeno consumidos por las distintas suspensiones frente a una cantidad fija de glucosa añadida como substrato exógeno. Como testigos se utilizaron células lavadas no sometidas a este tratamiento.

En los cuadros 3-4 se exponen los resultados obtenidos con las estirpes 537a y 537b de *Debaryomyces kloeckeri* respectivamente. En ambos experimentos se emplearon suspensiones de células en cantidad equivalente a 10 mg de peso seco. La cantidad de glucosa añadida fue de 20 μmol .

Siguiendo la técnica descrita para disminuir las reservas celulares, se realizaron experimentos sobre oxidación de aminoácidos y algunos ácidos del ciclo tricarboxílico. El tratamiento para disminuir las reservas celulares se realizó suspendiendo las células en la solución de sales du-

*Cuadro 3. Variación de la respiración endógena y de la actividad frente a 20 μmol de glucosa, en suspensiones de células lavadas de la estirpe 537a de *D. kloeckeri* (10 mg de peso seco), según la duración del tratamiento de vaciado de sus reservas celulares*

Horas de tratamiento	Microlitros de oxígeno consumidos a distintos tiempos (minutos)				Microlitros de oxígeno consumidos en 40 minutos frente a 20 μmol de glucosa
	10	20	30	40	
0	32	67	93	120	73
24	10	18	24	28	76
48	6	12	15	18	58
130	0	2	3	4	49

rante veinticuatro horas, ya que, según los resultados de los cuadros 3-4, en ese tiempo hay una gran disminución de la respiración endógena, conservándose prácticamente toda la actividad frente a la glucosa.

Cuadro 4. Variación de la respiración endógena y de la actividad frente a 20 μmol de glucosa, en suspensiones de células lavadas de la estirpe 537b de D. kloeckeri (10 mg de peso seco) según la duración del tratamiento de vaciado de sus reservas celulares

Horas de tratamiento	Microlitros de oxígeno consumidos a distintos tiempos (minutos)				Microlitros de oxígeno consumidos en 40 minutos frente a 20 μmol de glucosa
	10	20	30	40	
0	35	72	103	134	45
24	8	14	19	22	44
48	4	9	12	15	39
130	1	2	3	4	30

En los cuadros 5-6 se exponen, respectivamente, los resultados obtenidos con suspensiones lavadas de las estirpes de *Debaryomyces kloeckeri* 537a y 537b, sometidas a tratamiento de vaciado de sus reservas

Cuadro 5. Coeficiente de oxígeno de suspensiones de células lavadas de la estirpe 537a de D. kloeckeri, frente a 20 μmol de cada uno de los substratos

Substrato	Cf.O ₂	Substrato	Cf.O ₂
Glucosa	223	Arginina	10
Serina	93	Aspartato	7
Prolina	88	Alanina	102
Glicocola	42	Piruvato	6
Glutamato	22	Oxalacetato	8
Cetoglutarato	20		

celulares durante veinticuatro horas y colocadas frente a los substratos que se indican. Estos resultados están expresados en forma de coeficiente de oxígeno ($Cf \cdot O_2$) (microlitros de oxígeno consumidos en sesenta minutos por 10 mg de células).

*Cuadro 6. Coeficiente de oxígeno de suspensiones de células lavadas de la estirpe 537b de *D. kloeckeri*, frente a 20 μmol de cada uno de los substratos*

Substrato	Cf.O ₂	Substrato	Cf.O ₂
Glucosa	121	Arginina	0
Serina	24	Aspartato	0
Prolina	6	Alanina	27
Glicocola	23	Piruvato	5
Glutamato	0	Oxalacetato	2
Cetoglutarato	8		

DISCUSION

La oxidación de aminoácidos por células lavadas de *Debaryomyces kloeckeri* está influida por la presencia de substrato de reserva en el interior de estas células. A mayor contenido de substrato endógeno, la oxidación de los aminoácidos es menos intensa.

El cociente respiratorio de *Debaryomyces kloeckeri* es de 0,7 para las células procedentes de cultivos de veinticuatro horas y de 0,93 para las de cultivos de cuarenta y ocho horas; esta variación del cociente respiratorio con la edad del cultivo parece indicar que existen, al menos, dos substratos endógenos diferentes, ya que, según afirman Dawes y Ribbons (4), las diferencias de cocientes respiratorios encontradas por diversos autores, que oscilan entre 2,5 y 0,75, son debidas a distintos substratos endógenos.

Ya Quastel, en 1928 (9), observó que la respiración endógena podía reducirse considerablemente si las células lavadas de un microorganismo se suspenden durante un cierto tiempo en un medio no nutritivo. Por

otra parte, Stier y Standodr (12) afirman que la respiración endógena disminuye con el tiempo. El medio no nutritivo empleado por nosotros resulta eficaz cuando las células lavadas de *Debaryomyces kloeckeri* se suspenden en él durante veinticuatro horas. Siguiendo el criterio de Harrison (6) y Harrison y Lawrence (7), hemos sometido a este tratamiento cultivos de cuarenta y ocho horas en agar-Sabouraud-maltosa, ya que al recoger las células en fase poslogarítmica, permanecen viables más tiempo.

A fin de evitar la variación de la respiración endógena debida a la distinta procedencia de las células (3-4 y 10) hemos empleado siempre el mismo medio de cultivo.

La estirpe 537b presenta una tasa respiratoria mucho más baja que la 537a; este fenómeno es frecuente entre mutantes de levaduras resistentes a agentes tóxicos (8 y 11).

RESUMEN

La respiración endógena de *Debaryomyces kloeckeri* inhibe la oxidación de varios aminoácidos. Los experimentos realizados con células lavadas de dicho microorganismo indican que existen, por lo menos, dos substratos endógenos diferentes, según la edad del cultivo.

Se describe un método original para disminuir el contenido de sustancias de reserva de las células de *Debaryomyces kloeckeri* sin alterar la actividad frente a la glucosa.

Las células lavadas de *Debaryomyces kloeckeri* que han sido tratadas previamente para disminuir su contenido en sustancias de reserva, presentan mayor actividad oxidativa frente a diversos aminoácidos y algunos compuestos del ciclo de ácidos tricarboxílicos.

La estirpe 537b de *Debaryomyces kloeckeri*, mutante de la 537a, presenta menor actividad respiratoria que ésta frente a todos los substratos ensayados.

SUMMARY

The oxidation of several amino acids is inhibited by the endogenous respiration of the yeast *Debaryomyces kloeckeri*.

Respirometric studies showed that endogenous respiration was influenced by the age of the cells and also that at least two different endogenous substrates were present.

A new technique of starvation have been used in order to reduce the endogenous respiration without affecting the metabolism of glucose.

An increase in the rate of respiration of the starved cells was observed upon addition of substrates such as amino acids and some acids of the tricarboxylic cycle.

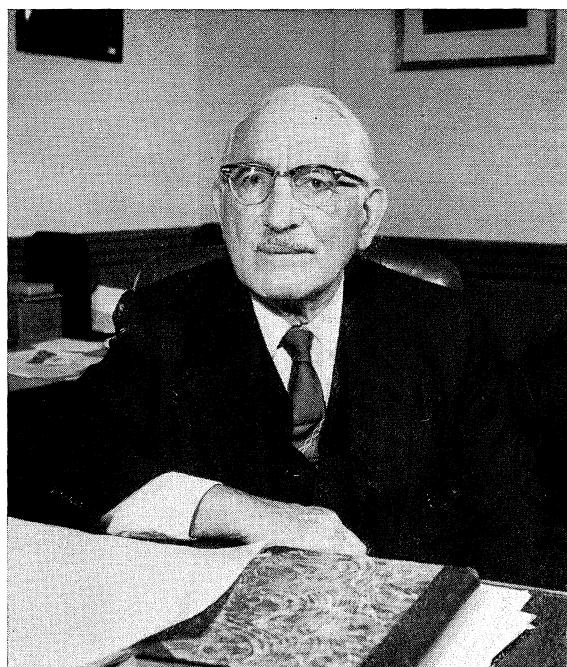
The strain 537b of *Debaryomyces kloeckeri* (a mutant of the 537a) showed a rate of respiration lower than the strain 537a.

BIBLIOGRAFIA

1. CLIFTON, C. E., y SOBECK, S. M. 1961. Oxidative assimilation of glucose and endogenous respiration of *B. cereus*. *J. Bacteriol.*, 81, 284.
2. CLIFTON, C. E., y SOBECK, S. M. 1961. Endogenous respiration of *B. cereus*. *J. Bacteriol.*, 82, 252.
3. COCHRANE, V. W., y GIBBS, M. 1951. The metabolism of species of *Streptomyces*. IV. The effect of substrate on the endogenous respiration of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.*, 61, 305.
4. DAWES, E. A., y RIBBONS, D. W. 1962. The endogenous metabolism of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 16, 241.
5. FERNÁNDEZ-PUENTES, J. L., y PÉREZ-SILVA, J. 1967. Utilización de distintas fuentes de carbono y de nitrógeno por levaduras. *Microbiol. Españ.*, 20, 37.
6. HARRISON (Jr.), A. P. 1960. The response of *Bacterium lactis* aerogenes when held at growth temperature in the absence of nutrient: An analysis of survival curves. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B.*, 152, 418.
7. HARRISON, A. P., y LAWRENCE, F. R. 1963. Phenotypic, genotypic and chemical changes in starving populations of *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.*, 85, 742.
8. HEBEKA, E. H., y SOLOTOROVSKY, M. 1962. Development of strains of *Candida albicans* resistant to candidine. *J. Bacteriol.*, 84, 237.
9. QUASTEL, J. H. 1928. A study of «resting» or nonproliferating bacteria. *J. Hyg.*, 28, 139.
10. REINER, J. M.; GES, H., y KAMEN, M. D. 1949. The effect of substrates on the endogenous metabolism of living yeast. *Arch. Biochem.*, 20, 175.
11. SLONIMSKI, P. P. 1949. Action de l'acriflavine sur les levures: IV. Mode d'utilisation du glucose par les mutants «petite colonie». *Ann. Inst. Pasteur.*, 76, 510.
12. STIER, J. B., y STANDODR, J. M. 1936. Según DAWES y RIBBONS. 1962. The endogenous metabolism of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 16, 241.
13. UMBREIT, W. W.; BURRIS, H., y STAUFFER, J. F. 1957. Manometric techniques. 3.^a edición. Burgess Publishing. Co., Minneapolis.

OCHENTA CUMPLEAÑOS DEL DR. WAKSMAN

Honramos nuestras páginas con un resumen de la biografía del Dr. Selman A. Waksman como homenaje y saludo en la fecha de este aniversario.



El Dr. Waksman nació el 22 de julio de 1898 en la ciudad de Priluka, cerca de Kiev, hijo de Jacob Waksman y Fradia London. Realizó la enseñanza primaria en su ciudad natal y completó sus años escolares en Odesa, donde obtuvo su diploma en el Quinto Instituto, en 1910, trasladándose a los Estados Unidos en el mismo año.

En el otoño de 1911, Waksman ingresó en la Universidad de Rutgers, con una beca del Estado. Recibió el grado de «Bachelor of Scien-

ce», en Agricultura, en 1915; entró a trabajar como Asistente de Investigación en Bacteriología de Suelos con el Dr. J. G. Lipman, en la Estación Agrícola Experimental de Nueva Jersey, al tiempo que continuaba en Rutgers, donde obtuvo el grado de «Master of Science», en 1916. En este mismo año se le concedió una beca para la Universidad de California, en la que obtuvo el Doctorado en Bioquímica.

En 1918 Waksman fue invitado por el Dr. Lipman para volver a Rutgers como microbiólogo y profesor de Microbiología del Suelo. En 1925 fue nombrado Profesor asociado y en 1930 Profesor titular. Cuando en 1940 se organizó el Departamento de Microbiología fue designado Profesor y Jefe del Departamento, y en 1949, Director del Instituto de Microbiología —creado en ese año y dedicado a la investigación y la enseñanza de graduados en Microbiología—, cargos que desempeñó hasta el 31 de agosto de 1958; continuando asistiendo, sin embargo, al laboratorio, donde ha proseguido sus tareas investigadoras y docentes. En diferentes ocasiones, Waksman ocupó cargos en la Industria y actuó como Consejero del Gobierno, de Instituciones Científicas y Laboratorios.

Es miembro de numerosas entidades científicas, norteamericanas y de otros países, entre ellas la Sociedad de Microbiólogos Españoles, de la que es Socio de Honor. En 1946 recibió el grado de Doctor en Medicina Honorario por la Universidad de Lieja; en 1950 fue nombrado Doctor *Honoris Causa* por la Universidad de Madrid, y en 1958, por las de Strasburgo y Jerusalén; es también Doctor *Honoris Causa*, en Medicina, por las Universidades de Atenas y Pavía, y en Ciencias, por varias Universidades de los Estados Unidos. Entre las numerosas distinciones que se le han concedido se encuentran la Gran Cruz de la Sanidad Española, la Orden del Sol Naciente Japonesa, la Legión de Honor Francesa y la Orden de la Cruz del Sur Brasileña; Premio Nobel de Fisiología y Medicina, en 1952.

Ha publicado más de cuatrocientos trabajos científicos y veinticinco libros. Entre estos últimos, se encuentran: «Enzymes», «Principles of Soil Microbiology», «The Soil and the Microbe», «Humus», «Microbial Antagonisms and Antibiotic Substances», «The Actinomycetes», «The Life of J. G. Lipman», «Soil Microbiology», «S. N. Winogradsky», «Guide to the Actinomycetes and their Antibiotics», «My Life with the Microbes», «The Brilliant and Tragic Life of W. M. W. Haffkine, Bacterio-

logist», «The Conquest of Tuberculosis», «The Actinomycetes. A summary of current knowledge» y «Actinomycin».

Las líneas de trabajo del Dr. Waksman, en orden cronológico, han sido: estudio de la población microbiana del suelo, oxidación del azufre por las bacterias, la fertilidad del suelo y los microorganismos; descomposición de residuos de animales y plantas, naturaleza y formación del humus; bacterias del mar; producción y naturaleza de las sustancias antibióticas; taxonomía, fisiología y bioquímica de los actinomicetos. Ha aislado, junto con sus discípulos y colaboradores, una serie de nuevos antibióticos: actinomicina, estreptotricina, estreptomicina, griseína, neomicina, candicidina y otros.

Con los derechos obtenidos de la estreptomicina y la neomicina se construyó y se mantiene, en Rutgers, el Instituto de Microbiología antes nombrado. Por su parte, los esposos Waksman establecieron, con la pequeña parte que de los derechos citados le corresponden a él, una Fundación para el desarrollo de la Microbiología, de la que el Dr. Waksman es Presidente, destinada a la ayuda de investigaciones y publicaciones microbiológicas en cualquier país.

BIBLIOGRAFIA

HANDBUCH DER MIKROBIOLOGISCHEN LABORATORIUMS-TECHNIK, por R. Dickscheit y A. Janke. 1967. Theodor Steinkopff, Dresden. XVI + 500 páginas.

Esta obra se ha elaborado tomando como base la de Alexander Janke «Arbeitsmethoden der Mikrobiologie», con lo que se recoge la vasta experiencia personal de este autor, que desde hace más de cuarenta años se interesa por los problemas relacionados con la metodología microbiológica, y ello hace que «Handbuch der mikrobiologischen Laboratoriumstechnik» no sea una mera recopilación de las distintas técnicas microbiológicas, sino que los autores, con acertado sentido crítico, exponen una selección de las que resultan más recomendables.

Está dividida en ocho capítulos. En el primero se da una idea muy concisa de los distintos grupos de microorganismos. Este capítulo, por supuesto, no dice nada nuevo a quienes estén iniciados en la Microbiología; sin embargo, cumple la finalidad de fijar los conceptos y términos que luego se han de emplear en los capítulos subsiguientes.

En el capítulo segundo, el lector encontrará normas y consejos para el montaje de laboratorios de microbiología, así como una serie de indicaciones generales para el manejo eficaz de los distintos tipos de microscopios. También se hace una descripción bastante detallada del micromanipulador y de su manejo.

El capítulo tercero está dedicado a las técnicas de observación microscópica y de coloración de los microorganismos.

El cuarto capítulo es una exposición ordenada de los métodos de esterilización de las técnicas para investigar y valorar la acción de los distintos factores disgenésicos.

La preparación de medios de cultivo se trata en el capítulo quinto, en el que previamente se hace una clasificación de estos medios y luego se recomiendan los métodos más apropiados, no sólo para la preparación en sí, sino también para la distribución de los mismos.

El capítulo sexto es otro modelo de exposición ordenada; está dedicado al aislamiento y cultivo de microorganismos. Comienza con el cultivo de bacterias (aerobias y anaerobias), continúa con el de los hongos (levaduras y mohos) y termina con la exposición de los métodos para el enriquecimiento, purificación y conservación de virus (animales, vegetales y bacterianos).

El capítulo séptimo está dedicado a las técnicas de recuento de células microbianas y demás métodos para la determinación de la marcha de los cultivos. Por último, en el capítulo octavo se exponen las técnicas para determinar la morfología, propiedades bioquímicas y serológicas de los microorganismos; dedicando mayor atención a las que se utilizan para la identificación.

Entre las cualidades de la obra que comentamos merecen destacarse la exposición ordenada, el estilo conciso y el que en muchos de los métodos los autores dan normas y consejos para obtener un mayor rendimiento de los mismos.

J. PÉREZ-SILVA

METODOS DE LABORATORIO EN MICROBIOLOGIA, por W. F. Harrigan y Margaret E. McCance (Traducción de Isabel García-Acha y J. Rodríguez-Villanueva). 1968. Editorial Academia, León. XII + 426 páginas.

En la versión española de la obra de Harrigan y McCance hemos tenido ocasión de comprobar el magnífico trabajo de estos autores al preparar este manual de laboratorio para los estudiosos de la Microbiología en las distintas ramas de la Ciencia.

La obra es bastante compleja y didáctica por cuanto incluye más de cien páginas dedicadas a la metódica general microbiológica, describiendo técnicas aplicables a la identificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos, basadas en sus características generales de tinción, cultivo, metabolismo y serología.

En su segunda parte, el libro incluye métodos especialmente dedicados al control microbiológico de alimentos, agua, suelo y ensilados; apartados, estos últimos, que amplían la utilidad de este Manual al campo agrícola y edafológico. En este capítulo de técnica de microbiología aplicada, los autores han dedicado una muy especial atención al examen y control microbiológico de la leche y sus derivados.

Como apéndices de interés, la obra cuenta con: una útil combinación de claves y tablas en la que se procura acelerar la identificación de los distintos géneros microbianos realizando las pruebas más imprescindibles; un capítulo dedicado a fórmulas y preparación de colorantes, reactivos y medios; y unas tablas para calcular en una muestra el número más probable de bacterias por métodos de dilución en tubo.

La traducción de una obra de tales características supone un perfecto conocimiento de la materia en cuestión y es una meritaria labor la que han realizado los Dres. García-Acha y Rodríguez-Villanueva poniendo al alcance de los estudiantes de habla hispana una guía de laboratorio para sus trabajos prácticos con microorganismos de diferentes habitats biológicos.

A. PORTOLES