VOLUMEN 22. 1969 ENERO - MARZO. NUMERO 1

Microbiología Española

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

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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

Suscripción (4 números): España, 200 PTA; extranjero, 300 PTA
Número: España, 60 PTA; extranjero, 90 PTA

MICROBIOLOGIA
ESPAÑOLA

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

Vicedirectores: Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Publicaciones del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

INDICE

Página

Microscopía electrónica de tejidos tumorales inducidos en *Phaseolus vulgaris* por *Agrobacterium tumefaciens*, por *M.ª Victoria Díaz-Múgica* y *M. Rubio-Huertos* 1

Estudio comparativo de las técnicas de tinción argéntica en la infraciliación de *Paramaecium aurelia*, por *M.ª Victoria Díaz-Múgica* 9

Estudio de bacterias aisladas del vino. II. Clasificación de bacterias lácticas, por *B. Iñigo, Ana M.ª Plasencia* y *F. Bravo*... 19

Estudios sobre la producción de sustancias de crecimiento por *Nectria galligena*, por *R. Beltrá, Ana M.ª Ballesteros* y *R. Lahoz* 41

Aminoácidos y azúcares del *Corynebacterium michiganensis* y de sus paredes celulares, por *Eulalia Cabezas de Herrera* y *R. Moreno* 55

Algunos datos sobre el comportamiento cromatográfico y electroforético de las β-glucanasas sintetizadas por dos microorganismos, por *A. Jiménez-Martínez* y *Monique Novaes-Ledieu* 63

Bibliografía, por *A. Portolés* 83

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA
SECCION DE VIRUS VEGETALES

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TEJIDOS TUMORALES INDUCIDOS EN *PHASEOLUS VULGARIS* POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

por

M.ª Victoria DÍAZ - MÚGICA y M. RUBIO - HUERTOS (*)

INTRODUCCION

La formación de tumores por *Agrobacterium tumefaciens* ha sido muy estudiada, principalmente en su aspecto bioquímico y citológico en el microscopio normal; por medio de cortes ultrafinos y microscopía electrónica se han estudiado también los tumores formados en el tallo de *Datura stramonium* por Hohl (2) y en cultivos de tubérculos de *Heliantus tuberosus* L por Ryter y Manigault (6). La nueva técnica introducida por Lippincott y Heberlein (3), de formación de tumores en hojas de *Phaseolus vulgaris* L., permite la obtención de tumores de desarrollo muy rápido y de pequeño tamaño en el nervio medio de las hojas o en las venillas de las mismas, de forma que constituyen un material muy adecuado para obtener una buena fijación y estudio al microscopio electrónico; lo que constituye el objeto de este trabajo.

(*) Agradecemos a la Fundación «Juan March» la beca concedida a uno de los autores para realizar parte de este trabajo.

MATERIAL Y METODOS

La estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada ha sido la V., muy virulenta, obtenida por Beltrá, de la vid, *Vitis vinifera* (5).

Las inoculaciones han sido realizadas sobre hojas de plantas jóvenes de *Phaseolus vulgaris* L., siguiendo el método de Lippincot (3).

Microscopía electrónica

Los tumores, muy pequeños y blandos, los hemos partido en dos o tres trozos de menos de 1 cm^3, y se fijaron en tetróxido de osmio al 2 %, en tapón de veronal de Palade, a pH 6,8, durante dos horas, a 4 °C. Los tejidos fueron luego deshidratados en una serie de acetona-agua y en el pase de acetona al 70 %, saturado con acetato de uranilo, doce horas. Una vez deshidratados, los tejidos se incluyeron en durcupán. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo LKB, con cuchilla de vidrio y se tiñeron con citrato de plomo. Las observaciones fueron realizadas con un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I (Servicio de Microscopía Electrónica del CIB).

OBSERVACIONES

Las células de la excrecencia tumoral aparecen de menor tamaño que las normales; tienen ribosomas, mitocondrias, plastidios, retículo endoplásmico y aparato de Golgi abundantes, aunque las mitocondrias aparecen hinchadas y con una sustancia transparente a los electrones; los cloroplastos son poco abundantes y deformados, con pocos grana e inclusiones de almidón. Los núcleos son muy lobulados y de gran tamaño *(figuras 1-3).*

Entre el tipo de células descritos anteriormente aparecen abundantes meatos o espacios extracelulares, con una gruesa pared, desprovistos de citoplasma; en ellos se encuentran a veces algunas células bacterianas, pero donde se encuentran principalmente y de forma muy abundante es en los vasos *(figura 4),* donde van acompañadas por una sustancia grisácea u oscura que las rodea y en algunos casos parece afectar a la integridad de la célula bacteriana haciendo que su citoplasma sea más denso, el nucleoide sea difícilmente distinguible y también existan cambios en la forma

Figura 1

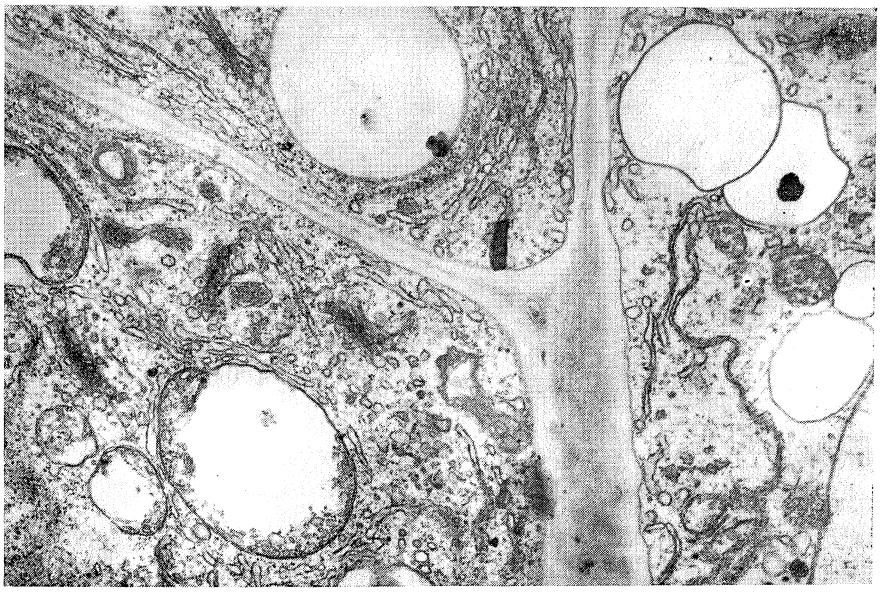

Figura 2

Figura 3

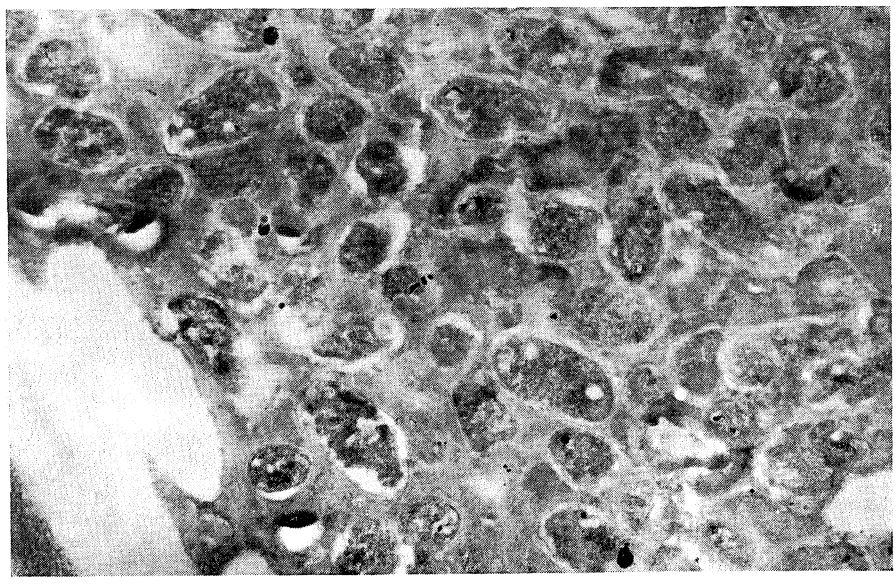

Figura 4

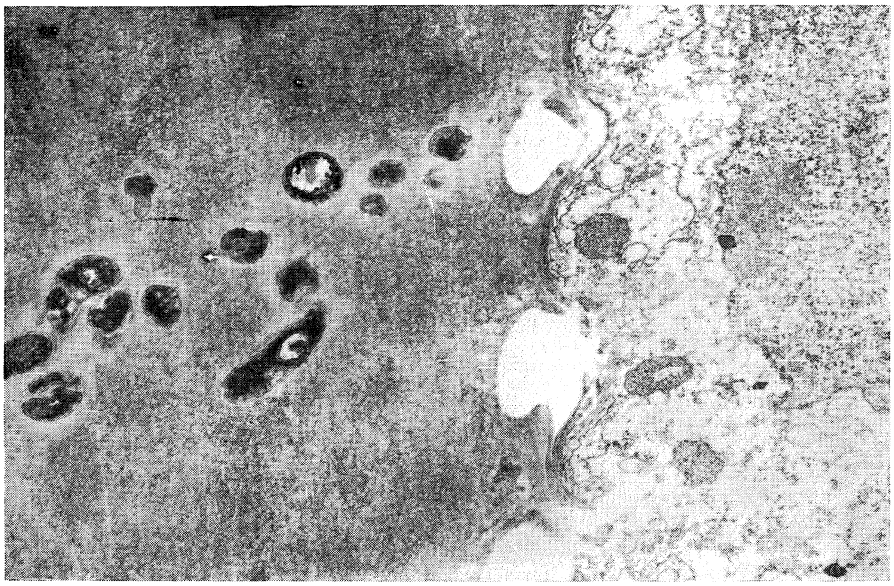

Figura 5

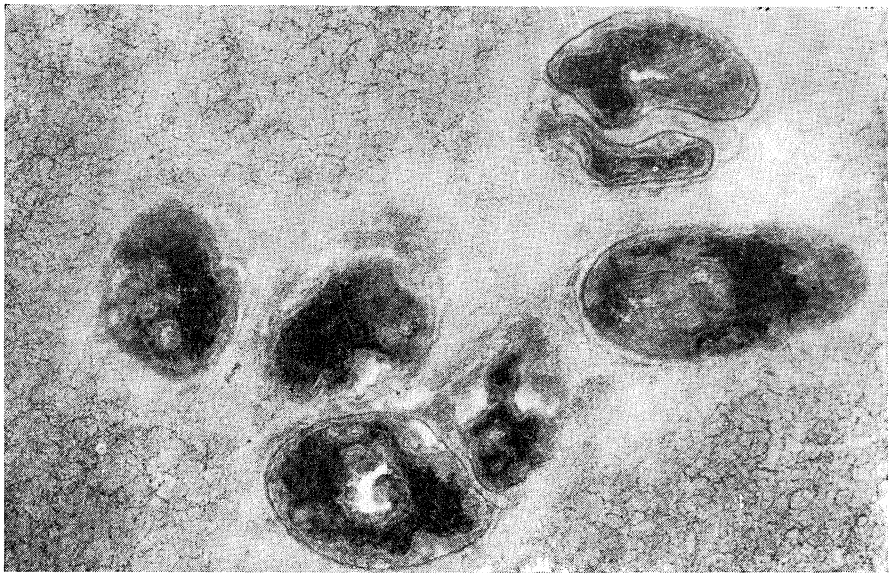

Figura 6

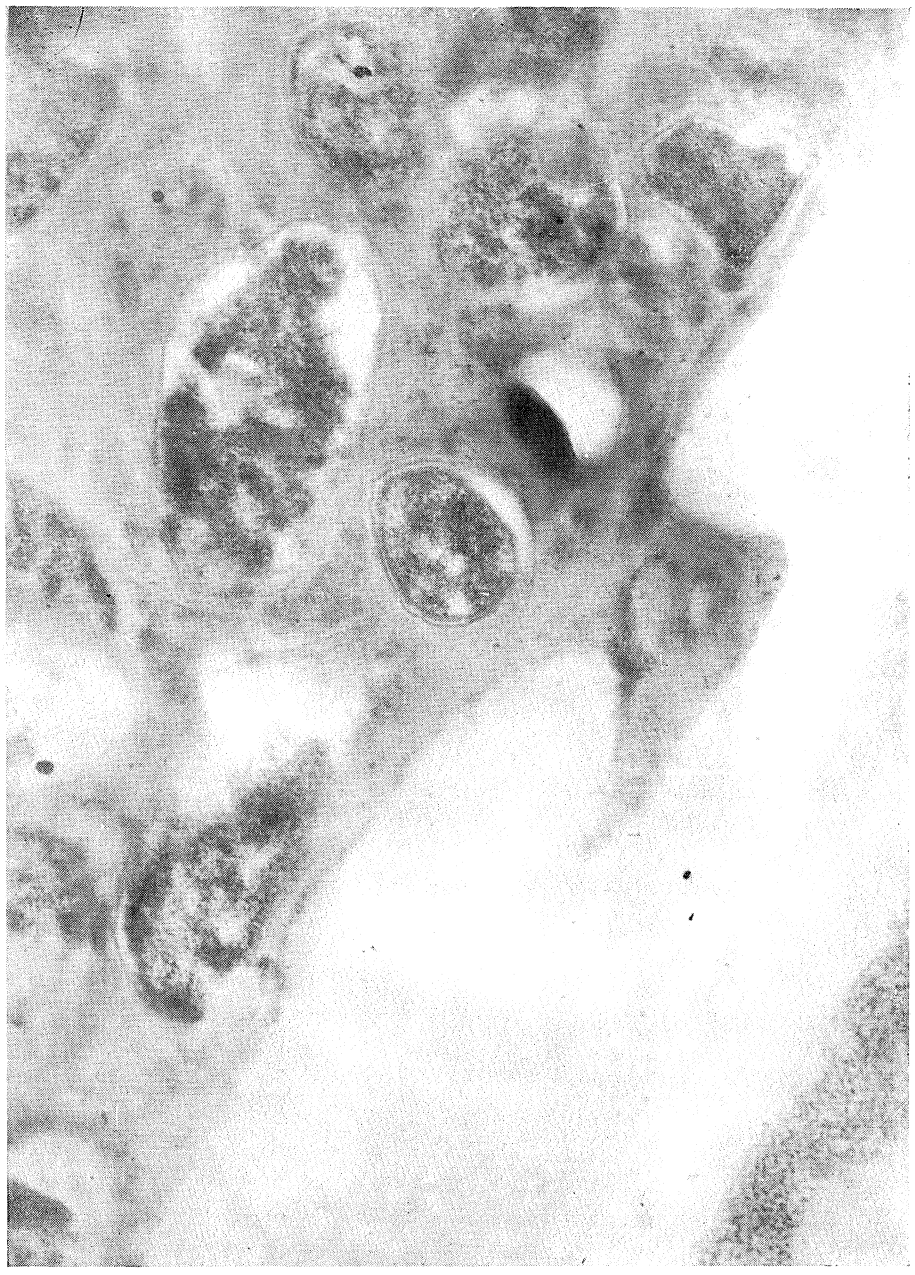

Figura 7

de la bacteria *(figuras 5-7),* pareciéndose más bien a las formas "bacteroides" encontradas en nódulos de especies de *Rhizobium.*

En general se puede observar bien la forma bacilar de las células bacterianas con la pared celular, membrana citoplásmica, ribosomas en el citoplasma y nucleoide difuso, aunque algunas células aparecen deformadas con lóbulos e invaginaciones, y el citoplasma muy oscurecido; los nucleoides parecen quedar como vacuolas.

DISCUSION

Los tejidos tumorales inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* vistos al microscopio electrónico, se diferencian muy poco histológicamente de los producidos al formarse un callo por cicatrización de una herida en el tejido vegetal. Solamente en el caso de los primeros, la producción de tejido es mucho mayor y en ellos se encuentran las bacterias inductoras, especialmente en los tejidos vasculares del floema.

En los resultados obtenidos hemos observado cómo las células bacterianas aparecen rodeadas de una sustancia opaca a los electrones, que parece afectar a la integridad de dichas células. Este mismo fenómeno lo hemos observado también en cortes ultrafinos de tumores inducidos por formas L de *Agrobacterium tumefaciens* (4); sin embargo, en el trabajo de Ryter y Manigault (6), no se menciona dicha sustancia ni modificación en las célula bacterianas, aunque en alguna de las figuras que acompañan al trabajo se observen dichas células completamente oscurecidas. Hemos pensado que podría tratarse de un artefacto de fijación, pero, generalmente, las bacterias deformadas se encuentran en los vasos del floema y las células contiguas, normales, están perfectamente preservadas por la fijación; además, se pueden encontrar diversos grados de modificación de las células bacterianas en un mismo corte, por lo que parece ser debido a una interacción bacteria-planta, como pasa en los nódulos de diversas especies de *Rhizobium* (1), en que la planta segrega alguna sustancia que rodea a las células microbianas y hace que se deformen, dando lugar a las formas llamadas bacteroides.

El papel que en la formación de los tumores de *Agrobacterium tumefaciens* pueda juzgar esta sustancia, probablemente inducida por la infección, hasta ahora, no se puede juzgar.

RESUMEN

Se han estudiado por medio de cortes ultrafinos y microscopía electrónica los tumores inducidos en hojas de *Phaseolus vulgaris* por *Agrobacterium tumefaciens*. El tejido, histológicamente, sólo difiere del cicatricial por su mayor abundancia y presencia de vasos desordenadamente colocados. En este tejido vascular aparecen células bacterianas rodeadas de una sustancia opaca a los electrones que parece afectar a la integridad de los microorganismos, modificando su ultraestructura en diferentes grados.

SUMMARY

Leaf tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens* were studied in ultrathin sections by electron microscospy; the bacterial cells were located in phloem tissue and they were surrounded by a dark substance which seems to affect the integrity, shape and ultrastructure of the bacterial cells in different degrees.

BIBLIOGRAFIA

1. BERGERSEN, F. J., y BRIGGS, M. J. 1958. J. Gen. Microbiol., 19, 482-90.
2. HOHL, H. R. 1960. Phytopathol. Z., 40, 317.
3. LIPPINCOTT, J. A., y HEBERLEIN, G. T. 1965. Am. J. Botany, 52, 856-63.
4. RUBIO-HUERTOS, M. Phytopathology, en prensa.
5. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Nature, 195, 101.
6. RYTER, A., y MANIGAULT, P. 1964. Bull. Soc. Franç. Physiol. Vegetale, 10, 44-56.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TECNICAS DE TINCION ARGENTICA EN LA INFRACILIACION DE *PARAMAECIUM AURELIA* (*)

por

M.ª Victoria DÍAZ-MÚGICA

INTRODUCCION

Durante numerosos años, los especialistas consagrados a la descripción de los Ciliados basaban su estudio únicamente en la observación del material vivo, con exclusión absoluta de las preparaciones fijadas. Aunque el estudio *in vivo,* debido a la movilidad y transparencia de la mayoría de estos animales, es realmente muy difícil, se debe a él la enorme suma de conocimientos que son la base de toda la Protistología. Desde Ehrenberg hasta Kahl, hábiles observadores, ayudados por excelentes dibujantes, han acumulado descripciones de una asombrosa precisión.

Durante mucho tiempo, se ha desconfiado, justamente, de los procedimientos de fijación, que corren el riesgo de alterar de manera notable la forma de ciertas especies particularmente delicadas. Desde hace unos cuarenta años, muchos investigadores han sentido necesidad de completar sus observaciones sobre el material vivo con el estudio de preparaciones definitivas, destinadas, bien a precisar ciertos elementos estructurales, bien

---

(*) Trabajo realizado en los Laboratorios de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias (Sección Biológicas), de la Universidad de Madrid, bajo la dirección del Prof. D. Fernández-Galiano.

a conservar definitivamente la imagen, aún incompleta, de una especie rara o nueva.

Las técnicas, desusadas e insuficientes, del carmín y la hematoxilina han sido sustituidas por otras más precisas: impregnaciones de plata, reacciones nucleares de Feulgen, etc. Estas nuevas técnicas han permitido enfocar los problemas de la Sistemática bajo un ángulo nuevo, inclinándose poco a poco al estudio de los animales en preparaciones fijadas y coloreadas, renunciando casi por completo a toda observación *in vivo*. Ayudada a su vez por la microscopía electrónica, una nueva Sistemática ha venido a superponerse a la antigua, aunque esta nueva sea también incompleta.

Nuestro propósito es estudiar en individuos de una misma especie, *Paramaeciun aurelia,* los efectos de las técnicas más utilizadas hoy, y poner en evidencia, tanto como nos sea posible, las diferencias entre unas y otras.

MATERIAL Y METODOS

Utilizamos el *Paramaecium aurelia,* que es un ciliado común en las aguas dulces que contienen restos vegetales en putrefacción. Las muestras han sido recogidas en la Ciudad Universitaria de Madrid.

En la actualidad, todos los métodos de tinción están basados en el de Ramón y Cajal (4), de impregnación argéntica, mediante fijación por una solución diluida de plata, y posterior reducción de ésta (ácido pirogálico, hidroquinona, etc.). Nosotros hemos estudiado los métodos de Chatton y Lwoff (1), de Río-Hortega (5), modificado por Fernández-Galiano (3), y el de Dragesco (2).

RESULTADOS

Método de Chatton y Lwoff

Se tiñen, en series longitudinales, grupos de tres gránulos, alternando con los cuales aparecen unos puntos coloreados más débilmente. Uniendo éstos, aparecen unas líneas, descritas como fibras longitudinales y transversales, puestas en duda por tinciones con carbonato de plata y microscopía electrónica.

Los puntos teñidos más débilmente corresponden al de salida de los tricocistos. Los gránulos, en grupos de tres, se interpretan considerando

el central como cinetosoma, y los dos laterales, como unos precipitados de plata reducida formados en la cámara que hay alrededor del cinetosoma, los cuales han sido observados por microscopía electrónica.

No se tiñen macro ni micronúcleo.

Para facilitar y mejorar los resultados obtenidos mediante este método, hemos recurrido a las siguientes modificaciones:

1) Utilizando como fijador el de Champy-Da Fano es necesario esperar de dos a tres horas y manipular varias veces con el material. Hemos observado que se alcanzan los mismos resultados y el proceso se reduce a cinco minutos, empleando 5 gotas del dialdehido glutárico al 5 % para 3 cm^3 de cultivo.

2) La inclusión en gelatina resulta verdaderamente penosa, por su bajo punto de fusión y su mala adherencia al portaobjetos. A pesar de trabajar a 0 °C, es muy frecuente que se desprenda durante la exposición a los rayos ultravioletas. Para salvar este inconveniente:

a) Desengrasamos los portaobjetos utilizando alcohol clorhídrico (9/1, v/v) lavando después).

b) Tratamos los portaobjetos con la albúmina de Mayer. Dejamos secar. Después colocamos una gota del material fijado e incluimos (con la albúmina, logramos mayor adherencia de la gelatina).

c) Elevamos el punto de fusión de la gelatina, añadiendo a la fórmula antes citada, 1 g de agar-agar, clarificando después con albúmina de huevo. Trabajando, como consecuencia, a 15 °C.

d) Sustituímos el uso de micropipeta por asa de siembra, logrando así una extensión fina y homogénea, teniendo la gelatina un espesor aproximado de 100 μ *(figuras 1-3).*

e) Utilizamos como aclarante el carboxilol.

Método de Fernández-Galiano

Aparece impregnado con absoluta exclusividad un solo gránulo (un cinetosoma) en la base de cada cilio; en *Paramaecium* se tiñen, además, con gran precisión las fibras cinetodésmicas que tienen su origen en cada uno de los cinetosomas. Los tricocistos pueden ser teñidos solamente en ciertos casos.

Se observan mejores resultados si la fijación se hace con formol, con-

siguiéndose teñir los cilios, aun a riesgo de alterar la forma de los ejemplares.

Los macro y micronúcleos se tiñen perfectamente, pudiendo incluso seguirse el proceso de reorganización del material nuclear.

Es conveniente que los ejemplares queden, al montarlos, suficientemente aplastados, pero sin romperlos, para lo cual, resulta excelente el siguiente procedimiento: sobre portaobjetos, bien limpios, ponemos una gota de ejemplares aclarados, extrayendo con pipeta el exceso de carboxilol, hasta dejarlos casi en seco. Colocamos el cubreobjetos, cuya presión es suficiente para el aplastamiento. Depositaremos lateralmente el bálsamo muy diluido, dejando que penetre por capilaridad *(figuras 4-8).*

Método de Dragesco

Los resultados obtenidos en *Paramaecium* mediante el proteinato de plata, no son reveladores. Nos encontramos con una maraña de cilios y tricocistos, donde apenas es posible distinguir nada.

DISCUSION

Utilizando la impregnación argéntica de Chatton y Lwoff, no se tiñen macro ni micronúcleos, siendo necesario para un estudio sistemático recurrir a tinciones complementarias (Feulgen, etc.).

Se tiñe bien la infraciliación; sin embargo, la inclusión en gelatina es enojosa.

Con la impregnación argéntica de Fernández-Galiano, teñimos macro y micronúcleos, cinetosomas y cilios.

Al hacer las tinciones en masa, es posible disponer de mayor número de ejemplares, con mayor comodidad. Se suprime la inclusión en gelatina, lo que hace que sea una técnica más sencilla.

La impregnación argéntica de Dragesco fue utilizada por su autor en *Euplotes* sp., tiñéndose allí cirros y membranelas, pero no gránulos basales. En *Paramaecium* únicamente teñimos cilios y tricocistos. El método es demasiado complicado.

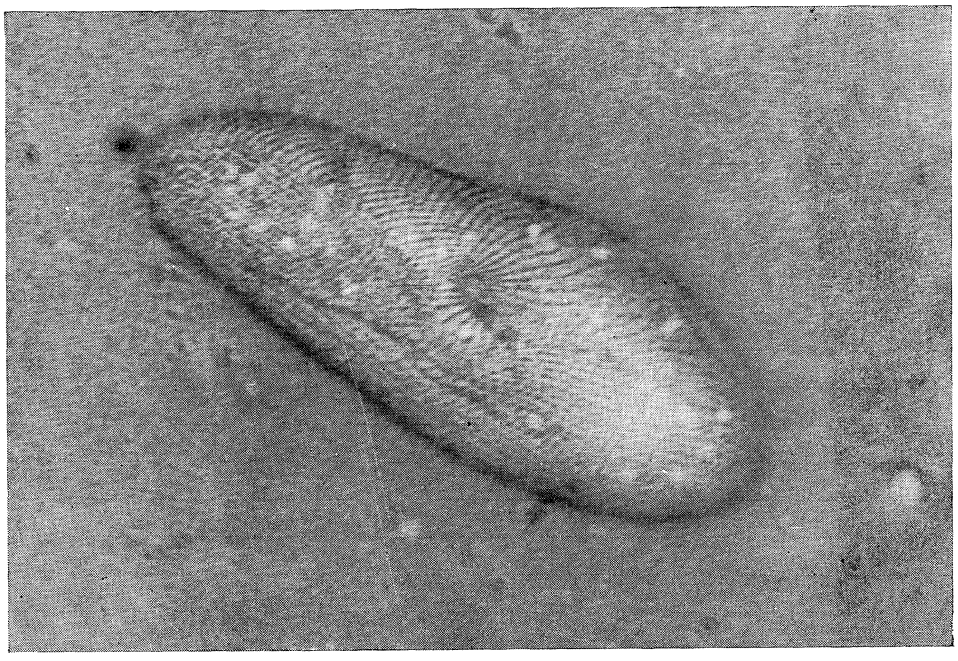

Figura 1. Paramaecium aurelia. *Impregnación por el método de Chaton y Lwoff. Citostoma, suturas preoral y postoral*

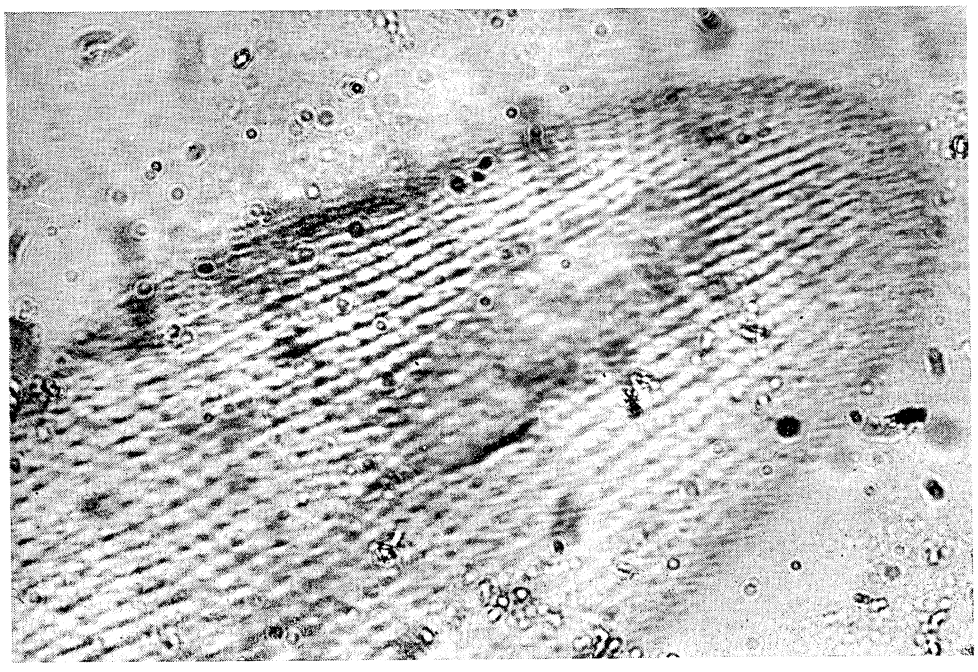

Figura 2. P. aurelia. *Método de Chatton y Lwoff. Fibras uniendo gránulos basales, descritas como fibras longitudinales*

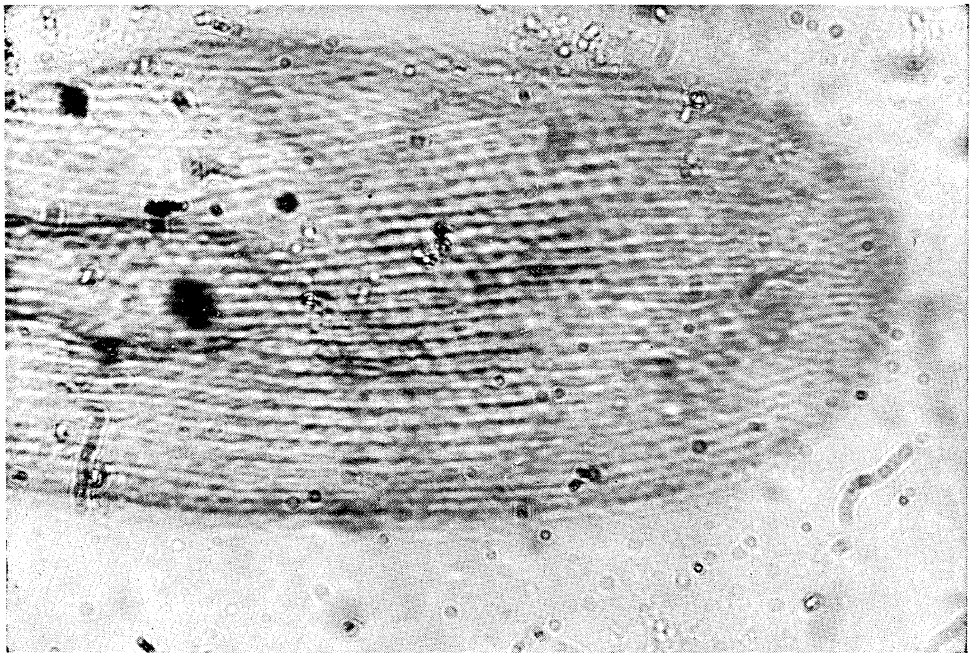

Figura 3. P. aurelia. *Método de Chatton y Lwoff. Fibras longitudinales*

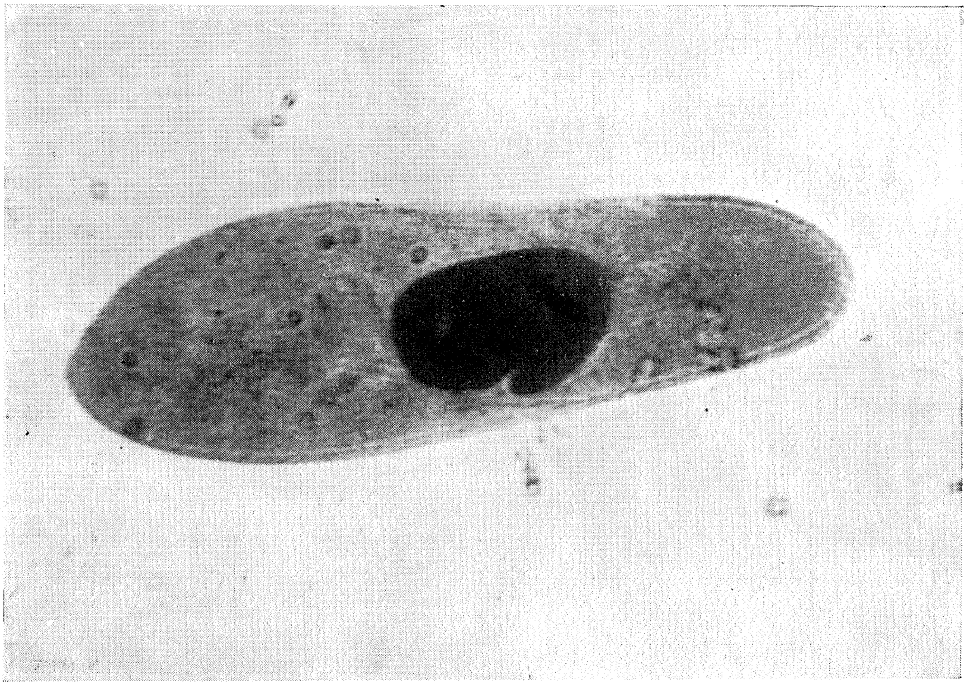

Figura 4. P. aurelia. *Método de Fernández-Galiano. Macronúcleo, micronúcleos en reorganización*

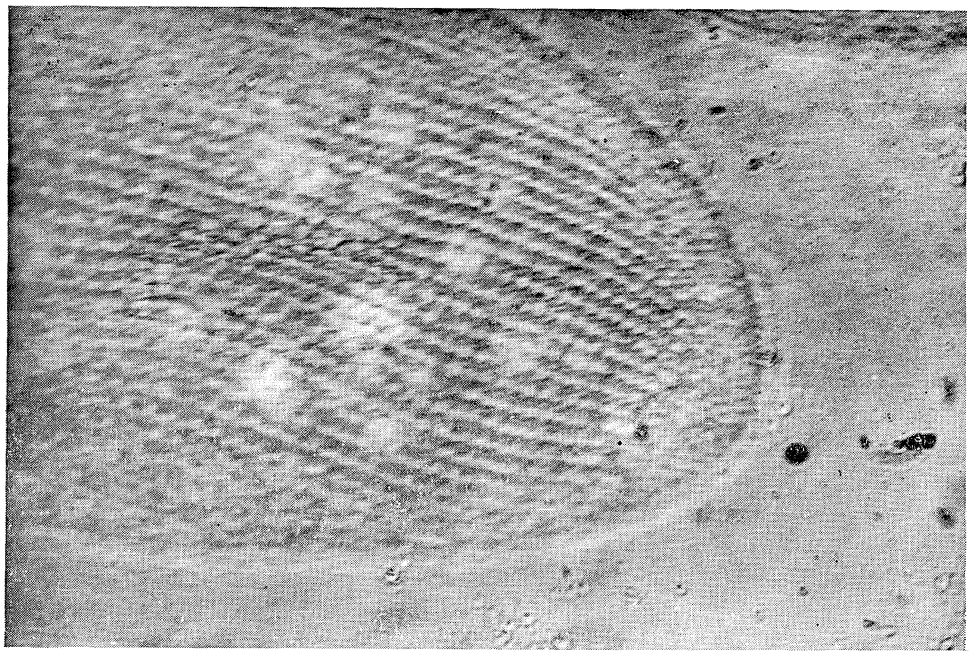

Figura 5. P. aurelia. *Método de Chatton y Lwoff. Contraste de fases*

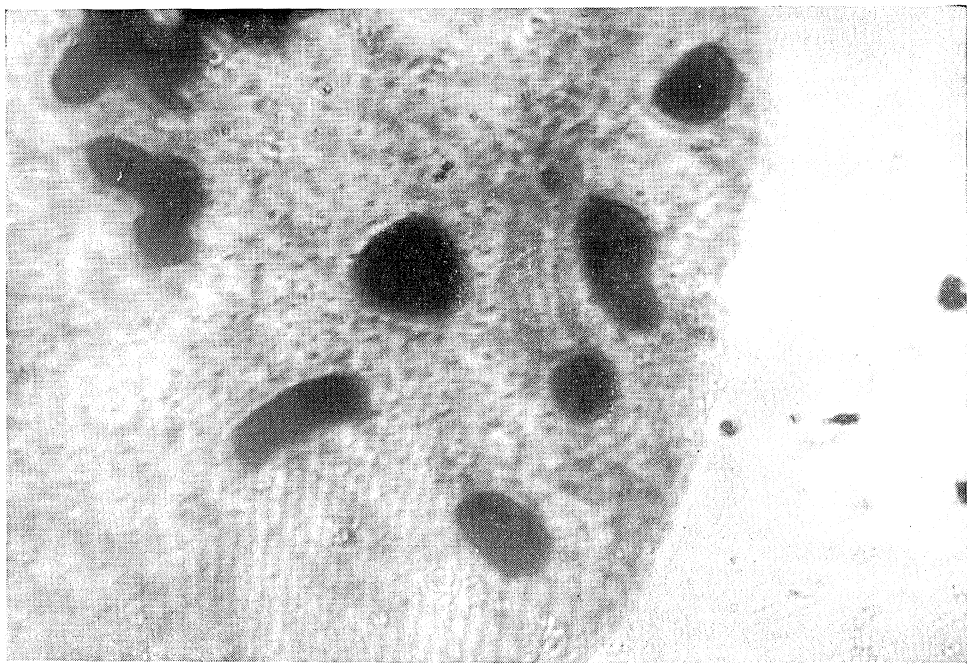

Figura 6. P. aurelia. *Método de Fernández-Galiano. Micronúcleo, cuadrulus y penículo*

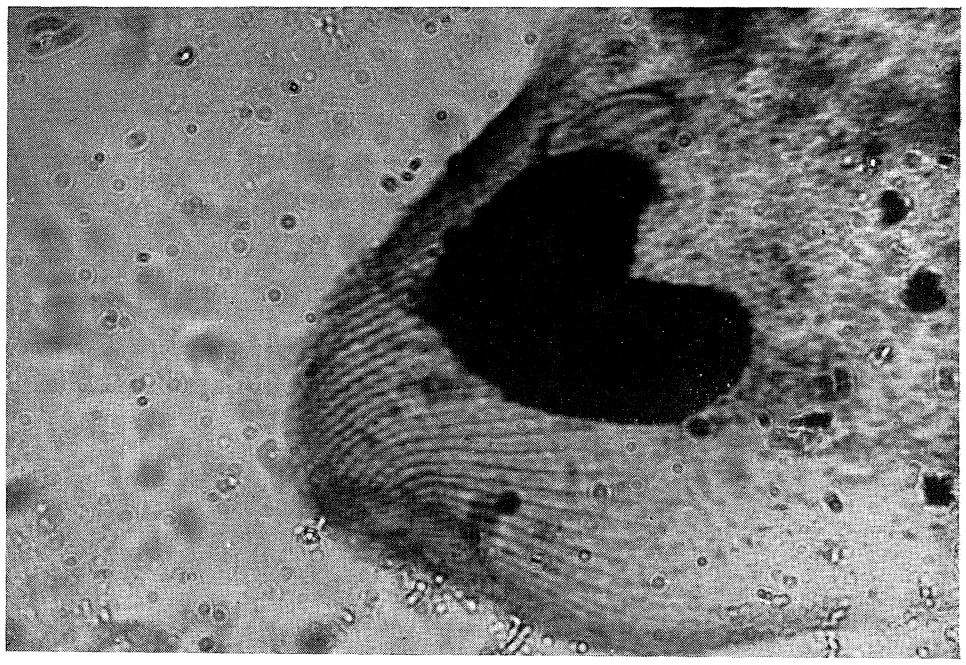

Figura 7. P. aurelia. *Método de Fernández-Galiano. Penículo, sutura postesofágica*

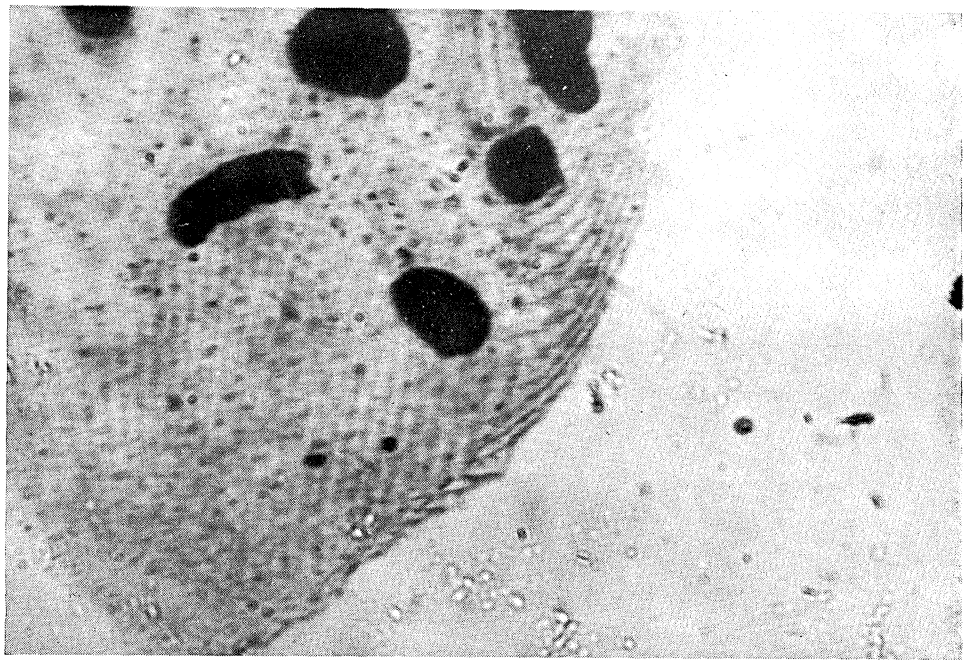

Figura 8. P. aurelia. *Método de Fernández-Galiano. Micronúcleos en reorganización y cinetias. Obsérvese la salida de una cinetodesmia de cada cinetosoma*

RESUMEN

Se han estudiado comparativamente los métodos de Chatton y Lwoff, de Fernández-Galiano y de Dragesco, para la impregnación argéntica de protozoos. En el *Paramaecium aurelia,* los mejores resultados se obtuvieron con el método de Fernández-Galiano, al que se han hecho algunas pequeñas modificaciones.

SUMMARY

We have studied comparatively the Chatton and Lwoff, Fernández-Galiano and Dragesco methods for the argentic impregnation of Protozoa. With *Paramaecium aurelia* the best results were obtained by a slight modified Fernández-Galiano method.

BIBLIOGRAFIA

1. CHATTON, E., y LWOFF, A. 1930. Impregnation, par diffusion argentique de l'infraciliature des Ciliés marins et d'eau doux après fixation cytologique et sans dessiccation. Compt. Rend. Soc. Biol., ICIV.
2. DRAGESCO, I. 1962. L'orientation actuelle de la systematique des ciliés et la technique d'impregnation au proteinate d'argent. Bull. Microscop. Appl., 11.
3. FERNÁNDEZ-GALIANO, D. 1965. Une nouvelle methode pour mettre en evidence l'infaciliature des ciliés. Excerpta Med. Ser. N, 91-263.
4. RAMÓN Y CAJAL, S. 1903. Un sencillo método de coloración del retículo protoplásmico. Trabajos Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid, II, 129-221.
5. RÍO-HORTEGA, P. del. 1919. Bol. Soc. Españ. Biol., VIII, 7-14.

PATRONATO «JUAN DE LA CIERVA» (C S I C)
INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO DE BACTERIAS AISLADAS DEL VINO
II. Clasificación de bacterias lácticas (*)

por

B. IÑIGO, ANA M.ª PLASENCIA y F. BRAVO

INTRODUCCION

Estudios microbiológicos realizados sobre velos acetificantes y sobre desarrollos bacterianos que dan lugar a anubados y otras alteraciones organolépticas del vino sirvieron de precedente a gran número de contribuciones sobre el estudio de la fermentación maloláctica (1-3, 5, 10, 13, 19, 23-24 y 29).

El aislamiento de bacterias vínicas responsables de anubados y de la producción de ácido láctico se llevó a cabo en un trabajo previo (14), estudiando los medios de cultivo apropiados para el aislamiento y conservación.

En orden a conseguir una sistemática dentro de la taxonomía de las bacterias lácticas, aisladas de diversos substratos naturales, sobresalen numerosos trabajos que hacen importantes aportaciones dentro de la taxonomía y fisiología de esta familia de bacterias, así como una visión crítica de la literatura sobre el tema (6, 20, 26-28 y 30).

En el presente trabajo se aborda la clasificación de 27 cepas de bacterias aisladas de vinos procedentes de diferentes zonas vinícolas españolas.

(*) Este trabajo forma parte de la tesis doctoral de Ana M.ª Plasencia.

MATERIAL Y METODOS

Cepas estudiadas

Las aisladas en un trabajo previo (14).

Características y pruebas fisiológicas

1. Determinación de la relación acidez volátil/total

A partir de glucosa; análisis a las dos semanas de inoculado el medio.

2. Asimilación de nitratos

Bacto-agar, 12 g; extracto de carne Difco, 3 g; bacto-peptona, 5 g; nitrato potásico, 1 g; agua destilada, 1 l.

El pH del medio se ajusta a 7,0. Se distribuye en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave a 121 °C, durante quince minutos. La reducción de nitratos fue determinada a las veinticuatro, setenta y dos y noventa y cuatro horas después de incubación a 30 °C.

Reactivo empleado: 8 g de ácido sulfanílico en 1.000 cm^3 de ácido sulfúrico diluido (1 : 20); naftilamina, 5 g en 1.000 cm^3 de ácido sulfúrico diluido (1 : 125), o bien 6 ml de dimetil-naftilamina en 1.000 cm^3 de ácido acético 5 N.

La ausencia de nitritos en un buen crecimiento puede indicar un completo consumo de nitratos o su descomposición a un estado más reducido que el de nitritos o la no reducción total. Esta posibilidad se comprueba añadiendo polvo de zinc, para reducir el nitrato presente a nitrito, que daría el color rosa característico al actuar los reactivos mencionados.

3. Licuación de gelatina

Los cultivos se inoculan en tubos conteniendo el siguiente medio estéril: extracto de carne, 3 g; peptona Witte, 5 g; gelatina, 120 g; agua destilada, 1 l. El pH del medio se ajusta a 7,0 y se esteriliza en autoclave a 120 °C, durante doce-quince minutos. Después de cuarenta y ocho horas de incubación a 30 °C, los cultivos se enfrían para ver si la gelatina ha sido licuada.

4. Producción de indol

Medio de cultivo: bacto-triptona Difco, 1 %. Incubación a 30 °C durante veinticuatro-cuarenta y ocho horas, al cabo de las cuales, a 5 cm^3 de

cultivo se añaden 0,2 a 0,3 cm^3 del reactivo de Kovacs. Un color rojo en la superficie libre del medio constituye una respuesta positiva.

5. Producción de acetilmetilcarbinol (Voges Proskauer)

Medio de cultivo: peptona Witte, 7 g; glucosa, 5 g; fosfato dipotásico, 5 g; agua destilada, 1 l. Se ajusta el pH a 7,0. Incubación a 30 °C; según la cantidad de crecimiento de la cepa en examen, de dos a siete días, se realiza el ensayo de determinación cualitativa de acetilmetilcarbinol: sobre 1 cm^3 de cultivo se adicionan 0,6 ml de una solución al 5 % de α-naftol en alcohol absoluto y 0,2 ml de solución al 40 % de hidróxido potásico. Es importante agitar cinco minutos después de la adición del reactivo. El desarrollo de un color rojo en la mezcla después de dos a cuatro horas de haber añadido los reactivos constituye una respuesta positiva.

En algunos casos se añade solución de creatina al 0,3 %, adicionándola en la solución de hidróxido potásico al 40 %.

6. Utilización de citratos

El medio empleado tiene la composición siguiente: fosfato monopotásico, 1 g; sulfato magnésico, 0,2 g; $Na(NH_4)_2PO_4$, 1,5 g; citrato sódico, 3,0 g; agua destilada, 1 l. Se emplea para diferenciar los tipos de bacilos gram-negativos, no esporiformes, que utilizan el citrato como única fuente de carbono.

7. Reacción litmus milk

Al hidratar el *bacto-skim-milk* obtenemos un equivalente de leche fresca desnatada. Disolvemos 100 g en 1 l de agua destilada fría. Se esteriliza en autoclave a 1 at durante quince minutos. Se incuban dos series, a 30° y 37 °C, durante un mes, observando la evolución al cabo de siete, quince y treinta días.

8. Producción de catalasa

Los cultivos se siembran sobre placas Petri conteniendo el medio A (14). Después de cuarenta y ocho horas de incubación a 30° y 37 °C, se adiciona sobre cada placa una solución de agua oxigenada al 10 %.

9. Utilización de $NH_4H_2PO_4$ como única fuente de nitrógeno

El medio de cultivo tiene la siguiente composición: $NH_4H_2PO_4$, 1,0 g; KCl, 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; glucosa, 10,0 g; agua destilada, 1 l. El pH se ajusta a 7,0 con NaOH 1 N. Incubación a 30 °C durante seis días.

10. Fermentación y crecimiento en carbohidratos y polialcoholes

Empleamos el siguiente medio base: extracto de carne, 3,0 g; peptona Witte, 5,0 g; extracto de levadura, 4,0 g; agua destilada, 1 l. La sustancia a ensayar se adiciona al 1 %. Se han estudiado: glucosa, sacarosa, galactosa, fructosa, maltosa, rafinosa, arabinosa, inulina, sorbitol, manitol, glicerol y eritrita. Previa disolución al baño María, se filtra. Control de pH, antes y después de la esterilización, a 1 at durante quince minutos; incubación, a 30 °C durante dos semanas.

La determinación cromatográfica de azúcares se lleva a cabo por el método utilizado por Gordon y colaboradores (11).

11. Crecimiento en ácidos

Medio base igual al anterior; el ácido ensayado, al 1 %. El pH se ajusta a 5,6-5,8. Esterilización, 1 at durante quince minutos. Se estudian: tartárico, málico, cítrico, láctico y succínico.

RESULTADOS

Los *cuadros 1-8* resumen los datos del trabajo taxonómico realizado. Las 27 cepas aisladas han sido clasificadas en 8 especies diferentes; llevándose a cabo un estudio comparado con los datos proporcionados por las claves del manual de Bergey (4) y la literatura citada.

DISCUSION

Según los antecedentes bibliográficos, las bacterias lácticas aisladas de vinos pertenecen a los géneros: *Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc* y *Pediococcus (cuadro 1).*

Cuadro 1

Cepa	Localidad	Muestra	Especie
1	Navarra	Tinto	*Pediococcus vini*
2	Navarra	Tinto	*P. vini*
3	Navarra	Tinto	*Lactobacillus plantarum*
4	Navarra	Tinto	*L. plantarum*
5	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. brevis*
6	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. brevis*
7	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. brevis*
8	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. brevis*
9	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. plantarum*
10	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. brevis*
11	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. buchneri*
12	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. buchneri*
13	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. brevis*
14	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. brevis*
15	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. plantarum*
16	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. plantarum*
17	Andalucía (Montilla)	Blanco	*Leuconostoc mesenteroides*
18	Andalucía (Montilla)	Blanco	*Le. mesenteroides*
19	Andalucía (Montilla)	Blanco	*Pediococcus vini*
20	Andalucía (Montilla)	Blanco	*Lactobacillus plantarum*
21	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. plantarum*
22	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. leichmannii*
23	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. leichmannii*
24	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. casei*
25	Andalucía (Montilla)	Blanco	*L. casei*
26	Andalucía (Jerez)	Blanco	*L. casei*
27	Andalucía (Jerez)	Blanco	*L. plantarum*

Lactobacillus plantarum

Ha sido aislado en vinos (2 y 19), existiendo descripciones de esta especie (30) y estudios comparativos con el *Lactobacillus casei,* aislados ambos de quesos (31). Numerosas especies han sido aisladas de forrajes ensilados (20). El mayor porcentaje de microorganismos aislados de este

último substrato corresponde a *L. plantarum*. *L. plantarum* se describe como bacilos con el extremo redondeado, aislados, a veces en parejas o en madejas; anaerobios facultativos, gram-positivos y no esporiformes; algunas razas son capaces de reducir nitratos; no licúan la gelatina; la mayoría de los cultivos acidifican y coagulan el *litmus milk;* producen ácido láctico inactivo; algunas razas son productoras de acetilmetilcarbinol. Es interesante el efecto que produce el jugo de tomate sobre los cultivos; actúa como estimulante, en la producción de ácidos. La prueba de producción de catalasas puede ser positiva cuando el microorganismo crece en un medio con baja concentración de carbohidratos fermentescibles (13), como es nuestro caso; encontrándose razas que no producen catalasas. Temperatura de crecimiento entre 25° y 37 °C. No crece a 45 °C. Respecto a la reducción de nitratos, existen trabajos de investigación que aclaran algunos datos discordantes (20); se ha podido comprobar que *L. plantarum* puede reducir nitratos en medios que contengan un 0,1 % de agar.

Recientemente se han aislado razas de lactobacilos homofermentativos semejantes en muchos aspectos a esta especie, excepto en su movilidad por medio de flagelos en fase precoz de crecimiento, representando estas razas al *Lactobacillus plantarum* var. *movile,* de Harrison y Hansen y la variedad de *L. casei* de Deibe y Niven (9, 12 y 17).

En el *cuadro 2* resumimos los datos obtenidos para las ocho cepas clasificadas dentro de esta especie. Cinco atacan el ácido málico, produciendo ácido láctico; el mismo número de cepas crecen a partir de ácidos tartáricos, cítrico y succínico; en las condiciones ensayadas no consumen ácido láctico.

Lactobacillus casei

Numerosos autores han basado la diferencia entre *Lactobacillus plantarum* y *L. casei* en la temperatura límite máxima de crecimiento y a veces en el poder rotatorio del ácido láctico producido (inactivo o dextro) (19 30). La morfología de los bacilos depende del medio de cultivo; no móviles, aislados, en parejas y a veces en cadena; gram-positivos, aunque a veces se han encontrado cepas gram-negativas (20). Temperaturas de crecimiento, entre 15° y 45 °C. Algunas especies tienen capacidad de reducir nitratos; producen ácido láctico dextro. Otros autores (25 y 31) establecen como caracteres distintivos entre *L. plantarum* y *L. casei* la capacidad de

Cuadro 2. Lactobacillus plantarum

Cepa núm.	Localidad Tipo de muestra	Medio de aislamiento	Aspecto microscópico de la muestra	Gram	Licuación gelatina	Reducción nitratos	Producción indol	Reacción *litmus-milk*	Producción acetilmetilcarbinol	Utilización fosfatos	Utilización citratos	Glucosa 6,7 (*)	Fructosa 6,4	Galactosa 6,7	Maltosa 6,8	Sacarosa 6,9	Arabinosa 6,5	Rafinosa 6,8	Lactosa 6,7	Inulina 6,9	Manitol 7,0	Sorbitol 6,8	Eritrol 6,7	Glicerol 6,7	Relación ac. volátil ac. total
3	Tinto Sarriá	A	Bacilo	+	—	+	—	—	—	—	—	+(**) 5,5	+ 5,3	+ 5,3	+ 5,4	+ 5,4	+ 5,6	+ 6,0	+ 5,5	+ 5,5	+ 5,4	+ 6,8	+ 7,6	+ 6,8	0,38
4	Idem	A	Bacilo	+	—	+	—	—	—	∓	—	+ 5,9	+ 5,3	+ 5,7	+ 5,4	+ 5,4	+ 5,8	+ 6,0	+ 5,8	+ 7,8	+ 5,4	+ 6,4	+ 7,7	+ 6,7	0,35
9	Blanco Montilla	A	Bacilo	+	—	—	—	—	—	+	—	+ 5,5	+ 5,3	+ 5,7	+ 6,6	+ 5,4	+ 5,8	—	+ 5,8	+ 7,7	+ 5,4	+ 6,3	+ 7,3	+ 6,7	0,02
15	Idem	A	Bacilo	+	—	+	—	+	+	+	+	+ 6,2	+ 6,9	+ 5,6	+ 5,1	+ 5,9	+ 5,5	+ 5,6	+ 5,4	+ 8,2	+ 6,1	+ 5,8	+ 8,3	+ 6,0	0,02
16	Idem	A	Bacilo	+	—	+	—	+	+	+	+	+ 6,3	+ 6,9	+ 6,0	+ 5,1	+ 5,7	+ 5,4	+ 5,5	+ 5,2	+ 8,0	+ 5,7	+ 5,7	+ 8,5	+ 5,9	0,02
20	Idem	A	Bacilo	+	—	—	—	—	—	∓	—	+ 4,8	+ 3,8	+ 4,6	+ 4,5	+ 4,3	+ 3,3	+ 5,8	+ 5,1	+ 6,6	+ 6,5	+ 5,7	+ 6,7	+ 6,5	0,41
21	Idem	A	Bacilo	+	—	—	—	—	—	∓	—	+ 4,2	+ 3,7	+ 4,6	+ 4,6	+ 4,9	+ 3,6	+ 5,3	+ 5,5	+ 6,7	—	+ 6,5	— 6,7	—	0,41
27	Idem	A	Bacilo	+	—	+	—	—	—	—	—	+ 3,3	+ 3,2	+ 3,3	+ 4,4	+ 4,8	+ 5,3	+ 6,0	+ 6,0	+ 6,7	—	+ 4,1	+ 6,9	+ +	0,04
Bergey's Manual			Bacilo	+	—	—		±				+	+	+	+	+	+	+	+	—	±	±	±		

(*) pH del medio esterilizado. (**) pH a los quince días de inoculado.

fermentar melobiosa y rafinosa el primero, y no el *L. casei;* además, la reacción de Voges Proskauer es negativa en *L. plantarum* y positiva para el *L. casei.* Langston y colaboradores (20) y Rogosa y colaboradores (30) no están de acuerdo en lo referente a la fermentación del manitol por *L. casei.*

El *cuadro 3* contiene el resumen de nuestros resultados. En las condiciones de nuestro trabajo, el *Lactobacillus casei* crece en ácido málico y cítrico, pero no en tartárico, succínico y láctico; produce ácido láctico a partir de ácido málico.

Lactobacillus leichmannii

Rogosa y colaboradores (30) hacen un amplio estudio de esta especie. Según el manual de Bergey (4), esta especie es aparentemente similar al *Lactobacillus delbrueckii,* pero se diferencia en presentar una temperatura óptima más baja. *L. delbrueckii* ha sido aislado de vinos de California (13). *L. leichmannii* no fermenta manitol ni galactosa (30); estas dos pruebas, así como los demás caracteres comunes, coinciden en las dos cepas aisladas por nosotros. El *cuadro 4* resume los datos obtenidos por nosotros para las dos cepas mencionadas. Se presentan como bacilos cortos y aislados a veces en cadenas de bajo número de individuos. Crecen en medios que contenga ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico o láctico; alcalinizando en los dos primeros; el ácido cítrico lo consumen, prácticamente, hasta agotarlo, produciendo pequeñas cantidades de láctico, málico y tartárico.

Lactobacillus buchneri

Ha sido aislado de vinos (19) con el nombre de *Bacterium manitopoeum* y del líquido del rumen de los ovinos (16) empleando el medio de Rogosa. Pederson (26) lo clasificó con el nombre de *Lactobacillus manitopoeum.* Según el Manual de Bergey (4), razas de esta especie pueden considerarse intermedias entre *L. brevis* y *L. fermenti;* considerando sinónimos *B. manitopoeum* de Müller-Thurgau, *L. manitopoeum* y *L. buchneri.*

Se presentan como bacilos aislados, en parejas y cadenas; no móviles y gram-positivos. Crecen en medios con ácido láctico y cítrico, alcalinizando el medio.

Cuadro 3. Lactobacillus casei

Cepa núm.	Localidad Tipo de muestra	Medio de aislamiento	Aspecto microscópico de la muestra	Gram	Licuación gelatina	Reducción nitratos	Producción indol	Reacción *litmus-milk*	Producción acetilmetilcarbinol	Utilización fosfatos	Utilización citratos	Glucosa 6,7	Fructosa 6,4	Galactosa 6,7	Maltosa 6,8	Sacarosa 6,9	Arabinosa 6,5	Rafinosa 6,8	Lactosa 6,7	Inulina 6,9	Manitol 7,0	Sorbitol 6,8	Eritrol 6,7	Glicerol 6,7	Relación ac. volátil ac. total
	Blanco			+	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	+	
24	Montilla	A	Bacilo	+	—	+	—	+	+	—	—	4,8	4,4	6,0	5,0	4,6	6,8	6,8	4,7	7,1	7,2	7,2	8,0	4,9	0,64
25	Idem	A	Idem	+	—	+	—	+	+	+	—	+ 4,3	+ 4,5	+ 5,3	+ 5,0	+ 4,7	— 6,8	— 6,8	+ 4,8	— 7,2	— 7,4	— 7,2	— 8,0	+ 5,0	0,49
26	Idem	A	Idem	+	—	+	—	—	+	+	—	+ 3,3	+ 3,2	+ 3,2	+ 4,3	+ 5,4	+ 5,8	— 6,6	+ 6,3	+ 6,6		+ 3,8	— 6,9	+ 6,6	0,03
Bergey's Manual			Idem	+	—							+	+	+	+	±			+		+				

Cuadro 4. Lactobacillus Leichmannii

Cepa núm.	Localidad Tipo de muestra	Medio de aislamiento	Aspecto microscópico de la muestra	Gram	Licuación gelatina	Reducción nitratos	Producción indol	Reacción *litmus-milk*	Producción acetilmetilcarbinol	Utilización fosfatos	Utilización citratos	Glucosa 6,7	Fructosa 6,4	Galactosa 6,7	Maltosa 6,8	Sacarosa 6,9	Arabinosa 6,5	Rafinosa 6,8	Lactosa 6,7	Inulina 6,9	Manitol 7,0	Sorbitol 6,8	Eritrol 6,7	Glicerol 6,7	Relación ac. volátil ac. total
	Blanco											+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	
22	Montilla	A	Bacilo	+	+	+	—	+	+	+	+	4,7	5,3	7,3	5,2	6,8	7,2	7,3	7,5	7,9	8,0	7,5	8,0	6,0	0,47
23	Idem	A	Idem	+	+	+	—	+	+	+	+	+ 4,7	+ 5,2	— 7,4	+ 5,1	+ 6,3	— 7,4	— 7,2	— 7,9	— 7,7	— 8,0	— 7,5	— 8,0	+ 6,0	0,62
Bergey's Manual			Idem	+	—	—						+	+	±	+	+	—	—	—	—	+				

En el *cuadro 5* se dan los resultados de los ensayos realizados con las cepas clasificadas dentro de esta especie.

Lactobacillus brevis

A partir de forrajes ensilados (20) han sido aisladas y clasificadas numerosas cepas de *Lactobacillus brevis;* descrito como bacilos cortos o medios con el extremo redondeado, en pares y aislados, produciendo anhídrido carbónico a partir de glucosa; se describe una raza atípica, *L. brevis* var; con sustanciosas variaciones en la morfología, muy similares a las observaciones obtenidas por Orla-Jansen (25), que los incluía en el género *Betabacterium.* Como resultado de un estudio sobre 300 cepas de lactobacilos heterofermentativos, Pederson (26) propuso una clasificación de estos microorganismos en cuatro especies, basándose en la temperatura de crecimiento y en la acción sobre arabinosa, lactosa, rafinosa y sacarosa.

De vinos secos de California se han aislado bacilos heterofermentativos identificados como *Lactobacillus brevis* (13), utilizando el medio de Rogosa para su aislamiento. También se han aislado del líquido del rumen de los óvidos (16). En la mayor parte de las citas bibliográficas se encuentra que el *L. brevis* presenta una vigorosa fermentación de la glucosa, hecho que está de acuerdo con nuestros resultados (26 y 30).

En el *cuadro 6* se dan los resultados para las siete cepas clasificadas en esta especie. Crecen más o menos ligeramente sobre málico cítrico y láctico; produciendo ácido láctico a partir de málico y cítrico; las cepas 13 y 14 producen tartárico y málico a partir de cítrico.

Pediococcus vini

Fue descrito por Pasteur y señalado como el causante de algunas alteraciones que sufre la cerveza. Cocos esféricos, en parejas y tétradas, gram-positivos, no móviles; suelen presentarse en paquetes de cuatro células, aunque también se encuentran aislados y en parejas.

Otros autores (15) lo asocian a un tipo de alteración de la cerveza, caracterizada por turbidez, bajo pH y un olor característico debido a la producción de diacetilo. Anaerobios facultativos, homofermentativos, produciendo grandes cantidades de ácido láctico inactivo a partir de carbohidratos. Aunque este género se caracterizó como catalasonegativo, re-

Cuadro 5. Lactobacillus buchneri

Cepa núm.	Localidad Tipo de muestra	Medio de aislamiento	Aspecto microscópico de la muestra	Gram	Licuación gelatina	Reducción nitratos	Producción indol	Reacción *litmus-milk*	Producción acetilmetilcarbinol	Utilización fosfatos	Utilización citratos	Glucosa 6,7	Fructosa 6,4	Galactosa 6,7	Maltosa 6,8	Sacarosa 6,9	Arabinosa 6,5	Rafinosa 6,8	Lactosa 6,7	Inulina 6,9	Manitol 7,0	Sorbitol 6,8	Eritrol 6,7	Glicerol 6,7	Relación ac. volátil ac. total
	Blanco			+								+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	
11	Montilla	A	Bacilo	+	—	—	—	—	±	+	—	5,5	5,4	5,7	6,6	5,3	5,8	6,5	5,9	7,9	5,3	6,4	7,6	6,4	0,15
												+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	
12	Idem	A	Idem	+	—	—	—	—	±	+	—	5,4	5,5	5,7	5,4	5,8	5,8	5,9	5,8	8,0	5,4	6,4	6,7	6,8	0,19
Bergey's Manual			Idem	+		—		—				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	

Cuadro 6. Lactobacillus brevis

Cepa núm.	Localidad Tipo de muestra	Medio de aislamiento	Aspecto microscópico de la muestra	Gram	Licuación gelatina	Reducción nitratos	Producción indol	Reacción *litmus-milk*	Producción acetilmetilcarbinol	Utilización fosfatos	Utilización citratos	Glucosa 6,7	Fructosa 6,4	Galactosa 6,7	Maltosa 6,8	Sacarosa 6,9	Arabinosa 6,5	Rafinosa 6,8	Lactosa 6,7	Inulina 6,9	Manitol 7,0	Sorbitol 6,8	Eritrol 6,7	Glicerol 6,7	Relación ac. volátil ac. total
	Blanco											+	+	+		+	+	—	+	+	+	+	—	—	
5	Montilla	A	Bacilo	+	—	+	—	—	—	+	—	5,4	5,3	5,4		5,4	5,6	6,8	5,6	5,4	5,5	6,6	7,5	6,6	0,22
												+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	
6	Idem	A	Idem	+	—	+	—	—	—	—	—	5,7	6,3	5,3	5,3	5,5	5,5	6,8	6,6	6,9	7,0	6,7	6,6	6,7	0,32
												+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	
7	Idem	A	Idem	—	—	±	—	—	—	—	—	5,3	5,2	5,3	5,4	6,8	6,5	6,8	6,7	6,9	7,0	7,0	7,0	6,7	0,01
												+	+	+		+	+	—	+	—	+	+	—	—	
8	Idem	A	Idem	—	—	—	—	—	±	+	—	5,4	5,4	5,7		5,4	5,8	6,8	5,9	6,8	5,5	6,3	7,6	6,7	0,13
												+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	
10	Idem	A	Idem	—	—	—	—	—	±	+	—	5,5	5,3	5,7	6,6	5,4	5,8	6,8	5,8	6,9	6,9	6,8	7,4	6,7	0,01
												+	+	+	+	—	+	—		+	—	+		—	
13	Idem	A	Idem	—	—	+	—	—	—	+	—	5,4	5,2	6,4	5,0	6,8	6,0	6,8		5,3	6,8	6,2		6,6	0,27
												+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	—	—	
14	Idem	A	Idem	—	—	+	—	—	—	+	—	5,3	5,3	6,4	5,4	6,8	6,1	6,8	5,7	5,4	6,8	6,2	7,4	6,6	0,40
Bergey's Manual			Idem	+	—			—				+	+	+	+	±	+	±	±	±	∓			∓	

cientemente (15) se ha visto que produce catalasa al crecer en carbohidratos a bajas concentraciones.

Actualmente, el género *Pediococcus* se incluye en la familia de las Lactobacteriaceas, en la tribu Estreptococaceas, con los géneros *Diplococcus, Streptococcus* y *Leuconostoc.*

Jensen y colaboradores (15) dan un medio sintético para *Pediococcus* en el cual crecen 32 de las 34 cepas estudiadas; dos de ellas necesitaban, además, riboflavina. Hacen notar que todas las razas estudiadas no crecen o apenas lo hacen en cervezas, incluso después de quitarles el anhídrido carbónico y neutralizarlas, concluyendo que sólo ciertos tipos de cervezas son apropiados para el desarrollo de estos microorganismos y sólo algunas razas aptas para crecer en cervezas causando las alteraciones descritas.

Pederson (26) estudió 121 cepas del género *Pediococcus* aisladas de vegetales en fermentación. Colonias pequeñas, redondas u ovales. Todos los cultivos producen láctico inactivo con trazas de ácidos volátiles y anhídrido carbónico. Temperatura óptima de crecimiento 20º-30 ºC. Produce doble cantidad de ácido láctico que otros cocos y esta característica le distingue de los pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Leuconostoc.*

Bidan (5) los aisló de vinos en fermentación maloláctica y de lias de vinos que la habían sufrido. Los describe como cocos gruesos agrupados en parejas y, a veces, en grupos de cuatro, no móviles, no esporiformes, gram-positivos. Temperatura óptima, 25º-30 ºC. No ataca la maltosa, a diferencia del *Pediococcus cerevisiae;* se ha propuesto la conveniencia de hacer un grupo con los *Pediococcus* aislados del vino, que no atacan la maltosa, dándole el nombre de *P. vini,* con características idénticas al *Micrococcus variococcus* (Müller-Thurgau) y al *M. malo-lacticus* (Seifert); todo esto de acuerdo con nuestros resultados.

Langston y colaboradores (20) estudian también los cocos aislados de forrajes ensilados, 79 cepas, dividiéndolas en cinco grupos. Existe discrepancia en los resultados obtenidos por Pederson en lo referente a la fermentación de sacarosa, lactosa y rafinosa, y los de Langston y colaboradores, ya que la mayoría de las cepas aisladas por los últimos autores no fermentan los mencionados azúcares.

Nakagawa y colaboradores (22) llegan a la conclusión de que el *Pediococcus* que crece en cerveza es completamente diferente al que fermenta los vegetales. Dividen el género *Pediococcus* en cinco especies:

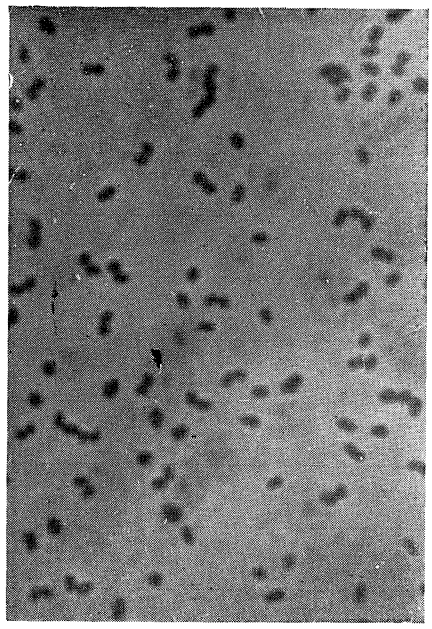

Figura 1. Pediococcus vini *aislado de vino tinto.* × *1.300*

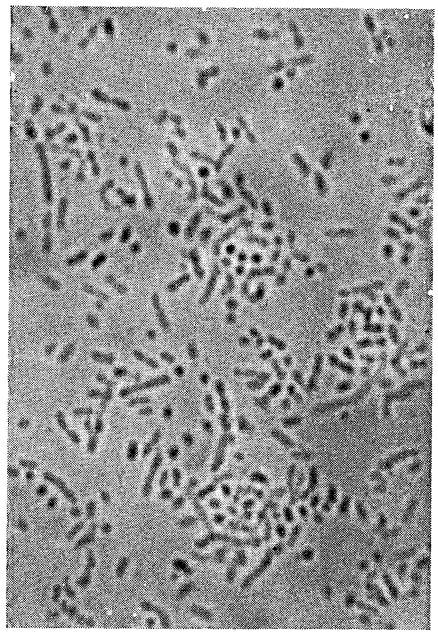

Figura 2. Leuconostoc mesenteroides *aislado de vino blanco.* × *1.300*

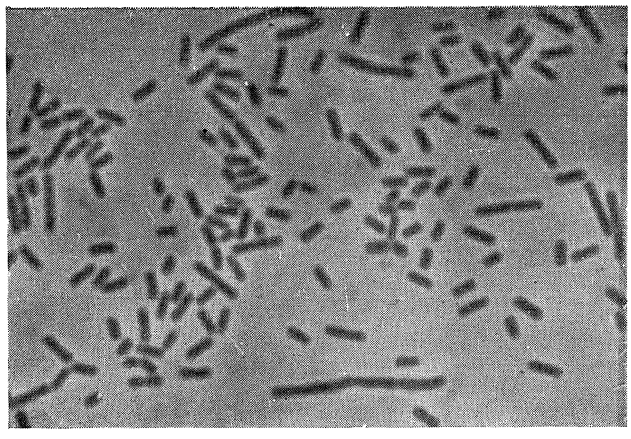

Figura 3. Lactobacillus brevis *aislado de vino blanco.* × *1.300*

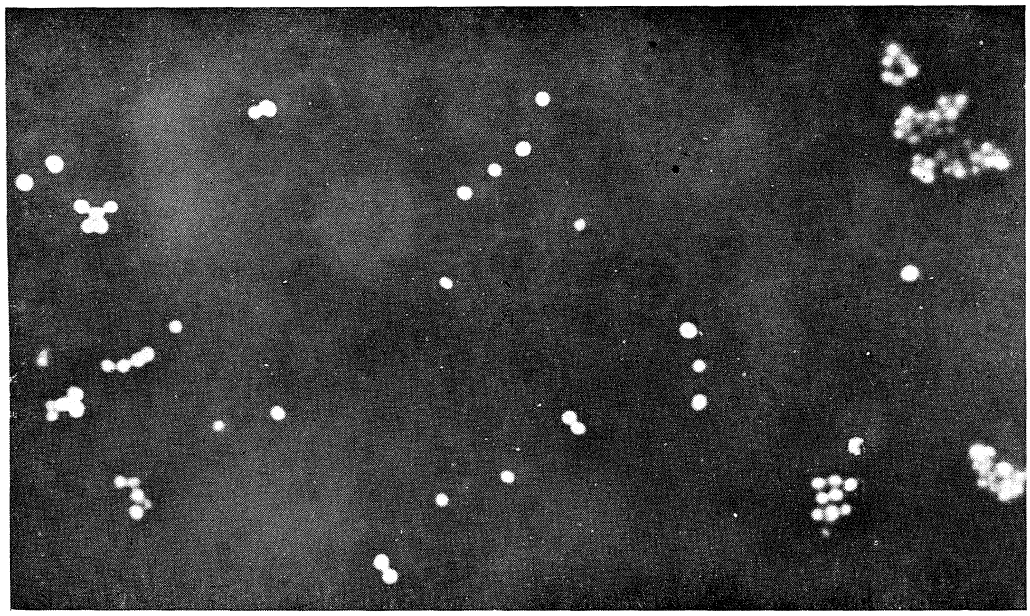

Figura 4. Pediococcus vini *aislado de vino tinto.* × *4.000*

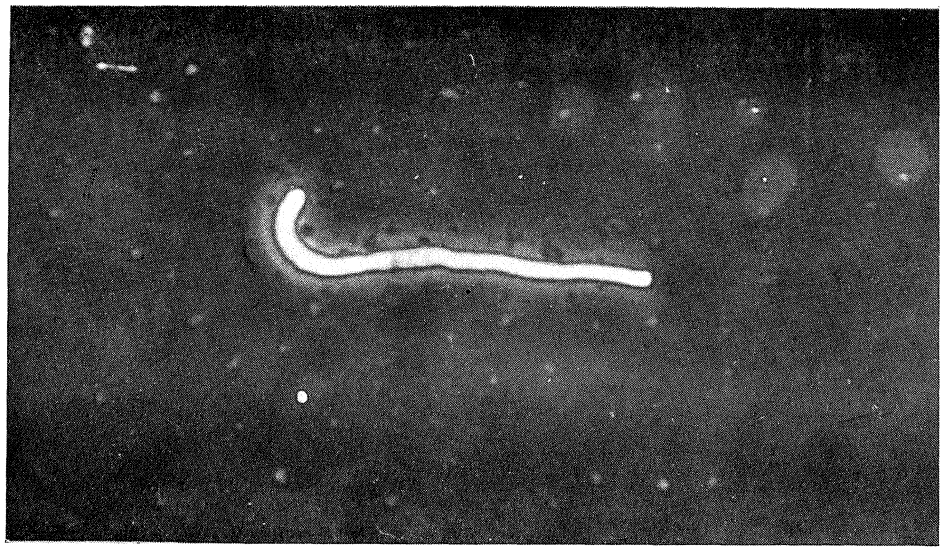

Figura 5. Lactobacillus plantarum *aislado de vino blanco.* × *4.000*

P. cerevisiae, P. acidilactici, P. pentosaceus, P. halophilus y *P. urinae-equi.* Describen un medio de cultivo general. Todos los *Pediococcus* son anaerobios facultativos, excepto el *P. cerevisiae* que es anaerobio "obligado".

Las cepas núms. 1 y 2, aisladas de vino tinto, y la cepa núm. 19, aislada de vino blanco, coinciden en sus caracteres con los mostrados por la especie *Pediococcus vini,* descrita por Bidan (5).

El *cuadro 7* presenta un resumen de los datos obtenidos en los ensayos realizados con las cepas clasificadas dentro de esta especie.

Leuconostoc mesenteroides

Ha sido aislado y estudiado por numerosos autores (5, 13 y 19). Diferencia fundamental con el *Leuconostoc citrovorum* es su capacidad para atacar las pentosas. Se describen como células ovales o ligeramente alargadas, aisladas o en cadenas cortas, gram-positivos, heterofermentativos. Temperatura óptima, 25º-32 ºC. También ha sido aislado de forrajes (20), dividiendo esta especie en dos tipos: tipo I, que produce fácilmente dextrana, y tipo II, que sólo la produce después de una serie de pases y enriquecimiento del medio.

Las razas aisladas de vinos no producen dextrana a partir de sacarosa (19), acidificando a partir de sacarosa y pentosas. Pederson y colaboradores (28) demuestran que especies de *Leuconostoc mesenteroides,* caracterizadas por la no producción de dextrana, por una serie de pases en medio ácido, conteniendo jugo de tomate o naranja, recobran la capacidad de producir dextrana y utilizar azúcares que previamente no fermentaban.

La cantidad de ácido acético y de anhídrido carbónico producido por las bacterias lácticas homofermentativas es más o menos constante e independiente de la concentración de azúcar en el medio (8). En cambio, las cantidades de ácido acético producidas por las especies heterofermentativas crecen con la concentración de azúcar en el medio; y la relación acético/láctico varía con la cantidad de azúcar fermentado.

En el *cuadro 8* se resumen los datos obtenidos en los ensayos realizados con las cepas 17 y 18, clasificadas dentro de esta especie. Acidifican a partir de tartárico y málico, produciendo láctico a partir del último; crecen en succínico, cítrico y láctico.

Cuadro 7. Pediococcus vini

Cepa núm.	Localidad Tipo de muestra	Medio de aislamiento	Aspecto microscópico de la muestra	Gram	Licuación gelatina	Reducción nitratos	Producción indol	Reacción *litmus-milk*	Producción acetilmetilcarbinol	Utilización fosfatos	Utilización citratos	Glucosa 6,7	Fructosa 6,4	Galactosa 6,7	Maltosa 6,8	Sacarosa 6,9	Arabinosa 6,5	Rafinosa 6,8	Lactosa 6,7	Inulina 6,9	Manitol 7,0	Sorbitol 6,8	Eritrol 6,7	Glicerol 6,7	Relación ac. volátil ac. total
1	Tinto Sarriá	A	Cocos	+	—	—	—	—	+	+	+	+ 4,6	+ 4,4	+ 5,2	— 6,7	+ 5,0	— 6,5	— 6,8	— 6,7	— 7,0	— 6,9	— 6,8	— 7,8	— 6,7	0,48
2	Idem	A	Idem	+	—	—	—	—	+	+	+	+ 4,6	+ 4,4	+ 5,1	— 6,7	+ 5,0	— 6,4	— 6,7	— 6,6	— 7,0	— 6,9	— 6,8	— 7,6	— 6,6	0,23
19	Blanco Montilla	A	Idem	+	—	—	—	—	+	+	+	+ 3,9	+	— 6,7	— 6,7	+ 5,7	— 6,6	— 7,1	— 7,2	— 7,6	— 7,2	— 7,2	— 8,0	— 7,0	0,51
Bidan	Blanco Francés		Idem	+	—	—	—		—			+	+		—	+	—	—	—					+	

Cuadro 8. Leuconostoc mesenteroides

Cepa núm.	Localidad Tipo de muestra	Medio de aislamiento	Aspecto microscópico de la muestra	Gram	Licuación gelatina	Reducción nitratos	Producción indol	Reacción *litmus-milk*	Producción acetilmetilcarbinol	Utilización fosfatos	Utilización citratos	Glucosa 6,7	Fructosa 6,4	Galactosa 6,7	Maltosa 6,8	Sacarosa 6,9	Arabinosa 6,5	Rafinosa 6,8	Lactosa 6,7	Inulina 6,9	Manitol 7,0	Sorbitol 6,8	Eritrol 6,7	Glicerol 6,7	Relación ac. volátil ac. total
17	Blanco Montilla	A	Cocos	+	—	—	—		—	—	—	+ 6,2	+ 3,4	+ 3,7	+ 4,5	+ 5,0	+ 3,3	+ 5,6	+ 4,8	+ 6,5	+ 4,4	+ 5,7	+ 6,7	— 6,4	0,11
18	Idem	A	Cocos	+	—	—	—		—	—	—	+ 3,2	+ 3,8	+ 4,2	— 6,8	+ 6,1	+ 3,4	+ 9	+ 5,1	—	+ 6,7	+ 6,4	— 6,7	— 6,4	0,35
Bergey's Manual			Idem		—	—	—					+	+	+		+	+	+	+	∓		∓		∓	

RESUMEN

Se han estudiado veintisiete cepas de bacterias lácticas aisladas de vinos. Presentándose los datos correspondientes a los ensayos morfológicos y fisiológicos sobre las cepas aisladas.

Las bacterias lácticas estudiadas, lactobacilos y cocos, han sido clasificadas como: *Lactobacillus plantarum, L. brevis, L. buchneri, L. leichmannii, L. casei, Leuconostoc mesenteroides* y *Pediococcus vini.*

SUMMARY

Twenty seven cultures of lactic bacteria have been studied. The data presented are the results of detailed colonial, morphological and phisiological studies on the strains isolated from wines.

The cultures of lactobacilli and cocci studied have been identified as: *Lactobacillus plantarum, L. brevis, L. buchneri, L. leichmannii, L. casei, Leuconostoc mesenteroides* and *Pediococcus vini.*

BIBLIOGRAFIA

1. Barre, P. 1966. Ann. Technol. Agr., 15, 173.
2. Barre, P. 1966. Ann. Technol. Agr., 15, 203.
3. Barre, P., y Galzy, P. 1962. Ann. Technol. Agr., 11, 121.
4. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
5. Bidan, P. 1956. Ann. Technol. Agr., 5, 597.
6. Carr, J. G. 1967. Symp. Intern. Oenol. III Bordeux-Cognac.
7. Castilow, T. N., y Humphreys, T. W. 1955. Science, 121, 168.
8. Christiensem, M. D.; Albury, M. N., y Pederson, C. S. 1958. Appl. Microbiol., 6, 316.
9. Deibel, R. H., y Niven (Jr.), C. F. 1958. Appl. Microbiol., 6, 323.
10. Fornachon, J. C. M.; Douglas, H. C., y Vaughn, R. H. 1949. Hilgardia, 19, 4.
11. Gordon, H. T.; Thornburg, W., y Weum, L. N. 1956. Anal. Chem., 28, 849.
12. Harrison (Jr.), H. P., y Hansen, P. A. 1950. J. Bacteriol., 59, 444.
13. Ingraham, J. L.; Vaughn, R. H., y Cooke, G. M. 1960. Am. J. Enol. Viticult., 11, 1.
14. Iñigo, B.; Plasencia, A. M.ª, y Bravo, F. 1969. Rev. Agroquim. Tecnol. Alimentos, 9, 116.

15. JENSEN, E. M., y LEELEY, H. W. 1954. J. Bacteriol., 67, 484.
16. JENSEN, R. G.; SMITH, K. L.; EDMONDSON, J. E., y MIRIDAM, C. P. 1956. J. Bacteriol., 72, 253.
17. KITAHARA, K., y LUZUKI, J. 1963. J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 1.
18. KUNKEE, R. E.; OUGH, C. S., y AMERINE, M. A. 1964. Wines Vines, 24.
19. LAMBION, R. A., y MESKHI, A. 1957. Ferment. Ind. Aliment., 12, 131.
20. LANGSTON, C. W., y BOUNA, C. 1960. Appl. Microbiol., 8, 223.
21. LUGG., J. W., y OVERELL, B. T. 1948. Australian J. Sci. Res., 1, 98.
22. NAKAGAWA, A., y KITAHARA, K. 1959. J. Gen. Appl. Microbiol., 5, 95.
23. NONOMURA, H., y OHARA, Y. 1967. Mitt. Rebe Wein Obst. Früchteverwert., XVII, 345.
24. NONOMURA, H.; YANAZAKI, T., y OHARA, Y. 1967. Mitt. Rebe Wein Obst. Früchteverwert., XVII, 449.
25. ORLA-JENSEN, S. 1943. The lactic acid bacteria. Mem. Acad. Roy. Sci. Danemark Suppl. Sect. Sci. Biol., 2, 1.
26. PEDERSON, C. S. 1949. Bacteriol. Rev., 13, 225.
27. PEDERSON, C. S. 1952. Bacteriol. Rev., 16, 228.
28. PEDERSON, C. S., y ALBURY, M. N. 1955. J. Bacteriol., 70, 702.
29. PEYNAUD, E. 1961. Ann. Technol. Agr., 10, 43.
30. ROGOSA, M.; WISEMAN, J. A., y DISRAELY, M. 1953. J. Bacteriol., 65, 681.
31. WHEATER, D. M. 1955. J. Gen. Microbiol., 12, 133.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL
SECCION DE QUIMICA MICROBIANA Y SERVICIO DE ANALISIS QUIMICO

ESTUDIOS SOBRE LA PRODUCCION DE SUSTANCIAS DE CRECIMIENTO POR *NECTRIA GALLIGENA*

por

R. BELTRÁ, ANA M.ª BALLESTEROS y R. LAHOZ

INTRODUCCION

Dentro del capo de la Fitopatología, se han publicado numerosos trabajos sobre el chancro producido por *Nectria galligena* en diferentes especies de pomáceas, principalmente en el manzano. Esta enfermedad se caracteriza por producir un chancro perenne de la corteza de las ramas o de los troncos de los árboles que ataca. La penetración del hongo en los árboles ocasiona la muerte de la corteza y del cambium, la cual es seguida por la muerte del leño, aunque el organismo causal raramente penetra en el xilema; cuando pasan algunos años, la corteza muerta se desprende de la superficie del chancro producido. A menudo, el leño presenta una serie de callos concéntricos circulares, los cuales, bajo condiciones uniformes de desarrollo, semejan una diana de tiro al blanco (13). La importancia de esta enfermedad radica en los daños que produce, así como en su difusión, ya que se encuentra muy extendida en Europa y América.

Entre la bibliografía dedicada al estudio de esta enfermedad son de destacar los trabajos de Lortie y colaboradores (11-12 y 14), los cuales han estudiado la influencia de determinados factores (climáticos, físicos, etc.) en el desarrollo de la enfermedad.

La intervención de las auxinas, especialmente ácido beta-indol acético (AIA), en la formación de los tumores vegetales producidos por bacterias, así como que las bacterias tumorígenas sintetizan AIA a partir del triptófano, es un hecho conocido desde los trabajos de Berthelot y Amoreaux (4) y Klein y Link (10). En los tumores producidos por hongos, ya se ha observado por Dunin y colaboradores (8) que el AIA se encuentra en las agallas que produce el hongo *Ustilago zeae* sobre el maíz. En el caso de los chancros producidos por *Nectria galligena,* Berducou (2-3) y Lortie y Lachanché (15) intentan explicar los mecanismos de su formación mediante el estudio de las sustancias de crecimiento, especialmente del AIA, probando su presencia por tests biológicos (elongación del tallo de guisante) y pruebas coloreadas (percloruro de hierro).

Probada por estos autores la presencia de sustancias de crecimiento en los cultivos de *Nectria galligena,* hemos considerado interesante el estudiar algunos factores que pudieran intervenir en su síntesis a partir del triptófano; se ha investigado sobre la influencia de las condiciones de cultivo (aireación), peso del micelio, etc., sobre la producción del AIA y metabolitos intermediarios de la degradación del triptófano. Estas experiencias son el punto de partida de una serie de ellas en las que intentaremos elucidar, mediante el estudio del metabolismo del triptófano por *Nectria galligena,* la vía de formación del AIA. Asimismo, esperamos que estos trabajos den alguna luz a los procesos por los cuales las células sanas del huésped se transforman en células que por sus características son semejantes a las células tumorales.

En los diez últimos años parece haberse extendido el estudio de la producción de sustancias de crecimiento, dentro de la Bioquímica de hongos fitopatógenos, aunque éstos no sean productores de tumores. En medios de cultivo con triptófano se ha encontrado que producen AIA *Taphrina deformans* (18), *Ustilago maydis* (1), *U. zeae* (8), *U. nuda, Claviceps purpurea, Fusarium solani, F. vasinfectum* (9 y 16), *U. violacea, U. longuissima,* etc. (17), *T. sadebeckii* y *T. epiphylla* (7), etc.

MATERIALES Y METODOS

La estirpe de *Nectria galligena* empleada procede del "Central Bureau voor Schimmelcultures", Baarn (Holanda). Inóculos procedentes de estos cultivos, los cuales se mantenían en agar-malta inclinado, durante veintio-

cho días a la oscuridad y a 25 °C, se sembraron en matraces de Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, con 200 ml del medio de Czapek-Dox, con 1 ‰ de triptófano, incubándolos durante treinta y cuatro días, a 25 °C, en agitación (90 r/m), tomando muestras de 250 ml de estos cultivos, a los 3, 6, 9, 11, 14, 19, 22, 25, 29 y 34 días.

A su vez se cultivó el microorganismo citado en fermentador de vidrio "Quickfit" (Quickfit and Quartz Ltd., Staffordshire, Inglaterra) de 10 l de capacidad, con 7 l del mismo medio, efectuándose la toma de muestra teniendo en marcha el agitador del fermentador para asegurar la homogeneidad. Las muestras fueron de 250 ml y se tomaron a los 3, 6, 9, 10, 11, 14, 19, 24, 29 y 34 días de inoculado el fermentador. El caudal de aire que llegaba al fermentador fue de 4 l/m durante el período de crecimiento del hongo, y de 2 l/m durante el período de autólisis, y una agitación de 500 r/m durante todo el proceso. Como criterio para definir cuándo empezaba la autólisis se siguió el del descenso en el peso seco del material sólido del cultivo, dependiendo esta fase de autólisis, entre otras cosas, de la edad, disminución de nutrientes, condiciones de cultivo, etcétera.

En las muestras procedentes del fermentador, así como en las que obtuvimos de los matraces en agitación, se separaba el líquido metabólico, mediante filtración por succión. En estas muestras se hicieron las siguientes determinaciones: a) Determinación del peso seco del micelio y b) Investigación y valoración cuantitativa del AIA.

a) Determinación del peso seco del micelio

En las muestras tomadas, tanto del fermentador como de los matraces en agitación, se determinó el peso del micelio seco, lavándolo varias veces con agua destilada, hasta obtener los líquidos de lavado incoloros; a continuación se troceó, poniéndolo en estufa a 60 °C, para su desecación.

Ya seco el micelio hasta peso constante, se determinó éste en balanza analítica.

b) Investigación y valoración cuantitativa del AIA

De los líquidos metabólicos objeto de este estudio, se extrajeron las auxinas ácidas y neutras por la técnica de Bitancourt (5). Los extractos obtenidos se estudiaron por cromatografía ascendente, con papel Whatman

núm. 1, desarrollándolos en la oscuridad y usando como disolvente alcohol isopropílico-amoníaco-agua (80 : 5 : 15) (19) y como revelador el reactivo de Ehrlich. El AIA presente en los cromatogramas se valoró por la técnica de Yamaki y Nakamura (20), basada en la coloración que producen los compuestos con anillos indólicos en presencia de ácidos minerales y sales de hierro (reactivo de Salkowski-Tang). El pH de la reacción fue ácido.

RESULTADOS

En el *cuadro 1* damos la variación del peso del micelio seco de *Nectria galligena,* cultivada en fermentador durante treinta y cuatro días, así como las concentraciones de AIA producidas por el hongo en las mismas condiciones (medio de Czapek-Dox, con el 1 ‰ de triptófano).

Cuadro 1

Período de incubación Días	Peso seco del micelio g/250 ml	A.I.A. en líquido metabólico Porcentaje, μg
3	0,0558	24,9
6	1,3124	54,2
9	2,0380	77,6
10	2,1019	85,9
11	1,9378	93,1
14	1,8402	51,4
19	1,8157	49,2
24	1,7034	47,6
29	1,5527	32,8
34	1,5270	32,8

En el *cuadro 2* damos la variación del peso del micelio seco de *Nectria galligena,* cultivada en agitación (90 r/m), durante treinta y cuatro días, así como las concentraciones de AIA producidas por el hongo en las mismas condiciones (medio de Czapek-Dox, con 1 ‰ de triptófano).

Cuadro 2

Período de incubación Días	Peso seco del micelio g/250 ml	A.I.A. en líquido metabólico Porcentaje, μg
3	1,0524	8,0
6	2,1432	18,5
9	3,2836	30,0
11	3,5970	33,0
14	4,0210	38,0
19	4,0108	37,0
22	3,4025	34,5
25	3,3014	32,0
29	2,4068	11,4
34	2,1625	11,0

En la *figura 1* están representadas la variación de las concentraciones de AIA producidas por *Nectria galligena,* cuando se cultiva durante treinta y cuatro días a 25 °C en el medio de Czapek-Dox con el 1 ‰ de triptófano, en el fermentador y en matraces en agitación.

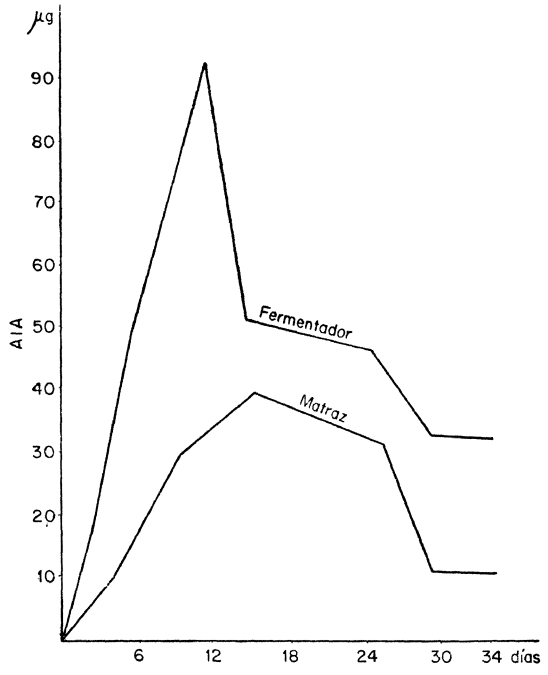

Figura 1

Por cromatografía de los extractos de las auxinas ácidas de los líquidos metabólicos procedentes de cultivos de *Nectria galligena* en fermentador y en matraces en agitación, hemos identificado la presencia de AIA, con Rf = 0,54 y 0,53, respectivamente. En estos cromatogramas se han observado asimismo la presencia de otras manchas, ocho en los cromatogramas procedentes de auxinas ácidas de líquidos metabólicos del fermentador y siete en los procedentes de matraces en agitación.

En el *cuadro 3* damos esquemáticamente la disposición y color de estas manchas con el reactivo de Ehrlich, así como en las *figuras 2-5* los cromatogramas obtenidos.

Cuadro 3. Auxinas ácidas

Fermentador		Matraz	
Azul violeta		Azul pálido	
		Morado	
Amarillo		Amarillo	
		Azul pálido	
Morado intenso		Morado intenso	
AIA		AIA	
Violeta pálido			
Azul		Amarillo	
Azul			
Azul			
	0,2 ml		0,2 ml

DISCUSION

Cuando se cultiva *Nectria galligena,* en fermentador con el medio de Czapek-Dox y con el 1 ‰ de triptófano, observamos que hay una relación directa entre el peso del micelio del hongo y la concentración de

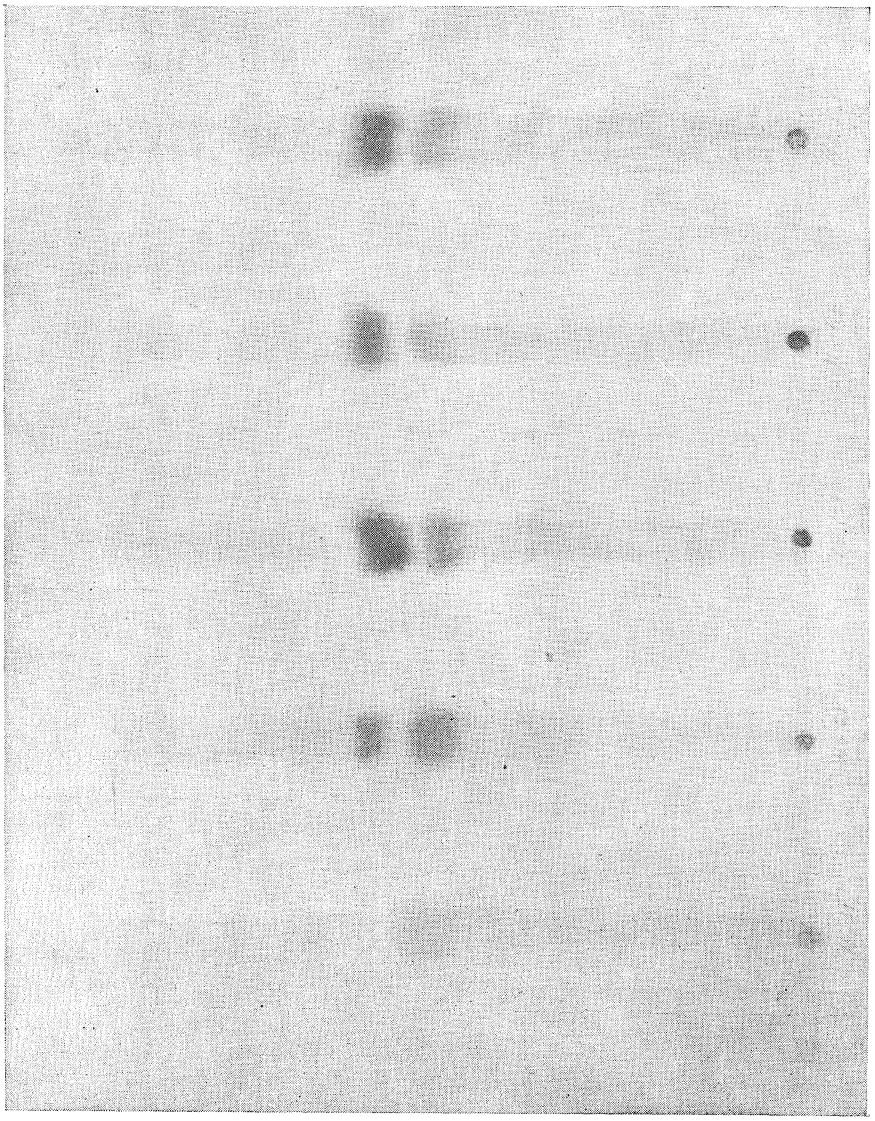

Figura 2

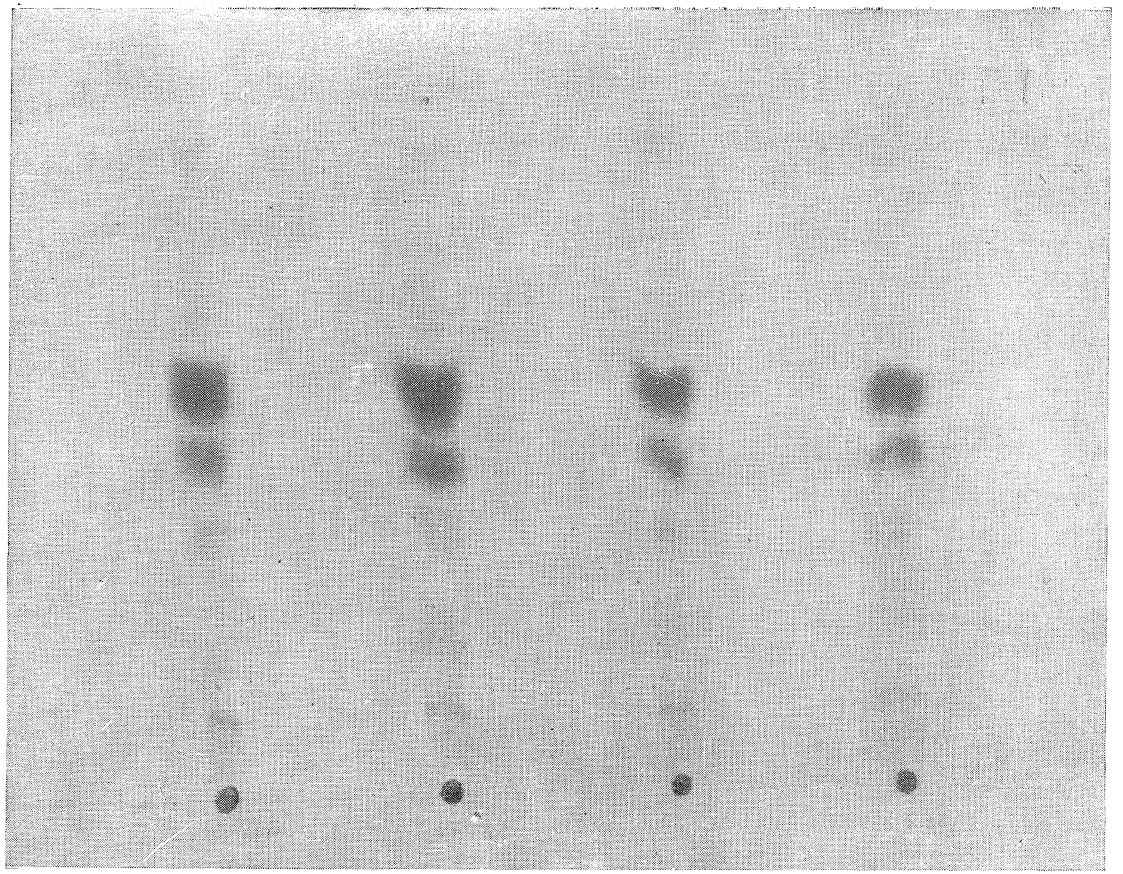

Figura 3

Figuras 2-3. Cromatograma unidimensional ascendente de auxinas ácidas aisladas de líquidos metabólicos, de tres a treinta y cuatro días de cultivo, de Nectria galligena, *en fermentador*

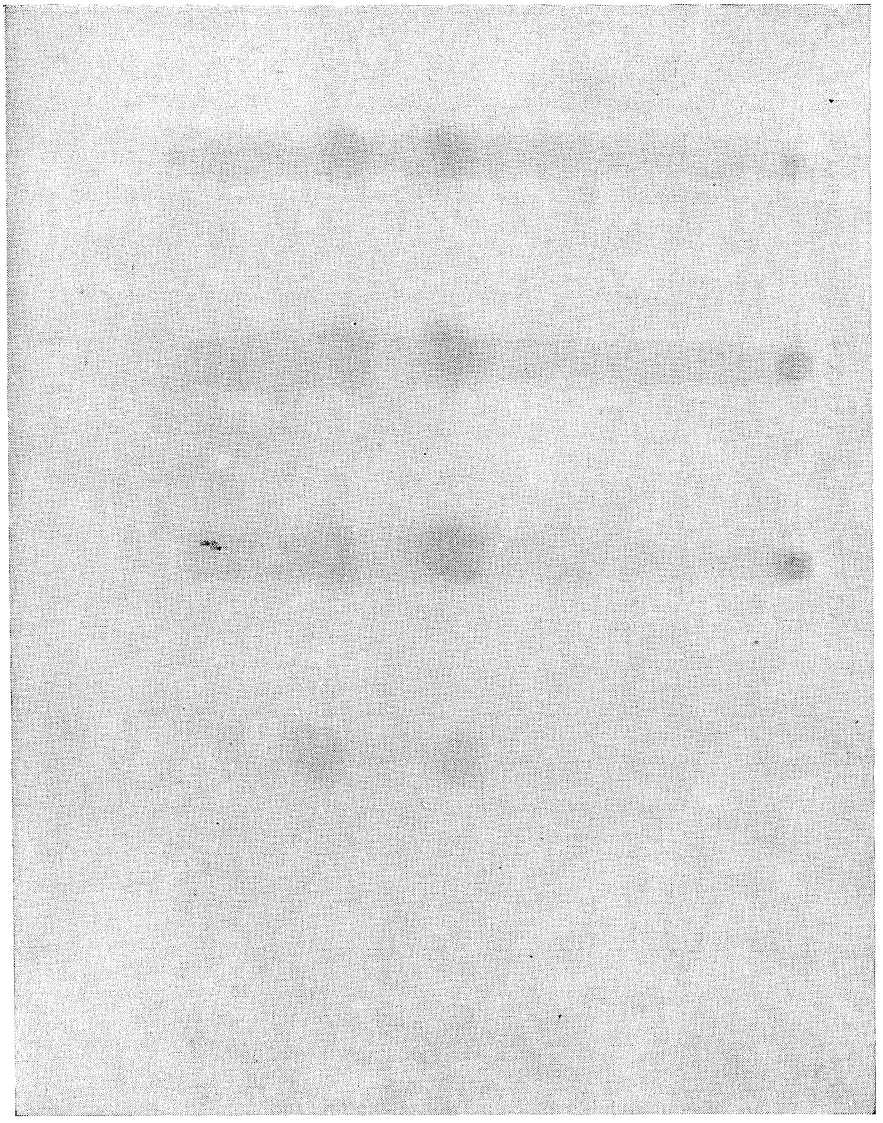

Figura 4

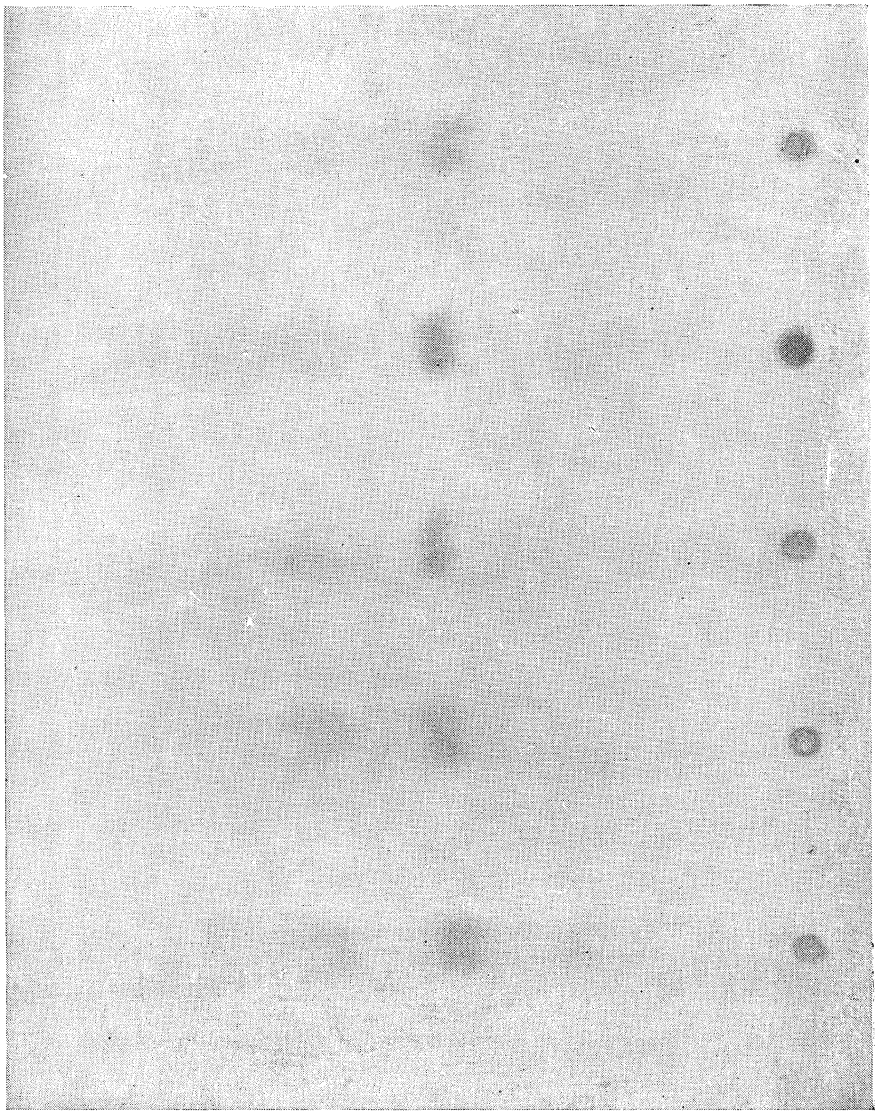

Figura 5

Figuras 4-5. Cromatograma unidimensional ascendente de auxinas ácidas aisladas de líquidos metabólicos, de tres a treinta y cuatro días de cultivo, de N. galligena, *en matraces, con agitación*

AIA que produce en el líquido metabólico. Esta relación, encontrada por nosotros, parece diferir de los datos obtenidos por Drakina (6), en diferentes especies de *Taphrina,* el cual, al estudiar la formación de AIA por el hongo, observa que si el medio de cultivo contiene triptófano, se produce una disminución del crecimiento del micelio.

Mahadevan (16), trabajando con *Fusarium vasinfectum,* encuentra que este hongo produce AIA en medios de cultivo con triptófano y que la concentración de auxina aumenta con la edad del cultivo. Alghise y colaboradores (1), con *Ustilago maydis,* observan que las concentraciones más altas de AIA a partir del triptófano, se producen aproximadamente a los sesenta días de cultivo y entonces declina. Este comportamiento no se observa con *Nectria galligena,* ya que con este hongo en un período relativamente corto de cultivo, de nueve a once días, obtenemos la máxima concentración de AIA, produciéndose en los días sucesivos de cultivo una disminución en la concentración de AIA *(figura 1).*

Este fenómeno parece repetirse cuando *Nectria galligena* se cultiva en matraces en agitación, siendo entre los once y diecinueve días, aproximadamente, cuando se produce la máxima concentración de AIA. Asimismo, en estas condiciones hemos observado la relación entre peso máximo de micelio y mayor concentración de AIA, debido probablemente a que la producción de AIA sea el resultado del metabolismo del triptófano por el micelio, siendo, por tanto, mayor este metabolismo cuando mayor sea la concentración de micelio en el cultivo.

El hongo *Nectria galligena* es, entre los descritos como productores de AIA a partir del triptófano, el que sintetiza en menos tiempo mayor concentración de esta fitohormona.

La diferencia encontrada en la producción de AIA, según se cultive *Nectria galligena* en fermentador o en matraces en agitación, creemos se debe a la aireación del medio de cultivo, ya que ésta es la única variable que hemos introducido en los dos medios de cultivo empleados. La aireación también parece influir en el metabolismo del triptófano por *Nectria galligena,* ya que al estudiar la vía de formación del AIA por cromatografía, hemos encontrado diferentes metabolitos, según se cultive el hongo en fermentador o en matraces en agitación *(cuadro 3).* Esta variedad en el número de metabolitos producidos según las condiciones de aireación del cultivo hace suponer que el metabolismo del triptófano está activado cuando se somete el cultivo de *N. galligena* a mayores concentraciones de oxígeno.

La identificación de estos metabolitos intermediarios de la degradación del triptófano, los cuales no están descritos en las vías de formación conocidas del AIA, se realizará en un futuro próximo.

RESUMEN

Al estudiar la producción de sustancias de crecimiento, especialmente AIA, por *Nectria galligena,* encontramos que este hongo es, entre los descritos como productores de AIA a partir del triptófano, el que sintetiza en menos tiempo mayor concentración de esta fitohormona. La mayor concentración de AIA según las condiciones en que se realice el cultivo, parece estar condicionada a la mayor aireación del medio. Asimismo, el metabolismo del triptófano por *N. galligena* parece ser diferente, según los diferentes metabolitos encontrados, cuando se cultiva el hongo con mayor o menor aireación. Se ha observado que la concentración de AIA que produce crece paralelamente a la concentración del micelio.

SUMMARY

While studying the growth substances formation, specially β-indole acetic acid (IAA) from *Nectria galligena,* we found that this mould is, amongst fungi described as IAA producer from tryptophan, the one producing higher concentration of IAA in a shorter time. The highest concentration of IAA seems to be conditioned to the highest aireation. *N. galligena* seems to metabolize tryptophan in different ways depending upon the amount of air supplied to cultures. The concentration of IAA formed increases with the yield of mycelium.

BIBLIOGRAFIA

1. Alghise, P.; D'Ambon, V., y Ghillini, C. A. 1962. Influence of nitrogen nutrition on auxin production by *Ustilago maydis.* Riv. Patol. Veg. Ser. 3, 2, 334-40.
2. Berducou, J. 1949. Recherches sur le mode d'action de certains champignons parasites *(Nectria).* Compt. Rend., 228, 1.052-54.

3. BERDUCOU, J. 1957. Mecanisme de la formation des chancres a *Nectria* du pommier. D. Sc. Thesis, Université de Toulouse.
4. BERTHELOT, A., y AMOREAUX, G. 1938. Sur la formation d'acide indole-3-acetique dans l'action de *Bacterium tumefaciens* sur le tryptophane. Compt. Rend., 206, 537-40.
5. BITANCOURT, A. A. 1954. La nature des auxines des tumeurs vegetales. Anné Biol., 30, 7-10.
6. DRAKINA, T. I. 1965. Production of beta-3-indole acetic acid by some *Taphrina* species. Vestn. Mosk. Univ. Ser. VI Biol. Pochvoved., 6, 16-22.
7. DRAKINA, T. I., y KEFELI, V. I. 1967. Resistance problem: interaction of indole acetic acid and phenol compounds in response to the pathological growth induced by *Taphrina*. Zh. Obshch. Biol., 28, 93-104.
8. DUNIN, M. S., y VOLDARSKII, A. D. 1963. Effect of physiologically active substances from *Ustilago zeae* on higher plants. Izv. Timiryazev. Sel'skokhoz. Akad. 5, 7-19.
9. HIRATA, S. 1963. Response of bean and tomato plants to the ether extract from the culture filtrates of phytopathogenic fungi. Miyazaki Daigaku Nogakubu Kenkyu Jiho, 8, 295-306.
10. KLEIN, R. M., y LINK, G. K. K. 1952. Studies on the metabolism of plant neoplasms. V. Auxin as a promoting agent in the transformation of normal to crown-gall tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 38, 1.066-72.
11. LORTIE, M. 1962. *Nectria* canker ans its incitant. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin.
12. LORTIE, M. 1964. Pathogenesis in cankers caused by *Nectria galligena,* Phytopathology, 54, 261-63.
13. LORTIE, M. 1966. Pathogenesis in cankers caused by *Nectria galligena.* Comunicación presentada en el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología.
14. LORTIE, M., y KUNTZ, J. 1963. Ascospore discharge and conidium release by *Nectria galligena* Bress. under field and laboratory conditions. Can. J. Botany, 41, 1.203-10.
15. LORTIE, M., y LACHANCHE, D. 1962. Production of plant growth substances by *Nectria* spp. (Abstr.). Can. Soc. Plant Physiol. Sci. Meeting.
16. MAHADEVAN, A. 1965. *In vitro* production of indole acetic acid by *Fusarium vasinfectum* Atk. Experientia, 21, 433-39.
17. NOVAT, N. 1966. Production of indolyl-3-acetic acid by some species of *Ustilago.* Compt. Rend. Soc. Biol., 160, 1.414-17.
18. SOMMER, N. F. 1961. Production by *Taphrina deformans* of substances stimulating cell elongation and division. Physiol. Plantarum, 14, 460-69.
19. VLITOS, A. J., y MEUDT, W. 1953. The role of auxin in plant flowering. I. A quantitative method based on paper chromatography for the determination of indole compounds and of 3-indoleacetic acid in plant tissues. Contrib. Boyce Thompson Inst., 17, 197-202.
20. YAMAKI, T., y NAKAMURA, K. 1952. Formations of indole acetic acid in maize embryo. Sci. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo, 3, 81-98.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTOS DE MICROBIOLOGIA GENERAL Y VIROLOGIA

AMINOACIDOS Y AZUCARES DEL *CORYNEBACTERIUM MICHIGANENSIS* Y DE SUS PAREDES CELULARES

por

EULALIA CABEZAS DE HERRERA y R. MORENO

INTRODUCCION

La composición química de las bacterias y especialmente de las paredes celulares de las mismas se ha tomado modernamente como un medio de clasificación bacteriana.

Con este objeto estudiamos la composición química del *Corynebacterium michiganensis* y de sus paredes celulares.

MATERIAL Y METODOS

Organismo

La bacteria usada ha sido el *Corynebacterium michiganensis* núm. 886 de la "National Collection of Plant Pathogenic Bacteria", Plant Pathology Laboratory, Hatching Green, Harpenden, Herts (Inglaterra). Este organismo es gram-positivo.

Obtención de las muestras

La bacteria se cultiva en caldo común durante una noche, en estufa a 25 °C y agitación. Las bacterias se recogen por centrifugación y lavados sucesivos con agua destilada estéril.

El residuo húmedo se divide en dos partes, una, en la que se analiza directamente la bacteria y otra, de la que se obtienen las paredes celulares para su posterior análisis.

Preparación de la pared celular

Para la separación y purificación de la pared celular combinamos los procedimientos de Cummins y Harris (7) y Alsop y Work (3), según el *esquema 1*.

Esquema 1

Células rotas

Se centrifugan 4 veces a 1.000 g, durante 20 minutos

Sedimento	Sobrenadante
	22.000 g, 30 min

Sedimento	Sobrenadante
Se lava con agua y tampón de fosfato 0,1 M, pH = 7,6; se digiere con tripsina y ribonucleasa, se lava varias veces con agua destilada y ClH 0,02 N y se centrifuga a 22.000 g, 30 min	

Sedimento	Sobrenadante
Se digiere con pepsina, se lava varias veces con agua destilada y se centrifuga a 22.000 g, 30 min	

Sedimento	Sobrenadante
Paredes celulares purificadas	

La bacteria se rompe por ultrasonido en un MSU Ultrasonic, durante diez minutos.

Obtención de las proteínas

A una parte de la suspensión celular o de las paredes se añade igual volumen de ácido tricloroacético al 10 %, dejando una noche en nevera. Se centrifuga a 3.000 g. El precipitado se extrae tres veces con cantidades apropiadas de ácido tricloroacético al 5 %, a 100 °C (baño María) durante diez minutos. El residuo de proteína se lava con alcohol de 96°, alcohol-éter (50 : 50) y éter, centrifugando después de cada lavado.

Hidrólisis ácida

En ampolla cerrada, durante dieciséis horas, se hidrolizan 0,02 g de proteína con 10 ml de ClH 6N a 100 °C. Se filtra para eliminar humina. Se lava y evapora dos o tres veces a baño María, hasta eliminar el ácido. El sedimento se recoge en alcohol isopropílico al 10 %.

Hidrólisis alcalina

0,02 g de proteína se hidrolizan en ampolla cerrada con 10 ml de barita de 8-14 %, a 100 °C durante dieciséis horas.

El bario se separa con un ligero exceso de SO_4H_2 N.

El precipitado de SO_4Ba se lava con agua caliente, a la que se ha añadido unas gotas de ácido acético.

Se evapora a baño María y el sedimento se recoge con 2 ó 3 ml de alcohol isopropílico al 10 %.

Hidrólisis de glúcidos

0,02 g de extracto seco de bacterias o paredes celulares, según el caso, se hidrolizan en tubo cerrado con 5 ml de SO_4H_2 2N, a 100 °C, durante dos horas.

El exceso de ácido se neutraliza con $Ba(OH)_2$; el SO_4Ba precipitado se separa por centrifugación, se evapora a 50 °C y el sedimento se disuelve en agua destilada estéril.

Cromatografía en papel

Empleamos cromatografía descendente (6), monodimensional para glúcidos y reacciones específicas de aminoácidos, y bidimensional para aminoácidos, en general.

Disolventes

Para cromatografía monodimensional: butanol-ácido acético-agua (80 : 20 : saturación). Para cromatografía bidimensional: fenol saturado con agua, al que se añaden unas gotas de amoníaco y butanol-ácido acético-agua (80 : 20 : saturación).

Revelado

Utilizamos ninhidrina al 0,1 % en alcohol isobutílico de 90 % como *reactivo general* de aminoácidos, y como *reactivos específicos* utilizamos los siguientes:

Reactivo de Sakaguchi (1), para arginina y derivados guanídicos monosustituidos.

Para histidina, la reacción de Pauly (4-5).

Glicina, histidina y triptófano: el reactivo de Zimmerman (4, 8 y 15-16).

Para metionina, cistina y cisteína, el reactivo de Winegard (23) modificado por Toennis (22).

Para ornitina y ácidos aminados, el reactivo de Curzon y Giltrow (8).

Fenil-alanina. El cromatograma revelado con ninhidrina se calienta y se pulveriza con CO_3NHa al 10 %, que produce color azul.

Para el triptofano y los compuestos del grupo del indol, se utiliza para revelar el cromatograma el reactivo de Ehrlich (19 y 21).

Para la tirosina, se pulveriza el cromatograma con reactivo de Gerngross (1).

La prolina e hidroxiprolina se revelan con isatina (2, 12 y 21).

Para la identificación de glúcidos empleamos el ftalato de anilina (14) y el nitrato de plata amoniacal (13).

Como revelador de aminoazúcares empleamos el reactivo de Morgan y Elson.

RESULTADOS

De los análisis efectuados por los procedimientos anteriormente indicados, hemos identificado en la bacteria total los siguientes aminoácidos: ácidos aspártico y glutámico, glicina, treonina, alanina, valina, metionina, leucina, isoleucina, difenilalanina, lisina, arginina y triptófano.

En la pared celular hemos encontrado como mayores constituyentes ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, treonina, valina, leucina e isoleucina, encontrándose en menor cantidad alanina, metionina y lisina.

Tanto en la bacteria total como en la pared celular identificamos arabinosa, glucosa, galactosa, manosa, ribosa y ramnosa y el aminoazúcar glucosamina.

DISCUSION

La composición química de la pared celular de las bacterias nos proporciona elementos importantes para la clasificación de éstas. Así, Cummis y Harris (7) han considerado que los aminoácidos presentes en la pared celular parecen ser característicos del género, y que los azúcares y aminoazúcares caracterizan la especie, con la excepción de la ribosa, que tiene una significación especial en el género *Corynebacterium.*

Entre los aminoácidos componentes de la pared celular de bacterias tiene especial importancia el ácido diaminopimélico. Este ácido, encontrado en bacterias, es un componente típico de su pared celular (20) y ha sido encontrado en casi todas las examinadas, excepto en muchos cocos gram-positivos y varios lactobacilos (25).

El ácido diaminopimélico se descarboxila, produciendo lisina (10), lo cual sugiere un posible mecanismo de biosíntesis de lisina en las bacterias. Por otra parte, ha sido demostrado (7) que en las bacterias gram-positivas se encuentran lisina o ácido diaminopimélico, pero no ambos. En este sentido están las observaciones de Powell y Strange (18), los cuales han encontrado lisina en algunas bacterias gram-positivas y ácido diaminopimélicos en sus esporas. Gause y colaboradores (11) diferencian mutantes de *Staphylococcus aureus,* según contengan lisina o ácido diaminopimélico.

El ácido diaminopimélico (forma meso) fue aislado primeramente del *Corynebacterium diphteriae* (24); sin embargo, en nuestros análisis sobre la composición en aminoácidos de la pared celular del *C. michiganensis* no hemos encontrado ácido diaminopimélico, pero sí lisina. En relación con este hecho están los hallazgos de Perkins y Cummis (17) con el *C. tritici* 471, el cual no contiene ni ácido diaminopimélico ni lisina, conteniendo en cambio ácido 2-4 diaminobutírico; otros *Corynebacterium* relacionados con éste contienen ornitina en vez de lisina.

En cuanto a los demás componentes analizados, lo más destacable es una mayor cantidad de valina en la pared y la presencia de ribosa, que normalmente no se encuentra en otros géneros bacterianos.

RESUMEN

Han sido analizadas las paredes celulares de *Corynebacterium michiganensis,* así como la bacteria entera, en cuanto a su composición de aminoácidos y azúcares, por cromatografía sobre papel. Los aminoácidos encontrados en la pared son: ácidos aspártico y glutámico, glicina, treonina, valina, leucina e isoleucina, los cuales también se encuentran en los análisis de la bacteria entera, y en menor cantidad que en ésta; alanina, metionina y lisina. No se ha encontrado ácido diaminopimélico.

Los azúcares encontrados son: arabinosa, glucosa, galactosa, manosa, ribosa, ramnosa y el aminoazúcar glucosamina.

SUMMARY

By mean of paper chromatography technics we have studied aminoacid, sugar, and aminosugar, composition of the whole bacteria and separately of its cell wall, of *Corynebacterium michiganensis.*

In the whole bacteria, aspartic acid, glutamic acid, glycine, treonine, alanine, proline, hidroxiproline, valine, methionine, leucine, isoleucine, difenilalanine, lisine, arginine, triptophane, glucose, galactose, manose, ribose, rhamnose, glucosamine were found.

In the cell wall valine, glicine, aspartic acid, glutamic acid, treonine, leucine, isoleucine as the highest components and in smaller quantity alanine, methionine and lisine. Arabinose, glucose, galactose, manose, ribose, rhamnose and the amino-sugar glucosamine were identified.

BIBLIOGRAFIA

1. ACHER, R., y CROCKER, D. 1952. Reactions colorées specifiques de l'arginine et de la tyrosine réalisées après chromatographie sur papier. Biochim. Biophys. Acta, 9, 704.
2. ACHER, R.; FROMAGEOT, C., y JUTISZ, M. 1950. Séparations chromatographiques d'acides aminés et de peptides. V. Les acides aminés individuels de l'insuline avec une note sur le dosage de la proline. Biochim. Biophys. Acta, 5, 81.
3. ALSOP, J., y WORK, E. 1963. Cell walls of propionibacterium species; fractionation and composition. Biochem. J., 87, 512.
4. BLOCK, R. J. 1951. Arch. Biochem. Biophys., 31, 266.
5. BOLLING, D.; BLOCK, R. J., y SOBER, H. A. 1949. Quantitative separation and determination of small amounts of histidina and tyrosine employing paper chromatography. Federation Proc., 8, 185.

6. CONSDEN, R.; GORDON, A. H., y MARTIN, A. J. P. 1944. Qualitative analisis of proteins: A partition chromatographic method using papers. Biochem. J., 38, 224.
7. CUMMINS, C. S., y HARRIS, H. 1956. The chemical composition of the cell wall in some Gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. J. Gen. Microbiol., 14, 583.
8. CURZON, G., y GILTROW, J. 1953. A chromatographic colour regent fora group of amino-acids. Nature, 172, 356.
9. CURZON, G., y GILTROW, J. 1954. Aromatic aldehydes as specific chromatographic colour reagents for amino-acids. Nature, 173, 314.
10. DEWEY, D. L., and WORK, E. 1952. Diaminopimelic acid decarboxylase. Nature, 169, 533.
11. GAUSE, C. F.; KOCHETKOVA, G. V., y VLADIMIROVA, G. B. 1961. Biochemical changes accompanying impaired respiration in staphylococci. Nature, 190, 978.
12. JUTISZ, M. 1959. These doctorates Sciences, París.
13. PARTRIDGE, S. M. 1948. Filter-paper partition chromatography of sugars. I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and fetal blood of sheep. Biochem. J., 42, 238.
14. PARTRIDGE, S. M. 1949. Aniline hydrogen phtalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature, 164, 443.
15. PATTON, A. R., y FOREMAN, E. M. 1949. Glycine reagent for paper chromatogram. Science, 109, 339.
16. PATTON, A. R.; FOREMAN, E. M., y WILSON, P. C. 1949. Do amino acids fluo resce on papergrams? Science, 110, 593.
17. PERKINS, H. R., y CUMMIS, S. S. 1964. Chemical structure of bacterial cell walls. Nature, 201, 1.105.
18. POWELL, J. F., y STRANGE, R. E. 1957. Diaminopimelic acid metabolism and sporulation in *Bacillus sphaericus.* Biochem. J., 65, 700.
19. REDDI, K. K., y KODICEK, E. 1953. Metabolism of nicotinic acid and related compounds in man and rat. Biochem. J., 53, 286.
20. SALTON, M. R. 1953. Studies of the bacterial cell wall. IV The composition of the cell walls of some Gram positive and Gram negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta, 10, 512.
21. SMITH, M. J. H., y TAYLOR, K. W. 1953. The separation of keto acids in blood and urine by paper chromatography. Biochem. J., 55, 30.
22. TOENNIES, G., y KOLB, J. J. 1951. Techniques and reagents for paper chromatography. Anal. Chem., 23, 823.
23. WINEGARD, H. M.; TONNIES, P., y BLOCK, R. J. 1948. Detection of sulfur-containing amino acid on paper chromatograms. Science, 108, 506.
24. WORK, E.; BIRUBAMN, S. M.; WINITZ, S. M., y GREENSTEIN, J. P. 1955. Separation of the three isomeric components of synthetic diaminopimelic acid. J. Am. Chem. Soc., 77, 1.916.
25. WORK, E., y DEWEY, D. L. 1953. The distribution of α-ε-diaminopimelic acid among various microorganisms. J. Gen. Microbiol., 9, 394.

INSTITUTO DE BIOLOGIA CELULAR (C S I C)
I SECCION DE BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS

ALGUNOS DATOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO Y ELECTROFORETICO DE LAS β-GLUCANASAS SINTETIZADAS POR DOS MICROORGANISMOS

por

A. JIMENEZ-MARTINEZ y MONIQUE NOVAES-LEDIEU

INTRODUCCION

Las enzimas hidrolíticas β-glucanasas están ampliamente distribuidas dentro de la flora microbiana del suelo y se pueden obtener con altos rendimientos cultivando un gran número de aquellos microorganismos en un medio apropiado. Las β-(1-3) y β-(1-6)glucanasas, enzimas que tienden a ser constitutivas, se encuentran en la mayoría de los caldos de cultivo de microorganismos, cualquiera que sea el substrato carbonado empleado (16). Por el contrario, las β-(1-4)glucanasas, enzimas adaptativas, son mucho menos corrientes, realizándose su síntesis sólo en presencia de un inductor (14 y 17).

Las β-(1-4)glucanasas han venido llamando la atención de los investigadores desde hace unos veinte años. En 1950, Reese y colaboradores (17), en un estudio realizado con los caldos celulolíticos de varios hongos, sugirieron que la hidrólisis de la celulosa corresponde a una serie de pasos. El primero de ellos lo llevaría a cabo una enzima (denominada por este equipo factor C_1) que actuaría sobre la celulosa cristalina o nativa, transformándola en celulosa reactiva. La naturaleza de este fenómeno no es bien conocida, suponiéndose que el factor C_1 hincha e hidrata la celulosa cristalina. Una vez en forma reactiva o amorfa, la celulosa sería ata-

cada por el factor C_x o carboximetilcelulasa (CMCasa), enzima, o más probablemente grupo de enzimas, que hidrolizan las cadenas glucanásicas hasta el nivel de celobiosa. Por último, el dímero sería hidrolizado a glucosa por una β-glucosidasa o celobiasa. Las investigaciones posteriores de otros autores (5, 11 y 18) parecen confirmar esa teoría. En todos estos trabajos, los autores han mostrado poco interés por las β-(1-3) y β-(1-6) glucanasas, que, dada su naturaleza de enzimas constitutivas, podían encontrarse en los caldos de cultivo empleados como fuentes de celulasas.

Otros investigadores, trabajando con los filtrados del cultivo del *Aspergillus niger,* llegaron a aislar, en varias operaciones de fraccionamiento, unas β-(1-3)glucanasas, al mismo tiempo que unas β-(1-4)glucanasas (1 y 4). De otra parte, unas β-(1-3)glucanasas han sido aisladas del caldo de cultivo del *Bacillus circulans* (22) y del de dos *Streptomyces* (7 y 19). En estos últimos trabajos, los investigadores utilizaron medios de cultivo muy complejos, a base de paredes celulares de levadura de panadería o de micelio de hongos, resultando la producción de enzimas en estas condiciones bastante variable y, en general, baja.

En cuanto a la purificación de β-(1-6)glucanasas, pocos resultados interesantes se han obtenido. Tanaka y Phaff (22) aislaron una enzima que actúa sobre los enlaces glucanásicos en β-(1-6) a partir del caldo de cultivo del *Bacillus circulans,* y Reese y colaboradores (16) purificaron parcialmente las β-(1-6)glucanasas sintetizadas por varios hongos.

En estudios realizados en nuestro laboratorio sobre paredes celulares de tres hongos oomicetos se emplearon complejos enzimáticos con una fuerte actividad celulásica, conteniendo también actividades β-(1-3) y β-(1-6)glucanásicas. Por ataques de las paredes con esas enzimas se pudo demostrar la presencia de carbohidrato(s) con enlaces β-(1-3), β-(1-4) y β-(1-6)glucosídicos (3 y 12). A la vista de los resultados obtenidos, pensamos que sería interesante, con el fin de hacer posteriormente un estudio más profundo de la estructura de la pared celular de aquellos hongos, tratar de purificar las diferentes enzimas hidrolíticas específicas presentes en los caldos de cultivo de dos microorganismos con fuerte actividad celulásica.

MATERIAL Y METODOS

Organismos y condiciones de cultivo

Para la obtención de caldos de cultivo presentando, entre otras actividades glucanásicas, una fuerte actividad celulásica, se han utilizado dos microorganismos: el Basidiomiceto sp. QM 806 y el *Streptomyces* sp. QM 814. Ambos procedían del "US Army Laboratory", Natick, Massachussets, y se cultivaron en los medios y en las condiciones descritos respectivamente, por Mandels y Reese (10) y Reese y Mandels (15). Indicaremos que los dos medios constan, entre otros componentes, de celulosa (Whatman cellulose powder), 10 g/l. Cuando la cantidad de celulasa liberada en el medio permanecía estacionaria (lo cual ocurre aproximadamente a los treinta días para el actinomiceto y a los veinte días para el basidiomiceto) se filtraban los cultivos por filtro de vidrio aglutinado. El caldo enzimático se conservaba a — 15 °C. La adición de mertiolato al 0,05 % permite la perfecta conservación del filtrado a 4 °C durante varios meses.

Valoraciones enzimáticas

Las actividades C_1 y C_x (CMCasa) se determinaron según describen Mandels y Reese (11) y Reese y colaboradores (17), respectivamente, valorando los azúcares reductores al final de la reacción por el método de Nelson modificado por Somogyi (21). Las actividades β-(1-3) y β-(1-6) glucanásicas se valoraron siguiendo el método de Mandels y colaboradores (9) y Reese y colaboradores (16), respectivamente, empleando para medir la primera actividad una solución de laminarina (Koch-Light) y para la segunda, una suspensión de pustulano (véase más adelante la preparación de este substrato).

Para valorar la proteína de los medios de cultivo se empleó el método de Lowry y colaboradores (8), mientras que la cantidad de proteína de los eluidos cromatográficos y electroforéticos se midió por absorción espectrofotométrica a 280 mμ.

Obtención y análisis del pustulano

Este producto es un polímero de glucosa con enlaces β-(1-6) y se preparó a partir del liquen *Umbilicaria pustulata,* según describen Lindberg y Mc Pherson (6). Con este propósito el liquen se recogió en San

Lorenzo del Escorial (Madrid) y de él se obtuvo un producto crudo, de color negro, que fue purificado siguiendo, con algunas modificaciones, el método de Reese y colaboradores (16). Para ello, se disolvió en SO_4H_2 0,3 N en la proporción del 0,1 % y se mantuvo quince minutos al baño de María. Se añadió, en caliente, alcohol hasta una concentración del 13%, y el precipitado negro que se formó (probablemente corresponde a melaninas) fue separado por centrifugación. De los sobrenadantes se precipitó el pustulano purificado, incrementando la concentración del alcohol hasta el 45 %. Se formó un precipitado blanco de pustulano, que se recogió por centrifugación, se lavó tres veces con acetona y se liofilizó. El rendimiento aproximado a partir de peso seco de liquen fue del 7 %. El pustulano obtenido de esta manera no es soluble en tampón de citrato 0,05 M, pH 4,5, pero forma suspensiones muy homogéneas.

La pureza del pustulano fue comprobada por cromatografía de un hidrolizado del mismo (HCl N, una hora, 105 °C) en butanol-acetona-agua (40:50:10 v/v) dando glucosa y gentibiosa como productos principales, junto con trazas de manosa y galactosa. De otra parte, haciendo actuar sobre el mismo substrato una β-(1-6)glucanasa del *Penicillium brefeldianum* (3) se obtuvo también glucosa y gentibiosa como productos principales de la hidrólisis.

Unidades de actividad

Para las celulasas se adoptaron las unidades descritas por Mandels y Reese (11) y para las β-(1-3) y β-(1-6)glucanasas las descritas por Mandels y colaboradores (9).

Electroferesis

Las pruebas ionoforéticas se realizaron sobre papel Whatman núm. 1, o bien sobre papel de fibra de vidrio GF 81 de la misma firma comercial, en un aparato HVE Shandon de alto voltaje. Cuando sólo interesaba conocer la posición de las diferentes proteínas, los electroforegramas se revelaron con una solución de negro de amido (20). Para determinar el reparto de actividades se corta el papel en tiras de 0,5 cm de ancho, que se eluyen cada una con 1 ml de tampón de citrato 0,05 M, pH, 4,5.

La actividad de los eluídos se valoró siguiendo el método correspondiente. En algunas pruebas se utilizó como soporte un bloque de almidón (9). Las condiciones de cada ensayo (diferencia de potencial, tiempo

de la operación y tampón empleado) estarán indicadas en el lugar correspondiente a cada uno.

RESULTADOS

Actividades presentes en los medios de cultivo

En el *cuadro 1* están recogidos los valores correspondientes a las diferentes actividades glucanásicas encontradas en los caldos de cultivo de los dos microorganismos estudiados. Se observa cómo el filtrado del basidiomiceto tiene las actividades β-(1-3)glucanasa y CMCasa más altas que el del *Streptomyces,* siendo muy similares las restantes actividades en los caldos de ambos microorganismos.

Cuadro 1. Actividades presentes en los medios de cultivo (*)

Organismo	Proteína (mg/ml)	Actividad específica			
		C_1	CMCasa	β(1-3) glucanasa	β(1-6) glucanasa
Streptomyces QM 814	1,4	1,7	9,6	1,4	1
Basidiomiceto QM 806	2,4	1,3	67,7	38,3	1

(*) Actividad expresada en unidades de la correspondiente enzima /mg de proteína.

Concentración de los filtrados enzimáticos por precipitación con acetona o con sulfato amónico

Con el objeto de concentrar los caldos de cultivo de ambos microorganismos y de purificar parcialmente las actividades glucanásicas presentes en ellos, los filtrados se trataron con agentes precipitantes. Las glucanasas del *Streptomyces* se precipitaron con acetona (1/2 en volumen) a 4 °C, manteniéndolas en frigorífico durante una noche. El precipitado se resuspendió y se centrifugó a 15.000 g durante quince minutos a 4 °C, diluyéndose finalmente con agua. El complejo enzimático del basidiomiceto se trató con $SO_4(NH_4)_2$ al 0,6 de saturación y todas las operaciones

siguientes fueron las mismas que en el caso del *Streptomyces,* salvo que se dializó durante veinticuatro horas a 4 °C frente a agua destilada. En el *cuadro 2* están representados los valores recuperados para la β-(1-3)glu-

Cuadro 2. Actividades presentes en los precipitados enzimáticos

Organismo	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (*)	
		CMCasa	β-(1-3) glucanasa
Streptomyces QM 814	2,5	95,0	12,0
Basidiomiceto QM 806	30,0	76,1	42,1

(*) La actividad está presentada en unidades correspondientes de enzima/mg de proteína.

canasa y la CMCasa. Se ve cómo en el caso del *Streptomyces* estas dos enzimas han sido purificadas unas diez veces, mientras que la actividad específica de la CMCasa y de la β-(1-3)glucanasa del basiodiomiceto no aumentó sensiblemente. De otra parte, la β-(1-6)glucanasa y el factor C_1, presentes en escasa proporción en los dos caldos, se recuperaron en los precipitados sin pérdida aparente.

Estudios cromatográficos y electroforéticos de las β-glucanasas

I) Concentrado enzimático del Streptomyces

a) Filtración por geles de Sephadex. En varias publicaciones científicas se ha descrito el fraccionamiento de enzimas celulásicas mediante el empleo de geles de Sephadex (14 y 18). Dada la presencia de varias carbohidrasas en los medios de cultivo del *Streptomyces* y existiendo la posibilidad de que algunas de ellas tuvieran pesos moleculares distintos de las celulasas, el concentrado enzimático, obtenido según se describió anteriormente, se filtró por varios tipos de Sephadex (G-50, G-75 y G-100) con el fin de obtener varias fracciones enzimáticamente activas sobre enlaces glucosídicos.

Las características fundamentales de las tres clases de columnas están indicadas en el *cuadro 3.* Cuando se utilizaron columnas de Sephadex

G-50, la elución se hizo con agua destilada y todas las actividades se recuperaron tras el volumen muerto, indicando la presencia de enzimas glucanásicas con pesos moleculares superiores a 10.000. Este eluido se con-

Cuadro 3. Características y resultados de la filtración por geles de Sephadex del concentrado enzimático del Streptomyces

Características	G-50	G-75 (*)	G-100 (*)
Tamaño de la columna (cm)	20 × 2	24 × 2	30 × 2
Flujo (ml/h)	15	10	10
Volumen de las fracciones (ml)	4	4	4
Proteína cargada (mg)	25	8	8
Actividad CMCasa cargada (**)	95	142,5	142,5
Proteína recuperada (1er. pico)	16	1,27	1,0
Actividad CMCasa recuperada (1er. pico)	42,5	182	232

(*) El producto cargado fue el obtenido por medio de la filtración por Sephadex G-50.

(**) Actividad específica expresada en unidades de CMCasa /mg de proteína.

centró por liofilización y se mantuvo en frigorífico a 4 °C, pudiendo conservarse varias semanas sin pérdidas apreciables de actividad. El liofilizado se dividió en dos fracciones iguales: una de ellas se filtró por Sephadex G-75 y la otra por Sephadex G-100. Para los 150 ml primeros de cada columna se utilizó como eluyente un tampón de citrato sódico 0,05 M, pH 6, con ClK 0,1 M, continuando la operación con este mismo tampón, pero con ClK 0,2 M. Los resultados obtenidos en las dos clases de cada columna se utilizó como eluyente un tampón de citrato sódico casos se recuperó aproximadamente la cuarta parte de la actividad carboximetilcelulásica tras el volumen muerto, lo que debe significar que esta actividad corresponde a una enzima(s) con un peso molecular alto, seguramente con un valor próximo a 100.000 o superior a esta cifra. La adición de ClK 0,2 M al citrato sódico, en los dos tipos de columnas, permite la elución de varios picos de proteínas, presentando algunos de ellos una escasa actividad CMCasa. La retención parcial sobre Sephadex G-75 y

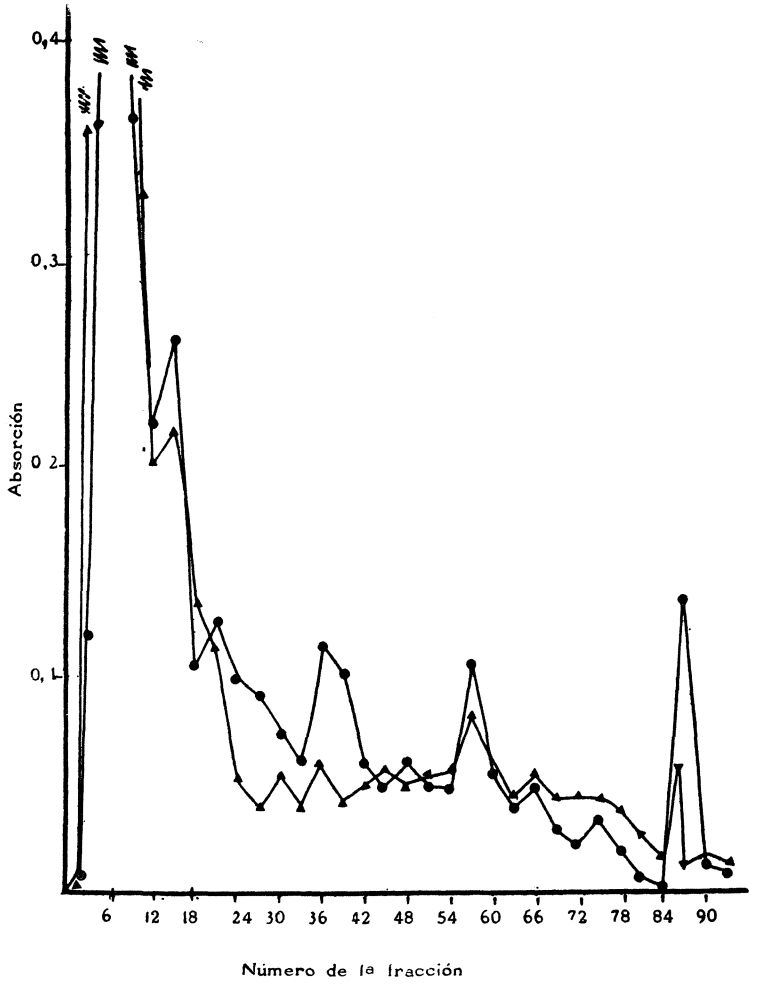

Figura 1 (*). *Filtración por Sephadex G-75 del concentrado enzimático del* Streptomyces *QM 814. ClK, 0,2 M.* ●, *absorción a 280 mμ.* ▲, *actividad CMCasa*

(*) Figuras 1-4: los azúcares reductores liberados por la acción de la enzima sobre el correspondiente substrato, se valoraron según se describió en "Material y Métodos".

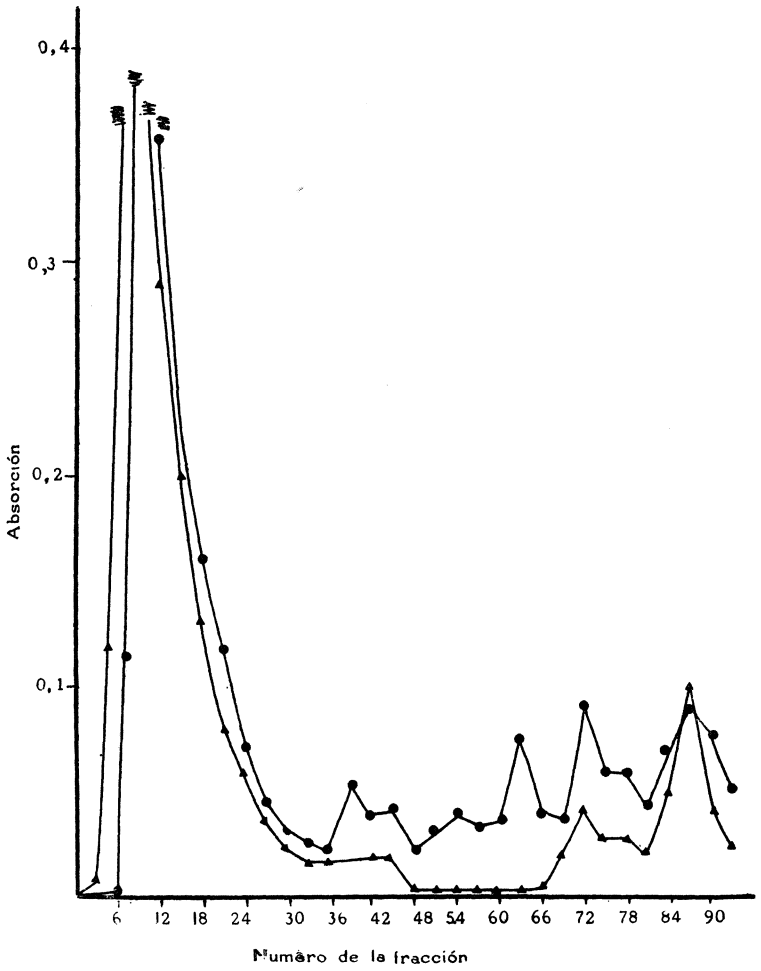

Figura 2. Filtración por Sephadex G-100 del concentrado enzimático del Streptomyces *QM 814. ClK, 0,2 M. ●, absorción a 280 mμ. ▲, actividad CMCasa*

G-100 de estas proteínas también activas sobre carboximetilcelulosa, permite asegurar que los pesos moleculares correspondientes a estas enzimas son inferiores al de la enzima que sale en el primer pico junto a otras proteínas, sin estar nada retenida por la resina. Estos pesos moleculares deben, por lo tanto, estar por debajo de 50.000 (en el caso del Sephadex G-75) o de 100.000 (en el del Sephadex G-100). Frente a estos resultados, diversas hipótesis pueden hacerse en cuanto a estas enzimas activas sobre carboximetilcelulosa. Se puede pensar en la existencia, en el caldo de cultivo original del *Streptomyces,* de varias enzimas capaces de hidrolizar la carboximetilcelulosa y presentando características distintas, o bien la presencia inicial de una sola CMCasa, correspondiendo las otras actividades celulásicas encontradas a productos de degradación de la enzima principal originados por la acción de las proteasas presentes en el complejo enzimático. Las restantes actividades (C_1, β-(1-3) y β-(1-6)glucanasas), no representadas en las *figuras 1-2,* se encuentran, en su mayor parte, en el pico primero, unidas a la CMCasa, lo que indica que todas estas enzimas deben tener pesos moleculares altos, impidiendo una resolución de ellas con estos tipos de Sephadex.

b) Cromatografía de cambio iónico. Las resinas cambiadoras de iones permiten la separación de proteínas con características muy similares, pero presentando entre ellas diferencias muy pequeñas de carga. Dado que el fraccionamiento por filtración resultó infructuoso, el producto eluído de una columna de Sephadex G-50, semejante a la descrita anteriormente, se liofilizó y cromatografió sobre una columna de resina aniónica DEAE Sephadex A-50, eluyendo con un gradiente continuo de ácido acético-acetato sódico a pH 4,0, entre 0,02 M y 1 M. Se preparó una columna de 15 × 1 cm, se reguló el flujo de salida a 8 ml/h y se recogieron fracciones de 4 ml. En la *figura 3,* correspondiente a esta cromatografía sobre resina cambiadora de iones, se observa la presencia de un pico principal de proteínas con fuerte actividad sobre carboximetilcelulosa, que se extiende sobre las fracciones 5 hasta 10, es decir, que viene bastante después del volumen muerto. A los tubos 10-12 corresponde otro pico menos importante con actividad CMCasa. La actividad β-(1-3)glucanásica está recogida en su mayor proporción en las fracciones 3-7, de tal manera que los tubos 7-10 contienen una carboximetilcelulasa muy purificada de la β-(1-3)glucanasa. Las otras dos carbohidrasas, que existen en pequeña cantidad en la preparación, el factor C_1 y la β-(1-6)gluca-

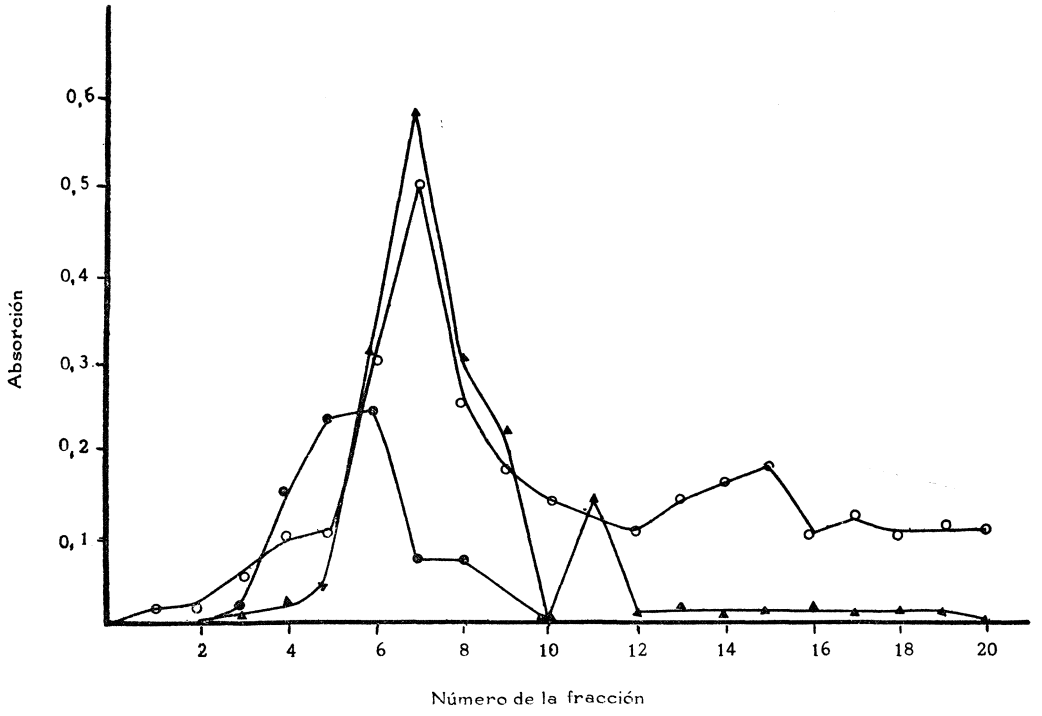

Figura 3. Cromatografía sobre DEAE-Sephadex A-50 del concentrado enzimático del Streptomyces *QM 814. ●, β-(1-3)glucanasa. ▲, CMCasa. ○, absorción a 280 mμ*

nasa (no representadas en la *figura 3*), salen juntas después del volumen muerto, sin contaminar la carboximetilcelulasa del pico principal. Hay que hacer notar que en esta cromatografía se aprecia una pérdida muy importante de CMCasa y de β-(1-3)glucanasa. Por la escasa cantidad del producto eluido no se intentó hacer una ulterior cromatografía de los tubos 7, 8 y 9, en los cuales, la CMCasa estaba bastante purificada de las restantes actividades.

II) Concentrado enzimático del basiodiomiceto

Los concentrados enzimáticos del basidiomiceto presentan fuertes actividades CMCasa y β-(1-3)glucanasa *(cuadro 2),* las cuales se trataron de aislar por métodos electroforéticos. Cuando se utilizó papel Whatman núm. 1 para esta operación, sólo se consiguió una débil movilidad de las dos β-glucanasas a pH alcalino, no llegando de otra parte a separar una actividad de la otra, mientras que a pH neutro o ácido las glucanasas permanecieron en el origen. Las condiciones de las diferentes ionoforesis, así como los resultados obtenidos en estas operaciones, están consignados en el *cuadro 4.* En las experiencias realizadas a pH 9,9 y 11,5 aparecía,

Cuadro 4. Condiciones y resultados de las electroforesis sobre papel de celulosa del concentrado enzimático del basidiomiceto

Tampón	Molaridad	pH	Voltios	Tiempo (horas)	Movilidad hacia el ánodo	
					Celulasa	β-(1-3) glucanasa
Fosfato	0,05 M	7.0	5.000	1	—	—
Piridina-H_2O-Acido acético (100:900:4)		6,5	5.000	2	—	—
Acetato	0,05 M	4,5	4.000	2	—	—
Tris-ClH	0,05 M	8,0	600	6	+	+
Tris-ClH	0,05 M	8,5	4.000	6	++	++
Carbonato-bicarbonato	0,05 M	9,9	600	20	++++	++++
Carbonato	0,05 M	11,5	600	24	++++++++++	

Las distancias al origen están expresadas: 0-1,5 cm, +; 1,5-3 cm, ++; 4-5 cm, +++ ; 5-7 cm, +++++

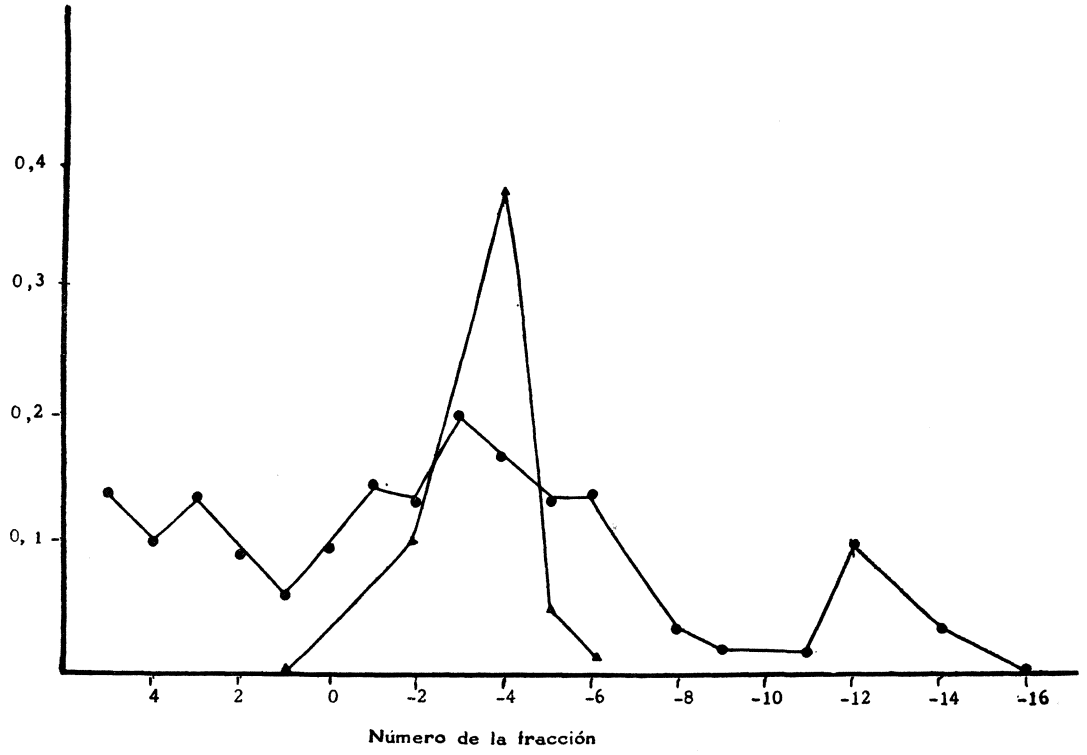

Figura 4. Electroforesis en bloque de almidón del concentrado enzimático del basidiomiceto QM 806. ●, β-(1-3)glucanasa. ▲ , β-(1-4)glucanasa

además, una zona fuertemente positiva al negro de amido, a 8 y 13 cm del origen, respectivamente, en dirección al ánodo. El eluido de esta zona no presentó en ninguno de los dos casos cualquiera de las actividades glucanásicas que se investigaban.

Debido a la gran absorción que presentaron las β-glucanasas en el papel de celulosa, se hicieron pruebas de fibra de vidrio, a pH alcalino. Se empleó como tampón una solución de carbonato sódico 0,05 M, pH 9,1 y se realizó la operación bajo un potencial de 600 V. Como era de esperar, dada la gran inercia química del soporte electroforético, la CMCasa y la β-(1-3)glucanasa se desplazaron rápidamente (5 y 25 cm del origen a las una y seis horas respectivamente), pero permanecieron unidas.

En un trabajo llevado a cabo por Mandels y colaboradores (9) estos investigadores encontraron que las carbohidrasas del basidiomiceto, en una electroforesis en bloque de almidón a pH 7,0, sólo se desplazaban débilmente hacia el ánodo. Este resultado coincidía con los descritos anteriormente, y habiendo, al mismo tiempo, demostrado la movilidad a pH alcalino, se hicieron experimentos empleando condiciones similares a las descritas por Mandels y colaboradores (9), pero en un tampón de carbonato-bicarbonato sódico 0,05 M, pH 9,1. En la *figura 4* está representado el gráfico correspondiente a una de estas pruebas, pudiéndose observar cómo la β-(1-3)glucanasa se ha fraccionado en tres componentes principales, estando el pico mayor solapado por la CMCasa. Es posible que se hubiera podido conseguir una purificación de dos β-(1-3)glucanasas, pero el método fue abandonado por las elevadas pérdidas de actividad y la difícil reproducibilidad de los resultados.

En el caso del *Streptomyces,* las ionoforesis realizadas en varias condiciones no dieron resultados interesantes, encontrando siempre pérdidas importantes de las diferentes actividades glucanásicas y una baja reproducibilidad.

DISCUSION

Se ha visto que, cultivando el Basidiomiceto QM 806 y el *Streptomyces* QM 814 en un medio conteniendo celulosa, se liberaban en el caldo de cultivo cuatro glucanasas: β-(1-3) y β-(1-6)glucanasas, CMCasa y factor C_1. La proporción de cada una de ellas fue muy variable, desta-

cando la elevada cantidad de CMCasa en los dos caldos enzimáticos y la fuerte proporción de β-(1-3)glucanasa en el caldo del basidiomiceto. La β-(1-6)glucanasa y el factor C_1 se encontraron siempre en baja proporción.

Precipitando el caldo enzimático del *Streptomyces* con acetona se ha conseguido aumentar las actividades específicas de las glucanasas unas diez veces sin que este tratamiento separase ninguna de las enzimas estudiadas. Mediante filtración por geles de Sephadex (G-50, G-75 y G-100) se ha demostrado el elevado peso molecular de las diferentes β-glucanasas (100.000 o superiores a 100.000) como se deduce en su inmediata aparición en el eluido tras el volumen muerto al pasar por el dextrano G-100 (*). Dado que con este tratamiento no se consiguió prácticamente aumentar la actividad específica de la CMCasa, se puede concluir que las restantes enzimas presentes (proteasas, α-(1-4)glucanasas, etc.) pasaron unidas a las β-glucanasas, teniendo, por tanto, pesos moleculares similares. De otra parte, sólo se consiguió recuperar escasamente una cuarta parte de la actividad CMCasa cargada sobre las columnas de Sephadex G-75 y G-100, lo que puede ser debido a una desnaturalización de la misma, descartando una retención de la enzima por el gel, visto el número de fracciones eluidas y la molaridad del eluyente. Se puede también aceptar la hipótesis de que estas pérdidas sean debidas a una retención sobre la columna, de algún activador específico de la CMCasa. (Se está desarrollando actualmente el estudio de la acción combinada de las diferentes fracciones sobre carboximetilcelulosa, sin que hasta el momento haya pruebas que confirmen aquel supuesto). Por otra parte, dado que en el medio de cultivo existen proteasas y que tras el componente principal aparecieron varios picos de escasa actividad carboximetilcelulásica, se puede sugerir la hipótesis de que se trate de productos de degradación de aquel componente, dotados de resto de actividad, siendo a la vez una posible explicación de las pérdidas de actividad encontradas.

Mejores resultados se han conseguido mediante cromatografía sobre DEAE-Sephadex A-50 del eluido enzimáticamente activo procedente de una columna de Sephadex G-50, ya que se ha podido obtener por este

(*) Los datos publicados por otros autores dan a las celulasas por ellos estudiadas pesos moleculares comprendidos entre 10.000 y 90.000 (5, 13-14, 18 y 24). En el presente trabajo se describe, por el contrario, la existencia de glucanasas con pesos moleculares superiores a 100.000 o próximos a esta cifra.

procedimiento, si no una CMCasa pura, por lo menos una fracción de CMCasa prácticamente libre de actividades β-(1-3) y β-(1-6)glucanásicas y de C_1 *(figura 3)*. De otra parte, esta operación ha permitido obtener unas fracciones careciendo de CMCasa y presentando una alta actividad específica sobre enlaces β-(1-3)glucosídicos. Por posteriores recromatografías se piensa lograr purificar completamente una β-(1-3)glucanasa y una carboximetilcelulasa.

Las β-glucanasas del basidiomiceto presentaron una gran resistencia a desplazarse sobre el papel de celulosa, durante las operaciones de electroforesis, lo que puede ser debido a pesos moleculares muy elevados. En el caso del factor C_1, esta falta de movilidad se podría explicar también por una absorción en su propio substrato, pero no así en las demás actividades. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hash y King (2) y Thomas y Whitaker (23) con las enzimas celulolíticas del *Myrothecium verrucaria,* aunque en ambos trabajos se logró la separación de varias carboximetilcelulasas. Dada la gran inercia química del papel de fibra de vidrio, se consiguió con este soporte una rápida migración de las β-glucanasas a pH alcalino, pero sin llegar a purificar ninguna de las actividades estudiadas. Destaca en este sentido la gran estabilidad de las carbohidrasas, no sólo frente a la temperatura (se pueden manejar durante un día a 20 °C, sin alterarse), sino frente a un pH elevado, como lo demuestra el hecho de que a pH 11,1 no se inactivan.

El método de separación mediante electroforesis en bloque de almidón, en contraposición a lo encontrado por Mandels y colaboradores (9), tenía los inconvenientes de la falta de reproducibilidad y las pérdidas de actividad. A pesar de estos inconvenientes, haremos resaltar que, a partir del complejo enzimático del basidiomiceto, se obtuvieron a pH 9,1 dos β-(1-3)glucanasas bastante purificadas de otras actividades glucanásicas, una en dirección al ánodo y otra hacia el cátodo, estando un tercer componente con actividad β-(1-3)glucanásica solapado con la CMCasa. Aquí como en el caso de las enzimas celulolíticas del *Streptomyces,* no se ha podido comprobar si las diferentes β-(1-3)glucanasas corresponden originalmente a varias carbohidrasas con actividad semejante, pero con características propias, o bien a una sola carbohidrasa, que por ataque con proteasas liberadas en el medio daría origen a nuevos componentes enzimáticos, conservando una cierta actividad glucanásica.

RESUMEN

Dos microorganismos, el *Streptomyces* QM 814 y el Basidiomiceto QM 806, cultivados separadamente en un medio nutritivo conteniendo celulosa, liberan en el medio cuatro tipos de β-glucanasas: β-(1-3) y β-(1-6) glucanasas, carboximetilcelulasa y factor C_1 en proporciones muy diferentes. Las carbohidrasas del *Streptomyces,* purificadas primeramente por precipitación con acetona, se cromatografiaron sobre columnas de Sephadex G-50, G-75 y G-100. Del comportamiento de las enzimas en el tratamiento con Sephadex se ha demostrado una cierta homogeneidad en cuanto a los pesos moleculares del factor C_1, de la β-(1-6) y de la β-(1-3)glucanasa y de una fracción muy activa sobre carboximetilcelulosa, siendo en todos los casos superiores a 100.000. El estudio de las curvas de elución de las columnas de Sephadex G-75 y G-100 demuestra además la existencia de varias fracciones que presentan una débil actividad CMCasa y las cuales corresponden a enzimas con pesos moleculares más bajos. Por cromatografía sobre DEAE Sephadex A-50 se obtiene una fracción con fuerte actividad CMCasa desplazada de las otras β-glucanasas. Se obtiene también otra fracción con una actividad CMCasa más débil, pero completamente libre de las otras β-glucanasas. En el caso del concentrado enzimático del basidiomiceto se estudió el comportamiento de la β-(1-3) glucanasa y de la CMCasa en la electroforesis sobre papel de celulosa y de fibra de vidrio. En el caso del papel Whatman núm. 1, empleando una amplia gama de pH, diferencias de potencial y de tiempo, sólo se consiguió una débil movilidad de la β-(1-3)glucanasa y de la CMCasa a pH alcalino, sugiriendo, esta gran adsorción sobre el papel de celulosa, un alto peso molecular para estas enzimas. Utilizando papel de fibra de vidrio se consiguió un rápido desplazamiento, pero sin que esto permitiera una separación de las actividades. Por electroforesis en bloque de almidón se ha conseguido el aislamiento de varias fracciones con actividad β(1-3) glucanasa y de una fracción con CMCasa, la cual siempre permaneció unida a una de las fracciones β-(1-3)glucanasa.

AGRADECIMIENTO

Nuestro más sincero agradecimiento al Prof. J. Rodríguez Villanueva por las facilidades dadas para la realización de este trabajo. Asimismo

agradecemos la asistencia técnica prestada por D.ª Concepción Duch de Navarro durante el desarrollo de esta investigación.

ABSTRACT

When the *Streptomyces* QM 814 or the Basidiomycete QM 806 were grown in a cellulose-containing nutritive medium, they liberated into the medium 4 kinds of β-glucanases: β-(1-3) and β-(1-6) glucanases, carboximethylcellulase, and C_1 factor. The proportion of each enzyme was very different. The *Streptomyces* carbohydrases were purified by precipitation with acetone followed by gel filtration through columns of Sephadex G-50, G-75 and G-100. From the behaviour of the enzymes on gel filtration the β-(1-6) and β-(1-3)glucanases, the C_1 factor, and the most active carboximethylcellulase fraction all have molecular weight higher than 100.000. The elution curves from the Sephadex G-75 and G-100 columns showed the presence of several fractions with weak CMCase activity, which corresponded to enzymes with lower molecular weight. By chromatography on DEAE-Sephadex A-50 a fraction with strong CMCase activity was displaced from the other β-glucanases, and followed by a further fraction with a lower CMCase and completely free from the other β-glucanases. The behaviour of the β-(1-3)glucanase and CMCase in an enzyme concentrate from the basidiomycete culture filtrates has been studied by eletrophoresis on cellulose paper and glass fibre paper. With Whatman nº 1 paper, using a wide range of pH, voltage and time, only at alkaline pH there was a weak mobility towards the anode. This result suggests that the enzymes have a high molecular weight. On glass fibre paper the enzymes migrated but did not separate. On starch block electrophoresis, several fractions with β-(1-3) glucanase activity were resolved: a further fraction was obtained with both CMCase and β-(1-3)glucanase activity.

BIBLIOGRAFIA

1. Clarke, A. E., y Stone, B. A. 1965. Biochem. J., 96, 793.
2. Hash, J. H., y King, K. W. 1958. J. Biol. Chem., 232, 395.
3. Jiménez, A. 1967. Composición química de la pared celular de los Oomicetos. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid.

4. KRISHNA MURTI, C. R., y STONE, B. A. 1961. Biochem. J., 78, 715.
5. LI, H. L.; FLORA, R. M., y KING, K. W. 1965. Arch. Biochem. Biophys., 111, 439.
6. LINDBERG, B., y MCPHERSON, I. 1954. Acta Chem. Scand., 8, 985.
7. LÓPEZ-BELMONTE, F. 1967. Protoplastos de hongos. Obtención, estructura y propiedades. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid.
8. LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, A.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J. 1951. J. Biol. Chem., 193, 265.
9. MANDELS, M.; MILLER, G. L., y SLATER, R. 1961. Arch. Biochem. Biophys., 93, 115.
10. MANDELS, M., y REESE, L. T. 1962. J. Bacteriol., 83, 400.
11. MANDELS, M., y REESE, E. T. 1964. Development in Industrial Microbiology 5, 5. American Institute of Biological Science, Washington, D. C.
12. NOVAES, M.; JIMÉNEZ, A., y VILLANUEVA, J. R. 1967. J. Gen. Microbiol., 47, 237.
13. OKADA, G.; NISIZAWA, K., y SUZUKI, H. J. 1968. Biochemistry (Tokyo), 63, 591.
14. PETTERSON, G.; COWLING, E. B., y PORATH, J. 1963. Biochim. Biophys. Acta, 67, 1.
15. REESE, E. T., y MANDELS, M. 1963. En R. L. WHISTLER (ed.). Methods in carbohydrate chemistry, 3, 139. Academic Press, New York.
16. REESE, E. T.; PARRISH, F., y MANDELS, M. 1962. Can. J. Microbiol., 8, 327.
17. REESE, E. T.; SIU, R. G. H., y LEVINSON, H. S. 1950. J. Bacteriol., 59, 485.
18. SELBY, K., y MAITLAND, C. G. 1967. Arch. Biochem. Biophys., 118, 254.
19. SKUJINS, J. J.; POTGIETER, H. J., y ALEXANDRE, M. 1965. Arch. Biochem. Biophys., 111, 358.
20. SMITHIES, O. 1955. Biochem. J. 61, 629.
21. SOMOGYI, M. J. 1952. J. Biol. Chem., 195, 19.
22. TANAKA, M., y PHAFF, H. J. 1965. J. Bacteriol., 89, 1.570.
23. THOMAS, R., y WHITAKER, D. R. 1958. Nature, 181, 715.
24. WHITAKER, D. R.; COLVIN, J. R., y COOK, W. H. 1954. Arch. Biochem. Biophys., 49, 257.

BIBLIOGRAFIA

INMUNOELECTROFORESIS, por *P. Grabar* y *P. Burtin* (Traducción de José M. Porres Juan). 1968. Editorial Toray-Masson, S. A. Barcelona. XII + 348 páginas, 99 figuras.

La inmunoelectroforesis, desde su descubrimiento, se reveló como una de las técnicas más eficaces para realizar estudios inmunológicos de sueros y de relaciones antígeno-anticuerpo. Resulta difícil, para nosotros, pensar en análisis inmunoelectroforéticos sin asociar a ellos la personalidad científica del Prof. Grabar y de su laboratorio que tantos hemos visitado.

Por otra parte, en la bibliografía de publicaciones referentes a esta materia es casi obligado encontrar las citas de la edición francesa (desde 1960) o inglesa (desde 1964): consideramos esto como la más elocuente prueba del gran interés de la obra original.

En cuanto a la versión española del Prof. Porres Juan, presentada por la Editorial Toray-Masson de Barcelona, corresponde a la edición inglesa de 1964 y puesta al día por sus autores, incluyendo además un nuevo capítulo referente a estudios inmunoelectroforéticos del líquido amniótico humano, del meconio y de las heces del niño.

La versión española mantiene, al igual que las anteriores, la clasificación en tres partes: técnicas inmunoelectroforéticas, aplicaciones al plasma humano y estudios en otros líquidos humanos. Su cuidada traducción, realizada por un especialista en la materia, como el Prof. Porres, pone a disposición de los estudiosos de la Inmunología —en el área de lengua hispana— un valioso libro de consulta, del que también es preciso resaltar su acertada presentación tipográfica.

A. PORTOLÉS

Depósito legal: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid