
VOLUMEN 22. 1969

JULIO - DICIEMBRE. NUMEROS 3 - 4

Microbiología Española

Revista

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS



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

	<u>Página</u>
Particularidades en la conjugación de <i>Stylomychia mytilus</i> Ehrenberg, por M. ^a Asunción Jareño, Pilar Alonso y J. Pérez-Silva.	177
Metabolismo de aminoácidos en levaduras. III) Fenómenos de adaptación en la oxidación de aminoácidos por <i>Debaryomyces kloeckeri</i> , por J. L. Fernández-Puentes y D. Rodríguez.	191
Estructuras cristalinas intracelulares en <i>Sclerotinia fructigena</i> , por F. D. Calonge	199
Protoplastos de hongos oomicetos, por A. Jiménez-Martínez y Monique Novaes-Ledieu	209
Técnica estandarizada para el aislamiento e identificación del agente etiológico de la tuberculosis del olivo, por P. Romero y V. Callao	219
Estudio etiológico del brote epidémico gripal ocurrido en Barcelona en febrero de 1968, por A. Pumarola, A. Rodríguez-Torres, J. Vidal y J. Orta	233
Respuesta de <i>Erwinia carotovora</i> a distintas fuentes de carbono, por Genoveva Tejerina y M. ^a Teresa Serra	251
Estudios fisiológicos en el hongo hiperparásito de royas <i>Darluca filum</i> . II. Efecto de los factores de crecimiento, por G. Nicolás	263
Influencia del inóculo en el crecimiento de <i>Citrobacter intermedium</i> C ₃ en cultivo discontinuo, por R. Clotet	271
II Congreso Nacional de Microbiología	283
Junta Directiva de la Sociedad	283
Bibliografía, por M. Rubio-Huertos	285

VOLUMEN 22. 1969

JULIO - DICIEMBRE. NUMEROS 3 - 4

Microbiología Española

Revista

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

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

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

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

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

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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

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

Número: España, 60 PTA; extranjero, 90 PTA

INDICE

	Página
<i>Alonso, Pilar</i> : véase <i>Jareño, Asunción</i>	177
<i>Arcos, J. M., and Chordi, A.</i> : Immunology of <i>Bacillus cereus</i> beta-lactamases	139
<i>Arcos, J. M.</i> : véase <i>Múgica, J. D.</i>	153
<i>Ballesteros, Ana M.^a</i> : véase <i>Beltrá, R.</i>	41
<i>Beltrá, R.; Ballesteros, Ana M.^a, y Lahoz, R.</i> : Estudios sobre la producción de sustancias de crecimiento por <i>Nectria ga-</i> <i>lligena</i>	41
<i>Bravo, F.</i> : véase <i>Iñigo, B.</i>	19
<i>Cabezas de Herrera, Eulalia, y Moreno, R.</i> : Aminoácidos y azú- cares del <i>Corynebacterium michiganensis</i> y de sus paredes celulares	55
<i>Calonge, F. D.</i> : Ultrastructure of the hyphae of <i>Phytophthora</i> <i>palmivora</i> with special reference to intrahyphal hyphae and vesicular elements	97
<i>Calonge, F. D.</i> : Estructuras cristalinas intracelulares en <i>Sclero-</i> <i>tinia fructigena</i>	199
<i>Callao, V.</i> : véase <i>Romero, P.</i>	219
<i>Clotet, R.</i> : Influencia del inóculo en el crecimiento de <i>Citrobac-</i> <i>ter intermedium C₃</i> en cultivo discontinuo	271
X Congreso Internacional de Microbiología	175
II Congreso Nacional de Microbiología	283

	Página
<i>Chordi, A.</i> : véase <i>Arcos, J. M.</i>	139
<i>Díaz-Múgica, M.^a Victoria</i> : Estudio comparativo de las técnicas de tinción argéntica en la infraciliación de <i>Paramaecium aurelia</i>	9
<i>Díaz-Múgica, M.^a Victoria, y Rubio-Huertos, M.</i> : Microscopía electrónica de tejidos tumorales inducidos en <i>Phaseolus vulgaris</i> por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1
<i>Elorza, M.^a Victoria</i> : Toxicidad de los iones metálicos para <i>Aspergillus nidulans</i>	131
<i>Fernández, F.</i> : Valoración microbiológica de cloruro de benzalconio en placa de agar	169
<i>Fernández, Purificación</i> : véase <i>Iriarte, M.^a Teresa</i>	113
<i>Fernández-Puentes, J. L., y Rodríguez, D.</i> : Metabolismo de aminoácidos en levaduras. III) Fenómenos de adaptación en la oxidación de aminoácidos por <i>Debaryomyces kloeckeri</i> .	191
<i>Iñigo, B.; Plasencia, Ana M.^a, y Bravo, F.</i> : Estudio de bacterias aisladas del vino. II. Clasificación de bacterias lácticas.	19
<i>Iriarte, M.^a Teresa; Fernández, Purificación; Ronda, E., y Portolés, A.</i> : Variaciones en la composición de aminoácidos celulares en <i>Erwinia carotovora</i>	113
<i>Jareño, Asunción; Alonso, Pilar, y Pérez-Silva, J.</i> : Particularidades en la conjugación de <i>Stylonychia mytilus</i> Ehrenberg.	177
<i>Jiménez-Martínez, A., y Novaes-Ledieu, Monique</i> : Algunos datos sobre el comportamiento cromatográfico y electroforético de las β -glucanasas sintetizadas por dos microorganismos	63
<i>Jiménez-Martínez, A., y Novaes-Ledieu, Monique</i> : Protoplastos de hongos oomicetos	209
Junta Directiva de la Sociedad	283
<i>Lahoz, R.</i> : véase <i>Beltrá, R.</i>	41
<i>Meza, Graciela</i> : véase <i>Sánchez-Marroquín, A.</i>	121
<i>Mondragón, M.^a Elena</i> : véase <i>Sánchez-Marroquín, A.</i>	121
<i>Moreno, R.</i> : véase <i>Cabezas de Herrera, Eulalia</i>	55
<i>Múgica, J. D.; Ruiz, M.^a Cristina, y Arcos, J. M.</i> : Penicillina-se distribution in <i>Escherichia coli</i> cells	153

<i>Nicolás, G.</i> : Estudios fisiológicos en el hongo hiperparásito de royas <i>Darluca filum</i> . II. Efecto de los factores de crecimiento	263
<i>Novaes-Ledieu, Monique</i> : véase <i>Jiménez-Martínez, A.</i>	63
<i>Novaes-Ledieu, Monique</i> : véase <i>Jiménez-Martínez, A.</i>	209
<i>Orta, J.</i> : véase <i>Pumarola, A.</i>	233
<i>Parés-Farrás, R.</i> : véase <i>Sancho, J.</i>	85
<i>Pérez-Silva, J.</i> : véase <i>Jareño, Asunción</i>	177
<i>Plasencia, Ana M.^a</i> : véase <i>Iñigo, B.</i>	19
<i>Portolés, A.</i> : Bibliografía	83
<i>Portolés, A.</i> : véase <i>Iriarte, M.^a Teresa</i>	113
<i>Pumarola, A.</i> ; <i>Rodríguez-Torres, A.</i> ; <i>Vidal, J.</i> , y <i>Orta, J.</i> : Estudio etiológico del brote epidémico gripal ocurrido en Barcelona en febrero de 1968	233
<i>Rodríguez, D.</i> : véase <i>Fernández-Puentes, J. L.</i>	191
<i>Rodríguez-Torres, A.</i> : véase <i>Pumarola, A.</i>	233
<i>Romero, P.</i> , y <i>Callao, V.</i> : Técnica estandarizada para el aislamiento e identificación del agente etiológico de la tuberculosis del olivo	219
<i>Ronda, E.</i> : véase <i>Iriarte, M.^a Teresa</i>	113
<i>Rubio-Huertos, M.</i> : Bibliografía	285
<i>Rubio-Huertos, M.</i> : véase <i>Díaz-Múgica, M.^a Victoria</i>	1
<i>Ruiz, M.^a Cristina</i> : véase <i>Múgica, J. D.</i>	153
<i>Sánchez-Marroquín, A.</i> ; <i>Mondragón, M.^a Elena</i> ; <i>Vierna, Lilia</i> , y <i>Meza, Graciela</i> : Nuevo substrato para la producción de L-lisina por mutantes auxótrofas de <i>M. glutamicus</i> (<i>C. glutamicum</i>)	121
<i>Sancho, J.</i> , y <i>Parés-Farrás, R.</i> : Identificación taxonómica de <i>Pseudomonas azotogensis</i>	85
<i>Serra, M.^a Teresa</i> : véase <i>Tejerina, Genoveva</i>	251
<i>Tejerina, Genoveva</i> , y <i>Serra, M.^a Teresa</i> : Respuesta de <i>Erwinia carotovora</i> a distintas fuentes de carbono	251
<i>Vidal, J.</i> : véase <i>Pumarola, A.</i>	233
<i>Vierna, Lilia</i> : véase <i>Sánchez-Marroquín, A.</i>	121

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL
SECCION DE PROTOZOLOGIA

PARTICULARIDADES EN LA CONJUGACION DE *STYLONYCHIA MYTILUS* EHRENBERG

por

M.^a ASUNCIÓN JAREÑO, PILAR ALONSO y J. PÉREZ-SILVA

INTRODUCCION

Al intentar estudiar la autogamia en *Stylonychia mytilus* encontramos que no existía una descripción detallada de los pasos fundamentales de la conjugación, o sea, la formación de pronúcleos y su estado en el momento de la unión. Según los datos recogidos en la bibliografía, las divisiones pregámicas y postgámicas en esta especie (8 y 2) siguen el esquema general admitido para otros oxitríquidos (3 y 5-7). Al encontrar nosotros en los autogamontes una serie de estadios que no encajaban en el citado esquema, creímos conveniente realizar un estudio detallado de la conjugación, con el fin de averiguar si tales estadios eran privativos de la autogamia o se producían también en la conjugación.

Por otra parte, la estirpe de *Stylonychia mytilus* utilizada en este trabajo posee unos micronúcleos muy apropiados para un estudio cariológico, debido a su tamaño y a la claridad con que se distinguen algunos estadios por los que pasan los cromosomas.

MATERIAL Y METODOS

La estirpe de *Stylonychia mytilus* que utilizamos en este trabajo ha sido aislada de una muestra de agua recogida en Cercedilla, en 1967. Desde entonces se viene cultivando en nuestro laboratorio en medio de

extracto de tierra, añadiendo como alimento un cultivo mixto de *Colpidium sp.* y *Chilomonas sp.*

Se han conseguido dos tipos de apareamiento complementarios (5 y 5R), lo cual ha permitido provocar la conjugación siempre que ha sido necesario. Lo que nos ha dado mejores resultados para provocar la conjugación ha sido añadir un poco de alimento en el momento en que se unen los cultivos de los dos tipos de apareamiento. Generalmente se conjugan una vez agotado el alimento. El apareamiento no ocurre en masa, sino que las parejas se van formando a lo largo de uno o dos días. Por lo tanto, para hacer un estudio seriado de la conjugación nosotros separamos las primeras parejas que se forman. En una o dos horas obtenemos suficiente material para hacer preparaciones abundantes a lo largo de todo el proceso.

Fijación y tinción

En unos casos se utilizó como colorante la orceína acética, que servía al mismo tiempo de fijador, y en otros, el verde de metilo-pironina-naranja G, previa fijación en metanol-acético (3 : 1). Asimismo se empleó la reacción nuclear de Feulgen.

RESULTADOS

En este trabajo se establece el número de divisiones pregámicas y postgámicas y se describe el estado de los cromosomas en algunas de las fases, especialmente en la primera división pregámica.

El número de micronúcleos en los individuos vegetativos varía de 2-5, a veces puede haber 6. Estos núcleos miden de 5-6 μ de diámetro en las preparaciones teñidas con orceína, y de 4-5 μ cuando se aplica la reacción de Feulgen.

Todos los individuos pueden entrar en conjugación cualquiera que sea el número de micronúcleos, aunque lo más frecuente es encontrar conjugantes con tres y cuatro. Generalmente, todos los micronúcleos intervienen en la primera división pregámica, sin embargo, a veces quedan sin funcionar uno o dos micronúcleos. Por lo tanto, una vez terminada la primera división, el número de productos varía de 4 a 12, siendo el más frecuente 6. Entre los números impares predomina el 7.

En la segunda división pregámica intervienen, por regla general, la mitad de los micronúcleos existentes, pero a veces se dividen un número mayor que el de los que quedan en reposo (*figura 1*) e incluso todos. Una vez terminada esta segunda división pregámica, cada conjugante posee de 6 a 14 micronúcleos, siendo los números más frecuentes 9 y 11. De los productos resultantes de esta segunda división pregámica, que suelen quedar ordenados en dos grupos (*figura 2*), dos o, con más frecuencia, cuatro empiezan una profase (*figura 3*), pero sólo dos, que serán los que funcionarán como pronúcleos, continúan el proceso, de manera que en el momento del intercambio micronuclear tanto el emigrante como el estacionario se encuentran en una profase avanzada (*figura 4*). Según nuestras observaciones en numerosas parejas durante el intercambio de pronúcleos, las frecuencias del número total de micronúcleos, incluyendo los pronúcleos, coinciden con las frecuencias encontradas al final de la segunda división. El pronúcleo, que pasa al otro conjugante en prometafase, llega a la metafase y se une en este estado con el estacionario (el cual también se encuentra en metafase), formando el sincarion (*figuras 5-7*), que inmediatamente experimenta la anafase, dando lugar a dos núcleos. Entre tanto empiezan a desaparecer los productos resultantes de las divisiones pregámicas.

Dado que la división del sincarion puede ser considerada como primera postgámica, en esta estirpe existen siempre tres divisiones postgámicas, puesto que los productos resultantes del sincarion se dividen dos veces más.

La secuencia de las dos últimas divisiones postgámicas puede seguirse claramente en las *figuras 8-12*. En la *figura 8* se observan las dos grandes profases de la segunda división postgámica; los restos micronucleares de las divisiones pregámicas son muy pequeños y se encuentran en estado avanzado de picnosis. En las *figuras 9-10* se muestran las metafases y anafases de esta división, quedando aún algunos restos, que suelen desaparecer por completo al terminar la telofase (*figura 11*). Los cuatro productos resultantes se agrandan como si todos empezaran una profase, pero solamente dos de ellos siguen el proceso según se muestra en la *figura 12*, donde pueden observarse dos núcleos difusos y dos en metafase, en cada conjugante. Por regla general, en esta división las anafases son asincrónicas, llegando antes a la telofase la situada en la región anterior.

Al terminar esta división postgámica se distinguen claramente los dos restos de la división anterior y los cuatro productos resultantes de la ter-

cera (*figura 13*), de los cuales uno dará origen al nuevo macronúcleo, dos de ellos quedarán como micronúcleos, y de los restantes, dos desaparecen rápidamente, de modo que, en el momento de la separación, los exconjugantes presentan el esbozo macronuclear y tres micronúcleos, uno de los cuales desaparece poco después.

Como resultado de numerosas observaciones llegamos a la conclusión de que el esbozo macronuclear no se origina a partir de uno cualquiera de los cuatro productos resultantes, sino que siempre procede del núcleo inferior de la telofase más avanzada (el situado en la región central del individuo). Los micronúcleos definitivos proceden siempre de la otra telofase, quedando situados a uno y otro lado del esbozo macronuclear.

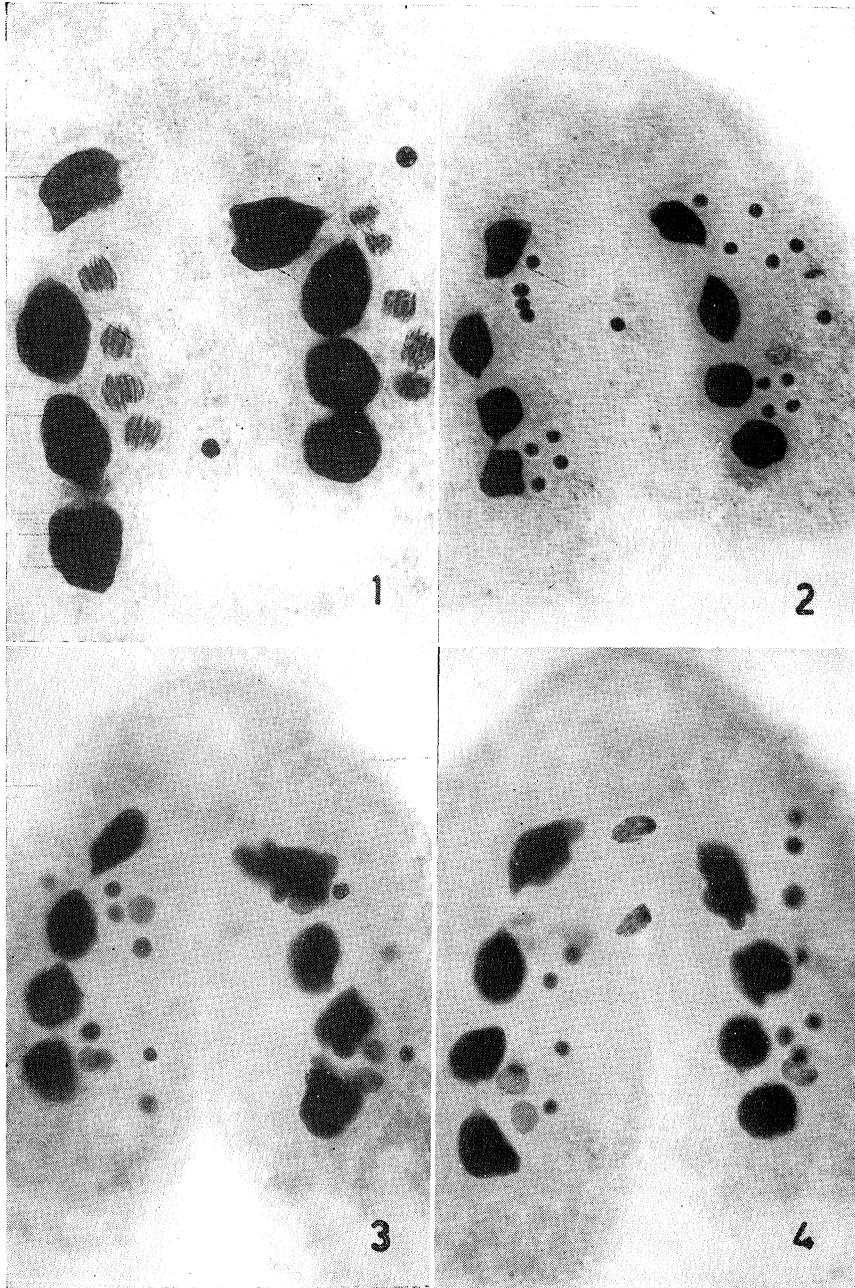
En cada una de las fases anteriormente descritas, los filamentos cromatínicos presentan distinto aspecto; solamente en la primera división pregámica se observan los cromosomas individualizados.

Al comenzar la profase de la primera división pregámica, los micronúcleos empiezan a esponjarse hasta duplicar su tamaño; al mismo tiempo, de la periferia empiezan a desprenderse filamentos cromatínicos, frecuentemente con aspecto arrosariado, hasta que el micronúcleo alcanza la llamada fase de "sol" (*figura 14*). Cada vez aumenta más el material cromatínico en la periferia y va disminuyendo en la parte central. Esta emigración es heteropolar, se colocan los filamentos formando una semiesfera y quedando en el polo opuesto una pequeña masa, con lo que resulta una figura a modo de "paracaídas", según se muestra en la *figura 15*. En esta fase y en el paso a la siguiente, los filamentos cromatínicos están separados y, por regla general, forman parejas con uno o varios puntos de contacto, constituyendo figuras en forma de "V", anillo, "8" y otras más complicadas, como puede apreciarse en las *figuras 16-18*. No se ha podido determinar con exactitud el número de dichos filamentos o cromosomas porque son muy numerosos (alrededor de 100).

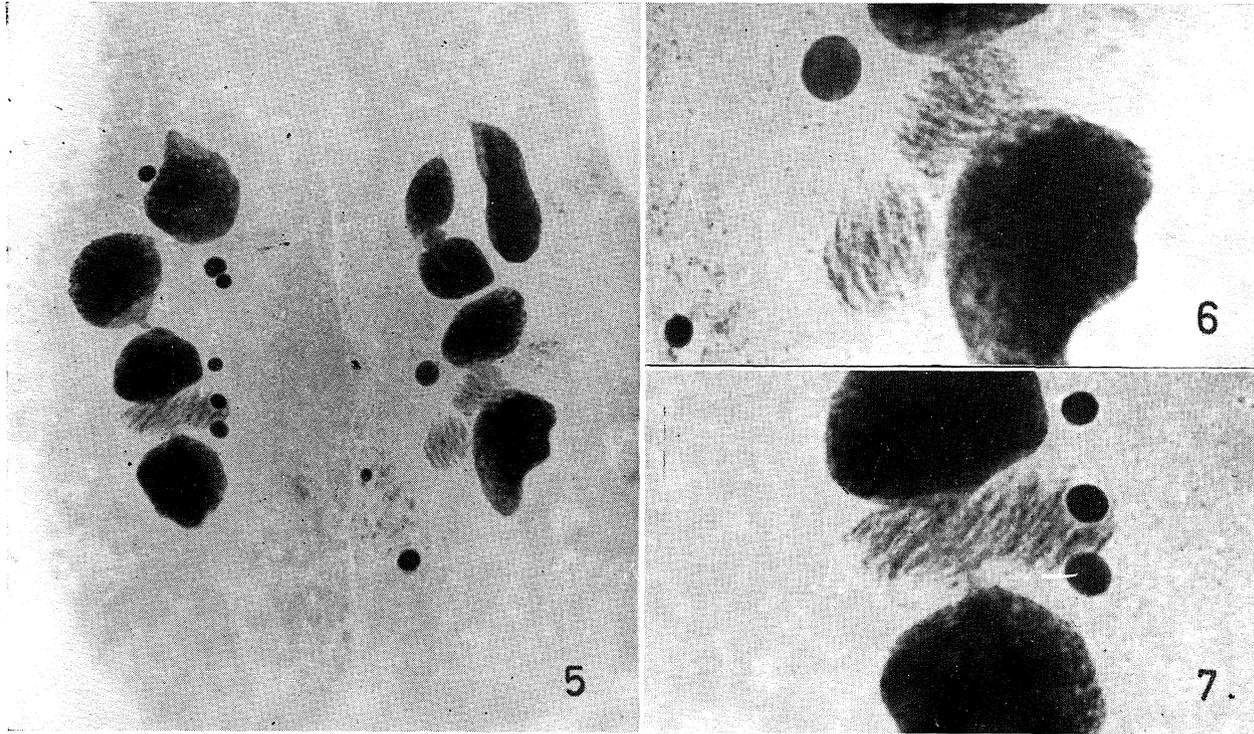
Los pocos filamentos que quedaban por emigrar al otro polo terminan por pasar, reagrupándose para constituir la metafase. En esta fase, los cromosomas parecen más cortos y gruesos y se disponen en una placa metafásica muy ancha (*figura 19*).

En la anafase, no todos los cromosomas emigran sincrónicamente a los polos, según se observa en la *figura 20*.

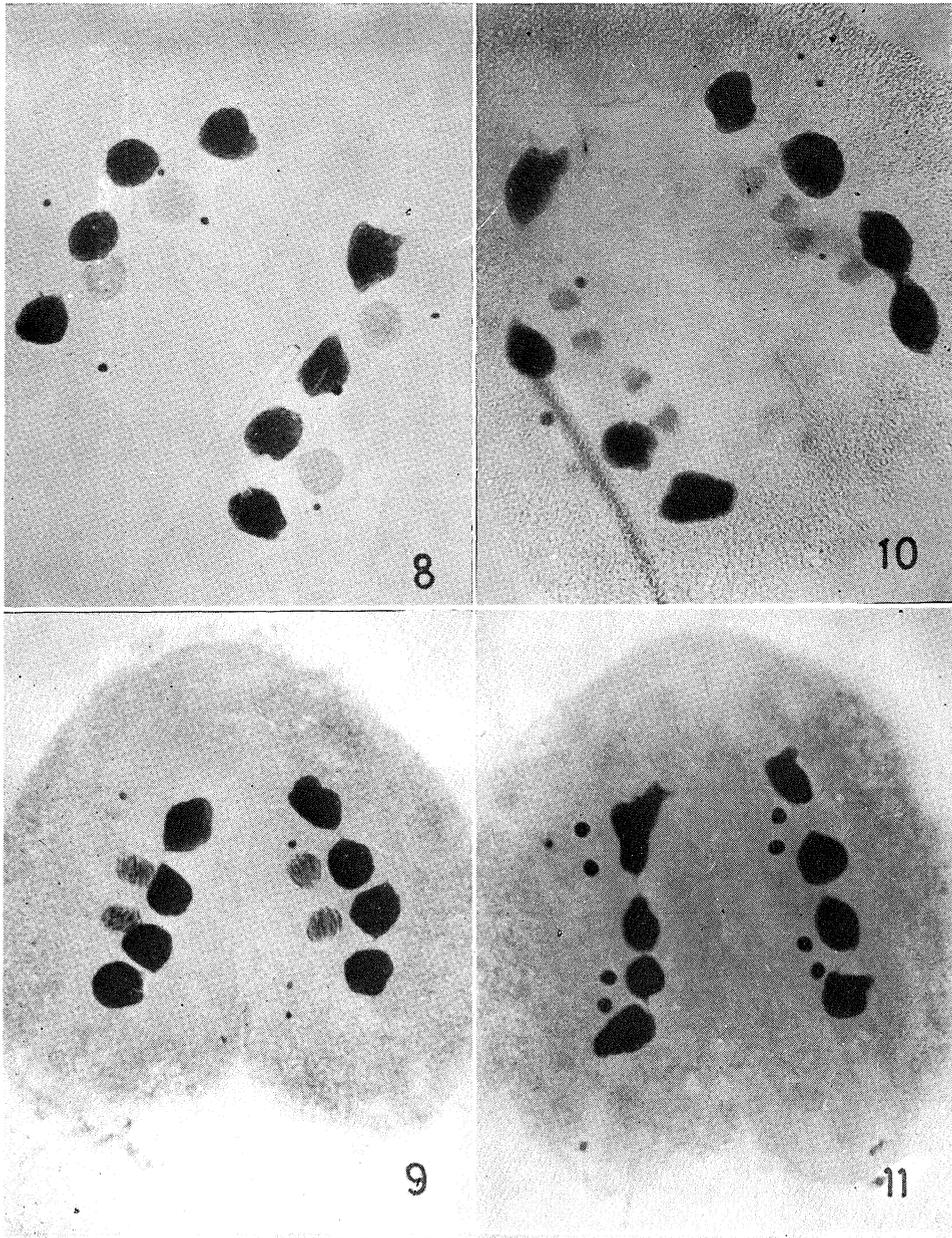
Inmediatamente después de la telofase comienza la profase de la segunda división. En ésta se pueden distinguir filamentos (*figura 21*), pero



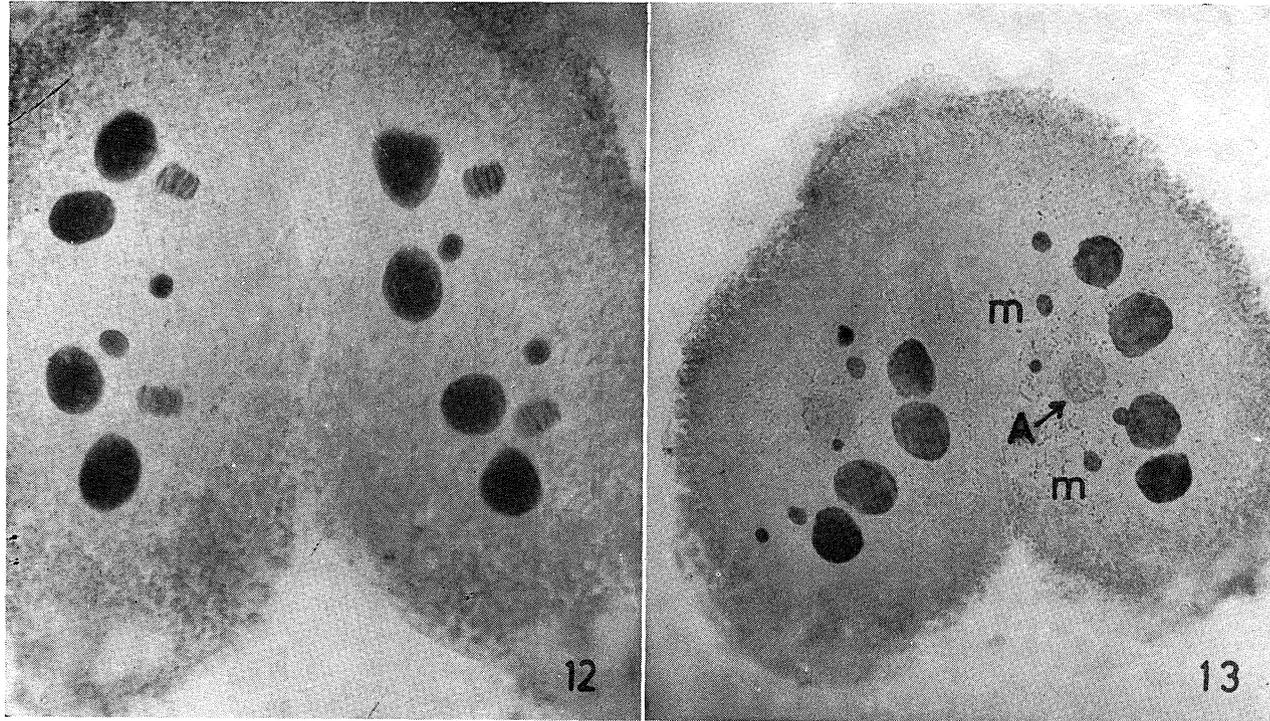
Figuras 1-4. *Stylynychia mytilus*, cuatro estados sucesivos de la conjugación. Orceína acética. 1) Metafasas de la segunda división pregámica. En cada conjugante ha quedado un núcleo residual. 2) Segunda división pregámica recién terminada. Obsérvese la disposición de los micronúcleos en dos grupos. 3) Fase un poco más avanzada que la anterior. Uno o dos micronúcleos de cada grupo empezando una profase. 4) Intercambio de pronúcleos



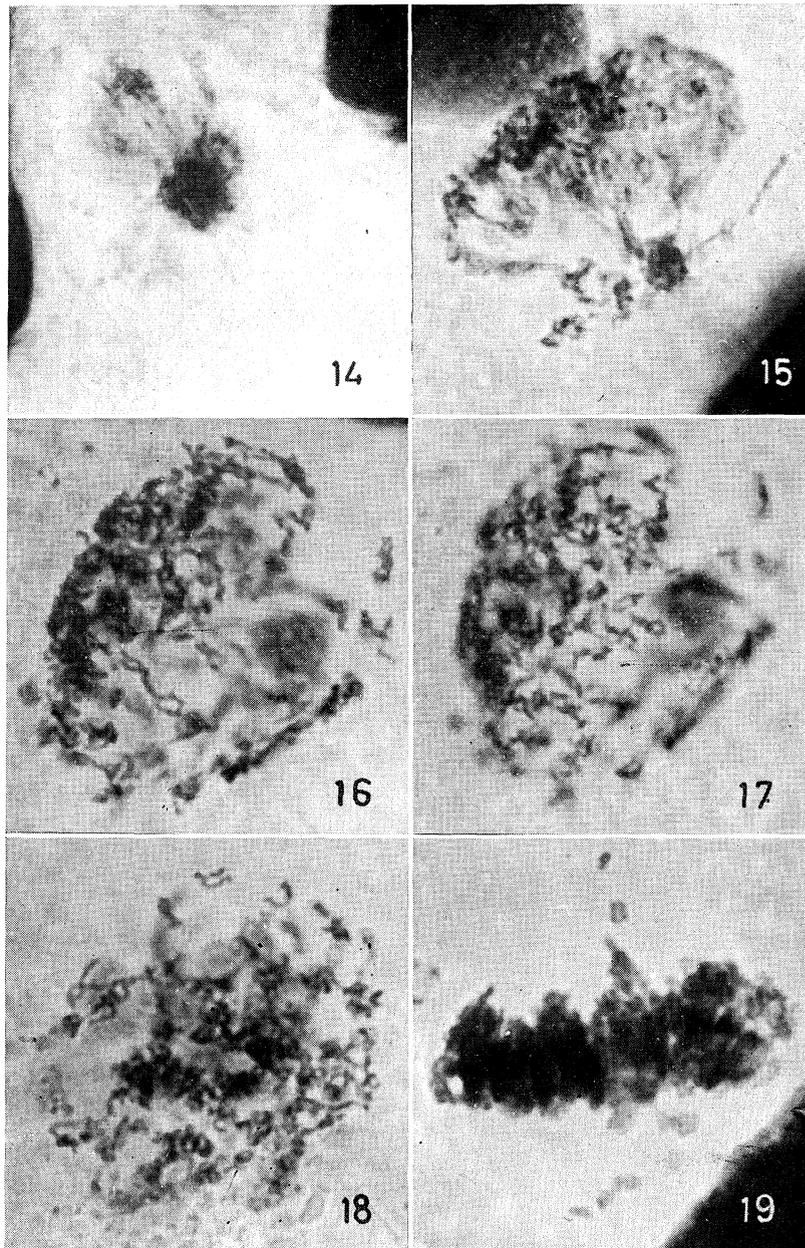
Figuras 5-7. *Styl. mytilus*. Orceína acética. 5) En el conjugante de la derecha, pronúcleos en metafase a punto de unirse. En el de la izquierda, pronúcleos ya unidos constituyendo el sincarion. 6-7) Pronúcleos y sincarion a mayor aumento



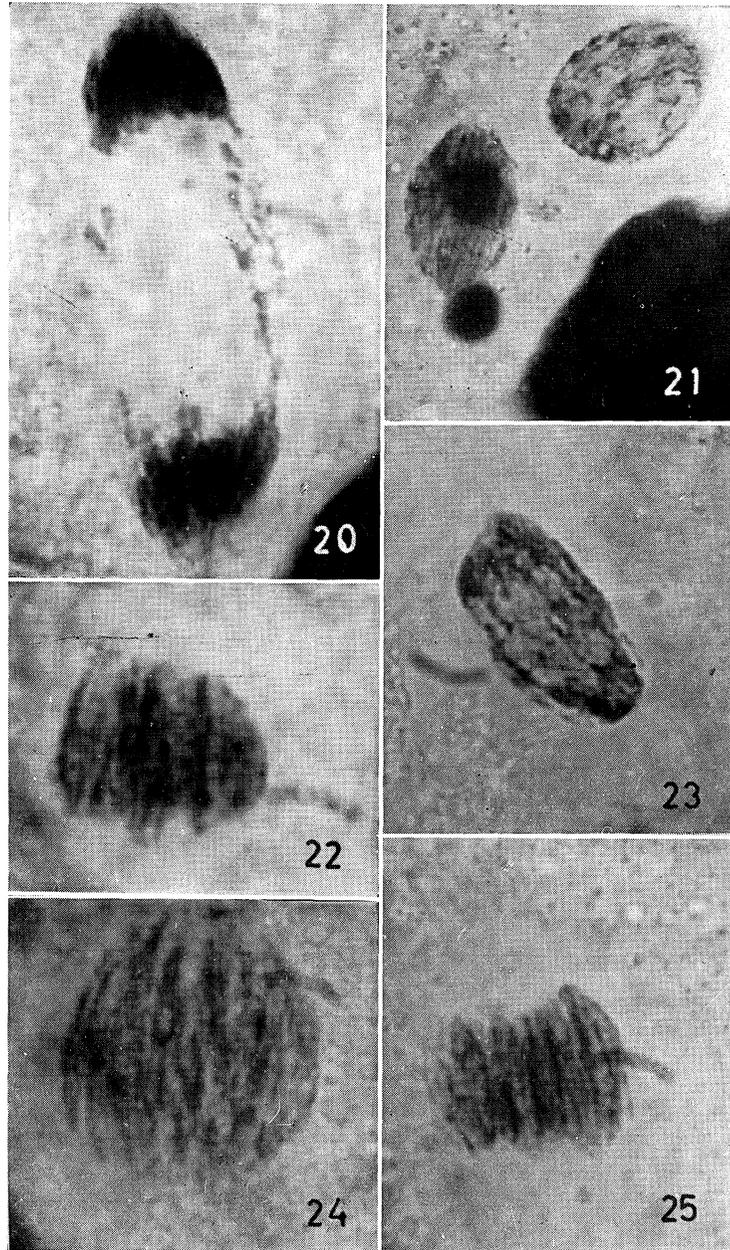
Figuras 8-11. Styl. mytilus. Orceína acética. Cuatro estados sucesivos (profases, metafases, anafases y telofases, respectivamente) de la segunda división postgámica



Figuras 12-13. Styl. mytilus. Orcéina acética. 12) Metafasas de la tercera división postgámica. 13) Disposición de los núcleos después de la tercera división postgámica. A: esbozo macronuclear; m: micronúcleo definitivo



Figuras 14-19. *Styl. mytilus*. Orceína acética. Diversos estados de los micro-núcleos durante la primera división pregámica. 14) Estado de "sol". 15) Estado de "paracaídas". 16-18) Estados intermedios entre el "paracaídas" y la metafase. Obsérvense los bivalentes con uno o varios quiasmas. 19) Metafase. Los cromosomas aparecen más gruesos y cortos que en las fases anteriores



Figuras 20-25. *Styl. mytilus*. *Orcéina acética*. 20) Anafase de la primera división pregámica. 21) Profases de la segunda división pregámica. 22) Metafase de la segunda división pregámica. 23) Pronúcleo emigrante en el momento de pasar al otro conjugante. 24) Metafase de la segunda división postgámica. 25) Metafase de la tercera división postgámica

no individualizados como en la primera división. En la metafase se observan menos filamentos que en la primera metafase, pero más largos (*figura 22*).

A continuación, los productos que darán lugar a los pronúcleos empiezan una profase, que al principio es igual en ambos. Posteriormente, el emigrante, en su camino hacia el otro conjugante, aparece alargado, generalmente piriforme; en él se distinguen filamentos dispuestos más o menos paralelamente al eje longitudinal (*figura 23*). Cuando este pronúcleo está próximo al estacionario del otro conjugante se encuentra ya en metafase (*figuras 5 y 6*) y en este estado se unen ambos núcleos, formando una metafase muy ancha, que constituye el sincarion (*figuras 5 y 7*). Las metafases de la segunda y tercera divisiones postgámicas difieren notablemente de la anterior, según se muestra en las *figuras 24-25*.

DISCUSION

Como hemos indicado anteriormente, en esta estirpe de *Stylonychia mytilus*, los individuos pueden entrar en conjugación cualquiera que sea el número de sus micronúcleos. Estas observaciones no coinciden con las realizadas por Maupas (8) en esta misma especie; puesto que este autor admite que, aunque los individuos pueden tener hasta ocho micronúcleos, la conjugación raramente se realiza entre individuos con más de dos micronúcleos. Por tanto, para este autor, el estado con dos micronúcleos representa la madurez sexual. Por el contrario, en *Styl. muscorum* (1), aunque también puede variar el número de micronúcleos, nunca se han observado conjugantes con dos. En nuestra estirpe, la madurez sexual parece ser independiente del número de micronúcleos.

El número total de divisiones durante la conjugación coincide con el admitido por otros autores (3 y 5-8). Sin embargo, todos ellos describen tres divisiones pregámicas, y en cambio, en la estirpe estudiada por nosotros hay dos divisiones pregámicas y luego se inicia una tercera que no llega a completarse como tal, puesto que en estado de prometafase se produce el intercambio de pronúcleos, los cuales se encuentran en metafase al unirse con los estacionarios correspondientes, dividiéndose seguidamente el sincarion; por tanto, esta división es realmente la primera postgámica. A continuación se verifican otras dos divisiones postgámicas. La conclusión de que no se completa la tercera división pregámica se basa en las

siguientes observaciones: los productos resultantes de la segunda división pregámica suelen quedar ordenados en dos grupos (de 3-5 productos cada uno, como muestra la *figura 2*); en fases más avanzadas, uno o dos núcleos de cada grupo se agrandan empezando una profase (*figura 3*) y poco después se observa el paso de pronúcleos (*figura 4*), permaneciendo constante el número de productos que había al final de la segunda división pregámica, aunque algo desordenados.

En cuanto a las divisiones postgámicas hemos observado siempre que los dos núcleos resultantes de la división del sincarion se dividen, originando cuatro productos, de los cuales, dos vuelven a dividirse, de modo que al finalizar las divisiones postgámicas hay siempre seis productos.

El hecho de que en nuestras observaciones el esbozo macronuclear y los micronúcleos procedan siempre de determinados productos resultantes de la tercera división, hace suponer que su posición en el citoplasma condiciona su destino ulterior. Un hecho semejante ha sido descrito en *Onychodromus grandis* (8).

Como en otros casos descritos en la conjugación de ciliados, en la estirpe estudiada por nosotros, las dos divisiones pregámicas son de carácter meiótico. Según se muestra en las *figuras 16-18*, durante la prometafase de la primera división pregámica se aprecian claramente los bivalentes con uno o varios quiasmas, constituyendo figuras que se asemejan a las observadas en los estados diplonema y diacinesis, en los cromosomas de los organismos superiores. En la metafase, aunque estos cromosomas se acortan y engruesan, se sigue observando en algunos su naturaleza doble (*figura 19*). En las restantes divisiones micronucleares no se distinguen los cromosomas individualizados, sino que están enmascarados, constituyendo filamentos de grosor variable, lo cual está de acuerdo con lo descrito por Devidé en *Stylonychia sp.* (4).

RESUMEN

En una estirpe de *Stylonychia mytilus*, de la que se han obtenido dos tipos de apareamiento complementarios, se estudia el proceso de conjugación, llegando a las conclusiones siguientes: Los micronúcleos llevan a cabo dos divisiones pregámicas; el intercambio de pronúcleos se realiza en estado de prometafase; la unión de estacionario y emigrante tiene lugar en metafase; el sincarion experimenta tres divisiones postgámicas. El esbo-

zo macronuclear y los dos micronúcleos definitivos se originan siempre a partir de determinados productos resultantes de la tercera división postgámica. Se describe, asimismo, el estado de los cromosomas en las diferentes fases.

SUMMARY

In a strain of *Stylonychia mytilus* from which two complementary mating types were obtained, the process of conjugation is studied, and the following conclusions are reached. The micronuclei undergo two pregamic divisions; the interchange of pronuclei occurs at prometaphase stage; the fusion of stationary and migratory pronuclei takes place at metaphase stage; the synkaryon undergoes three postgamic divisions. The macronuclear anlage and the two effective micronuclei originate always from definite products resulting from the third postgamic division. The stage of the chromosomes in the different steps is also reported.

BIBLIOGRAFIA

1. ALONSO, P., y PÉREZ-SILVA, J. 1965. Conjugación in *Stylonychia muscorum* Kahl. J. Protozool., 12, 253-58.
2. AMMERMANN, D. 1965. Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten *Stylonychia mytilus*. Arch. Protistenk., 108, 109-52.
3. CALKINS, G. N. 1919. *Uroleptus mobilis* Engelm. I. History of the nuclei during division and conjugation. J. Exptl. Zool., 27, 293-357.
4. DEVIDÉ, Z. 1951. Chromosomes in Ciliates (Euciliata and Opalinidae) Bull. Intern. Acad. Yougoslave, 208, 75-114.
5. GREGORY, L. H. 1923. The conjugation of *Oxytricha fallax*. J. Morphol., 37, 555-81.
6. KAY, M. W. 1946. Studies on *Oxytricha bifaria*. III. Conjugation. Trans. Am. Microscop. Soc., 65, 132-48.
7. MANWELL, R. D. 1928. Conjugation, division and encystment in *Pleurotricha lanceolata*. Biol. Bull., 54, 417-63.
8. MAUPAS, E. 1889. Le rajeunissement karyogamique chez les ciliés. Arch. Zool. Exptl. Gén. (Sér. 2), 7, 149-517.

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

METABOLISMO DE AMINOACIDOS EN LEVADURAS

III) Fenómenos de adaptación en la oxidación de aminoácidos por *Debaryomyces hloeckeri*

por

J. L. FERNÁNDEZ-PUENTES y D. RODRÍGUEZ

INTRODUCCION

Es bien conocido que tanto las células animales como las vegetales generan a través del ciclo tricarboxílico materiales para la biosíntesis de los constituyentes celulares, y además, al ligar los sistemas de deshidrogenasas con los de la cadena respiratoria, producen gran cantidad de energía.

Según describe Niederpruem (4), la existencia del ciclo tricarboxílico ha sido comprobada en muchas células animales y vegetales; sin embargo, hasta hace pocos años, se ha puesto en duda su participación en hongos y otros microorganismos.

Sperber (5) señala que los sistemas enzimáticos que participan en el ciclo tricarboxílico no son constitutivos en las células de la levadura *Torulopsis utilis*, sino que su síntesis puede ser inducida en determinadas condiciones.

En el presente trabajo damos cuenta de los fenómenos de adaptación observados en la oxidación de los aminoácidos arginina, alanina, ácido glutámico y ácido aspártico por *Debaryomyces hloeckeri*, y su relación con algunos intermediarios del ciclo tricarboxílico.

MATERIAL Y METODOS

En este trabajo se ha utilizado la estirpe 537a de *Debaryomyces kloeckeri* descrita en una publicación previa (2).

La preparación de células lavadas y la técnica para disminuir la respiración endógena se realizaron de la forma ya descrita en otra publicación (3).

La medida del consumo de oxígeno se efectuó en el respirómetro de Warburg, de acuerdo con las técnicas descritas por Umbreit y colaboradores (8).

En los experimentos de adaptación, las células lavadas se mantenían durante cuatro horas en contacto con el substrato, en agitación a 26 °C.

RESULTADOS

Con el fin de observar el efecto que sobre la oxidación de aminoácidos tenía la incubación previa de las células en presencia de aquéllos se realizó el experimento siguiente:

Células de *Debaryomyces kloeckeri*, cultivadas en agar-Sabouraud-maltosa durante cuarenta y ocho horas, a 25° C, se recogieron en solución salina al 4 %, y, después de lavadas dos veces, se disminuyeron sus reservas celulares siguiendo el tratamiento ya descrito (3). La preincubación de estas células en los distintos aminoácidos se llevó a cabo colocando en matraces de Erlenmeyer de 50 ml de capacidad, 3 ml de una suspensión de levadura (30 mg de peso seco), junto con 22,5 ml de amortiguador de fosfatos 0,1 M a pH 6,5, y 4,5 ml de solución 0,1 M de arginina, ácido glutámico o alanina. Después de cuatro horas de incubación, las células se separaron por centrifugación, se lavaron y resuspendieron en amortiguador de fosfatos. Cantidades de estas suspensiones equivalentes a 10 mg de peso seco se colocaron en las tazas del respirómetro de Warburg frente a 20 μ mol del aminoácido en que fueron preincubadas, y se comparó el consumo de oxígeno de estas células con el de células sin preincubar.

En la *figura 1* se representan los microlitros de oxígeno consumidos por cada una de estas suspensiones, observándose en los tres casos estudiados que la tasa respiratoria es mayor en las células preincubadas.

De acuerdo con la hipótesis de la adaptación sucesiva establecida por Stanier (6), si un microorganismo ha sido adaptado para oxidar un determinado substrato A, simultáneamente ha quedado adaptado para oxidar todos los intermediarios B, C, D, ... Z, que participan en la secuencia

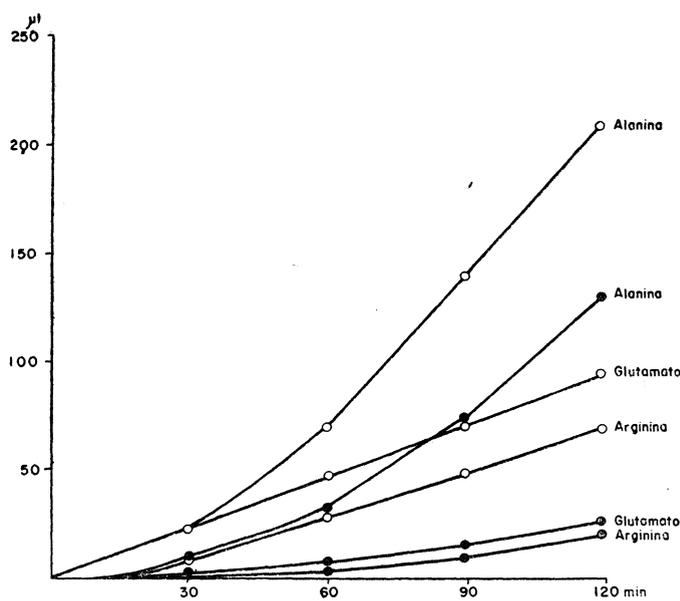


Figura 1. ●, células sin preincubar. ○, células preincubadas

de reacciones enzimáticas que conducen desde A hasta Z. En cambio, si han sido adaptadas al intermediario C, quedan adaptadas a todos los que le siguen, D, E, F, ... Z, pero no necesariamente a los que le preceden, B y A. Por todo lo expuesto, realizamos experimentos en los que se preincubaron las células lavadas de *Debaryomyces klockeri* en asparagina y luego se determinó el consumo de oxígeno al ponerlas frente a ácido glutámico, alanina y arginina. Los resultados de este experimento se exponen en el cuadro 1, en el que se indican los microlitros de oxígeno consumidos en una hora por suspensiones de células lavadas (10 mg de peso seco) sin preincubar y preincubadas en asparagina, y colocadas frente a

20 μmol de l-glutamato sódico, l-arginina y dl-alanina. Los valores numéricos representan la diferencia entre los microlitros de oxígeno observados y los correspondientes sin sustrato externo.

Cuadro 1

Células	l-glutamato sódico	l-arginina	dl-alanina
Sin preincubar	17	8	30
Preincubadas	83	9	47

Este resultado indica que la preincubación en asparagina facilita la oxidación del glutamato y de la alanina, pero no de la arginina.

Teniendo en cuenta que el ácido α -cetoglutarico, que se forma como intermediario dentro del ciclo tricarboxílico, conduce a la síntesis del ácido glutámico, se realizaron experimentos con el fin de averiguar si las células se adaptaban simultáneamente a ambos sustratos. Para ello, siguiendo la técnica usual, se preincubaron en ácido glutámico y luego se determinó el oxígeno consumido al colocar dichas células frente a los ácidos glutámico y α -cetoglutarico. Los resultados de este experimento se exponen en el cuadro 2, en el que se expresan los microlitros de oxígeno consumidos en una hora por suspensiones de células lavadas (10 mg de peso seco) sin preincubar y preincubadas en l-glutamato sódico, frente a 20 μmol de l-glutamato sódico y α -cetoglutarato sódico. Los valores numéricos representan la diferencia entre los microlitros de oxígeno consumidos en presencia y en ausencia de sustrato externo.

Cuadro 2

Células	l-glutamato sódico	α -cetoglutarato sódico
Sin preincubar	14	17
Preincubadas	43	47

Se observa que la adaptación de las células para oxidar el ácido glutámico lleva consigo la adaptación simultánea para el ácido α -cetoglutarico.

En otra serie de experimentos se estudió el efecto que sobre la oxidación del ácido glutámico podían tener la incubación previa de las células en distintos aminoácidos. En el *cuadro 3* se exponen los microlitros de oxígeno consumidos en una hora por suspensiones de células lavadas, sin preincubar y preincubadas en l-arginina, dl-alanina, aspartato sódico o l-glutamato sódico, y colocadas frente a 20 μ mol de esta última sustancia; asimismo se indican los observados en ausencia de sustrato externo.

Cuadro 3

Substrato de preincubación	l-glutamato sódico	Respiración endógena
Arginina	88	47
Asparagina	123	42
Alanina	118	96
Aspartato	88	45
Glutamato	89	44
Testigo sin preincubar	54	40

Según se desprende de estos resultados, la preincubación de las células en otros aminoácidos favorece la oxidación del glutamato, siendo la asparagina el sustrato que mejor se adapta a las células entre los cinco ensayados.

En un trabajo previo (3) dábamos cuenta de la acción inhibidora que sobre la oxidación de aminoácidos ejercían las sustancias de reserva acumuladas en las células de *Debaryomyces kloeckeri*. Como normalmente estas células se cultivan en agar-Sabouraud-maltosa, la cantidad de sustancias de reserva que pueden acumular es tan grande, que son utilizadas por las células lavadas con preferencia al sustrato externo. Este hecho se comprobó preincubando durante cuatro horas células lavadas y libres de la mayor parte de sustancias de reserva, en maltosa (0,45 mmol) en glutamato (0,45 mmol) y en la mezcla de maltosa y glutamato. Cada una de estas suspensiones (10 mg de peso seco), después de lavadas, se pusieron frente a 20 μ mol de glutamato y se midió el oxígeno consumido durante

una hora. Los resultados se exponen en el *cuadro 4*, en el que, además de los microlitros de oxígeno consumidos frente al glutamato, se indican los consumidos sin sustrato externo.

Cuadro 4

Substrato de preincubación	l-glutamato sódico	Respiración endógena
Maltosa	227	198
Maltosa + glutamato	164	136
Glutamato	90	41
Testigo sin preincubar	53	38

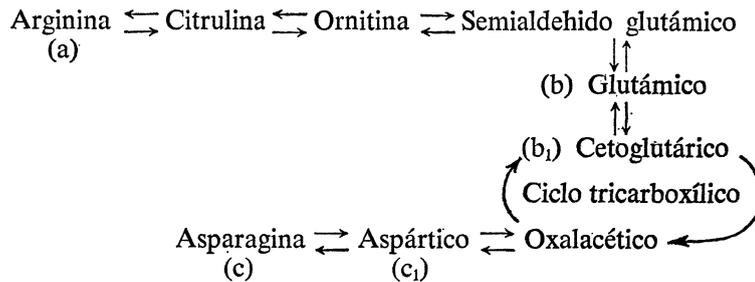
Se observa que la respiración endógena es mucho mayor cuando las células se han preincubado en maltosa, algo inferior en las preincubadas en maltosa + glutamato y mucho menor en las preincubadas en glutamato, siendo, sin embargo, la oxidación del glutamato mucho más pronunciada en estas últimas.

DISCUSION

Sperber (5) observó que las células lavadas de *Torulopsis utilis* no eran capaces de oxidar los ácidos succínico, málico, fumárico y cítrico. En cambio, si el microorganismo se hacía crecer en un medio de cultivo con ácido succínico como fuente de carbono, las células lavadas podían oxidar cualquiera de los cuatro ácidos citados. Sperber explica estos hechos admitiendo que los sistemas enzimáticos del ciclo tricarbóxico no son constituyentes normales de *T. utilis*, sino que puede sintetizarlos en determinadas circunstancias.

Nosotros hemos observado un hecho análogo en *Debaryomyces kloeckeri*, ya que las células preincubadas en asparagina, arginina, ácido aspártico o ácido glutámico y colocadas frente a este último consumen mayor cantidad de oxígeno que las células sin preincubar. El mismo efecto se manifiesta en la oxidación del ácido cetoglutárico con las células preincubadas en ácido glutámico.

Abelson y Vogel (1) admiten que la ruta seguida en la síntesis de aminoácidos por *Torulopsis utilis* es la siguiente:



Teniendo en cuenta la teoría de la adaptación sucesiva de Stanier vemos que la etapa de (a) a (b) existe en *Debaryomyces kloeckeri*, ya que las células preincubadas en arginina quedan adaptadas para oxidar el ácido glutámico. También se produce el paso de (b) a (b₁) por cuanto que las células preincubadas en ácido glutámico y adaptadas a éste quedan adaptadas para oxidar al ácido cetoglutarico; lo mismo ocurre con el paso de (c) y (c₁) a (b), vía ciclo tricarboxílico. Sin embargo, según los resultados del cuadro 1, las células preincubadas en asparagina no quedan adaptadas para oxidar la arginina, lo que indica que en el paso de (b) a (a) falta alguna de las enzimas que intervienen en la síntesis de arginina a partir de ácido glutámico.

RESUMEN

En el presente trabajo se demuestra que las células lavadas de *Debaryomyces kloeckeri* quedan adaptadas para oxidar el ácido glutámico si previamente se incuban en arginina, asparagina, ácido aspártico o ácido glutámico. Las células adaptadas para oxidar el ácido glutámico también lo están para oxidar el ácido α -cetoglutarico.

Se demuestra que los sistemas enzimáticos del ciclo tricarboxílico, así como los que participan en la síntesis de arginina y asparagina a partir del ácido glutámico, no son constitutivos de las células de *Debaryomyces kloeckeri*, y que su síntesis puede ser inducida por incubación prolongada de las células lavadas, en arginina, asparagina, ácido aspártico o ácido glutámico.

SUMMARY

Washed cell suspensions of *Debaryomyces hansenii* become adapted to oxidize glutamic acid and ketoglutaric acid when they are previously incubated in the presence of arginine, asparagine, aspartic acid or glutamic acid.

The enzymatic systems involved in the Krebs tricarboxylic acid cycle and in the synthesis of arginine and asparagine from glutamic acid appear to be no constitutive of the cells of *Debaryomyces hansenii*. Their synthesis can be induced by preincubation of the washed cell suspensions in the presence of arginine, asparagine, aspartic acid or glutamic acid.

BIBLIOGRAFIA

1. ABELSON, P. H., y VOGEL, J. 1955. J. Biol. Chem., 213, 355.
2. FERNÁNDEZ-PUENTES, J. L., y PÉREZ-SILVA, J. 1967. Microbiol. Españ., 20, 37.
3. FERNÁNDEZ-PUENTES, J. L., y RODRÍGUEZ, D. 1968. Microbiol. Españ., 21, 93.
4. NIEDERPRUEM, D. J. En G. C. AINSWORTH y A. SUSSMAN. 1965. The Fungi, vol. I, 269. Academic Press, Nueva York.
5. SPERBER, E. 1944. Nature, 154, 116.
6. STANIER, R. Y. 1947. J. Bacteriol., 54, 339.
7. STRITTMATER, C. F. 1957. J. Gen. Microbiol., 16, 169.
8. UMBREIT, W. W. 1957. Manometric Techniques. Burgess Publishing Co., Minneapolis.

ESTRUCTURAS CRISTALINAS INTRACELULARES EN *SCLEROTINIA FRUCTIGENA* (*)

por

F. D. CALONGE

INTRODUCCION

La presencia de cristales dentro de las células vegetales es un hecho bien frecuente y que se da tanto en células normales, como en otras sometidas a un proceso patológico. Abundantes inclusiones cristalinas han sido observadas en plantas superiores dentro del citoplasma (7), y del núcleo (12), de células sanas y de células infectadas con virus (8).

Inclusiones cristalinas en hongos han sido encontradas en *Aphanomyces euteiches* (9) y en *Neurospora crassa* (4 y 11). A pesar de las pocas citas bibliográficas de este tipo, hoy día existentes, creemos que este fenómeno no ha de ser raro en hongos. El presente trabajo muestra un estudio al microscopio electrónico sobre la morfología y estructura de ciertos cuerpos cristalinos existentes en el citoplasma de *Sclerotinia fructigena*.

MATERIALES Y METODOS

El hongo utilizado para estos estudios ha sido *Sclerotinia fructigena* Aderh. & Ruhl., el cual fue aislado a partir de frutos de manzano naturalmente infectados en una plantación cerca de Bristol (Inglaterra).

(*) Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Botánica de la Universidad de Bristol (Inglaterra), subvencionado por la Fundación "Juan March" y el Agricultural Research Council.

Una vez conseguido el cultivo monospórico, se procedió a inocular peras maduras procedentes de Africa del Sur. Después de siete días de incubación a 25 °C se tomaron trocitos de pera infectada y, posteriormente, fueron sometidos al tratamiento adecuado con vistas a su estudio ultramicroscópico.

Las técnicas de microscopía electrónica seguidas, así como los instrumentos utilizados en este trabajo fueron idénticos a los ya descritos anteriormente (3).

RESULTADOS

La observación ultramicroscópica, a pequeño aumento, de cortes muy finos de la hifa infectante de *Sclerotinia fructigena* (figura 1), mostró todos los componentes típicos que integran la estructura del hongo. Se pudieron ver con toda claridad abundantes núcleos, mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas, etc. Las inclusiones cristalinas fueron menos frecuentes (figura 1, flecha), aunque a veces pudieron ser encontrados varios cristales en el citoplasma de una misma célula (figura 2). En todas las observaciones realizadas se han visto siempre estas formas cristalinas en el citoplasma, a veces en la proximidad del núcleo (figuras 3-4), pero nunca dentro de este último. Cuando se observó con más detenimiento y mayor aumento la ultraestructura de estos cristales, se pudo apreciar que están formados por una substancia granular a manera de punteado, con los bordes perfectamente delimitados y rodeados por una membrana de unos 40 Å de grosor (figura 5).

Las dimensiones de estos cristales oscilaron entre 0,2 μ y 0,5 μ de diámetro y presentaron forma hexagonal generalmente (figuras 1-2 y 6), aunque en algunas ocasiones aparecieron con un contorno poliédrico variable, cuadrangular (figuras 3 y 5), rectangular (figura 4), triangular (figura 7) y pentagonal (figura 8).

Por último, fueron vistos cristales junto al poro septal y a ambos lados del septo (figura 8).

Abreviaturas usadas en las figuras

CR: Cristal	NU: Nucléolo
M: Mitocondria	PS: Poro septal
MC: Membrana citoplásmica	RE: Reticulo endoplásmico
MN: Membrana nuclear.	S: Septo
N: Núcleo	V: Vacuola

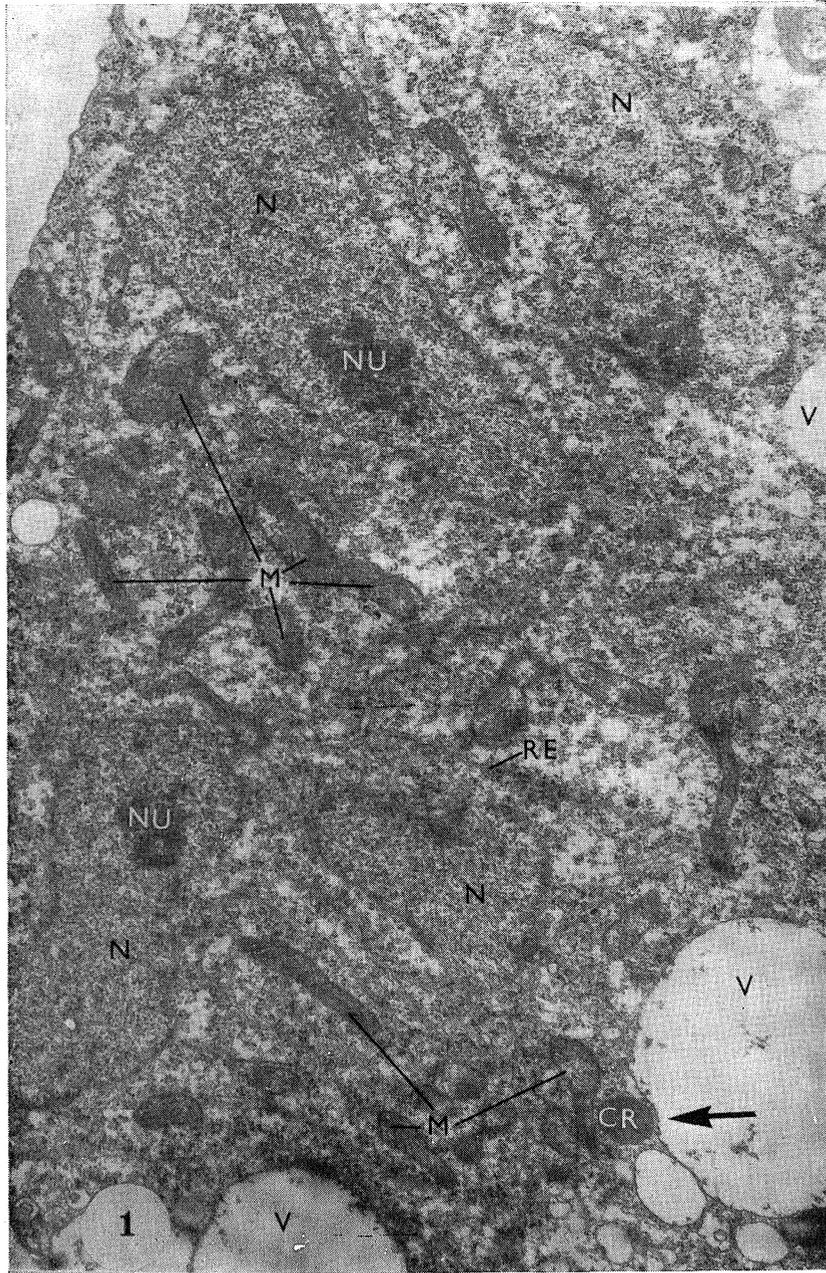


Figura 1. Parte de una célula de *Sclerotinia fructigena* mostrando abundantes núcleos, mitocondrias, retículo endoplásmico y vacuolas. Un cristal puede ser visto junto a una vacuola (flecha). $\times 15.500$

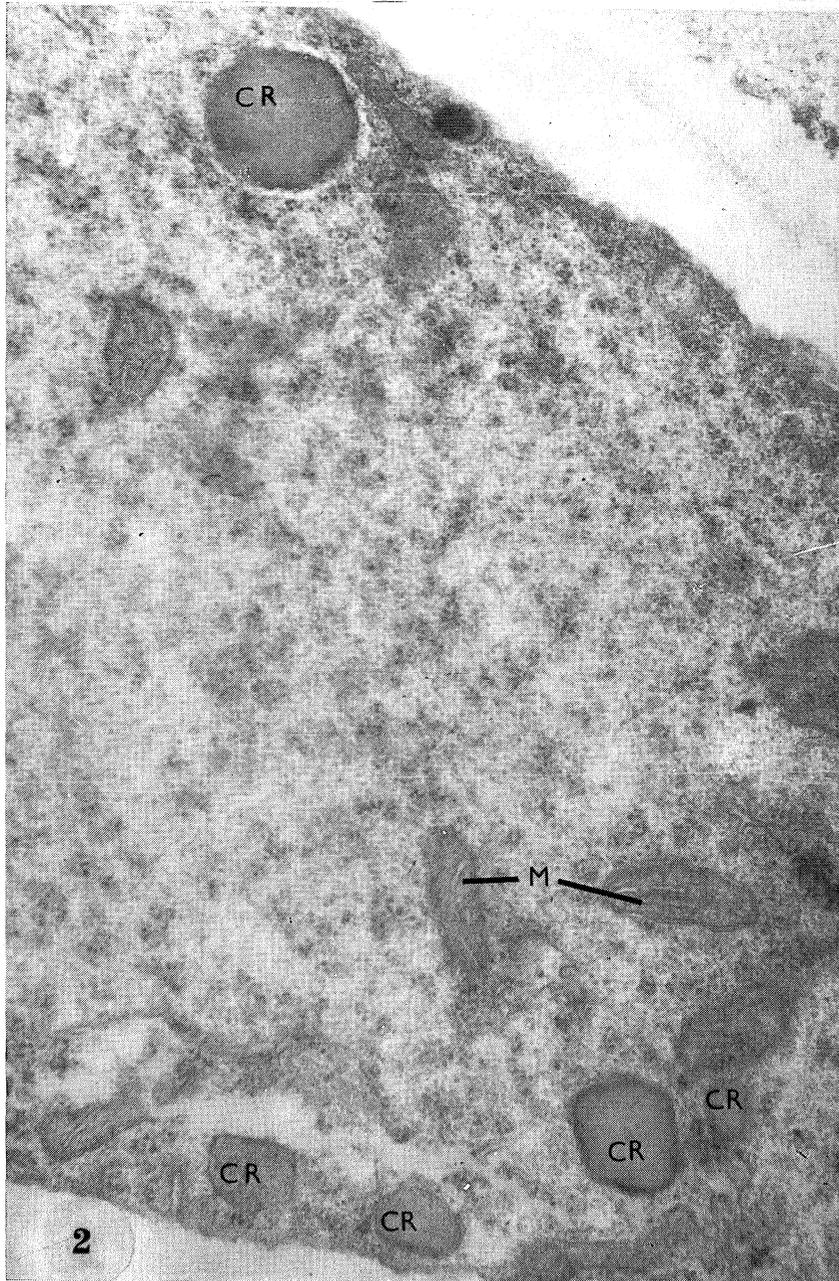
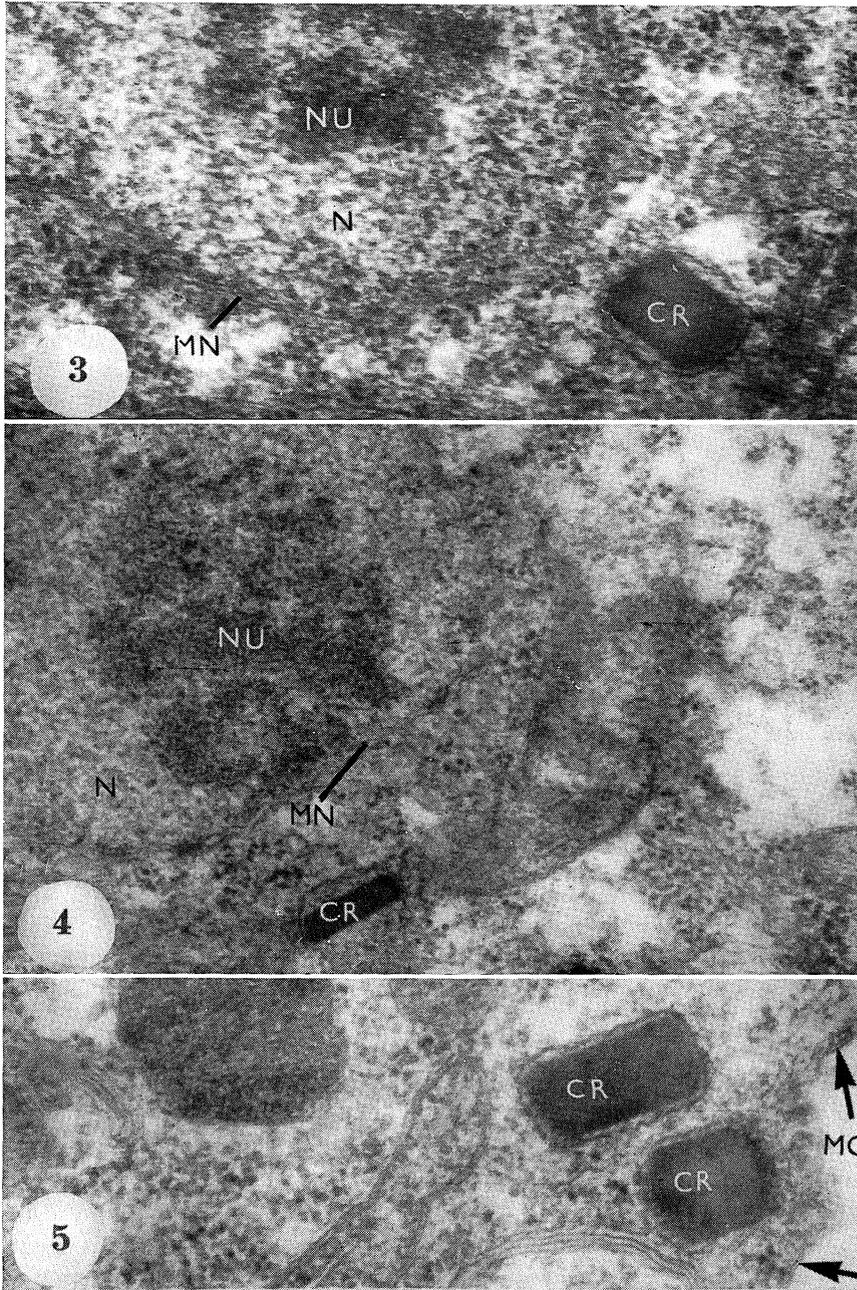


Figura 2. Sección de otra célula de *S. fructigena* con varios cristales en su interior.
× 30.300



Figuras 3-4. Obsérvese la presencia de un cristal en las proximidades del núcleo. 3) $\times 64.000$; 4) $\times 53.200$. Figura 5. Dos cristales rodeados por una membrana muy fina. Compárese esta membrana con la citoplásmica o plasmalema (flechas) $\times 63.200$

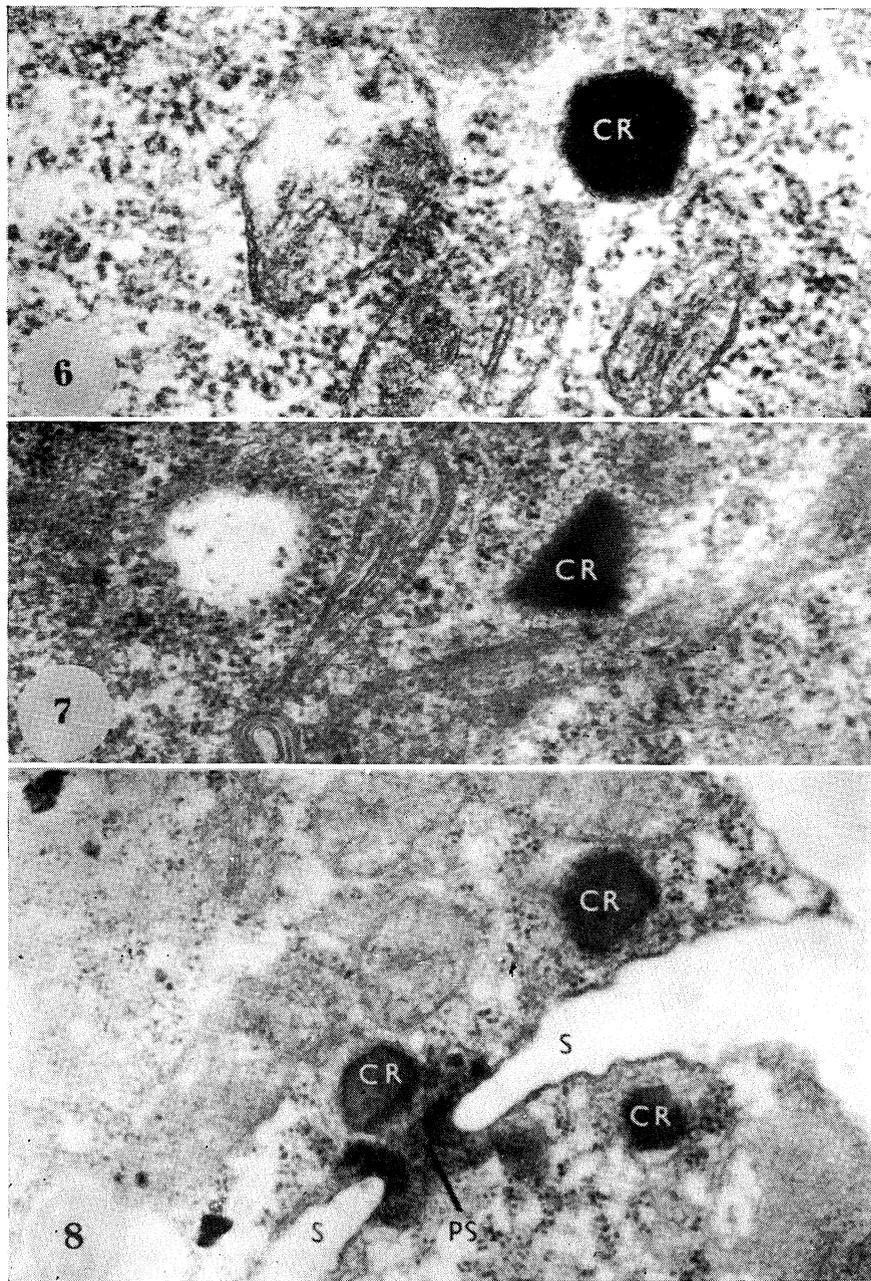


Figura 6. Sección de un cristal mostrando un contorno típicamente hexagonal. $\times 64.500$. Figura 7. Sección de otro cristal presentando un contorno triangular. $\times 43.700$. Figura 8. Sección de la hifa vegetativa al nivel del septo. Nótese la presencia de varios cristales, uno de los cuales aparece junto al poro septal. $\times 41.800$

DISCUSION

Los resultados conseguidos durante esta investigación muestran un ejemplo más de la existencia de inclusiones cristalinas en células vegetativas de un hongo, en este caso *Sclerotinia fructigena*. Es significativo el hecho de que mientras este tipo de cristales se da en la hifa vegetativa tanto ordinaria como intrahifal de *S. fructigena* (2), no obstante, no se han podido detectar indicios de los mismos ni en los macro, ni en los microconidios de ésta y otras especies de *Sclerotinia* (13). Este fenómeno también ha sido observado en el caso de *Neurospora crassa* (11), no habiéndose encontrado aún una explicación satisfactoria de este hecho.

La ultraestructura de estos cuerpos cristalinos en *Sclerotinia fructigena* presenta un gran parentesco con aquellos otros encontrados en *Neurospora crassa* (11). La estructura cristalina, propiamente dicha, en *S. fructigena* aparece rodeada por una membrana-unidad muy fina, de modo similar a lo observado en el caso de los cristales del coleoptilo de *Avena* (10).

Poco se conoce acerca de la composición química y función de las inclusiones cristalinas celulares en los vegetales no afectados por alguna infección. Tsuda y Tatum (11) han realizado un interesante trabajo mediante microscopía normal y electrónica, complementado con estudios químicos y citológicos, en el cual llegan a la conclusión de que los cristales existentes en las células vegetativas de *Neurospora crassa* son de ergosterol, aunque de momento se desconoce la misión de estos cristales dentro de la célula. Estos autores afirman que a pesar de la ausencia de cristales en los conidióforos y conidios de *Neurospora crassa*, sin embargo, la concentración de ergosterol en estos órganos es mayor que en las hifas vegetativas.

Con relación a la función de ciertos cristales intracelulares existentes en las células periféricas de tubérculo de patata en período de reposo, se ha sugerido que están constituidos por proteínas, las cuales actúan como sustancias de reserva (5). Todas estas estructuras cristalinas, además de actuar como materiales de reserva, también pudieran intervenir de una manera mecánica, taponando los poros de los septos (4) en un momento determinado; de forma análoga a como se cree funcionan los cuerpos de Woronin (6). Por otro lado, también se han observado algunos cuerpos de Woronin, en hongos, con estructura cristalina interna (1).

En cuanto a la morfología de los cristales intracelulares en *Sclerotinia fructigena*, parecen presentar forma hexagonal, aunque hay que tener en cuenta la dirección de corte al seccionar, para la interpretación final. Así, pues, si el corte se realiza paralelamente a la cara hexagonal más grande, entonces aparece como un hexágono; si se hace transversalmente aparecerá como un rectángulo, y si el corte es oblicuo, como un triángulo o como un pentágono. Es necesario continuar profundizando más en estos estudios para poder llegar a resolver el problema de la estructura tridimensional y composición química de estos cristales, y de esta forma deducir el papel que los mismos desempeñan dentro de la célula viva.

RESUMEN

En el curso de un estudio general sobre la ultraestructura de *Sclerotinia fructigena*, se observaron cristales intracitoplasmáticos de variada morfología en las hifas vegetativas. Al microscopio electrónico, las secciones de estos cristales mostraron contornos hexagonales, pentagonales, rectangulares y triangulares. Pensamos que todas estas formas proceden de un solo tipo de cristalización, el prisma hexagonal, y que la distinta morfología exhibida en las secciones no es sino una consecuencia de la distinta dirección de corte seguida en cada caso. Se ha podido observar cómo el cristal presenta una estructura granular, a modo de punteado, y todo él aparece rodeado por una membrana-unidad de, aproximadamente, 40 Å de grosor.

Aunque se desconoce la naturaleza de estos cuerpos cristalinos, en este trabajo se discute tanto su posible composición química como su función.

AGRADECIMIENTO

El autor quiere manifestar su más sincera gratitud al Prof. L. E. Hawker y al Departamento de Botánica de la Universidad de Bristol (Inglaterra), por todas las facilidades dadas, que han hecho posible este trabajo. También expresa su más profundo agradecimiento a la Fundación "Juan March" y al Agricultural Research Council, por sus ayudas económicas.

SUMMARY

The present study shows the results of a series of electron microscope observations on the structure and morphology of the crystalline bodies

existent within the cells of the vegetative hyphae in *Sclerotinia fructigena*. In all the observed sections the crystals appeared in the cytoplasm, sometimes at the vicinity of the nucleus but never within the latter. The ultrastructure of the crystalline inclusions showed a granular appearance, regularly ordered, with well delimited faces being the whole crystal surrounded by a single membrane about 40 Å thick. The morphology of the crystalline sections appeared as a hexagon, or as a pentagon, triangle and rectangle according to the direction of sectioning of the crystal, but the general idea was that the crystalline bodies are hexagonal prisms.

The nature of these crystals is unknown, but their possible chemical composition and function are discussed here.

BIBLIOGRAFIA

1. BRACKER, C. E. 1967. Ultrastructure of fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 5, 343-74.
2. CALONGE, F. D. 1968. Origin and development of intrahyphal hyphae in *Sclerotinia fructigena*. *Mycologia*, 60, 932-42.
3. CALONGE, F. D. 1969. The occurrence of glycogen-membrane complexes in fungi. An electron microscope study. *Protoplasma*, 67, 79-85.
4. LOWRY, R. J., y SUSSMAN, A. S. 1966. Intrahyphal hyphae in "clock" mutants of *Neurospora*. *Mycologia*, 58, 541-49.
5. MARINOS, N. G. 1965. Comments on the nature of a crystal-containing body in plant cells. *Protoplasma*, 60, 31-33.
6. REICHLER, R. E., y ALEXANDER, J. V. 1965. Multiperforate septations, Woronin bodies and septal plugs in *Fusarium*. *J. Cell Biol.*, 24, 489-96.
7. RUBIO-HUERTOS, M. 1959. Inclusiones intracelulares producidas por diferentes virus del clavel (*Dianthus caryophyllus*). *Microbiol. Españ.*, 12, 331-38.
8. RUBIO-HUERTOS, M.; CASTRO, S.; MORENO, R., y LÓPEZ-ABELLA, D. 1968. Ultraestructura de células de *Dianthus caryophyllus* infectadas por dos virus al mismo tiempo. *Microbiol. Españ.*, 21, 1-11.
9. SHATLA, M. N.; YANG, C. Y., y MITCHELL, J. E. 1966. Cytological and fine-structure studies of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 56, 923-28.
10. THORNTON, R. M., y THIMANN, K. V. 1964. On a crystal-containing body in cells of the oat coleoptile. *J. Cell Biol.*, 20, 345-50.
11. TSUDA, S., y TATUM, E. L. 1961. Intracellular crystalline ergosterol in *Neurospora*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11, 171-77.
12. WEINTRAUB, M.; RAGETLI, H. W. J., y VETO, M. 1968. Fine structure of nuclear crystals in leaves of two *Dianthus* species. *Am. J. Botany*, 55, 214-20.
13. WILLETS, H. J., y CALONGE, F. D. 1969. Spore development in the brown rot fungi (*Sclerotinia* spp.). *New Phytol.*, 68, 123-31.

PROTOPLASTOS DE HONGOS OOMICETOS

por

A. JIMÉNEZ - MARTÍNEZ y MONIQUE NOVAES - LEDIEU

INTRODUCCION

Giaja (12) descubrió que el jugo digestivo del caracol *Helix pomatia* era capaz de digerir la pared celular de diferentes levaduras y hongos, y basándose en estos resultados Eddy y Williamson (5), trabajando con varias especies de *Saccharomyces* obtuvieron unos cuerpos, sensibles al choque osmótico, que denominaron protoplastos. A partir de este hallazgo han sido numerosos los trabajos sobre obtención de protoplastos de hongos y levaduras, tema recientemente revisado por Villanueva (25).

El término protoplasto designa un protoplasma envuelto en un plasmalema absolutamente desprovisto de pared celular, mientras que el de esferoplasto, según Brenner y colaboradores (4), o "protoplasto", según Emerson y Emerson (6), corresponde a un protoplasma y un plasmalema con restos más o menos importantes de pared celular. En hongos filamentosos parece que puedan existir ambos tipos (25), mientras que en levaduras se trata de esferoplastos, como ha sido demostrado recientemente por Streiblová (24) mediante estudios de criocorrosión, y por García Mendoza y colaboradores (9), estudiando el comportamiento inmunológico de las membranas de los esferoplastos de *Candida utilis*. Otros resultados obtenidos por Ottolenghi (20) están de acuerdo con estos datos.

Las enzimas líticas que actúan sobre paredes celulares de hongos filamentosos son muy abundantes, destacando las obtenidas a partir de actinomicetos (10-11, 13 y 23), así como de bacterias (8, 16 y 21).

Dado que la mayor parte de los hongos filamentosos estudiados hasta hoy, desde el punto de vista de la obtención de protoplastos, tienen un fuerte porcentaje de quitina y de β -(1-3)glucano en sus paredes celulares, es preciso, si se quiere obtener una lisis efectiva de éstas, hacer actuar a la vez sobre las células vivas una β -(1-3)glucanasa y una quitinasa. A esta conclusión llegaron Furuya e Ikeda (8) cuando encontraron que la adición de quitinasas a la β -(1-3)glucanasa del *Bacillus circulans* exaltaba la lisis en el *Aspergillus flavus*.

En estos últimos años se han realizado estudios bastante completos sobre la composición química de la pared celular de los hongos oomicetos, conocidos desde hace bastante tiempo como celulósicos. Los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigadores (1-2, 7 y 18-19) han permitido comprobar la existencia de un glucano con enlaces β -(1-4) de tipo celulósico y de un complejo glucano-proteína, con mayoría de enlaces glucosídicos en β -(1-3) y β -(1-6).

Con objeto de tener un conocimiento más profundo de los diferentes glucanos de la pared celular de los oomicetos se ha realizado un estudio para determinar cuáles son las enzimas glucanásicas activas en la lisis de las paredes celulares y capaces de formar protoplastos, en tres especies distintas de aquellos hongos. Anteriormente, Nicolás (17), haciendo actuar el complejo celulolítico del *Trichoderma lignorum* sobre el micelio vivo de *Pythium butleri* y *Phytophthora heveae*, obtuvo una lisis parcial de sus paredes celulares con la consiguiente liberación de algunas vacuolas y protoplastos (o esferoplastos) vacuolizados. De otra parte, Bartnicki-García y Lippman (3) consiguieron abundantes protoplastos y "protoplastos" de dos especies de *Phytophthora* utilizando las celulastas de un *Streptomyces*, y más recientemente Eveleigh y colaboradores (7) han realizado unos estudios sobre las enzimas responsables de la lisis de una especie de *Pythium* y de la formación de "protoplastos".

MATERIAL Y METODOS

Organismos y medios de cultivo

Los hongos empleados para la obtención de protoplastos, *Phytophthora heveae*, *Pythium butleri* y *Saprolegnia litoralis*, procedían de la colección del "Commonwealth Mycological Institute", Kew (Inglaterra). Los medios y condiciones de cultivo han sido descritos previamente (14 y 19).

Sistemas líticos

Como fuentes de celulasas crudas (factor C₁ o celulasa propiamente dicha, y CMCase o carboximetilcelulasa), se han empleado los caldos de cultivo del Basidiomiceto sp. QM 806 y del *Streptomyces* sp. QM 814. Las condiciones de obtención de los respectivos concentrados enzimáticos y las actividades enzimáticas presentes en los mismos han sido publicadas previamente (15).

Un caldo enzimático muy rico en β -(1-3)glucanasa se obtuvo cultivando el Basidiomiceto sp. QM 806 en las condiciones descritas por Reese y Mandels (22) empleando almidón como fuente de carbono. Después de doce-quince días de crecimiento, se filtraron los caldos, que se conservaban a -15°C .

Para obtener una β -(1-6)glucanasa se cultivó el *Penicillium brefeldianum* QM 1872 en el mismo medio y condiciones utilizados con el basidiomiceto para obtener una β -(1-3)glucanasa, sustituyendo el almidón por glicerol al 1 %. Los cultivos se mantuvieron durante quince-dieciocho días en incubación.

Valoración de las β -glucanasas

Los métodos de valoración de las β -glucanasas y las unidades adoptadas para cada una de ellas se han descrito anteriormente (15).

Condiciones para la obtención de protoplastos

El micelio de los diferentes hongos se ponía en tubos de hemólisis con 0,5 ml del sistema lítico, siendo el tampón citrato sódico —ácido cítrico 0,05 M, a pH 6. Como estabilizador osmótico se empleó SO₄Mg en concentraciones comprendidas entre 0,25 y 0,6 M. La incubación fue estática o con agitación a 27 °C. Con el objeto de que los resultados fueran comparativos, la concentración de las dos celulasas empleadas fue la misma: 125 U, expresadas en actividad CMCase en 0,5 ml de mezcla de incubación. En el microscopio de contraste de fases se observa paralelamente la desintegración del micelio y la aparición de protoplastos.

RESULTADOS

a) *Acción de los complejos celulolíticos*

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos están resumidos en el *cuadro 1*. Varias muestras se observaron al microscopio durante un período de una-veinticuatro horas y únicamente con el complejo enzimático del basidiomiceto (β -(1-3) y β -(1-4)glucanasas) se pudieron detectar protoplastos. Se debe hacer notar que los resultados cuantitativos variaron notablemente de un experimento a otro, aunque siempre hubo desintegración de micelio.

Las preparaciones se observaron en un microscopio Zeiss de contraste de fases, equipado con un objetivo 45 \times y un ocular 10 \times .

Cuadro 1. Protoplastos obtenidos a las seis horas de incubación ()*

Organismo productor del sistema lítico	Organismos ensayados		
	<i>Phy. heveae</i>	<i>S. litoralis</i>	<i>Py. butleri</i>
Basidiomiceto sp. QM 806	+++	++++	+
<i>Streptomyces</i> sp. QM 814	—	—	—

(*) Las cruces indican el porcentaje medio de protoplastos contados por campo. +++++, 3 protoplastos; +++, 2-3 protoplastos; +, 0,2-0,5 protoplastos.

El proceso lítico de la pared celular de los tres oomicetos se produce de un modo muy semejante con ambas preparaciones enzimáticas, apreciándose a la media hora de incubación la rotura del micelio, preferentemente por los puntos de ramificación de las hifas. Al mismo tiempo el protoplasma se hace sumamente granuloso y aparece con abundantes corpúsculos esféricos, de color amarillo, que teñidos con Sudán III toman el color característico de los gránulos de grasa. Es de destacar el elevado contenido en corpúsculos de esta naturaleza en hongos oomicetos, como se ha demostrado también en un estudio al microscopio electrónico en el caso de *Pythium butleri* y *Phytophthora heveae* (14).

En el caso de *Saprolegnia litoralis*, cuyo protoplasma está sumamente vacuolizado, se obtuvieron un gran número de vacuolas junto con protoplastos muy vacuolizados.

b) Acción de β -(1-3) y β -(1-6)glucanasas

Como se ha dicho previamente, en la pared celular de los tres hongos oomicetos existe un glucano no celulósico que corresponde a más del 50 % del peso seco de la pared celular (14 y 19). Este glucano consta de enlaces glucosídicos en β -(1-3) y β -(1-6), con una baja proporción de enlaces en β -(1-4), incluyendo en su estructura macromolecular la mayor parte de la proteína de la pared celular, constituyendo un complejo glucano-proteína (18-19). Con el fin de investigar la función de este glucano no celulósico en el mantenimiento de la estructura química de la pared celular *in vivo*, se hicieron diversas incubaciones con dos complejos glucanásicos que presentaban muy baja actividad celulásica. En el cuadro 2 están expresadas las actividades enzimáticas presentes en los caldos crudos. Se ve cómo en el caso del basidiomiceto, prácticamente la única enzima presente es una β -(1-3)glucanasa. Por el contrario, cuando se trata del preparado enzimático del *Penicillium brefeldianum*, existe una alta proporción de β -(1-3)glucanasa, acompañada de una menor proporción de β -(1-6)glucanasa.

Cuadro 2. Actividades presentes en los medios de cultivo

Organismo productor del sistema lítico	Unidades de actividad enzimática		
	CMCasa	β (1-3) glucanasa	β (1-6) glucanasa
Basidiomiceto sp. QM 806 (*)	0,12	120,0	0,01
<i>Pen. brefeldianum</i> QM 1.872	0,20	25,0	6,60

(*) El basidiomiceto se cultivó empleando almidón como fuente de carbono (véase Material y Métodos).

Para concentrar los caldos enzimáticos, el complejo del basidiomiceto se precipitó con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 0,8 de saturación y se mantuvo a 4 °C durante cinco días. El precipitado resultante se recogió por centrifugación a 12.700 g durante veinte minutos, se disolvió en agua y se dializó frente a agua del grifo. Todas las actividades presentes en el medio original se recuperaron cuantitativamente en el precipitado con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (cuadro 2).

Por otra parte, el caldo enzimático del *Penicillium brefeldianum* se concentró en un rotovapor unas 40 veces (en volumen) y posteriormente se dializó frente a agua del grifo. El resultado del análisis de las actividades enzimáticas, tras esta última operación, está expresado en el cuadro 3, donde se puede observar que mientras que la actividad β -(1-6)glucanásica no ha experimentado prácticamente pérdida, la correspondiente a las otras dos enzimas se ha reducido a bastante más de la mitad.

Cuadro 3. Actividades presentes en los concentrados enzimáticos

Organismo productor del sistema lítico	Unidades de actividad enzimática		
	CMCasa	β (1-3) glucanasa	β (1-6) glucanasa
Basidiomiceto sp. QM 806 (*)	1,2	1.180	0,12
<i>Pen. brefeldianum</i> QM 1.872	2,5	416	248

(*) El basidiomiceto se cultivó empleando almidón como fuente de carbono (véase Material y Métodos).

Se estudió también la acción de estos dos concentrados enzimáticos sobre el micelio vivo de los tres oomicetos. Las condiciones de incubación fueron las mismas que aquellas empleadas para estudiar la acción de las celulasas, variando únicamente el tipo de enzimas. Cuando se trata del concentrado enzimático del basidiomiceto se empleó un volumen del preparado correspondiente a 125 U de β -(1-3)glucanasa. En el caso del concentrado enzimático del *Penicillium brefeldianum*, además de 125 U de β -(1-6)glucanasa estaban presentes unas 210 U de β -(1-3)glucanasa.

Después de veinticuatro horas de incubación no se observó ni desintegración del micelio, ni, por otra parte, salida de protoplastos, en el microscopio de contraste de fases. Igualmente, no se encontró ninguna alteración en la pared celular, tan sólo la aparición de un protoplasma sumamente granuloso, como en el caso de las incubaciones con celulasas.

El conjunto de los resultados obtenidos parece indicar que el componente celulósico debe envolver de alguna forma al complejo glucano-proteína, que posee enlaces glucosídicos en β -(1-3) y β -(1-6), impidiendo la acción de las glucanasas específicas correspondientes. La celulosa tam-

bién podría formar la capa externa de la pared celular de los oomicetos y el complejo glucano-proteína encontrarse más al interior formando una segunda capa, por lo que las enzimas β -(1-3) y β -(1-6)glucanásicas no alcanzarían este nivel para ejercer su acción. Apuntando en este sentido están los resultados conseguidos por microscopía electrónica de cortes finos de las hifas de *Pythium butleri* y *Phytophthora heveae*, en los cuales se aprecian, completamente diferenciadas, dos capas en la pared celular (14).

DISCUSION

Se ha estudiado la acción de diversos preparados glucanásicos sobre el micelio vivo de tres hongos oomicetos. Estudios anteriores habían demostrado que la pared celular de los mismos contiene celulosa y un complejo glucano-proteína con enlaces glucosídicos en β -(1-3) y β -(1-6), sin que se sepa exactamente qué tipo de ligazón mantiene a esos componentes formando la unidad total de esta pared (14 y 18-19).

En el presente trabajo se describe la preparación de protoplastos de los tres oomicetos con el complejo celulásico del basidiomiceto. Los resultados más positivos se han obtenido trabajando con *Pythium butleri*, mientras que la obtención de aquellos ha sido difícil con *Saprolegnia litoralis*. En general, los protoplastos comenzaban a aparecer a las dos horas de incubación; su número seguía progresando hasta las seis horas y se estabilizaba para no aumentar incluso después de veinticuatro horas de tratamiento, aun cuando el micelio ya estuviese completamente digerido. Por el contrario, con el complejo celulolítico del *Streptomyces*, sólo se consiguió una desintegración del micelio y una lisis parcial de la pared celular. Nunca se liberaron protoplastos porque permanecía una fina película (restos de pared) recubriendo las hifas que impedía la salida de los mismos. Estos resultados pueden indicar que la β -(1-3)glucanasa, presente en gran proporción en el crudo celulásico del basidiomiceto (15), actúa sinérgicamente con las celulasas del mismo (factor C₁ y carboximetilcelulasa) produciendo una lisis más efectiva de las paredes celulares de los oomicetos. Por el contrario, en el concentrado celulolítico del *Streptomyces* existe una escasa proporción de β -(1-3)glucanasa, con lo cual sería difícil una lisis suficiente para permitir la salida de los protoplastos.

Por otra parte, dado que las enzimas β -(1-3) y β -(1-6)glucanásicas no actúan en absoluto (al menos en lo que se refiere a una acción obser-

vable al microscopio de contraste de fases) sobre las paredes celulares, se puede pensar con bastante fundamento que la celulosa está recubriendo al complejo glucano-proteína, por lo que este último forma la capa interna y se encuentra inaccesible al ataque. Esto parece estar de acuerdo con los resultados obtenidos estudiando cortes finos de pared en el microscopio electrónico, habiéndose podido distinguir claramente dos capas.

Finalmente y atendiendo al diferente modo de salida de los protoplastos de la hifa, bien los que salen de un poro de la pared celular o aquellos que se obtienen tras la digestión de una región de la pared, hinchamiento de la hifa y posterior liberación de cuerpos esféricos, podría pensarse, como vimos anteriormente, en la existencia de una mezcla de protoplastos, totalmente desprovistos de restos de pared, y esferoplastos, todos ellos sensibles al choque osmótico. Posteriores estudios químicos e inmunológicos de la membrana de los protoplastos obtenidos en el presente trabajo, podrían aclarar la exacta naturaleza de los mismos.

AGRADECIMIENTO

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

RESUMEN

Se ha estudiado la acción de los caldos celulolíticos del Basidiomiceto sp. QM 806 y del *Streptomyces* sp. QM 814, sobre el micelio vivo de tres hongos oomicetos. Se ha conseguido la obtención de protoplastos y esferoplastos de estos tres hongos con el preparado enzimático del basidiomiceto (que posee a la vez actividad β -(1-4) y β -(1-3)glucanásica), mientras que con el preparado del *Streptomyces*, sólo se logró una lisis parcial de las paredes celulares. El porcentaje total de protoplastos obtenidos fue siempre relativamente bajo, con el orden siguiente: *Pythium butleri* > *Phytophthora heveae* > *Saprolegnia litoralis*. La presencia de celulasas es imprescindible para producir lisis, ya que las β -(1-3) y β -(1-6) glucanasas por sí solas no tienen efecto alguno. Se infiere que la celulasa debe enmascarar de algún modo el complejo glucano-proteína con enlaces glucosídicos en β -(1-3) y β -(1-6), presente en la pared celular de los oomicetos.

ABSTRACT

This paper describes the action of the cellulolytic preparations from Basidiomycete sp. QM 806 and *Streptomyces* sp. QM 814 on living mycelium of three Oomycetes. Protoplasts have been successfully obtained by means of the Basidiomycete enzyme, which also contains a β -(1-3)glucanase, whereas with the *Streptomyces* enzyme, only a partial cell wall digestion has been observed.

Protoplasts can be obtained from *Pythium butleri*, *Phytophthora heveae*, and *Saprolegnia litoralis* in this decreasing order of susceptibility. Cellulase activity is necessary to obtain lysis, but β -(1-3) and β -(1-6)glucanases by themselves do not produce apparent cell wall digestion. It can be concluded that the cellulose must cover in some way the glucan-protein complex, which possesses β -(1-3) and β -(1-6) linkages in the Oomycetes cell walls.

BIBLIOGRAFIA

1. ARONSON, J. M.; COOPER, B. A., y FULLER, M. S. 1967. Science, 155, 332.
2. BARTNICKI-GARCÍA, S. 1966. J. Gen. Microbiol., 42, 57.
3. BARTNICKI-GARCÍA, S., y LIPPMANN, E. 1966. J. Gen. Microbiol., 42, 411.
4. BRENNER, S.; DARK, F. A.; GERHARDT, P.; JEYNES, M. H.; KANDLER, O.; KELLENBERGER, E.; KLIENEBERGER-NOBEL, E.; MCQUILLEN, K.; RUBIO-HUERTOS, M.; SALTON, M. R. J.; STRANGE, R. E.; TORNESIK, J., y WEIBULL, C. 1958. Nature, 181, 1713.
5. EDDY, A. A., y WILLIAMSON, D. H. 1957. Nature, 179, 1252.
6. EMERSON, S., y EMERSON, M. R. 1958. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 44, 668.
7. EVELEIGH, D. E.; SIETSMA, J. H., y HASKINS, R. H. 1968. J. Gen. Microbiol., 52, 89.
8. FURUYA, A., e IKEDA, Y. 1960. J. Gen. Appl. Microbiol., 6, 40.
9. GARCÍA-MENDOZA, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. D.; URUBURU, F., y VILLANUEVA, J. R. 1968. J. Bacteriol., 95, 2393.
10. GARCÍA-MENDOZA, C., y VILLANUEVA, J. R. 1962. Nature, 195, 1326.
11. GASCÓN, S., y VILLANUEVA, J. R. 1963. Can. J. Microbiol., 9, 651.
12. GIAJA, J. 1922. Compt. Rend. Soc. Biol., 86, 708.
13. HORIKOSHI, K., e IDA, S. 1959. Nature, 183, 186.
14. JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, A. 1967. Estudio de la composición química de la pared celular de los Oomicetos. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid.

15. JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, A., y NOVAES-LEDIEU, M. 1969. *Microbiol. Españ.*, 22, 63.
16. MITCHELL, R., y ALEXANDER, M. 1963. *Can. J. Microbiol.*, 9, 169.
17. NICOLÁS, G. 1965. Algunos aspectos fisiológicos de hongos hiperparásitos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid.
18. NOVAES-LEDIEU, M., y JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, A. 1968. *J. Gen. Microbiol.*, 54, 407.
19. NOVAES-LEDIEU, M.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, A., y VILLANUEVA, J. R. 1967. *J. Gen. Microbiol.*, 47, 237.
20. OTTOLENGHI, P. 1966. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 35, 363.
21. PHAFF, H. J. 1963. *Ann. Rev. Microbiol.*, 17, 15.
22. REESE, E. T., y MANDELS, M. 1959. *Can. J. Microbiol.*, 5, 173.
23. RODRÍGUEZ-AGUIRRE, M. J.; GARCÍA-ACHA, I., y VILLANUEVA, J. R. 1964. *Antonie van Leeuwenhoek*, 30, 33.
24. STREIBLOVÁ, E. 1968. *J. Bacteriol.*, 95, 700.
25. VILLANUEVA, J. R. 1966. Protoplasts of Fungi. En G. C. AINSWORTH y A. S. SUSSMAN. *The Fungi*, vol. 2, 3. Academic Press, Nueva York.

TECNICA ESTANDARDIZADA PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL AGENTE ETIOLOGICO DE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO

por

P. ROMERO y V. CALLAO

INTRODUCCION

El *Pseudomonas savastanoi* se encuentra en los tumores del olivo atacado de tuberculosis. Desde los trabajos de Smith en 1908 (12) se han utilizado diferentes técnicas para su aislamiento e identificación. Hemos estudiado experimentalmente los métodos empleados hasta el momento y obtenido resultados que nos permiten establecer una técnica estandarizable para realizar estos propósitos, de acuerdo con las características bioquímicas y antigénicas del germen.

MATERIAL Y METODOS

Se han recogido 136 muestras de tumores de olivo (*cuadro 1*) en diferentes localidades de las provincias de Granada, Jaén, Sevilla, Córdoba, Cádiz, Almería, Huelva, Alicante, Valencia, Albacete, Badajoz y Ciudad Real, aunque la mayoría proceden de las cinco primeras enunciadas.

Las lesiones del olivo que hemos seleccionado se encuentran en los primeros estadios de su formación; poseen aspecto jugoso, superficie lisa y entera, color castaño, ya que consideramos, y siguiendo el criterio de Smith y Erwin (13), que en ellos se aislaría con mayor facilidad y positividad el germen causal de la enfermedad.

Cuadro 1. Número de muestras por provincia de las que se ha aislado Pseudomonas savastanoi ()*

Granada	39
Jaén	20
Córdoba	8
Málaga	7
Sevilla	6
Valencia	4
Cádiz	2
Badajoz	2
Huelva	1
Albacete	1
Almería	0
Ciudad Real	0
Alicante	0
Total	90

(*) Se han catalogado sólo 119 muestras de las 136 recogidas.

a) Aislamiento

Hemos procedido a aislar el germen a partir de los tumores de olivo:

1) Desinfección de la superficie, mediante una solución de clorohipoclorito cálcico (polvos de gas) al 10 %, p/v, durante treinta minutos (8).

2) Eliminación del desinfectante, por lavado con solución salina estéril (9 ‰), tres a cuatro veces, a intervalos de cinco, diez, quince y veinte minutos.

Si los tumores no poseen un aspecto fresco, los tiempos de lavado se prolongan hasta dos horas. Así logramos reblandecerlos al máximo.

3) Pulpación, en un mortero que contiene arena de cuarzo.

4) Siembra. Se realiza por diseminación en una placa de Petri, que contiene alguno de los medios indicados para el aislamiento [agar-glicerina 2 ‰, agar común, agar-judía (16)], aunque después de las primeras experiencias siempre hemos utilizado el agar-judía verde (judías verdes grado infantil, 128 g; agar-agar, 20 g; agua, 1.000 ml).

5) Incubación, en una estufa, a 25 °C ($\pm 0,5$) durante cuatro días, tiempo necesario para que nuestras colonias alcancen un desarrollo apropiado para poder distinguirlas de otras parecidas, que también aparecen en la placa.

6) Obtención de masa microbiana mediante resiembra en tubos que contienen agar-judía, inclinado. Se puede prescindir de esta epata.

Pruebas realizadas:

Determinación de la movilidad.

Tinción por el método de Gram.

Tinción de flagelos. Se han obtenido mejores resultados con la técnica de Casares Gil.

Los gérmenes que respondieron a bacilos gram-negativos móviles por flagelos polares (*figura 1*) se sometieron a las pruebas bioquímicas y serológicas que más adelante exponemos.

b) Identificación

Reacciones bioquímicas

Con las 90 estirpes de *Pseudomonas savastanoi* aisladas por nosotros y con las estirpes *Ps. savastanoi* "M" y *Ps. savastanoi* "F" (*) se han realizado las siguientes investigaciones bioquímicas: fermentación de los azúcares: glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa; de los polialcoholes manitol y salicinol [según técnicas de Ruiz-Falcó (11)]; esculina (11), hidrólisis del almidón (11), formación de indol (11), reacción del rojo de metilo (11), reacción de Voges-Proskauer, crecimiento en un medio con citrato como única fuente de carbono, actuación sobre el ácido cítrico, malónico, benzoico (7), formación de catalasa; reducción de los nitratos a nitritos (11), crecimiento en el medio de leche (11), leche tornasolada (11), leche artificial (1), formación de ácido sulfhídrico (15), formación de ureasa (15), actuación sobre la alanina (4), serina (4), metionina (4), prueba óxido-fermentativa para la glucosa empleando el medio de Hugh y Leifson (6), actuación sobre el lactato cálcico (16), formación de gelatinasa (11), actuación sobre el gluconato potásico (3), crecimiento en patata (11), crecimiento en un medio mineral que lleva como fuente de carbono parafina líquida (14) y formación de gas de los nitratos (11).

(*) Estirpe *Pseudomonas savastanoi* "M" cedida por la Dra. R. Beltrá y procedente de la Colección Nacional de Agentes Fitopatógenos, de la Escuela de Botánica, de la Universidad de Cambridge. Estirpe OS-6071, denominada *Ps. savastanoi* "F", enviada por el Centro Nacional de Investigaciones Agronómicas, Estación Central de Patología Vegetal, París.

Métodos serológicos

Con todas las estirpes aisladas hemos procedido a su identificación mediante la reacción de aglutinación en sus modalidades macro y microscópicas.

La obtención del suero anti-*Pseudomonas savastanoi* "M" se realizó según la pauta utilizada en la Escuela de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y que ya fue descrita por Henares (5). Las concentraciones de las suspensiones inoculantes que nosotros hemos empleado son las siguientes:

1.ª Semana. Concentración de la suspensión inoculante: 5.000×10^6 gérmenes/cm³.

	<i>Antígeno</i> <i>cm³</i>

Día primero	0,5
Día segundo	1,0
Día tercero	1,5

2.ª Semana. Concentración de la suspensión inoculante: 20.000×10^6 gérmenes/cm³.

	<i>Antígeno</i> <i>cm³</i>

Día primero	0,5
Día segundo	1,0
Día tercero	1,5

3.ª Semana. Concentración de la suspensión inoculante: 30.000×10^6 gérmenes/cm³.

	<i>Antígeno</i> <i>cm³</i>

Día primero	1,00
Día segundo	1,5
Día tercero	2,0

La valoración del suero se realizó por aglutinación al límite según el método de Kolle (9), resultando un título de 1/100.000.



Figura 1. Ps. savastanoi teñido por el método de Gram ($\times 1.250$)

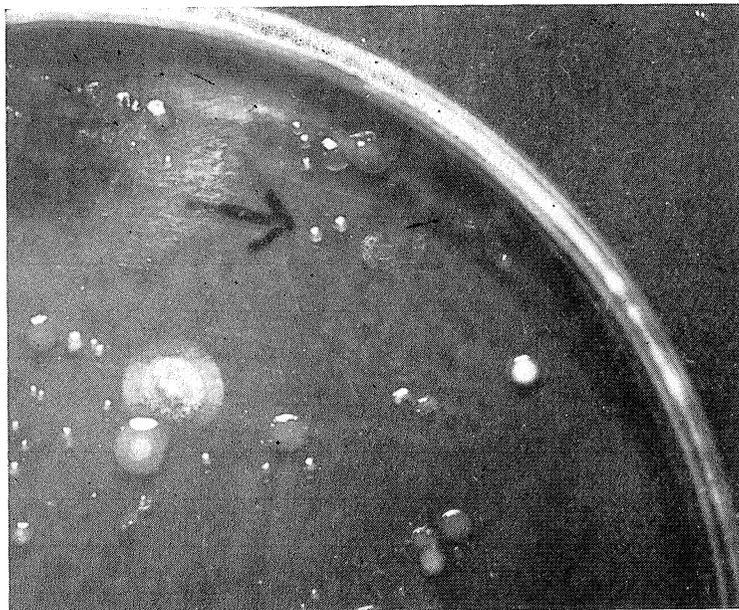


Figura 2. Aspecto de las colonias de Ps. savastanoi (indicadas por una flecha) en el medio agar-judía verde, a los cuatro días del aislamiento ($\times 2$).

RESULTADOS, DISCUSION Y COMENTARIOS

Se han investigado 136 muestras distintas de tumores de olivos que padecían tuberculosis, aunque sólo hemos estudiado 119, de las que se han aislado 90 estirpes de *Pseudomonas savastanoi*. Los casos negativos correspondieron a tumores viejos que presentan un aspecto totalmente lignificado (herrumbroso) y superficie totalmente resquebrajada.

Para el aislamiento del germen se han ensayado los medios, de agar-glicerina al 2 %, agar-glicerina-sales minerales y agar-judía verde, resultando elegido este último.

Las colonias que se observaron eran lisas, brillantes, ligeramente opacas, no confluentes, de borde entero, convexas, algo acuminadas, fácilmente suspendibles y de tamaño relativamente pequeño (*figura 2*).

Las 90 estirpes de *Pseudomonas savastanoi* aisladas se han sometido a 34 pruebas bioquímicas diferentes cuyos resultados se exponen a continuación (10) y se resumen en el *cuadro 2*.

El *Pseudomonas savastanoi* no acidifica el medio glucosado (11), aunque en nuestras experiencias se ha visto que después de veintiún días de incubación a 25 °C, el 11 % de las estirpes forman ácidos. En el medio de Hugh y Leifson (6), a las noventa y seis horas de incubación, el 100 % de las estirpes forman ácidos; la galactosa (6) es oxidada con formación de ácidos por el 100 % de las estirpes, siendo negativa dicha formación de ácidos (11) por vía fermentativa, aún después de veintiún días de incubación.

Ninguna de las estirpes ensayadas produce ácidos a partir de la sacarosa por vía fermentativa, aunque el 87,78 % de las mismas los producen por vía oxidativa (6). Sobre la lactosa no existe formación de ácidos en ningún caso.

En el medio líquido con manita (11) se observa formación de ácidos después de veintiún días de incubación en 8 % de las estirpes, sin que en el resto de las mismas se observe este fenómeno.

Sobre la maltosa y salicina (6 y 11) no producen ácidos ninguna de las estirpes ensayadas; excepcionalmente sobre ambas (4 % de las estirpes) forman ácidos (6) en anaerobiosis (tubo con parafina en la prueba de Hugh y Leifson), a los veintiún días de incubación.

La esculina (11) es descompuesta por el 100 % de los gérmenes, dato que consideramos de sumo interés en la identificación del *Pseudomonas savastanoi*.

Todas las estirpes han crecido en el medio de Koser, en cuarenta y ocho horas de incubación.

Los ácidos orgánicos (7) cítrico y malónico son utilizados por el 100 % de las estirpes, a consecuencia de lo cual resulta una alcalinización del medio, aunque tardíamente (una-dos semanas). También se produce una alcalinización (4) en un medio con alanina o serina, al término de una-dos semanas.

Cuadro 2. Resumen de las características bioquímicas del Pseudomonas savastanoi

Glucosa	Acidos (vía oxidativa)
Galactosa	
Sacarosa	Generalmente ácidos (vía oxidativa), excepcionalmente no los produce
Lactosa	No produce ácidos
Salicina	
Maltosa	
Manitol	Generalmente no produce ácidos, sólo excepcionalmente
Esculina	Hidrolizada
Almidón	Hidrolizado
Indol	Negativo
Rojo de metilo	
Voges-Proskauer	
Koser	Crecimiento
Acido cítrico	Utiliza: alcalinización del medio
Acido malónico	
Alanina	Utiliza: alcalinización del medio
Serina	
Acido benzoico	Variable
Catalasa	Positivo
Nitratos	No reduce
Leche	Inalterada
Leche tornasolada	Alcalinización y reducción tardía
Leche artificial	Variable
Sulfhídrico	Negativo
Ureasa	
Lactato cálcico	Negativo: excepcionalmente utilizados
Gluconato potásico	
Gelatinasa	Negativo
Patata	Pigmentación parda
Parafina	Utilizada

En el medio de cultivo con ácido benzoico (7) se ha encontrado que el 56,66 % de las estirpes producen alcalinización, pero siempre necesitando dos-tres semanas de incubación a 25 °C, y el 43,33 % de las mismas no actúan debido a que la concentración en que se encuentra (0,3 %) impide el desarrollo de los gérmenes.

Respecto a la producción de catalasa, el 100 % de las estirpes son positivas.

Los nitratos (11) no son reducidos por el 100 % de las estirpes.

En su actuación sobre la leche (11), el 100 % de las estirpes no producen alteración visible (peptonización, coagulación, etc.), aunque todas ellas producen un pigmento amarillo verdoso (prácticamente amarillo), soluble en la grasa, y que se encuentra en la superficie del medio formando un rodete de este color. Para la formación de este pigmento necesitan generalmente más de una semana.

Sobre la leche tornasolada (11) el 100 % de las estirpes, a la semana de incubación, producen una alcalinización, aunque con intensidad variable, y al término de dos o tres semanas reducen el medio desde un color azul malva a casi incoloro.

Sobre el medio de leche artificial (1) nosotros hemos encontrado el 62,23 % de positividades, aunque la coloración muchas veces es muy débil; el 27,77 % de los casos, negativos, y el 10 %, de reacciones dudosas.

Tanto la formación de ácido sulfhídrico (15) como la descomposición de la urea (15) fueron negativas en el 100 % de los casos. En el primer medio se ha observado la formación de un pigmento verde-amarillo fluorescente, que consideramos de interés para la identificación del *Pseudomonas savastanoi*.

Sobre el lactato cálcico (16) han actuado el 4,44 % de las estirpes (estirpes 61, 63, 87 y 90) y negativamente, el 95,56 %.

Sobre la gelatina (11) no han actuado el 100 % de las estirpes y sí han producido una pigmentación amarilla.

Sobre el gluconato potásico (3) han actuado el 2,22 % de las estirpes y negativamente, 97,78 % de las mismas.

Sobre la patata (11), el 100 % de las estirpes han producido una pigmentación más o menos parda.

En el medio mineral con parafina (14) se han desarrollado el 100 % de las estirpes, resultado que posee gran interés, ya que se puede emplear dicho medio para enriquecer el germen de los productos en que se encuentre.

Todas las estirpes han aglutinado frente al suero anti-*Pseudomonas savastanoi* "M", aunque con distinta intensidad (cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen de la intensidad aglutinante de 90 estirpes de *Pseudomonas savastanoi* frente al suero anti-*Pseudomonas savastanoi* "M" (*)

Intensidad	Número de estirpes	Porcentaje
+++	45	50
++	27	30
+	18	29

(*) La aglutinación se ha realizado macroscópicamente. La intensidad se ha determinado por la rapidez y tamaño de los grumos formados.

CONCLUSIONES

Como resumen de lo anteriormente expuesto concluimos que la técnica que consideramos estandarizable para el aislamiento e identificación del *Pseudomonas savastanoi* a partir de tumores de olivo, es la que a continuación se esquematiza (10).

I) Desinfección de los tumores con una solución de polvo de gas al 10 %, p/v.

II) Pulpación.

III) Aislamiento por diseminación en placas de Petri con agar-judía verde e incubación a 25 °C, durante noventa y seis horas.

IV) Identificación.

- a) Caracteres morfológicos: bacilos gram-negativos móviles por flagelos polares.
- b) Caracteres antigénicos: aglutinación con el suero específico.
- c) Caracteres bioquímicos:
 - 1) Formación de ácidos a partir de la glucosa y galactosa

por vía oxidativa a las noventa y seis horas (prueba de Hugh y Leifson). Muy pocas estirpes acidifican el agua de peptona glucosada después de veintiún días de incubación.

- 2) No formación de ácidos en la prueba de Hugh y Leifson sobre lactosa, maltosa y salicina. Excepcionalmente con maltosa y salicina se observa acidificación en el tubo anaerobio (tubo cerrado con parafina en la prueba de Hugh y Leifson), en el 4 % de las estirpes investigadas, a los veintiún días de incubación a 25 °C.
- 3) Crecimiento utilizando citrato sódico como única fuente de carbono.
- 4) Crecimiento en medio mineral que posee parafina líquida como única fuente de carbono.
- 5) Descomposición de la esculina.
- 6) Reacción de catalasa positiva.
- 7) Alcalinización de un medio líquido enriquecido en alanina o serina, al término de dos semanas de incubación a 25 °C.
- 8) Alcalinización de un medio líquido enriquecido en ácido cítrico, al término de dos semanas de incubación a 25 °C.
- 9) Reacción de rojo de metilo y de Voges-Proskauer negativa.
- 10) No reducción de los nitratos.
- 11) No formación de ácido sulfhídrico.
- 12) No producción de gelatinasa.
- 13) No formación de indol en agua de peptona utilizando el reactivo de Kovacz.
- 14) Peptonización de la leche.

RESUMEN

Hemos expuesto los medios de cultivo y técnicas de aislamiento e identificación que consideramos más apropiados para obtener—en cultivo puro—la bacteria productora de la tuberculosis del olivo, a partir de tumores.

Se indican los resultados obtenidos en las 34 pruebas bioquímicas a que se han sometido 90 estirpes de *Pseudomonas savastanoi* aisladas por nosotros, resaltándose cuáles son las más apropiadas para su identificación.

También se señala su identificación mediante la reacción de aglutinación frente a su suero específico.

SUMMARY

In this paper have been exposed the techniques and media to isolate the bacterium of the tuberculous of olivetree from tumours.

The results obtained submitting 90 strains of *Pseudomonas savastanoi* isolated in our laboratory to 34 biochemical tests have been included, being indicated those most useful for the identification.

Agglutination reactions using specific antisera have been used for this purpose.

BIBLIOGRAFIA

1. BELTRÁ, R. 1955. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Madrid.
2. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
3. COWAN, S. T., y STEEL, K. J. 1965. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press.
4. GABY, W. L.; LOGAN, C., y WHITAKER, S. 1962. Catabolism of nitrogenous compounds by *Pseudomonas*. J. Gen. Microbiol., 28, 377.
5. HENARES, R. 1964. Estudio bacteriológico de las diarreas infantiles en Granada. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Granada.
6. HUGH, R., y LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. J. Bacteriol., 66, 24.
7. KAUFMANN, F. 1954. Enterobacteriaceae. Ejnar Munksgaard Publisher, Copenhagen.
8. OLIVARES, J. 1964. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Granada.
9. PFEIFFER, R., y KOLLE, W. 1896. Zur differential diagnose der Typhusbazillen mittelstserum USW. Deut. Med. Wochschr., nº 12.
10. ROMERO, P. 1966. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Granada.
11. RUIZ-FALCO, A. Citado en V. CALLAO, 1936. Clasificación y estudio de los tipos de neumococo predominante en la patología de Madrid. Premio de la Real

Academia Nacional de Medicina.

12. SMITH, E. 1908. Recent studies of the olive tubercle organism. U. S. Dep. Agr. Bull., 131, 37.
13. SMITH, E., y ERWIN, F. 1905. Some observations on the biology of the olive-tubercle organism. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig., 15, 189.
14. SOLARI, A. A.; DATO, A., y colaboradores. 1962. Use selective enrichment medium for the isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from heces. J. Bacteriol., 84, 190.
15. WADSWORTH, A. B. 1943. Métodos Estandar de Laboratorio del Departamento de Sanidad del Estado de Nueva York. Labor, S. A., Buenos Aires.
16. WILSON, E. F., y MAGIE, A. R. 1963. Physiological, serological and pathological evidence that *Ps. tonelliana* is identical with *Ps. savastanoi*. Phytopathology, 53, 653.
17. ZAPATERO, E., y GRACIAN, M. 1941. Manual de Técnica Bacteriológica. Imprenta Castellana, Valladolid.

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA
SEGUNDA CATEDRA DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE
SECCION DE HEMOPARASITOLOGIA (C S I C)

ESTUDIO ETIOLOGICO DEL BROTE EPIDEMICO GRIPAL OCURRIDO EN BARCELONA EN FEBRERO DE 1968

por

A. PUMAROLA, A. RODRÍGUEZ-TORRES, J. VIDAL y J. ORTA

INTRODUCCION

El estudio biológico de los casos de gripe clínica proporciona datos de gran valor epidemiológico y profiláctico. Los síndromes gripales pueden ser producidos por cualquiera de los tres subtipos de *virus gripal A, B* o *C*, pero, además, cuadros clínicamente semejantes pueden ser producidos también por *adenovirus, mixovirus parainfluenza* y *enterovirus respiratorios*. Sólo el diagnóstico virológico puede aclarar la etiología exacta del proceso y, por otra parte, el aislamiento del virus gripal permite identificar la variante antigénica responsable de un brote epidémico con las consecuencias de orden preventivo que de ello puedan deducirse para la protección de la población mediante la vacunación.

Esta circunstancia es de particular importancia cuando se detecta la aparición de una nueva variante de virus gripal, frente a la cual la población no tendría ningún grado de inmunidad, y que podría dar lugar a epidemias de grandes proporciones. Por ello, la Organización Mundial de la Salud se interesa especialmente en la recogida de todos los datos concernientes a la gripe en los diferentes países, a través de los Centros Nacionales e Internacionales por ella establecidos (1).

El diagnóstico biológico de la gripe se efectúa por:

- a) Aislamiento del virus.
- b) Investigación de los anticuerpos en el suero de los enfermos.

El conocimiento reciente de que los virus gripales pueden aislarse sobre cultivos celulares, además de en embrión de pollo, ha impulsado su uso con este fin, lo que tiene la indudable ventaja de permitir el aislamiento de otros virus responsables de cuadros parecidos que no se desarrollan, o lo hacen mal, en embrión de pollo.

Durante el mes de febrero de 1968 tuvimos noticia de un notable incremento de las afecciones de tipo gripal, en Barcelona y sus alrededores. El estudio de 32 enfermos de diversas procedencias pertenecientes a este brote es el objeto de la presente comunicación.

MATERIAL Y METODOS

I. *Material clínico*

Los casos estudiados proceden de dos ambientes epidemiológicos distintos, enfermos, en su mayoría, domiciliarios y algunos ambulatorios de la población general, particularmente adultos, y niños acogidos en el Instituto de Puericultura de la Casa Provincial de Maternidad.

1) *Casos entre la población general.*

a) Se estudiaron 16 enfermos en San Adrián de Besós. En dicha localidad, limítrofe con Barcelona, se observó un importante incremento de los procesos de tipo gripal a partir de primeros de febrero. El proceso, que afectó a todas las edades, fue relativamente benigno, y se caracterizaba clínicamente por fiebre elevada (39°-40 °C) de instauración generalmente brusca y de dos a cuatro días de duración, quebrantamiento general intenso, artralgias y cefalea. La sintomatología respiratoria era muy escasa en la mayoría de los casos, consistiendo generalmente en tos seca y, muy raramente, faringitis con ligera disfagia. En esta localidad posiblemente sufrió la enfermedad más del 25 % de la población.

b) Dos casos se estudiaron en Hospitalet de Llobregat, otra población limítrofe de la capital, donde un brote epidémico similar se produjo por la misma época.

2) *Casos entre la población infantil del Instituto de Puericultura (Dr. Carbonell).*

a) Aproximadamente el 10 de febrero enfermaron algunos niños de una sala de dicha Institución. En los seis días siguientes sufrieron la enfermedad la totalidad de los 39 niños, de 4 a 5 años de edad, albergados en dicha sala. El cuadro clínico fue bastante uniforme, caracterizándose por fiebre de 38°-40 °C, de dos a tres días de duración y escasa participación respiratoria, observándose sólo tos seca y enrojecimiento faringoamigdalario. No se presentaron complicaciones broncopulmonares. Se estudiaron serológicamente y mediante ensayos de aislamiento del virus, 10 de estos enfermos.

b) Hacia el 16 de febrero, procesos similares hicieron su aparición en otra sala, que alberga a unas 50 niñas de 2 a 3 años y medio de edad, repartidas en pequeñas habitaciones de ocho camas. Esta sala se halla muy separada de la anterior, en pabellones completamente independientes, y no existen posibilidades de contacto directo de los niños de ambas salas. En el plazo de cuatro días enfermaron 30 niñas, con un cuadro clínico similar al presentado por los niños de la primera sala. Se estudiaron 4 de estos enfermos.

II) *Métodos de aislamiento*

Los productos patológicos se inocularon en embriones de pollo de diez días de incubación y células primarias de riñón de mono *Macacus rhesus* o *Cercopithecus aethiops* (vervet).

1) *Obtención, transporte y conservación de las muestras*

Las secreciones bucofaríngeas, para la investigación de la presencia del virus gripal en las mismas, se obtuvieron en 32 enfermos mediante frotis faringoamigdalario enérgico con hisopo estéril. En todos ellos, la toma de muestras se verificó entre el 1.º y 5.º día del comienzo clínico de la enfermedad.

En 9 casos, el hisopo fue sembrado directamente sobre cultivos celulares de riñón de mono, en la cabecera del enfermo, y además en todos los casos (32), se introdujo un hisopo en un tubo de ensayo conteniendo 5 cm³ de medio de transporte (solución de Hanks con 30 % de líquido amniótico bovino y 2.000 U/cm³, de penicilina, 2.000 µg/cm³, de estreptomomicina y 25 U/cm³, de micostatina). Antes de las dos horas, los medios de transporte con los productos patológicos fueron repartidos en volúme-

nes de 1 cm³ y congelados a — 50 °C, hasta el momento de su inoculación en tubos de cultivo celular o embrión de pollo.

2) *Cultivos celulares*

La suspensión celular de los riñones de mono tripsinados (*) se reparte en frascos de 60 cm³ y en tubos tipo hemólisis, con medio de crecimiento (hidrolizado de lactoalbúmina al 0,5 % en solución de Hanks con 2 % de suero de ternera y antibióticos). Se incuban a 37 °C. A los siete días de crecimiento se cambia el medio de crecimiento por medio de supervivencia, consistente en medio 199 sin suero, al que se añade siempre 1/500 de suero antiviral hemadsorbente SV₅ y la dosis habitual de antibióticos. Se conservan a temperatura del laboratorio, siendo utilizables durante una semana.

3) *Inoculación de los productos patológicos*

Hemos seguido tres técnicas distintas:

a) *Inoculación de embriones de pollo.* Cada uno de los productos patológicos mantenido a — 50 °C fue inoculado en un mínimo de 6 embriones por doble vía, amniótica y alantoidea. Se inocula 0,1 cm³ en cavidad amniótica por la técnica de Sohier y Esser (11), y 0,1 cm³ en cavidad alantoidea. A los tres días se recogen ambos líquidos de cada huevo, verificando una aglutinación cualitativa. En los primeros pases negativos, los líquidos amnióticos se mezclan para la realización de un segundo pase. En total, se verificaron tres pases en todos los ensayos de aislamiento.

b) *Inoculación de cultivos celulares con el producto patológico conservado a — 50 °C en medio de transporte.* En todos los casos procedimos a inocular un mínimo de 10 tubos de cultivo celular conteniendo 1 cm³ de medio de supervivencia, con 0,1 cm³ de producto congelado. Se incubaron a 33 °C en posición estacionaria. Se efectuó lectura diaria del posible efecto citopático y una reacción de hemadsorción (10) al 4.º, 7.º, 11.º y 14.º día. Al término de la incubación se recogieron las células + el medio para efectuar un segundo pase inmediato, o previa congelación a — 50 °C si era preciso retrasar el mismo.

(*) Las suspensiones celulares de riñón de mono que recibimos periódicamente, a + 4 °C, así como los sueros de referencia utilizados, nos fueron proporcionados por el Prof. Sohier, de la Cátedra de Bacteriología, Virología e Inmunología de Lyon.

c) *Inoculación directa de cultivos celulares a la cabecera del enfermo.* Después de su inoculación, se dejan los frascos durante cuatro horas a temperatura ambiente, plazo necesario para que el virus, de existir, penetre en el interior de las células, y se procede después a un tratamiento antibiótico para suprimir las contaminaciones bacterianas.

La incubación y lectura se efectúan como en el caso anterior. Si se observa una acción citopática, que en el caso del virus gripal consistirá en la presencia de células redondeadas en racimos con núcleos densos y picnóticos, se investiga la presencia de hemaglutininas. En cualquier caso se realiza una hemaglutinación a los 7 y 14 días. Practicamos la hemaglutinación con hematíes de cobayo a la temperatura del laboratorio (10).

4) *Identificación de los virus aislados*

Tras detectar la presencia de una hemaglutinina en los cultivos celulares, líquidos amnióticos o alantoideos se procedió a la identificación de los virus aislados, o se esperó al siguiente pase si la hemaglutinación era muy débil.

La *identificación del tipo* se realizó mediante la reacción de fijación del complemento por el método de Sohier y colaboradores (12) frente a sueros antisolubles de gripe A y B.

La *identificación del subtipo*, dentro del tipo A, se realizó mediante la práctica de la reacción de inhibición de la hemaglutinación (RIH) con sueros de referencia preparados en el hurón frente a los antígenos víricos de los virus gripales A₁ y A₂ (10). Mediante la misma reacción con suero antiviral gripal B, se confirmó la identificación del tipo.

La *identificación de la variante antigénica* concreta fue iniciada con los sueros específicos de varias cepas A₂ en la RIH. La identificación completa fue realizada en el Centro Mundial de la Gripe de Londres, por el Dr. Pereira.

III) *Métodos serológicos*

1) *Obtención y conservación de las muestras*

De todos los enfermos en que ello fue posible se tomaron dos muestras de sangre, una en los cinco primeros días de la enfermedad y otra a partir del 15.º día. Los sueros repartidos se conservan a — 20 °C. Todos los sueros del mismo enfermo se ensayan en la misma sesión de laboratorio.

2) *Reacción de fijación del complemento (RFC)*

La realizamos por el micrométodo en tubos de Sohier y colaboradores (12), de tipo Kolmer, con fijación a 37 °C durante una hora, frente a los antígenos solubles de los virus gripales A y B (A₂/Singapour/4/57 y B/Johanesbourg/33/58).

3) *Reacción de inhibición de la hemaglutinación*

En los sueros correspondientes a los enfermos en los que se aisló un virus gripal, se practicó una RIH frente al virus homólogo. Los sueros se trataron previamente con enzima destructora del receptor para suprimir los inhibidores inespecíficos y con glóbulos rojos de gallina para suprimir las posible aglutininas antiespecie (10). La reacción se realiza en placas de Perspex, por el método patrón recomendado por la OMS (1-2).

RESULTADOS

1) *Aislamiento del virus*

En conjunto, de los 32 casos en que se intentó el aislamiento de virus se aislaron 14 cepas de virus gripal A₂, lo que representa un 43,7 % de muestras positivas (*cuadros 1-3*).

Ocho cepas se obtuvieron de los 16 enfermos estudiados en San Adrián; otras 2 cepas se aislaron de los enfermos estudiados en Hospitallet y 4, de los 14 niños estudiados en el Instituto de Puericultura de Barcelona.

La distribución de los aislamientos de acuerdo con la fecha de la enfermedad en la que fueron obtenidos los frotis faríngeos, se refleja en el *cuadro 3*. Se consiguió el aislamiento en el 55,5 % de los casos estudiados al 2.º día de enfermedad, y en el 50 %, en el 3.º y 4.º días. La eficacia del aislamiento fue menor en el primer día (20 %) y no se obtuvieron resultados positivos en dos casos cuyo frotis se practicó el 5.º día.

1) *Mediante la inoculación al embrión de pollo* se aislaron 13 cepas (*cuadro 4*); la inoculación fue positiva al primer pase en 7 casos y al segundo en 6. Los terceros pases ciegos realizados con todas las muestras negativas no ofrecieron ninguna positividad. El porcentaje de aislamiento con este método fue del 40,6.

I Estudio biológico de casos de gripe en la población general (San Adrián y Hospitalet)

Categoría	Edad años	Sexo	Procedencia	Fecha del frotis faríngeo	Días tras comienzo enfermedad	Aislamiento virus	Fechas de los sueros	RFC antígenos solubles		RIH virus homólogos
								A	B	
	50	H	S. Adrián	8-II	3	V. gripal A ₂	8-II	0	0	0
							23-II	32	0	80
	13	H	S. Adrián	8-II	4	V. gripal A ₂	8-II	0	0	20
	2	32	V	S. Adrián	8-II	1		8-II	0	0
							23-II	≥ 64	0	
ido	9	H	S. Adrián	8-II	3		8-II	0	0	
							23-II	64	0	
)	52	V	S. Adrián	8-II	3		8-II	0	0	
							23-II	8	0	
B.	62	V	Hospitalet	13-II	3	V. gripal A ₂	13-II	0	0	10
io	51	V	Hospitalet	13-II	3	V. gripal A ₂	13-II	0	0	40
							13-II	0	0	
D.	19	H	S. Adrián	13-II	1		23-II	0	0	
	44	H	S. Adrián	13-II	2		13-II	0	0	
	46	H	S. Adrián	13-II	3	V. gripal A ₂	13-II	0	0	0
							23-II	0	0	20
	12	H	S. Adrián	13-II	1		13-II	0	0	
							26-II	64	0	
a	34	H	S. Adrián	13-II	2		13-II	0	0	
							23-II	8	0	
	28	H	S. Adrián	15-II	1	V. gripal A ₂	15-II	0	0	40
							26-II	16	0	1280
na	38	H	S. Adrián	15-II	2	V. gripal A ₂	15-II	0	0	20
idez	58	V	S. Adrián	15-II	2	V. gripal A ₂	26-II	32	0	160
							15-II	0	0	20
							26-II	16	0	80
	19	V	S. Adrián	15-II	3	V. gripal A ₂	15-II	0	0	0
ro							26-II	≥ 64	0	40
	15	V	S. Adrián	15-II	2	V. gripal A ₂	15-II	0	0	20
ido							26-II	32	0	160
	47	V	S. Adrián	23-II	1		23-II	0	0	

Cuadro 2. Estudio biológico de casos de gripe en niños del Instituto de Puericultura de Barcelona

Nombre	Edad años	Sexo	Fecha del frotis faríngeo	Días del comienzo enfermedad	Virus aislado	Fecha de los sueros	RFC antígenos solubles		RIH virus homólogos
							A	B	
José R.	5	V	16-II	2		16-II	0	0	
Pablo R.	5	V	16-II	2	V. gripal A ₂	28-II	≥64	0	
						16-II	0	0	80
						28-II	0	0	320
Alberto	5	V	16-II	2	V. gripal A ₂	8-III	0	0	320
						16-II	8	0	80
						28-II	64	0	1280
Pedro L.	5	V	16-II	5		2-V	8	0	80
						16-II	32	0	
						28-II	16	0	
Juan	5	V	16-II	5		16-II	32	0	
Juan C.	5	V	16-II	3		28-II	≥64	0	
						16-II	0	0	
						28-II	16	0	
Carlos	5	V	16-II	3		16-II	0	0	
						28-II	16	0	
						16-II	0	0	
Pedro M.	5	V	16-II	2		28-II	16	0	
						16-II	8	0	
						28-II	0	0	
Ladislao	5	V	16-II	3		16-II	0	0	
						29-II	0	0	
						16-II	0	0	
Juan M.	5	V	16-II	3		29-II	0	0	
						16-II	0	0	
						29-II	0	0	
Magdalena	3	H	20-II	4		19-II	0	0	
Antonia	2	H	20-II	3		20-II	0	0	
Esperanza	2	H	20-II	3	V. gripal A ₂	19-II	0	0	10
						6-III	0	0	≥80
Mercedes D	2	H	20-II	3	V. gripal A ₂	22-II	0	0	40

Cuadro 3. Distribución de los aislamientos de virus gripal según la fecha de obtención del frotis faríngeo

Día de enfermedad	Número de casos	Positivos
1.º	5	1 (20 %)
2.º	9	5 (55,5 %)
3.º	14	7 (50 %)
4.º	2	1 (50 %)
5.º	2	
	32	14 (43,7 %)

La adaptación del virus aislado al desarrollo en cavidad alantoidea fue rápida; recordemos que en todos los casos la inoculación se practicó por doble vía. En 8 casos, en el primero de los pases que resultó positivo (1.º y 2.º), la hemaglutinación se observó ya en el líquido alantoideo; en 4 casos, la adaptación se consiguió al 2.º pase y en 1, al 3.º pase.

2) *Mediante la inoculación de cultivos celulares de riñón de mono con los productos patológicos en medio de transporte que se habían mantenido congelados a — 50 °C*, todos los intentos de aislamiento resultaron negativos; la reacción de hemadsorción fue negativa en los tubos inoculados y fueron negativos también los segundos pases sobre huevo.

3) *Mediante la inoculación directa de los productos patológicos sobre células de riñón de mono a la cabecera del enfermo* se aislaron 4 cepas. En dos casos, la hemaglutinación positiva se demostró en el primer pase, a los ocho y doce días de incubación. De uno a tres días antes de la detección de la hemaglutinina se pudo apreciar una acción citopática típica, aunque ligera. Teniendo presente la evidente sensibilidad del embrión de pollo a las cepas aisladas, el 2.º pase se realizó en todos los casos por inoculación al huevo embrionado, lo que permitió aislar dos nuevas cepas. Se practicó además un tercer pase ciego de todas las muestras que habían resultado positivas al inocular inicialmente sobre embrión de pollo. Este tercer pase fue negativo en todos los casos.

Cuadro 4. Cepas de virus gripal A₂

Procedencia	Nombre	Inoculación en embrión de pollo						Inoculación de cultivos celulares						
		1.º pase		2.º pase		3.º pase		1.º pase	Pases sucesivos en embrión de pollo					
		Am.	Al.	Am.	Al.	Am.	Al.		2.º pase		3.º pase			
									Am.	Al.	Am.	Al.		
San Adrián	Serrano	+	—	+	+			—	—	—				
San Adrián	Arroyo	+	+					—	—	—				
Hospitalet	López	+	+					—	—	—				
Hospitalet	Medrano	+	—	+	+			—*	+	—	+	+		
San Adrián	Calvo	—	—	+	—	+	+	—*	—	—	—	—		
San Adrián	Brocal	—	—	+	—	+	+	+* (8 d.)	+	+				
San Adrián	Carmona	+	—	+	—	+	+	—	—	—				
San Adrián	Fernández	—	—	+	+			—	—	—				
San Adrián	Haro	—	—	+	+			—	—	—				
San Adrián	Navarro	—	—	—	—	—	—	+* (12 d.)	+	+				
Barcelona	Riera	—	—	+	+			—*	—	—	—	—		
Barcelona	Alberto	—	—	+	+			—*	+	+				
Barcelona	Rodríguez	+	+					C						
Barcelona	Domínguez	+	+					—	—	—				

Am, Líquido amniótico. Al, Líquido alantoideo. +, Hemaglutinación positiva. —, Hemaglutinación negativa. *, Inoculación directa del cultivo celular a la cabecera del enfermo. C, Cultivo contaminado.

Tres de los cuatro aislamientos obtenidos sobre células de riñón de mono fueron positivos ya en líquido alantoideo al primer pase sobre huevo, y el cuarto, al 2.º pase.

En resumen (*cuadro 5*), a partir del producto congelado a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio de transporte se obtuvieron 13 aislamientos positivos por inoculación al embrión de pollo (40,6 %) y ninguno por inoculación de cultivos celulares. Mediante la inoculación directa de cultivos celulares a la cabecera del enfermo se obtuvieron 4 aislamientos positivos (44,4 %).

Cuadro 5. Frecuencia de aislamientos en embrión de pollo y cultivos celulares

Método	Producto	Casos	Aislamientos	Porcentaje
Embrión de pollo	Congelado	32	13	40,6
Cultivo celular	Congelado	32	0	0
Cultivo celular	Inoculación directa	9	4	44,4

En 9 casos se realizó la inoculación en embrión de pollo y la inoculación directa de cultivos celulares, por lo que puede compararse la sensibilidad de ambos métodos. En estos 9 casos se aislaron 6 virus gripales (*cuadro 6*); 3, en embrión de pollo y cultivo celular; 2, únicamente en embrión de pollo, y 1, únicamente en cultivo celular.

Cuadro 6. Aislamientos positivos a partir del mismo producto patológico, en cultivos celulares a la cabecera del enfermo y en embrión de pollo previa congelación

Casos	Aislamientos	Embrión de pollo y cultivo celular	Embrión de pollo	Cultivo celular
9	6	3	2	1

II) Identificación de los virus aislados

La identificación del tipo fue realizada sin dificultad. Todos los virus aislados fijaron el complemento en presencia de un suero de referencia anti-virus gripal A; en cuanto al título hemaglutinante obtenido fue $\geq 1/4$. La misma reacción fue en todos los casos negativa frente a un suero de referencia anti-virus gripal B.

La identificación de todos los virus aislados como pertenecientes al subtipo A₂ fue igualmente rápida y categórica mediante la RIH con sueros de referencia anti A₁ y A₂.

La identificación de la variante antigénica concreta dentro del subtipo A₂, mediante la RIH, presenta muchas más dificultades en razón de la variabilidad de las cepas en su avidez para los anticuerpos, y su distinta sensibilidad a los inhibidores inespecíficos. Ensayamos la respuesta de la mayoría de cepas aisladas frente a sueros de referencia preparados en el hurón por inoculación de diversas cepas de virus gripal A₂, concretamente los sueros anti A₂/Lyon/62 (Napierala), A₂/Lyon/65 (Cayssiol) y A₂/Lyon/67 (Cacciopo). Los resultados preliminares de estas pruebas parecían indicar que las cepas aisladas eran semejantes antigénicamente a las cepas prevalentes en Europa en 1967.

Para el estudio antigénico detallado se remitieron dos cepas al Centro Mundial de la Gripe (Prof. Pereira). Sus resultados confirman que las cepas aisladas están emparentadas con la última variante de cierta importancia descrita para el virus gripal A₂ (cepa tipo Tokyo/3/67) (cuadro 7).

Cuadro 7. Reacción de inhibición de la hemaglutinación

Cepas	Sueros anti			
	A ₂ /Singapore/ 1/57	A ₂ /England/ 12/64	A ₂ /England/ 10/67	A ₂ /Tokyo/ 3/67
A ₂ /Barcelona/ 1/68 (Brocal)	120	60	160	1.320
A ₂ /Barcelona/ 2/68 (Navarro)	120	80	120	960

III) Resultados serológicos

1) Reacción de fijación del complemento

La RFC frente a los antígenos solubles de gripe A y B se realizó en los sueros correspondientes a los 32 casos estudiados. En 24 casos obtuvimos dos sueros del enfermo, uno, precoz, dentro de los cinco primeros días de enfermedad, contemporáneo del frotis faríngeo, y otro, tardío, tomado entre diez y veinte días después del primero. En 8 casos no se pudo obtener más que el suero precoz.

Todos los sueros resultaron negativos frente al antígeno soluble de gripe B.

En los sueros precoces no se detectaron anticuerpos frente al antígeno soluble del virus gripal A en 28 casos; títulos de 8, en dos casos (al 2.º día de enfermedad), y títulos de 32, en 2 casos (al 5.º día de enfermedad). medad).

Los resultados frente a gripe A de los 24 casos en los que se obtuvieron 2 sueros se reflejan en el *cuadro 8*.

Se observó un aumento significativo (≥ 4 veces) del título de anticuerpos fijadores del complemento en 13 casos, y un título significativo de infección reciente (32) ya en el 1.º suero en los 2 casos en que fue tomado al 5.º día de enfermedad. En conjunto, pues, en 15 casos (62,5 %) se estableció por RFC el diagnóstico de gripe A.

En 6 casos (25 %) no se detectaron anticuerpos, y en 3 se obtuvieron títulos no significativos (8) en alguno de ambos sueros. En conjunto, pues, el diagnóstico no pudo establecerse por RFC en 9 casos (37,5 %).

Cuadro 8. Reacción de fijación de complemento con antígeno soluble de gripe A₂. Resultados en los casos en que se obtuvieron dos sueros

Número de casos	Diagnóstico serológico		Sin diagnóstico serológico	
	Aumento significativo de títulos AC	Títulos de AC significativos	Títulos de AC no significativos	Títulos negativos
24	13	2	3	6
	15 (62,5 %)		9 (37,5 %)	

2) *Reacción de inhibición de la hemaglutinación*

En los 14 casos en que se aisló el virus causal, los sueros de los enfermos se ensayaron frente al virus aislado mediante RIH. En los 10 casos en que se obtuvieron 2 sueros, la RIH mostró un aumento significativo del título de anticuerpos.

DISCUSION

El aislamiento de los virus gripales se ha venido realizando clásicamente mediante la inoculación de los productos patológicos al embrión de pollo. Sin embargo, desde 1955 se conoce que los tres tipos de virus gripal pueden aislarse en cultivos celulares de riñón de mono. En relación con los virus gripales del tipo B existe unanimidad en considerar que se aíslan con mucha mayor facilidad en estos cultivos celulares que en el huevo embrionado (4, 7-8 y 13). Probablemente lo mismo ocurre con los virus del tipo C (13). En cuanto hace referencia al virus gripal A₂, aunque algunos autores (9) obtienen mejores resultados en los cultivos celulares que en el embrión de pollo, en general se considera superior el aislamiento en embrión de pollo (3 y 5-6). Las principales razones que se aducen para explicar los diferentes resultados obtenidos en varios laboratorios con el uso de ambos métodos de aislamiento para el virus A₂, son la diversidad en el sistema de obtención de las muestras, en la calidad de las células y en las formas de cultivo, así como diferencias entre las cepas aisladas.

En nuestro trabajo el virus gripal A₂ ha sido aislado mucho más fácilmente sobre huevo que sobre células de riñón de mono. Sin embargo, existe una notable diferencia entre los resultados comparativos de la inoculación en embrión y en cultivo celular, según que éste haya sido inoculado directamente a la cabecera del paciente o lo haya sido a partir del producto congelado a —50 °C en medio de transporte. En efecto, de 13 muestras embrión-positivas congeladas ninguna ha resultado positiva por este método, habiendo sido el tiempo y condiciones de permanencia en congelación igual para ambos tipos de inoculación. En cambio, en las 5 muestras embrión-positivas que fueron inoculadas directamente sobre cultivos celulares se obtuvieron 3 resultados positivos (60 %), y además, una muestra resultó positiva en cultivo celular, siendo negativa en embrión de pollo.

La eficacia del aislamiento de virus para el diagnóstico de la gripe A₂ ha sido excelente en nuestros casos, puesto que entre el 2.º y 4.º día de la enfermedad obtenemos de un 50 a un 55 % de éxitos, cifras muy próximas a las señaladas por Davis (4).

Los virus aislados en nuestro estudio se han adaptado con facilidad al desarrollo en la cavidad alantoidea. En 9 de los 14 virus aislados tal adaptación se consiguió ya en el 1.º pase. Para Kilbourne (6), la inoculación en cavidad alantoidea tiene una eficacia similar a la amniótica para el virus gripal A₂. Parece aconsejable, pues, como hemos hecho en el presente trabajo, seguir la técnica de inoculación por doble vía que ofrece la garantía de máxima eficacia.

Las cepas aisladas en Barcelona, en febrero de 1968 corresponden antigénicamente a la variante A₂/Tokyo/3/67.

La RFC ha sido en nuestro estudio notablemente eficaz, permitiendo el diagnóstico del 62,5 % de los 24 casos en que se obtuvieron dos sueros. 9 casos (37,5 %) no pudieron ser diagnosticados por RFC, aunque en 3 (12,5 %), los anticuerpos aparecieron en el suero, si bien a títulos insuficientes para el diagnóstico de certeza. De esta forma, sólo 6 casos (25 %) representan un fallo total de la reacción.

El fracaso de la RFC con antígenos solubles es un hecho bien conocido en los niños, que tras la primoinfección reaccionan mal frente a los antígenos solubles y mejor ante los antígenos víricos. Si estudiamos los fallos de la RFC según la edad de los casos en los que no aparecieron anticuerpos, 4 ocurrieron entre 11 niños menores de 5 años, lo que representa una ineffectividad de la reacción del 36,6 %. Entre los adultos, la RFC fue ineficaz sólo en el 15,3 % (2 casos sobre 13).

La RIH es de interpretación delicada para el diagnóstico serológico. Para su uso debe preferirse en cualquier caso una cepa de la propia epidemia; por ello, nosotros utilizamos esta reacción en los sueros de los enfermos, utilizando como antígeno hemaglutinante el virus aislado de los mismos. En los 10 casos (con virus aislado y dos sueros) la reacción resultó positiva.

RESUMEN

Durante el mes de febrero de 1968 tuvo lugar en Barcelona y sus alrededores un importante aumento de las afecciones de tipo gripal. Los procesos, clínicamente benignos, afectaron a todas las edades. Se descri-

ben las características del brote epidémico que afectó también a una colectividad infantil.

Se intentó el aislamiento del virus causal en 32 casos. En todos ellos el producto patológico conservado a -50°C se inoculó en embrión de pollo y cultivos celulares de riñón de mono. En 9 casos, además, se pudieron practicar siembras directas de cultivos celulares a la cabecera del enfermo.

Se aislaron 14 cepas de virus identificadas como Mixovirus influenza A_2 . El estudio de estas cepas demostró que estaban antigénicamente relacionadas con la cepa $A_2/\text{Tokyo}/3/67$.

Se comenta la sensibilidad de los diferentes métodos de aislamiento y se presentan los resultados serológicos de los casos estudiados.

SUMMARY

During February 1968, an increase of cases of influenza-like diseases were observed in Barcelona and the surroundings. The disease, clinically mild, affected all age groups. The epidemiological characteristics of the outbreak are described.

14 strains of Myxovirus Influenza A_2 were isolated from 32 cases, by inoculation in embrionated eggs and in monkey kidney cells cultures. Antigenically, the strains were related to the $A_2/\text{Tokyo}/67$ variant.

The sensitivity of the isolation methods and the serological results were reported.

BIBLIOGRAFIA

1. Comité d'Experts des Maladies à Virus Respiratoires. 1959. Bull. OMS Sér. Rappt. Tech., 170.
2. Comitte on Standard Serological Procedures in Influenza Studies. 1950. J. Immunol., 65, 347.
3. CHANOCK, R. M.; JOHNSON, K. M.; COOK, M. K.; WONG, D. C., y VARGOSKO, A. 1961. Am. Rev. Respirat. Diseases, 83, 125.
4. DAVIS, D. J.; PHILIP, R. N.; BELL, J. A.; VOGEL, J. E., y JENSEN, D. V. 1961. Am. J. Hyg., 73, 138.
5. KALTER, S. S.; CASEY, H. L.; JENSEN, K. E.; ROBINSON, R. Q., y GORRIE, R. H. 1959. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 100, 367.
6. KILBOURNE, E. D. 1959. J. Clin. Invest., 38, 266.

7. MOGABGAB, W. J.; GREEN, I. J.; DIERKHISING, O. C., y PHILLIPS, I. A. 1955. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 89, 654.
8. PEYRON, L.; HENRY, M., y SOHIER, R. 1966. Ann. Biol. Clin., 24, 1135.
9. SHELOKOV, A.; VOGEL, J. E., y CHI, L. 1958. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 97, 802.
10. SOHIER, R. 1964. Diagnostic des Maladies à Virus. Flammarion, Paris.
11. SOHIER, R., y ESSER-TRIMBERGER, I. 1952. Ann. Inst. Pasteur, 82, 168.
12. SOHIER, R.; PEILLARD, M. M.; GINESTE, J., y FREYDIER, J. 1956. Ann. Biol. Clin., 14, 281.
13. TAKEMOTO, K. K.; LYNT, R. K.; ROWE, W. P.; HUEBNER, R. J.; BELL, J. A.; MELLIN, G. W., y DAVIS, D. J. 1955. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 89, 308.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA FITOPATOLOGICA

RESPUESTA DE *ERWINIA CAROTOVORA* A DISTINTAS FUENTES DE CARBONO

por

GENOVEVA TEJERINA y M.^a TERESA SERRA

INTRODUCCION

Se sabe, desde los trabajos de Gale (3), que la presencia de algunos hidratos de carbono en el medio en que se desarrolla una bacteria es capaz de modificar la síntesis de sus enzimas de inducción, y que de todos aquéllos es la glucosa quien ejerce este efecto de forma más marcada. Las experiencias de Neidardt y Magasanik (10) sobre la producción de histidasa y mioinositoldeshidrogenasa por *Aerobacter aerogenes* explican este hecho por la teoría de represión catabólica, que asimismo es admitida por Cohn y Horibata (1) para aclarar el efecto de la glucosa sobre la síntesis de β -galactosidasa por *Escherichia coli*.

Entre los microorganismos parásitos de plantas ha sido señalado por Gäumann y Bohni (4) una disminución en la síntesis de enzimas del *Aspergillus niger* por la presencia de glucosa, y Keen y Horton (7) indican también el mismo efecto en el *Pyrenochaeta terrestris*.

En el presente trabajo exponemos la acción ejercida por distintos azúcares, con atención especial a la glucosa, sobre la síntesis de la enzima poligalacturonasa (PG) por la bacteria *Erwinia carotovora*.

MATERIAL Y METODOS

Estirpe

Se emplea la estirpe de *Erwinia carotovora* 312 procedente de la Colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas, de Harpenden (Inglaterra), que conservamos a 40 °C en tubos inclinados de agar-judía.

Medio de cultivo

Consiste en una solución al 0,2 % de pectina *Citrus decumana* en tampón fosfato 7,6 mM, de pH 7,0, al que se incorpora en el momento de la siembra 1,0 mg de ácido l(+)-glutámico, 1,0 mg de L-cistina y 0,1 mg de L-histidina/ml del medio. Volúmenes de 10 ml se distribuyen en matraces de Erlenmeyer de 100 ml provistos de un tubo de fotómetro para seguir el crecimiento de *Erwinia carotovora* por la lectura de su densidad óptica, a 600 m μ en un espectrocolorímetro de Bausch-Lomb (Spectronic 20). Cada matraz se inocula con 1 % (v/v) de una suspensión acuosa de bacterias de 0,5 de densidad óptica, procedente de un cultivo de veinticuatro horas. La incubación se practica a 25 °C, en agitación, durante diferentes períodos de tiempo.

La actividad de la enzima poligalacturonasa se valora en los sobrenadantes de los cultivos mediante la técnica de Jansen y McDonnell (6), expresándose en miligramos de ácido monogalacturónico/mililitro de sobrenadante.

Influencia de los azúcares en la formación de la enzima

El medio de cultivo que hemos indicado se enriquece por la incorporación de diversos azúcares, que alcanzan concentraciones diferentes comprendidas entre 10⁻² y 10⁻⁵ M. Los medios así resultantes se inoculan con *Erwinia carotovora* e incuban durante veinticuatro horas en agitación, retirándose periódicamente muestras para después de centrifugadas hacer la valoración enzimática en sus sobrenadantes.

Preferencia en la utilización de la fuente carbonada en una mezcla de pectina y glucosa

Los resultados obtenidos en la experiencia precedente nos permiten fijar una concentración de glucosa capaz de facilitar la síntesis enzimática. Esta concentración, 10⁻⁴ M, es la que contiene el medio de cultivo

donde va a desarrollarse la bacteria y seguimos la formación de PG simultánea a la utilización de pectina y glucosa, para relacionar la presencia de la enzima con la asimilación de ambas sustancias.

Acción inhibitoria de la glucosa incorporada en diferentes fases de crecimiento de Erwinia carotovora

Hemos tomado la concentración inhibitoria $2,5 \times 10^{-3}$ M para estudiar si la inhibición se presenta, no sólo cuando la glucosa forma parte del medio de cultivo, sino también cuando se incorpora a él una vez que la bacteria ha alcanzado diferentes fases de desarrollo. Para ello, al cultivo en las condiciones establecidas se añade glucosa después de dos, cuatro, seis, nueve y media, catorce y veinticuatro horas. La presencia de la enzima PG se sigue por ensayos practicados en las muestras de cultivo que se toman en diferentes tiempos de incubación.

Influencia de los azúcares en la actividad PG

El efecto de los distintos azúcares en la actividad PG de *Erwinia carotovora*, *in vitro*, se examina con el sobrenadante de un cultivo dializado de veinticuatro horas y de actividad conocida, al que se añade el azúcar correspondiente hasta alcanzar dos concentraciones distintas, $2,5 \times 10^{-3}$ y 10^{-2} M. Después de mantener en contacto doce horas a 4 °C, se determina la actividad y se compara con el correspondiente control.

Análisis cromatográfico

Se practica en los sobrenadantes después de precipitar en ellos la pectina con doble volumen de etanol de 95 % y HCl 0,05 N. Empleamos papel Whatman núm. 1 y como solvente butanol-ácido acético-agua (4 : 1 : 5). El revelador es ftalato de anilina.

RESULTADOS

Influencia de diferentes concentraciones de azúcar en la formación de la enzima PG

El medio de cultivo contiene 0,2 % de pectina y se enriquece por incorporación de un azúcar que alcanza concentraciones diversas.

El cuadro 1 reproduce los resultados obtenidos, que se expresan en tanto por ciento del control con sólo pectina. Existen azúcares, como la maltosa, totalmente inactivos, frente a los cuales no se produce alteración alguna en el mecanismo de síntesis enzimática. Otro caso distinto corresponde a la manosa, que se manifiesta inhibidor, parcial o total, dependiendo de la

Cuadro 1. Formación de PG por *Erwinia carotovora*, cultivada veinticuatro horas en un medio con pectina + diferentes concentraciones de azúcar

Azúcar añadido	Concentraciones del azúcar (M)					
	10^{-5}	10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-3}	5×10^{-3}	10^{-2}
Glucosa	120	120	110	15	0	0
Arabinosa	160	160	160	160	93	0
Galactosa	98	116	133	140	140	0
Levulosa	135	137	137	67	0	0
Manosa	73	83	80	0	0	0
Lactosa	120	120	120	120	58	40
Maltosa	109	109	109	109	109	109

concentración que alcanza en el medio. Y, por último, cabe destacar otro grupo, al que pertenecen glucosa, arabinosa, galactosa, levulosa y lactosa, que se comportan como estimulantes, a pequeñas dosis, y como inhibidores a concentraciones más elevadas; el paso de una acción a otra está marcado por una determinada molaridad para cada uno de los azúcares.

Preferencia en la utilización de la fuente carbonada

Puesto que concentraciones bajas de glucosa producen un ligero incremento en la formación de poligalacturonasa, hemos querido seguir periódicamente la inducción de la enzima durante treinta horas de cultivo de la bacteria en un medio que contiene pectina y una concentración estimulante de glucosa (5×10^{-4} M). Además de observar el crecimiento de *Erwinia carotovora*, determinamos su producción de PG en diferentes tiempos, a la vez que se analiza cromatográficamente la desaparición de glucosa. Los resultados aparecen en la figura 1, donde puede observarse

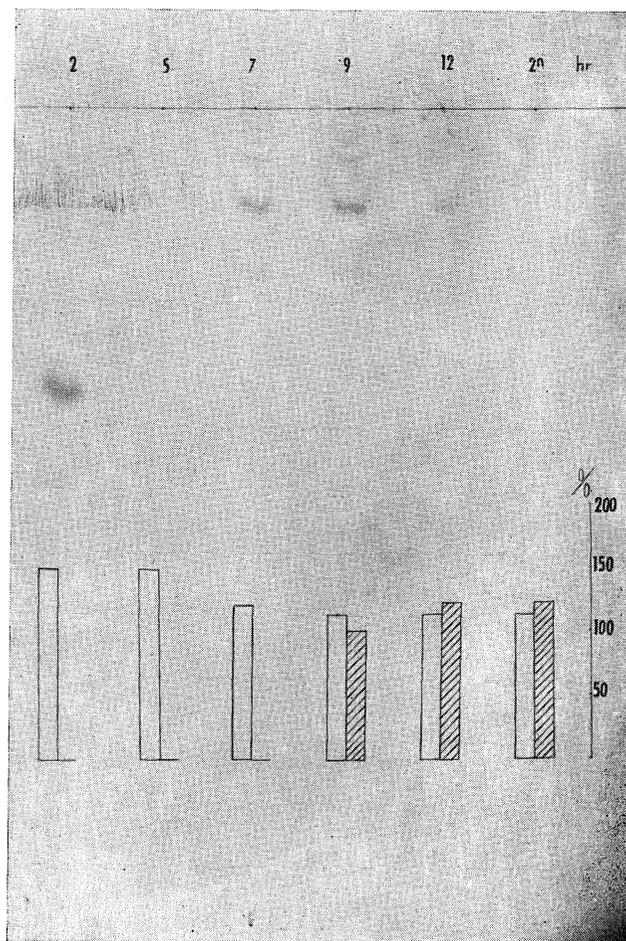


Figura 1. Comportamiento de *Erwinia carotovora* cultivada en un medio con 0,2 % de pectina y glucosa 5×10^{-4} M (el desarrollo, □, y actividad enzimática, ▨, se expresan en porcentaje del control con sólo pectina). El análisis cromatográfico muestra la desaparición de glucosa y la aparición de ácidos urónicos, que también son consumidos.



Figura 3. Análisis cromatográfico de un cultivo de *E. carotovora* en un medio con pectina, que a las nueve horas recibe glucosa, hasta alcanzar una concentración $2,5 \times 10^{-3} M$

como la glucosa es consumida inmediatamente sin que pueda ser detectada en 0,05 ml del medio a las cinco horas de cultivo. Hasta este período de crecimiento, la bacteria experimenta un notable estímulo respecto al control (con sólo 0,2 % de pectina y sin nada de glucosa), que se prolonga, aunque de forma menos marcada, durante las treinta horas de duración de la experiencia. A las siete horas de cultivo se revelan por cromatografía ácidos urónicos de diverso grado de polimerización, procedentes de la degradación de la pectina y que no existen durante el período precedente de asimilación de glucosa, lo que sugiere que en el medio con mezcla de pectina y glucosa es este último el primero que se consume y sólo después de haber sido utilizada la glucosa se inicia la asimilación de pectina. A partir de las doce horas, los urónicos dejan de ser detectados, lo que indica que ha cesado su formación y que han sido también utilizados por la bacteria. La formación de la enzima durante este ensayo no se anticipa al período observado en el control, puesto que en ambos casos aparece al cabo de siete a nueve horas y su determinación en el medio de cultivo presenta valores muy semejantes durante el resto de la experiencia. El ligero aumento de PG en presencia de 5×10^{-4} M no creemos es muy significativo, dado el estímulo que este azúcar ocasiona sobre la producción celular de *Erwinia carotovora*.

Acción inhibidora de glucosa cuando se incorpora a un cultivo de Erwinia carotovora en distintas fases de desarrollo

Hemos tomado como testigos de esta experiencia dos cultivos de *Erwinia carotovora*, uno en el medio habitual con pectina y otro en el que la pectina ha sido sustituido por $2,5 \times 10^{-3}$ M de glucosa; en ambos cultivos hemos seguido el desarrollo de la bacteria, así como la formación de enzima, si bien en el medio con sólo glucosa no hay síntesis de PG. La concentración de glucosa empleada como inhibidora es $2,5 \times 10^{-3}$ M, que, como indicamos, se añade al cultivo normal de *E. carotovora* en distintos momentos, y los resultados aparecen en la *figura 2*, por la que vemos que el crecimiento de la bacteria apenas sufre modificación por la presencia de glucosa, cualquiera que sea su fase de desarrollo en que la recibe. Creemos interesante destacar la depresión que las curvas de crecimiento manifiestan alrededor de las veinte horas de cultivo y su recuperación posterior, no sólo cuando el medio contiene pectina y más tarde glucosa, sino también con pectina solamente como única fuente de carbono.

En cuanto a la formación enzimática, la misma figura 2 muestra los valores correspondientes a las distintas fases del cultivo de *Erwinia carotovora* en el medio normal con sólo pectina, así como los resultados obtenidos después de añadir glucosa ($2,5 \times 10^{-3}$ M) en distintos momentos de crecimiento de la bacteria. No hay duda de que no existe actividad enzimática cuando esta concentración de glucosa se halla presente en el

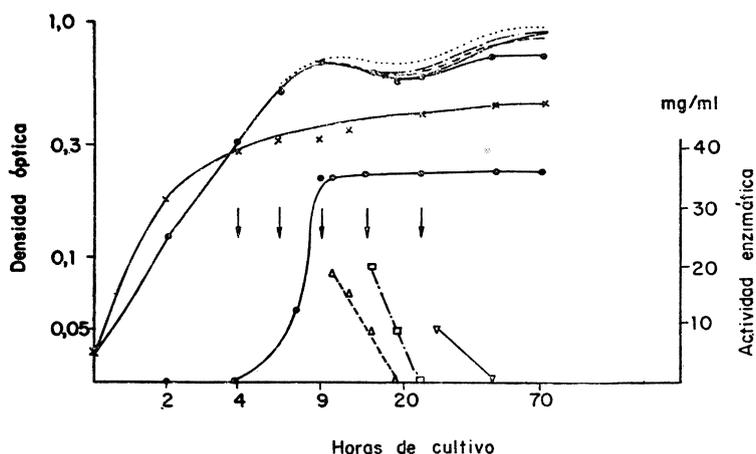


Figura 2. Desarrollo y actividad PG en *E. carotovora* cultivada en distintos medios: con glucosa, $2,5 \times 10^{-3}$ M (× — ×), con 0,2 % de pectina (● — ●) y con la misma concentración de pectina a la que se añade la glucosa, después de seis horas (.....), nueve horas (- - -), catorce horas (- . -) y veinticuatro horas (—)

medio desde que se inicia el cultivo de *E. carotovora*, o cuando su incorporación al mismo se efectúa transcurridas dos, cuatro y seis horas. Ahora bien, si la glucosa se añade a un cultivo de nueve horas y media, catorce o veinticuatro, puede observarse que casi inmediatamente a esta incorporación se manifiesta una disminución brusca de la enzima PG, que desaparece totalmente del medio unas horas después.

Hemos querido conocer la relación de esta desaparición de PG con la asimilación por la bacteria de la glucosa que se añade al medio. Para ello elegimos la experiencia en la que se añade la glucosa al cultivo de nueve horas y media y las muestras que se retiran antes y después de la adición de glucosa, para determinar en ellas la enzima PG; se utilizan también para efectuar un análisis cromatográfico, cuyo resultado corresponde a la

figura 3. A medida que *Erwinia carotovora* va desarrollándose, aparecen en el medio polímeros del ácido galacturónico de diferente peso molecular, que también se distinguen junto con la glucosa en el momento en que ésta se incorpora; a partir de este punto, la glucosa del medio va desapareciendo, lo que indica que su consumo es inmediato, a la vez que también desaparecen los polímeros del galacturónico, lo que parece indicar que no sólo son aprovechados, sino que además deja de ser aprovechada la pectina de donde proceden.

Influencia de los azúcares en la actividad PG

Se han tomado de cada uno de los azúcares dos concentraciones que inhiben total o parcialmente la formación de PG ($2,5 \times 10^{-3}$ y 10^{-2} M), probándose su acción sobre un sobrenadante dializado, cuya actividad corresponde a 36,5 mg de ácido monogalacturónico/ml. En ningún caso se ha manifestado destrucción de actividad enzimática, obteniéndose en todos los ensayos valores casi idénticos al control.

DISCUSION

La bacteria *Erwinia carotovora* produce poligalacturonasa cuando se cultiva en un medio con pectina como única fuente de carbono, que actúa a la vez como agente de inducción. El enriquecimiento de dicho medio con distintos azúcares puede modificar la biosíntesis de la enzima, modificación que depende tanto de la naturaleza del carbohidato añadido como de su concentración. En general, todos los azúcares probados, con excepción de manosa y maltosa, producen un estímulo en la formación de PG cuando se encuentran en concentraciones bajas, pero al aumentar su molaridad en el medio determinan una marcada inhibición en la formación enzimática, que no se refleja, por el contrario, en el desarrollo bacteriano. Este comportamiento de *E. carotovora* puede relacionarse con el de *Fusarium oxysporum* de las experiencias de Patil y Dimond (11), ya que también en este caso la bacteria se adapta al segundo substrato sin fase lag y asimismo es capaz de utilizar por completo los catabolitos procedentes del azúcar cuando está en concentraciones bajas, y sólo se manifiesta represión en la síntesis de PG al alcanzar concentraciones que proporcionan cantidades elevadas de catabolitos. Estas concentraciones varían con los distintos azúcares ensayados, oscilando entre 10^{-3} y 10^{-2} M.

El hecho de que haya sido la glucosa el azúcar que desde las experiencias de Monod (9) y Gale (3) se ha relacionado más directamente con la biosíntesis de enzimas de inducción, nos ha decidido a centrar este estudio en su efecto sobre la síntesis de PG. Así, hemos observado que cuando *Erwinia carotovora* se cultiva en presencia de pectina y glucosa, manifiesta una clara preferencia en la utilización de esta última, que desaparece inmediatamente del medio, según el análisis cromatográfico, y sólo después de haber sido consumida se inicia el consumo de pectina, como revelan los ácidos urónicos que aparecen cuando ya no hay glucosa. Resultados análogos han sido observados por Durham y McPherson (2) en sus estudios con *Pseudomonas fluorescens*, ya que este microorganismo ataca inmediatamente la glucosa, cualquiera que sea el momento en que se añade al medio donde se cultiva.

Esta predilección de *Erwinia carotovora* para la utilización de glucosa influye en la inducción de PG, ya que al añadir concentraciones superiores a $2,5 \times 10^{-3}$ M de dicho azúcar en cualquiera de las fases de crecimiento que preceden a la formación de la enzima, dicha formación queda anulada y no aparece PG en el cultivo, aunque éste se prolongue hasta setenta y dos horas. Si la incorporación de la dosis inhibitoria de glucosa tiene lugar después de que la enzima ha comenzado a formarse y a ser detectada en el medio de cultivo, podemos observar que coincidiendo con la inmediata utilización de esta glucosa cesa la formación de PG, que no sólo se interrumpe durante el tiempo en que *E. carotovora* consume la glucosa, sino que tampoco se recupera después de consumida toda ella.

El mecanismo por el cual ejerce la glucosa este efecto tiene un interés fisiológico extraordinario, ya que por ser *Erwinia carotovora* un microorganismo fitopatógeno, podría sugerirse una regulación de su patogénesis dependiente de la composición química del huésped. A este respecto, cabe recordar que Russel (12), en sus experiencias con remolacha señala que el tratamiento previo con glucosa, fructosa o sacarosa aumenta su resistencia hacia *Peronospora farinosa*, de igual forma que Horton y Keen (5) hacen notar que cuando el contenido en azúcar disminuye en la cebolla, la síntesis enzimática de su patógeno *Pyrenochaeta terrestris* aumenta, decidiendo la aparición rápida de los primeros síntomas de la enfermedad. También Wood (13) ha indicado que los tejidos vegetales ricos en carbohidratos son capaces de reducir la producción de enzimas en algunos de sus patógenos.

Tras estas consideraciones, nos atrevemos a sugerir que la interven-

ción de azúcares en la síntesis de poligalacturonasa por *Erwinia carotovora* puede constituir un factor importante en el curso de la infección vegetal, una vez que la bacteria ha establecido contacto con el posible huésped.

RESUMEN

La bacteria *Erwinia carotovora* sintetiza poligalacturonasa (PG) cuando se cultiva en un medio con pectina como única fuente de carbono. El enriquecimiento de dicho medio con distintos azúcares, o bien no modifica la síntesis de la enzima o, por el contrario, produce un ligero estímulo o inhibición, de acuerdo con la concentración del azúcar añadido.

En presencia de una mezcla de pectina y glucosa, *Erwinia carotovora* manifiesta una clara preferencia en la utilización de glucosa y sólo cuando ésta es agotada inicia la asimilación de pectina, con la consiguiente biosíntesis de la enzima. Pero si la concentración de glucosa es superior a $2,5 \times 10^{-3}$ M, su incorporación al medio de cultivo determina la supresión de síntesis enzimática, y si se añade una vez iniciada ésta, su brusca interrupción.

SUMMARY

Erwinia carotovora synthesizes polygalacturonase (PG) when grown in a medium with pectin as the sole carbon source. The enrichment of this medium with different sugars, either does not change the synthesis of the enzyme or, on the contrary, promotes or inhibits it, according to its concentration.

In the presence of a mixture of pectin and glucose, *Erwinia carotovora* exhibits a strong preference in taking glucose and only when this glucose is used up, starts the assimilation of pectin followed by the synthesis of the enzyme. If the glucose concentration is higher than $2,5 \times 10^{-3}$ M, suppress that synthesis and in the case of being added after the synthesis has started, it stops suddenly.

BIBLIOGRAFIA

1. COHN, M., y HORIBATA, K. 1959. *J. Bacteriol.*, 78, 624-35.
2. DURHAM, N. N., y MCPHERSON, D. L. 1960. *J. Bacteriol.*, 80, 7-13.
3. GALE, E. F. 1943. *Bacteriol. Rev.*, 7, 139-73.
4. GAUMAN, E., y BOHNI, E. 1947. *Helv. Chim. Acta*, 30, 1.591-95.
5. HORTON, J. C., y KEEN, N. T. 1966. *Phytopathology*, 56, 908-16.
6. JANSEN, E. F., y McDONNELL, L. R. 1945. *Arch. Biochem.*, 8, 97-112.
7. KEEN, N. T., y HORTON, J. C. 1966. *Can. J. Microbiol.*, 12, 443-53.
8. MAGASANIK, B. 1961. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26, 249-56.
9. MONOD, J. 1942. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Thèse, deuxième édition. Hermann, París.
10. NEIDARDT, F. C., y MAGASANIK, B. 1957. *J. Bacteriol.*, 73, 253-59.
11. PATIL, S. S., y DIMOND, A. E. 1968. *Phytopathology*, 58, 676-82.
12. RUSSELL, G. E. 1968. *Ann. Appl. Biol.*, 61, 381-86.
13. WOOD, R. K. S. 1955. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 5th., 263-93.

CENTRO DE EDAFOLOGIA DE SALAMANCA (C S I C)

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS EN EL HONGO HIPERPARASITO DE ROYAS *DARLUCA FILUM*

II. Efecto de los factores de crecimiento

por

G. NICOLÁS

INTRODUCCION

En un trabajo anterior de esta serie (7), estudiando la nutrición carbonada y nitrogenada en *Darluca filum* comprobamos que para obtener un buen crecimiento había que añadir siempre al medio base extracto de levadura o bien un complejo vitamínico, y que en su ausencia el crecimiento era mínimo. Este fenómeno parecía indicar que *D. filum* era deficiente para uno o varios factores de crecimiento que no podía sintetizar y que, por lo tanto, necesita que estos sean aportados al medio de cultivo.

Este fenómeno de insuficiencia para ciertos factores de crecimiento es bastante frecuente entre los hongos, sobre todo los parásitos, como es el caso de *Darluca filum*, ya que su especialización por un determinado huésped puede ser debida a que este huésped sintetice estos factores de crecimiento necesarios para su desarrollo.

En este trabajo se estudian los requerimientos de factores de crecimiento en *Darluca filum*.

MATERIAL Y METODOS

Para este estudio se utilizó un cultivo monospórico de *Darluca filum* procedente del Centralbureau voor Schimmelcultures, de Baarn (Ho-

landa). El microorganismo se mantenía por resiembra cada dos o tres semanas en tubos inclinados con medio GAE (glucosa, 10 g; asparagina, 1 g; extracto de levadura, 0,5 g; KH_2PO_4 , 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$, 0,01 g; agar, 20 g, y agua destilada, 1.000 ml). Para todos los experimentos utilizábamos medios líquidos cuya composición era: sales minerales (medio GAE), glucosa 10 g/l y asparagina g/l. A este medio base añadíamos los siguientes factores de crecimiento: tiamina, biotina, ácido p-aminobenzoico, nicotinamida, pantotenato de calcio, piridoxina, inositol, riboflavina y ácido nicotínico; todos a la concentración de 2 mg/l, excepto la biotina que se añadió en una concentración de mg/l. Este medio era ajustado a pH 6,0 con NaOH o HCl, en un pHmetro Beckman. 100 ml de este medio se añadían en matraces de Erlenmeyer de 300 ml, lavados previamente con una mezcla crómica. El inóculo se hacía a partir de una suspensión de micelio que lavábamos varias veces con agua destilada estéril para eliminar los posibles factores de crecimiento que se puedan arrastrar del medio GAE donde manteníamos los cultivos.

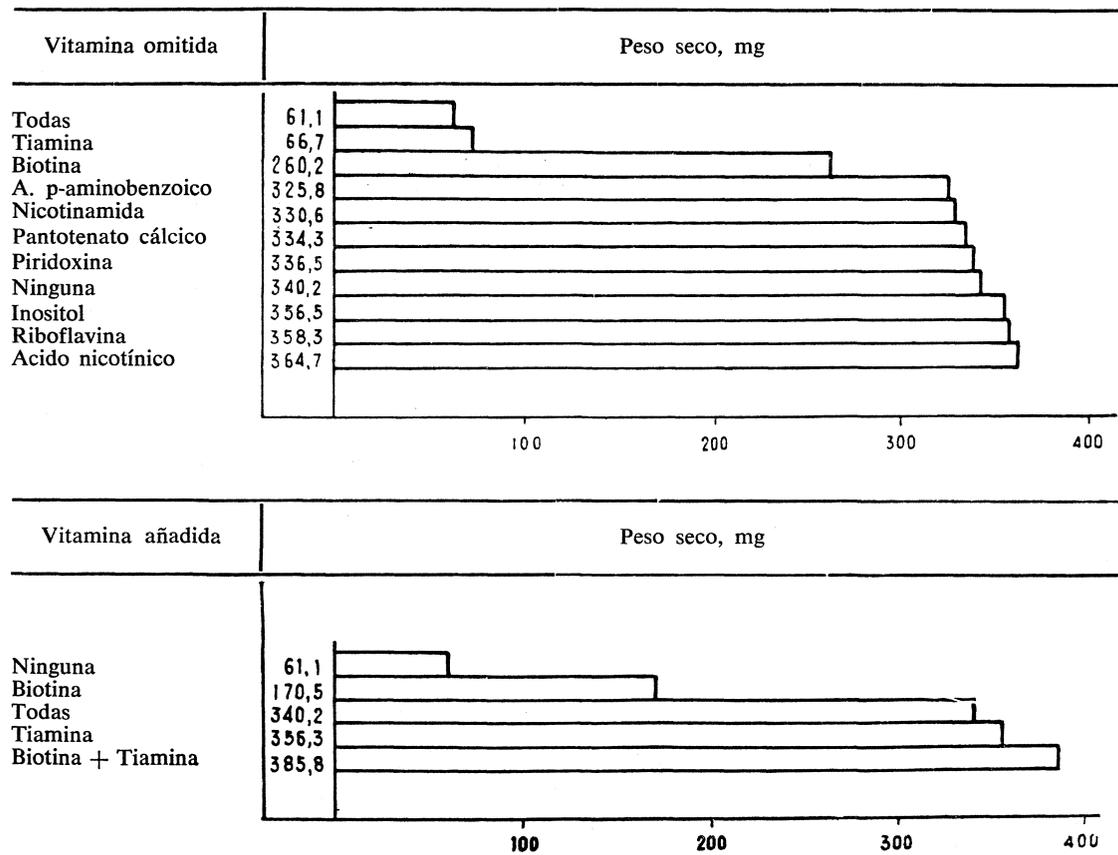
Los cultivos se mantenían siempre en agitación a 28 °C. El período de incubación era de doce días, al cabo de los cuales se determinaba el crecimiento por peso seco del micelio. Todos los resultados son la media de, al menos, tres experimentos.

En los estudios preliminares preparábamos varios medios: uno, con todas las vitaminas añadidas, otro, sin ninguna y una serie en la que colocábamos todas las vitaminas menos una, que omitíamos. En estudios posteriores utilizábamos medios con tiamina y biotina, con tiamina sola y con biotina sola. Para el estudio de la concentración óptima de tiamina establecíamos un gradiente que iba desde 0,002 mg/l hasta 600 mg/l.

Las sales minerales y la glucosa del medio basal se esterilizaban en autoclave durante veinte minutos, a 110 °C. La asparagina y las soluciones de vitaminas se esterilizaban por filtración con filtros Eka y eran añadidas asépticamente al medio base.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fueron utilizadas nueve vitaminas, todas ellas del complejo B, no utilizándose otras aparte de éstas porque, según Lilly y Barnett (6), los factores de crecimiento más a menudo requeridos por los hongos pertenecen al complejo vitamínico B. Los resultados pueden verse en las *figuras 1-2*.



Figuras 1-2. Factores de crecimiento en *Darluca filum*

El hecho de que aparezca algún crecimiento en el control sin vitaminas, puede ser debido a una contaminación de la glucosa o la asparagina; de todas formas, este crecimiento cesa pronto, que es lo que verdaderamente indica una deficiencia para un determinado factor de crecimiento, ya que según Barnett y Lilly (1), la total deficiencia no queda establecida por la ausencia o por un mínimo crecimiento, sino por el hecho de que el crecimiento cese pronto.

a) *Requerimientos de tiamina*

En todas las pruebas que hicimos omitiendo la tiamina del medio de cultivo, observábamos que el crecimiento era muy pobre, semejante al obtenido en el control sin vitaminas; el crecimiento se detiene a los pocos días, lo que nos da una idea de la deficiencia total de *Darluca filum* para esta vitamina.

En un experimento posterior preparábamos un medio en el que la única vitamina añadida fue la tiamina, y observábamos que se producía un crecimiento incluso superior al obtenido con todas las vitaminas, aunque como veremos después, una adición de biotina a este medio aumentaba el crecimiento. Casos de deficiencia total de tiamina análogos al observado por nosotros con *Darluca filum* son frecuentes en la literatura. Leben y Keitt (5), estudiando la nutrición de *Venturia inaequalis*, encuentran una marcada deficiencia para tiamina; a los mismos resultados llegan Swartz y Georg (9) trabajando con *Trichophyton tonsurans*, y Erwin y Katznelson (4) con *Phytophthora cryptogea*.

Una vez establecida la deficiencia total de *Darluca filum* para tiamina, tratamos de estudiar su concentración óptima. Se establecieron una serie de medios con cantidades crecientes de tiamina y se encontró que según íbamos aumentando la cantidad de tiamina también aumentaba el crecimiento, hasta llegar a la concentración de 200 mg/1, en que una mayor cantidad de tiamina ya no aumentaba el crecimiento, permaneciendo éste más o menos estable (*figura 3*). Como puede apreciarse, el requerimiento de tiamina es muy grande y podría tener relación con el fenómeno de

hiperparasitismo observado en este hongo, ya que según Shigo y colaboradores (8), la ausencia o presencia de un determinado factor de crecimiento en el huésped puede variar el grado de parasitismo.

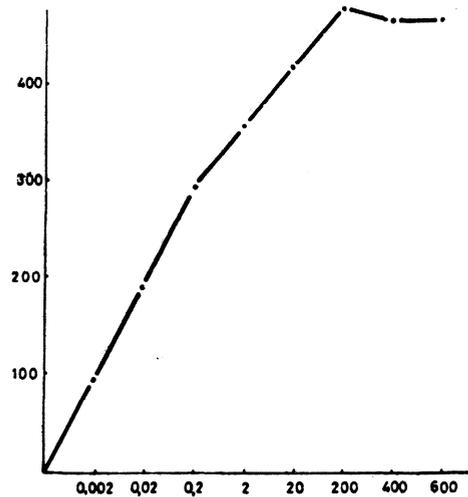


Figura 3. Concentración óptima de tiamina

b) Requerimiento de biotina

En los medios en que la biotina era omitida observábamos que el crecimiento, aunque bueno, siempre era inferior al obtenido con todas ellas u omitiendo alguna a excepción de la tiamina. Para comprobar si la deficiencia era total o simplemente una deficiencia parcial, preparábamos un medio en el que la única vitamina añadida era la biotina (figuras 1-2) y otro medio con tiamina + biotina; se observaba que en el medio con biotina solo el crecimiento era bastante malo, y que al ponerla con tiamina el crecimiento era superior que cuando la tiamina iba sola. Estos resultados parecen indicar que *Darlúca filum* tiene sólo una deficiencia parcial para biotina. Este es un fenómeno bastante frecuente en los hongos, ya que casi siempre las deficiencias para tiamina y biotina van juntas. Barnett y Lilly (2) dan una lista de hongos en la que la deficiencia total o parcial de biotina va acompañada por una deficiencia total en tiamina.

c) *Requerimiento de otros factores de crecimiento*

Con las restantes vitaminas no observábamos ningún efecto beneficioso en el crecimiento, ya que en los medios en que se omitía alguno de estos factores de crecimiento, el desarrollo era casi el mismo que con todas las vitaminas. En algunos de los medios ensayados observábamos que el crecimiento aumentaba con respecto al medio que llevaba todas las vitaminas; esto ocurría cuando omitíamos el inositol, riboflavina y el ácido nicotínico. Esto pudiera ser debido a que estas vitaminas tuvieran un efecto tóxico en el crecimiento. Un fenómeno parecido a éste es el descrito por Beckman y Riker (3): trabajando con *Chalara quercina* encuentran que si quitaban la riboflavina del medio, el crecimiento aumentaba.

A la vista de estos resultados podemos decir que *Darluka filum* se comporta respecto a los factores de crecimiento como un hongo parásito típico.

RESUMEN

Este trabajo muestra el efecto de los factores de crecimiento en el desarrollo de *Darluka filum*. Este hongo parece ser completamente deficiente para tiamina, mientras que sólo es parcialmente deficiente para biotina. Se estudia también la concentración óptima de tiamina. Inositol, riboflavina y ácido nicotínico parecen tener un efecto tóxico sobre el crecimiento de *D. filum*.

SUMMARY

This article shows the effect of the growth factors in the nutrition of *Darluka filum*. This fungi seems to be completely deficient for thiamine, whereas it is only partially deficient for biotin. The optimal concentration of thiamine is also studied. Inositol, riboflavin and nicotinic acid seems to have a toxic effect in the growth of *D. filum*.

BIBLIOGRAFIA

1. BARNETT, L. H., y LILLY, V. J. 1947. *Mycologia*, 39, 699.
2. BARNETT, L. H., y LILLY, V. J. 1951. *Phytopathology*, 41, 327.
3. BECKMAN, C. H., y RIKER, A. J. 1953. *Phytopathology*, 43, 441.
4. ERWIN, D. C., y KATZNELSON, C. D. 1961. *Can. J. Microbiol.*, 7, 15.
5. LEBEN, C., y KEITT, G. W. 1948. *Am. J. Botany*, 35, 337.
6. LILLY, V. G., y BARNETT, L. H. 1947. *Am. J. Botany*, 34, 131.
7. NICOLÁS, G., y VILLANUEVA, J. R. 1965. *Mycología*, 57, 782.
8. SHIGO, A. L.; ANDERSON, C. D., y BARNETT, L. H. 1961. *Phytopathology*, 51, 616.
9. SWARTZ, H. E., y GEORG, L. K. 1955. *Mycologia*, 47, 475.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

INFLUENCIA DEL INOCULO EN EL CRECIMIENTO DE *CITROBACTER INTERMEDIUM* C₃ EN CULTIVO DISCONTINUO

por

R. CLOTET

Citrobacter intermedium C₃ acumula aminoácidos durante el crecimiento en un medio con sal amónica como única fuente de nitrógeno (2). Al estudiar las condiciones de cultivo que resultan más favorables para la segregación de aminoácidos se llegó al conocimiento de que el crecimiento total no es independiente del inóculo, contrariamente a lo previsto en la ecuación general del crecimiento bacteriano (3).

En el presente trabajo se examina cuantitativamente la relación entre el inóculo, el crecimiento total y la velocidad de multiplicación en la referida cepa bacteriana.

1. MATERIAL Y METODOS

1.1. Medio de cultivo

Constituido por glucosa (20 g/l), CINH₄ (14 g/l), PO₄H₂K (1 g/l), SO₄Mg (0,5 g/l) y CO₃Ca (5 g/l) esterilizado separadamente (medio M1-14) (3).

El inóculo se prepara con el mismo medio o en otro cuya concentración de cloruro amónico es de 7 g/l (medio M1). En ambos casos no se utiliza carbonato cálcico para estabilizar el pH del medio.

1,2. Medida de crecimiento

Por peso seco del residuo celular a 105 °C (3).

1,3. Condiciones de crecimiento

Se ha realizado en tubos de 20 × 200 mm, conteniendo 10 ml de medio, incubado a 30 °C, y con una agitación cada doce horas que suponga un coeficiente de transporte de oxígeno de 0,07 mM/l min (3).

En todos los casos, el inóculo se incuba cuarenta y ocho horas a 30 °C. La cantidad de material celular inoculado se expresa en gramos de peso seco/litro de desarrollo, y se llama *iniciador*.

2. RESULTADOS

Curvas de crecimiento obtenidas con distintos iniciadores preparados en medios M1 y M1-14 se tabulan en los *cuadros 1-2*.

Por crecimiento previo en agar-M1 y en frasco de Roux (noventa y seis horas a 30 °C) se ha preparado una suspensión en Ringer 1/4 de *Citrobacter intermedium* C₃. 5 ml de esta suspensión sirven de inóculo (380×10^{-3}) a medio M1-14 elaborado previamente de tal forma que los componentes establecidos para los 10 ml estén contenidos en 4 ml, añadiendo a continuación 1 ml con la suspensión de carbonato cálcico correspondiente. El crecimiento obtenido se da en el *cuadro 1*.

A las setenta y dos horas se centrifuga y esteriliza el sobrenadante por filtración. Este medio es prácticamente M1-14 debido al escaso crecimiento, pero ha estado en contacto con una abundante masa de *Citrobacter intermedium* C₃ durante setenta y dos horas.

Se realiza un subcultivo, en las condiciones tipo descritas, en este medio y en medio M1-14. El iniciador usado ha sido de $0,92 \times 10^{-3}$ g/l, y los resultados obtenidos están tabulados en el *cuadro 3*.

Cuadro 1. Crecimiento (expresado en g/l de peso seco) de C. intermedium C₃ en medio M1-14 con carbonato, con iniciadores distintos preparados en medio M1

Horas	Iniciador					
	$0,3 \times 10^{-3}$	$1,04 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,53 \times 10^{-3}$	$3,82 \times 10^{-3}$	380×10^{-3}
24				0,300	0,240	0,400
48	0,450	0,440	0,460	0,400	0,270	
72						0,450
96			0,535			
120	0,590	0,580		0,560	0,510	
168	0,580	0,625	0,640			0,470

Cuadro 2. Crecimiento (expresado en g/l de peso seco) de C. intermedium C₃ en medio M1-14 con carbonato, con iniciadores distintos preparados en M1-14

Horas	Iniciador					
	$0,06 \times 10^{-3}$	$0,61 \times 10^{-3}$	$0,82 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$2,14 \times 10^{-3}$
24	0,220	0,280	0,225	0,210	0,245	0,240
48	0,500	0,515	0,430	0,320	0,440	0,310
96	0,450	0,500			0,535	0,420
120			0,550	0,460		
168	0,610	0,585			0,570 (144 h)	0,500
192			0,645	0,580		

Cuadro 3. Crecimiento (expresado en g/l de peso seco) de C. intermedium C₃ en M1-14 que previamente ha contenido su material celular

Horas	Crecimiento en M1-14 normal	Crecimiento en M1-14 incubado con material celular de <i>C. intermedium</i> C ₃
24	0,280	0,010
72	0,415	0,020
144	0,520	0,130

3. DISCUSION

De los *cuadros 1-2* se deduce que sistemáticamente un iniciador más alto produce un crecimiento menor, sea en el valor obtenido o en la velocidad.

Durante la fase logarítmica:

$$R = \frac{\log \frac{X_n}{X_o}}{t \log 2} \quad (k)$$

X_n, número de bacterias después de n generaciones; X_o, número de bacterias iniciales; n, número de generaciones, y R, velocidad de multiplicación.

En el supuesto de que la masa de la bacteria permanece constante en el intervalo estudiado, se puede substituir la relación de número por la de masas, por lo que (k) se expresará:

$$R = \frac{\log \frac{M_n}{M_o}}{t \log 2} \quad (k')$$

Con los datos de los *cuadros 1-2* y (k') se han calculado los valores de R consignados en los *cuadros 4-5*.

Cuadro 4. Velocidad de multiplicación $\frac{\log \frac{M_n}{M_o}}{t \log 2}$ de *C. intermedium* C_3 en medio MI-14 con carbonato con masa inicial distinta preparada en MI

Horas	Iniciador (Mo)						
	$\times 10^{-3}$	0,3	1,04	1,1	1,53	3,82	380
24					0,317	0,249	0,0029
48		0,220	0,182	0,181	0,162	0,128	
72							0,0035
96				0,093			
120		0,091	0,076		0,071	0,059	
168		0,065	0,057	0,054			0,0018

Cuadro 5. Velocidad de multiplicación $\frac{\log \frac{M_n}{M_o}}{t \log 2}$ de *C. intermedium* C_3 en medio MI-14 con carbonato con masa inicial distinta preparada en MI-14

Horas	Iniciador (Mo)						
	$\times 10^{-3}$	0,06	0,61	0,82	1,02	1,1	2,14
24		0,493	0,370	0,338	0,320	0,325	0,284
48		0,270	0,202	0,188	0,173	0,180	0,149
96		0,134	0,101			0,093	0,080
120				0,078	0,073		
168		0,079	0,059			0,062 (144 h)	0,047
192				0,050	0,048		

Las figuras 1-2 permiten admitir que las funciones $R = f(t)$ en ambos casos se rectifican utilizando coordenadas logarítmicas. Las curvas obtenidas poseen todas aparentemente la misma pendiente, con distinta ordenada en el origen que depende del inóculo.

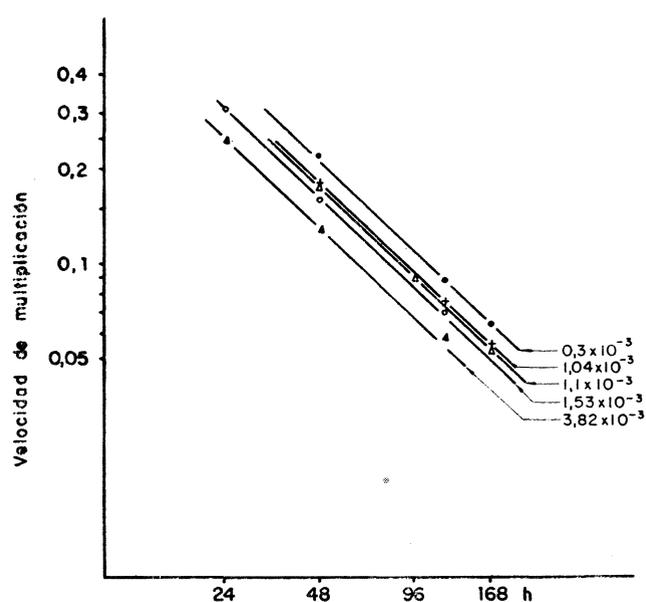


Figura 1. Velocidad de multiplicación de *C. intermedium* C_3 en medio M1-14, con carbonato, con masas iniciales preparadas en M1, en función del tiempo, expresadas las variables en coordenadas logarítmicas

$R = f(t)$ toma, pues, en el intervalo estudiado la expresión:

$$\log R = a + \alpha \log t (m)$$

Para confirmar su aparente paralelismo se han determinado los respectivos valores de α y el posible grado de significación entre las dos series (cuadro 6).

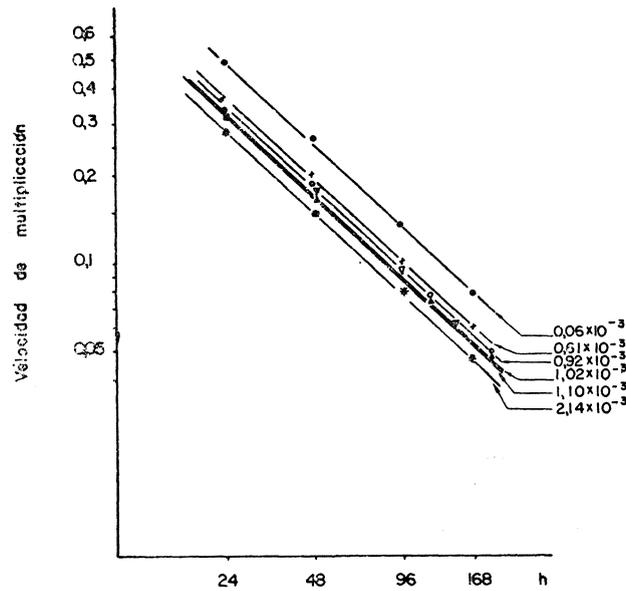


Figura 2. Velocidad de multiplicación de *C. intermedium* C₃ en medio M1-14, con carbonato, con masas iniciales preparadas en M1-14, en función del tiempo, expresadas las variables en coordenadas logarítmicas

Cuadro 6. Valores α para las distintas curvas de las figuras 1-2

Figura 1 (Iniciador en M1)		Figura 2 (Iniciador en M1-14)	
Mo	α	Mo	α
$0,30 \times 10^{-3}$	-0,973	$0,06 \times 10^{-3}$	-0,940
$1,04 \times 10^{-3}$	-0,926	$0,61 \times 10^{-3}$	-0,943
$1,10 \times 10^{-3}$	-0,948	$0,82 \times 10^{-3}$	-0,912
$1,53 \times 10^{-3}$	-0,942	$1,02 \times 10^{-3}$	-0,917
$3,82 \times 10^{-3}$	-0,895	$1,10 \times 10^{-3}$	-0,925
		$2,14 \times 10^{-3}$	-0,925

Para los 9 grados de libertad existentes, el valor hallado (0,703) es el valor de t correspondiente a una probabilidad del 50 %. Las dos series de

valores de α se hallan en una misma ecuación empírica. En consecuencia, la concentración de cloruro amónico sobre la que se ha obtenido el iniciador, no ejerce ninguna influencia sobre la pendiente de la ecuación que describe el crecimiento de *Citrobacter intermedium* C₃ en M1-14.

Se toma para el valor de α de (m) el promedio de las dos series (cuadro 6): $\alpha = -0,93$.

Con lo cual:

$$\log R = a - 0,93 \log t$$

o bien:

$$R = A t^{-0,93}$$

siendo $A = 10^a$

a es una constante (ordenada en el origen) que depende del inóculo, es decir, de la masa bacteriana inicial (M₀).

Intentando encontrar una posible relación entre a y M₀ se han determinado los distintos valores de a para cada M₀, ya que en cada caso:

$$a = \log R - 0,93 \log t$$

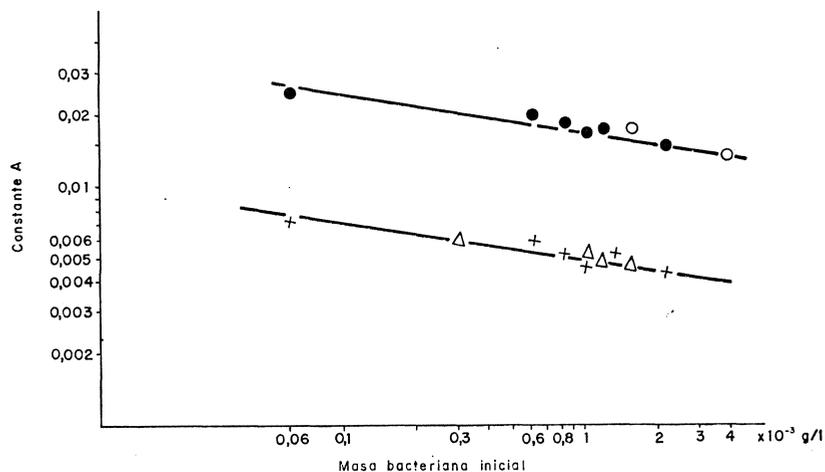


Figura 3. Influencia del iniciador sobre la velocidad de crecimiento. Constante A en función de la masa bacteriana inicial para las veinticuatro y cuarenta y ocho horas de crecimiento de *C. intermedium* C₃ en M1-14, con carbonato, con iniciadores desarrollados en M1 y M1-14. Iniciador en M1: 0,24 h; Δ, 48 h. Iniciador en M1-14: ●, 24 h; +, 48 h.

Se ha calculado la ordenada en el origen tomando los valores correspondientes a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas. Expresando gráficamente los valores de A en función de Mo para las dos series en coordenadas logarítmicas se observa una función lineal (*figura 3*). Se han incluido los valores de A a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas para comprobar cuidadosamente la total superposición de valores en las dos series, ya que a las veinticuatro horas los datos son escasos. Comprobada esta total identidad, se toma como ordenada en el origen los valores de A a las veinticuatro horas y además se observa que de forma general el fenómeno es independiente del medio en que se ha desarrollado el inóculo.

Por tanto, para *Citrobacter intermedium* C₃ el crecimiento en M1-14 iniciado con un inóculo desarrollado indistintamente en M1 ó M1-14, y entre las veinticuatro y ciento sesenta y ocho horas, vendrá dado por el sistema:

$$\left. \begin{array}{l} R t^{0,93} = A \\ A Mo^\gamma = K \end{array} \right\} \text{ (n)}$$

siendo γ la pendiente de la ecuación de la *figura 3*.

El valor de γ viene dado por:

$$\log A = \log K + \gamma \log Mo$$

y tomando los valores correspondientes resulta

$$\gamma = -0,153 \quad \text{y} \quad K = 0,93$$

El sistema de ecuaciones (n) se transforma en:

$$\boxed{R Mo^{0,153} t^{0,93} = 0,039} \quad \text{(p)}$$

relación general, válida para el crecimiento de *Citrobacter intermedium* C₃ en M1-14 entre las veinticuatro y ciento sesenta y ocho horas.

La ecuación (p) permite llegar a la conclusión de que la velocidad de multiplicación R de *Citrobacter intermedium* C₃ creciendo en M1-14 con carbonato disminuye con el valor del inóculo y con el tiempo de incubación, en ambos casos en forma potencial. De hecho, R sólo puede disminuir si la fracción de bacterias que se divide es cada vez más pequeña, si

el tiempo absoluto de división es cada vez mayor o si la fracción de células que mueren o se hacen inviables es cada vez mayor. Las tres posibilidades son, desde el punto de vista operativo, equivalentes, pero todas ellas concordantes con la presencia de una sustancia tóxica en el medio cuya concentración sea proporcional al número de bacterias presentes en cada instante y al tiempo de permanencia de estas bacterias en el medio. Esta interpretación viene confirmada por el efecto inhibitorio obtenido con un medio filtrado en el que previamente se ha incubado una cantidad suficientemente grande de células para que prácticamente no haya crecimiento (*cuadro 3*). El efecto de M_0 y t sobre la velocidad de multiplicación es entonces independiente de la presencia misma de las células y por tanto consecuencia de un factor tóxico liberado al medio.

Examinando la curva de crecimiento durante los valores de t para los que se ha verificado (p), puede observarse que comprenden la fase logarítmica y la transición a la estacionaria. Entonces cabría pensar en la posibilidad de que la ecuación (p) tenga un carácter mucho más general, representando la expresión matemática de la fase de transición en función de sustancias tóxicas como causas del paro del crecimiento en el cultivo discontinuo.

La influencia del tamaño del inóculo sobre el tiempo medio de generación y el crecimiento total ha sido considerado recientemente por varios autores, sobre la base de la formación de sustancias inhibitorias solubles. Tal es el caso del modelo de Ramkrishna (5) para cultivo continuo y discontinuo, si bien posteriormente incluye además la influencia del metabolismo endógeno (6). Las sustancias inhibitorias del crecimiento pueden producirse como consecuencia de un medio de crecimiento con algún componente en proporción desequilibrada frente a las necesidades nutritivas del organismo (6).

Horvath (4), estudiando las condiciones de crecimiento de *Bacillus subtilis* 168 encuentra que el tamaño del inóculo aumenta el tiempo de generación y disminuye el crecimiento total, como ya habían señalado Burkholder y Giles (1). Las curvas que relacionan el tiempo de generación en función del tiempo de cultivo para distintos inóculos consignados por Horvath son superponibles a las 1-2, si bien se refieren a una escala de tiempos mucho más pequeña.

RESUMEN

En *Citrobacter intermedium* C₃ que acumula aminoácidos durante el crecimiento en un medio con sal amónica como única fuente de nitrógeno, se observa que el crecimiento total, C, y la velocidad de multiplicación, R, no es independiente del inóculo, Mo.

Se realizan varias determinaciones de C por peso seco con distintos Mo, ya sea en medio de crecimiento e inóculo, glucosa-sales amónicas, con 7 g/l de cloruro amónico, ó 14 g/l.

Los valores de R son función logarítmica del tiempo de incubación, t, y con un valor de α en coordenadas semilogarítmicas independiente de la concentración de cloruro amónico en el que se ha desarrollado el inóculo. Por otro lado, la ordenada en el origen de $R = f(t)$, A, es, a su vez, función logarítmica de Mo e independiente de la concentración de cloruro amónico en el medio de desarrollo del inóculo.

De todo ello se deduce la ecuación:

$$R Mo^{0,153} t^{0,93} = 0,039 \quad (p)$$

válida para el crecimiento de *Citrobacter intermedium* C₃ en medio glucosa/sales amónicas entre las veinticuatro y ciento sesenta y ocho horas, siendo independiente de la concentración de cloruro amónico en el medio de inóculo.

La disminución de R al aumentar Mo puede explicarse por la presencia de una sustancia tóxica en el medio cuya concentración sea proporcional al número de bacterias presentes en cada instante y a t. Se confirma esta hipótesis por el efecto inhibitor obtenido con un medio filtrado en el que previamente se ha incubado una cantidad suficientemente grande de células para que prácticamente no haya crecimiento. La ecuación (p) puede ser la expresión matemática de la fase logarítmica y de transición a la estacionaria en presencia de sustancias tóxicas que determinen el paro del crecimiento en cultivo discontinuo.

SUMMARY

Citrobacter intermedium C₃ what accumulates amminoacids during the growing in glucose-amonium salts medium, hasn't the total growth (C) and the multiplication rate (R) independent of the inocula (Mo). Different

determinations of C was doing at different Mo developed in glucose-ammonium salts medium, as at 7 g/l as 14 g/l NH₄Cl.

The R values are logarithmic function of the incubation time (t), and with the α value, in semilogarithmic coordinate axes, independent of the ammonium salt in the inocula. On the other hand, the origin ordinate of $R = f(t)$, A, is also logarithmic function of Mo and independent of the ammonium salt in the medium of inocula. It can put in the mathematical expression:

$$R \cdot Mo^{0,153} t^{0,93} = 0,039 \text{ (p)}$$

valid for the growing (between 24 and 168 hours) of *Citrobacter intermedium* C₃ in glucose-ammonium salts medium.

(p) suggests the presence of toxic substances in the medium, proportional to the total number of bacteria and t. It's confirmed for the inhibitor effect obtained with a filtered medium incubated previously with a big number of microorganisms. (p) can be also the equation what describes the logarithmic and stationary phase by action of toxic substances what would determine the stop of growing in discontinuous culture.

BIBLIOGRAFIA

1. BURKHOLDER, P. R., y GILES, N. H. 1947. Am. J. Botany, 34, 345.
2. CLOTET, R.; GUINEA, J., y PARES FARRÁS, R. 1968. Microbiol. Españ., 21, 155.
3. CLOTET, R.; GUINEA, J., y PARES-FARRÁS, R. 1969. Rev. Españ. Fisiol., 25, 41.
4. HORVATH, S. 1967. J. Gen. Microbiol., 48, 215.
5. RAMKRISHNA, D. 1965. Models for the dynamics of microbial growth. Ph. D. Thesis. University of Minnesota, Minneapolis.
6. RAMKRISHNA, D.; FREDRICKSON, A. G., y TSUCHIYA, H. M. 1966. J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), 12, 311.

II CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Se ha celebrado este Congreso en Madrid, en la sede del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, durante los días 20 a 22 de noviembre; fue organizado por la Sociedad de Microbiólogos Españoles y el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, y presidido por el Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad. Se pronunciaron cuatro conferencias, a cargo de los profesores Rafael Gómez Lus (Universidad de Zaragoza), Gonzalo Piédrola Gil (Universidad de Madrid), Julio Rodríguez Villanueva (Universidad de Salamanca) y Lorenzo Vilas López (Universidad de Madrid), y se presentaron más de un centenar de comunicaciones, distribuidas en las secciones siguientes: Fisiología Microbiana y Biología Molecular, Virus, Microbiología General, Inmunología y Microbiología de Patógenos, y Antibióticos.

La Secretaría del Congreso ha recogido en una publicación los resúmenes de las conferencias y comunicaciones.

JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD

El día 22 de noviembre, dentro del marco del Congreso anterior, se celebró una Asamblea General de la Sociedad de Microbiólogos Españoles en la que se llevó a cabo el escrutinio de los votos recibidos para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva. Como resultado de la elección, la Junta ha quedado constituida de la siguiente forma:

Presidente: Dr. Gonzalo Urgoiti Somovilla

Vicepresidente: Prof. Agustín Pumarola Busquets

Secretario: Dr. Julio Pérez Silva

Tesorero: Dr. Enrique Feduchy Mariño

Bibliotecario: Dr. Alvaro Zugaza Bilbao

Vocal: Prof. Vicente Callao Fabregat

Vocal: Dr. Andrés Chordi Corbo

II CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Se ha celebrado este Congreso en Madrid, en la sede del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, durante los días 20 a 22 de noviembre; fue organizado por la Sociedad de Microbiólogos Españoles y el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, y presidido por el Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad. Se pronunciaron cuatro conferencias, a cargo de los profesores Rafael Gómez Lus (Universidad de Zaragoza), Gonzalo Piédrola Gil (Universidad de Madrid), Julio Rodríguez Villanueva (Universidad de Salamanca) y Lorenzo Vilas López (Universidad de Madrid), y se presentaron más de un centenar de comunicaciones, distribuidas en las secciones siguientes: Fisiología Microbiana y Biología Molecular, Virus, Microbiología General, Inmunología y Microbiología de Patógenos, y Antibióticos.

La Secretaría del Congreso ha recogido en una publicación los resúmenes de las conferencias y comunicaciones.

JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD

El día 22 de noviembre, dentro del marco del Congreso anterior, se celebró una Asamblea General de la Sociedad de Microbiólogos Españoles en la que se llevó a cabo el escrutinio de los votos recibidos para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva. Como resultado de la elección, la Junta ha quedado constituida de la siguiente forma:

Presidente: Dr. Gonzalo Urgoiti Somovilla

Vicepresidente: Prof. Agustín Pumarola Busquets

Secretario: Dr. Julio Pérez Silva

Tesorero: Dr. Enrique Feduchy Mariño

Bibliotecario: Dr. Alvaro Zugaza Bilbao

Vocal: Prof. Vicente Callao Fabregat

Vocal: Dr. Andrés Chordi Corbo

Vocal: Dr. José Manuel Gómez Jiménez de Cisneros

Vocal: Prof. Sebastián Miranda Entrenas

Vocal: Dr. Antonio Portolés Alonso

Vocal: Prof. Julio Rodríguez Villanueva

Vocal: Dr. Fernando Ruiz-Falcó López

Vocal: Prof. Juan Santa María Ledochowski

BIBLIOGRAFIA

TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN BIOLOGÍA, por *Rafael González-Santander*. 1969. Aguilar, S. A. de Ediciones, Madrid. XL + 666 páginas y 102 ilustraciones.

La Microscopía Electrónica se ha convertido, sin duda, en una de las técnicas auxiliares más eficaces para la investigación en campos tan dispares como la Metalurgia, Física y Química y la Biología; en esta última, donde se centra fundamentalmente el libro del Dr. González-Santander, gracias a las nuevas técnicas de preparación de materiales, se ha conseguido un extraordinario desarrollo. Todas estas técnicas son descritas con extraordinaria minuciosidad, lo que hace que la obra sea de gran interés práctico para todos aquellos que se dediquen a estos problemas.

El libro está dividido en seis capítulos y tres apéndices. En el primer capítulo, o introducción, se pone de manifiesto la importancia de la Microscopía Electrónica en Biología, una relación de todos los microscopios electrónicos instalados en España y algunos datos sobre el desarrollo de la investigación ultraestructural en nuestra patria. En los demás capítulos se estudia ordenadamente el proceso de tratamiento de los materiales, desde la toma de muestras hasta el momento de la observación al microscopio electrónico. La dilatada experiencia del autor en este campo, hace que describa hasta los más mínimos detalles de los métodos, pues sabe la gran importancia que éstos tienen, y todo ello con la máxima claridad de exposición que, además, ayuda con numerosos gráficos, por lo que resulta un manual imprescindible para el que quiera adentrarse en el campo de la Microscopía Electrónica en Biología.

M. RUBIO-HUERTOS

MYCOPLASMA DISEASES OF MAN (Compendio de los trabajos presentados al Simposio Internacional de Reinhardsbrunn Castle, 2-6 de octubre de 1968). Directores: *Martin Sprössig* y *Wolf Witzleb*. 1969. Veb Gustav Fischer Verlag, Jena. 356 páginas y 66 ilustraciones.

Las enfermedades producidas por micoplasmas en el hombre tienen cada día mayor importancia clínica, ya que gran parte de las enfermeda-

des atípicas del aparato respiratorio y del urinario son producidas por ellas, y sobre todo si tenemos en cuenta que la mayoría de los micoplasmas son resistentes a muchos de los antibióticos empleados corrientemente.

Los trabajos de este simposio son todos de directa aplicación clínica y por ello creemos que sean de gran utilidad al especialista, en particular para aquellos servicios hospitalarios donde, dado un número de pacientes elevado, se presenten con frecuencia casos de estas enfermedades atípicas y rebeldes a los tratamientos convencionales.

M. RUBIO-HUERTOS

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA HIGIENE DE LOS ALIMENTOS. Informe de un Comité de Expertos de la OMS reunido con participación de la FAO. 1968. Organización Mundial de la Salud, Serie de Informes Técnicos, núm. 399, Ginebra. 71 páginas.

Después de exponer los últimos adelantos realizados en microbiología de los alimentos, especialmente en materia de salmonelas, *Clostridium botulinum* y otras bacterias, virus y rickettsias, el informe estudia las micotoxinas y los parásitos animales de importancia desde el punto de vista de la higiene de los alimentos.

En la parte del informe correspondiente a la tecnología de la higiene de los alimentos, se exponen los diferentes métodos de conservación y se señalan los riesgos inherentes a una elaboración o un envase defectuosos, dedicando especial atención a los artículos que pueden ser particularmente peligrosos, por ejemplo, la carne y sus derivados, los alimentos preparados y listos para el consumo, pero sin esterilizar, y los productos crudos.

Finalmente se formulan recomendaciones sobre los métodos de muestreo y de laboratorio, y sobre el establecimiento de normas microbiológicas para alimentos. El informe termina con una lista de recomendaciones sobre los estudios que conviene emprender. En forma de anexo se ha incluido una selección bibliográfica sobre microbiología de los alimentos.

En resumen, un manual práctico de gran interés para los cultivadores de este campo de la Higiene.

Depósito legal: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid

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