VOLUMEN 23. 1970 OCTUBRE - DICIEMBRE. NUMERO 4

Microbiología Española

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

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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

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

MICROBIOLOGIA
ESPAÑOLA

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

Vicedirectores: Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

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

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

INDICE

Página

Aislamiento de bacterias halófilas estrictas proteolíticas, de muestras de sal común, por *Cándida González* y *Carmen Gutiérrez.* 223

Especies de *Propionibacterium* relacionadas con la "zapatería". Factores que influyen en su desarrollo, por *F. González-Cancho, M. Nosti-Vega, M. J. Fernández-Díez* y *N. Buzcu* 233

Chemical and physiological changes in fungi during autolysis. XI. The exponential law in the induced autolysis of *Aspergillus terreus,* by *R. Lahoz, F. Reyes, R. Beltrá, Juana González-Ibeas, Ana M.ª Ballesteros* and *Magdalena Miralles* 253

Contribución al estudio *in vitro* de la mineralización bacteriana de fosfatos, por *J. M. Barea, A. Ramos* y *V. Callao* 257

Influence of some pesticides on *Azotobacter,* by *Isabel Gil, J. Morales, A. Martín, C. Ruano* and *F. Aragonés* 271

Estudio de la acción conjunta de cloranfenicol y framicetina, por *F. Guerrero, A. Giráldez* y *A. Hosta* 279

X Congreso Internacional de Microbiología, por *R. de Vicente-Jordana* 297

Trabajos de autores españoles en el Congreso de Méjico 303

Simposio sobre Fermentación 305

Nuevo Departamento 305

Cambio de nombre de la Sociedad 305

Curso sobre Microbiología de los Alimentos 305

Cursos en la Universidad de Salamanca 306

VOLUMEN 23. 1970

Microbiología Española

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

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 Española de Microbiología.

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Difusión y 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

Aragonés, F.: véase *Gil,* Isabel 271

Ballesteros, Ana M.ª: véase *Lahoz,* R. 253

Barea, J. M.; *Ramos,* A., y *Callao,* V.: Incidencia de gérmenes mineralizadores de fosfatos en suelo de vega y secano de la provincia de Granada 149

Barea, J. M.; *Ramos,* A., y *Callao,* V.: Contribución al estudio *in vitro* de la mineralización bacteriana de fosfatos 257

Beltrá, R.; *Marcilla,* Pilar; *Rodríguez de Lecea,* Josefina, y *Rosa,* Carmen de la: Estudio comparativo de la formación y biogénesis del ácido beta-indolacético por *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas L fijas 1

Beltrá, R.: véase *Lahoz,* R. 253

Buzcu, N.: véase *González-Cancho,* R. 233

Calonge, F. D.: Determinación cualitativa de aminoácidos y azúcares libres en hoja de cebada sana e infectada con la roya ... 195

Callao, V.: véase *Barea,* J. M. ... ... 149 y 257

Cambio de nombre de la Sociedad 305

Campo, J. del: Alejandro Otegui Vicandi (†) 69

Congreso Internacional de Micología 71

Congreso de Virología 157

Curso sobre Microbiología de los Alimentos 305

Cursos en la Universidad de Salamanca 306

Fernández, F.: Valoración de cloranfenicol con *Bacillus cereus.* 107

Fernández-Díez, M. J.: véase *González-Cancho,* F. 233

Foz, A.: Estudios sobre la estandardización de las reacciones serológicas utilizadas para el diagnóstico de la brucelosis 159

Gil, Isabel; *Morales,* J.; *Martín,* A.; *Ruano,* C., and *Aragonés,* F.: Influence of some pesticides on *Azotobacter* 271

Gil-Fernández, Carmen: Sensibilidad de la cepa "Ferrán", de células de riñón de cerdo, a su infección por virus 203

Gil-Fernández, Carmen: véase *Ronda-Laín,* Concepción 61

Gil-Fernández, Carmen, y *Vilas-Minondo,* Pilar: Establecimiento de dos cepas de células de riñón de cerdo 23

Giráldez, A.: véase *Guerrero,* F. 279

González, Cándida y *Gutiérrez,* Carmen: Aislamiento de bacterias halófilas estrictas proteolíticas, de muestras de sal común ... 223

González-Cancho, F.; *Nosti-Vega,* M.; *Fernández-Díez,* M. J., y *Buzcu,* N.: Especies de *Propionibacterium* relacionadas con la "zapatería". Factores que influyen en su desarrollo 233

González-Ibeas, Juana: véase *Lahoz,* R. 253

Guerrero, F.; *Giráldez,* A., y *Hosta,* A.: Estudio de la acción conjunta de cloranfenicol y framicetina 279

Guinea, J.: Análisis colonial de la producción de ácido glutámico por *Citrobacter intermedium* C_3 13

Gutiérrez, Carmen: véase *González,* Cándida 223

Hernández, S.: Heterogeneidad colonial de *Citrobacter intermedium* C_3, en relación con la segregación de alanina 139

Hosta, A.: véase *Guerrero,* F. 279

Lahoz, R.; *Reyes,* F.; *Beltrá,* R.; *González-Ibeas,* Juana; *Ballesteros,* Ana M.ª, and *Miralles,* Magdalena: Chemical and physiological changes in fungi during autolysis. XI. The exponential law in the induced autolysis of *Aspergillus terreus* 253

Manrique, Sara: véase *Sánchez-Marroquín,* A. ... ... 113 y 127

Marcilla, Pilar: véase *Beltrá,* R. 1

Martín, A.: véase *Gil,* Isabel 271

Miralles, Magdalena: véase *Lahoz,* R. 253

Morales, J.: véase *Gil,* Isabel 271

Nosti-Vega, M.: véase *González-Cancho,* F. 233

Nuevo Departamento 305

Ramos, A.: véase *Barea,* J. M. ... ... 149 y 257

Reyes, F.: véase *Lahoz,* R. 253

Página

Rodríguez de Lecea, Josefina: véase *Beltrá,* R. 1

Rodríguez-Rebollo, M.: véase *Santaolalla,* M. 179

Ronda-Laín, Concepción, and *Gil-Fernández,* Carmen: Plaque assay in Petri dishes in the absence of CO_2 atmosphere 61

Rosa, Carmen de la: véase *Beltrá,* R. 1

Ruano, C.: véase *Gil,* Isabel 271

Sánchez-Marroquín, A.; *Manrique,* Sara, y *Vierna,* Lilia: Producción de riboflavina por *Eremothecium ashbyii* Guilliermond en jugo de *Agave* 113

Sánchez-Marroquín, A.; *Manrique,* Sara, y *Vierna,* Lilia: Producción de riboflavina por *Ashbya gossypii* (Ashby & Nowell) Guill. en jugo de *Agave* sp. 127

Santaolalla, M., y *Rodríguez-Rebollo,* M.: Ultraestructura y composición química de las paredes celulares del *Micrococcus morrhuae,* halófilo obligado 179

Simposio sobre Antibióticos 71

Simposio sobre Fermentación 305

Trabajos de autores españoles en el Congreso de Méjico 303

Vela, Amparo: Ultraestructura de hojas de *Calendula officinalis* infectadas por un virus anisométrico 47

Ventín, M.: Esterilización de materiales plásticos por radiaciones ultravioletas 73

Vicente-Jordana, R. de: X Congreso Internacional de Microbiología 297

Vierna, Lilia: véase *Sánchez-Marroquín,* A. ... ... 113 y 127

Vilas-Minondo, Pilar: véase *Gil-Fernández,* Carmen 23

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

AISLAMIENTO DE BACTERIAS HALOFILAS ESTRICTAS PROTEOLITICAS, DE MUESTRAS DE SAL COMUN (*)

por

CÁNDIDA GONZALEZ y CARMEN GUTIERREZ

INTRODUCCION

La alteración del pescado salado llamada "rojo" se atribuyó a microorganismos, a partir del año 1870, por los trabajos de Farlow (7) en los Estados Unidos, que concluyen en el origen microbiano de la infección aunque el "rojo" del pescado salado, de etiología desconocida, está señalado en el año 2.700 a. de J. C., según datos tomados de Soudan (23). Farlow aísla del pescado y de muestras de sal de Cádiz dos organismos que identifica como un alga o un hongo a uno de ellos, *Clathrocystis roseo-persicina,* y al otro, como una sarcina, *Sarcina morrhuae*. Dos años después, Poulsen (14) aisla del lodo de la bahía de Copenhague dos bacterias: *Micrococcus littoralis* y *S. littoralis,* el último semejante a *S. morrhuae* de Farlow y ambos causantes de la infección. Desde entonces se publican numerosos trabajos consagrados a la microbiología del "rojo", y hoy se sabe que la infección está producida por bacilos y cocos que tienen en común su marcado halofilismo y la pigmentación. Una buena revisión sobre las bacterias relacionadas con el "rojo", está recogida en los trabajos de Bertullo (1) y en los de Tropa

(*) Trabajo leído en el II Congreso Nacional de Microbiología. Madrid, noviembre de 1969.

y Galamba (24). Todos estos microorganismos tienen como habitat el agua del mar, las charcas de aguas saladas, el mucus de los peces marinos y, al menos temporalmente, la sal. Según Browne (2) todas las sales marinas contienen bacterias rojas halófilas, y Gibbons (8-9), Shewan (22) y Petrowa (12-13) demuestran su presencia en la sal gema, aunque la población es más numerosa en la sal marina. Schneider (20) advierte la presencia de halobacterias del "rojo" en la sal de la industria y valora las pérdidas considerables que ocasionan.

Las consultas que la industria nos ha hecho sobre el problema del "rojo", la escasez de datos que nos permitan enjuiciar la calidad de nuestras sales y el aislamiento en nuestros laboratorios, de muestras de bacalao con "rojo", de un halófilo estricto identificado como *Halobacterium salinarium* (16) y anteriormente por Rejas (15) de un coco que clasifica como *Micrococcus morrhuae,* nos indujo a realizar el trabajo cuya primera parte describimos, tratando de determinar: a) contenido de bacterias rojas halófilas en muestras de sales recogidas en las salinas (de mina y marinas) y en las sales comerciales; b) concentración óptima de ClNa en los cultivos de las bacterias aisladas; c) resistencia de los halófilos aislados al envejecimiento de las sales y a otros agentes físicos; d) posible actividad proteolítica de estas bacterias, formación de indol y de SH_2.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de sal

Se estudian tres muestras de sal gema y dos de agua salada recogidas en Cabezón de la Sal, sin posibilidad de contaminación con otras muestras o ambientes infectados. Dos muestras de sales marinas, recogidas en las salinas con las mismas precauciones que las anteriores. Treinta y cuatro muestras de sales comerciales de cocina. Veintiocho sales comerciales de mesa, catalogadas como refinadas, deshidratadas y purificadas; de estas últimas, seis son de mina (Cs. M. 1; Lt. M. 1, 2, 3, 4, y 5) y veintidós, marinas.

Medios de cultivo

Para aislamiento y conservación de las bacterias empleamos el de Sehgal y Gibbons (21), cuya composición es como sigue: casaminoácidos Difco, 7,5 g; extracto de levadura Difco, 10 g; citrato sódico, 4 g; clo-

ruro potásico, 2 g; sulfato magnésico heptahidratado, 20 g; cloruro sódico, 250 g; agua destilada, hasta 1.000 ml; pH = 7,4 con solución N de hidróxido potásico. El medio se solidifica con agar Difco al 15 ‰. El medio líquido se reparte en matraces de Erlenmeyer de 100 ml, 10 ml/matraz, sembrándolos con 1 g de sal y cerrándolos con algodón y papel parafinado para evitar la evaporación, incubándolos a 37 °C. En cuanto hay crecimiento se aíslan las bacterias en placas del mismo medio con agar, sembrándolas en estría o por el procedimiento de gota (6), incubándolas dentro de sacos de plástico para evitar la desecación.

Concentración óptima de ClNa

Se estudió en el mismo medio con ClNa al 10, 15, 20, 25 y 30 % (p/v), siguiendo el crecimiento en un colorímetro modelo Spectronic 20, a 600 mμ.

Resistencia al envejecimiento de las sales

Las muestras de sales positivas en un primer aislamiento se conservaron en el laboratorio en los envases originales abiertos, a temperatura ambiente, durante año y medio y dos años, volviendo a sembrar las muestras al final de este período.

Termorresistencia

Se determinó en 1 ml de los cultivos de tres días en medio de Sehgal y Gibbons (22), en baño María regulado a 65°, 70° y 80 °C. Enfriados los cultivos bruscamente, se resiembran en medio nuevo e incuban durante un mes.

Medios para determinar la actividad proteolítica

La hidrólisis de la gelatina se estudió en el medio 73 de Norberg y Hofsten (11) que contiene sulfato magnésico heptahidratado, 10 g; cloruro cálcico, 0,2 g; cloruro sódico, 250 g; gelatina Oxoid, 10 g; extracto de levadura Difco, 1 g; agua destilada, hasta 1.000 ml; agar Difco, 15 g; pH = 7.

La hidrólisis de la caseína se vio en un medio preparado por nosotros tomando como base el 73, al que se le mezcla leche en polvo Difco o caseína Merck. La leche se preparó en solución acuosa al 20 %

y esterilizada aparte durante quince minutos, a 110 °C, se añadió al medio hasta una concentración final de 0,8 %. La caseína se solubilizó según Norberg y Hofsten, en Tris O,1 M, ajustando el pH a 8 con ácido clorhídrico, que contiene 15 % de ClNa. La solución esterilizada por ebullición durante quince minutos, se mezcla con el medio 73 hasta la concentración final 0,1 %. Sembradas las placas en estría o en gota e incubadas dentro de sacos de plástico, se observa la hidrólisis de la caseína por el halo transparente que rodea a las colonias, lo mismo que la hidrólisis de la gelatina, después de añadir a estas últimas placas la solución de cloruro mercúrico.

Formación de SH_2 e indol

Se hizo en tira de papel impregnado en subacetato de plomo, en el primer caso, y para el indol, en una solución de 10 g de paradimetildiaminobezaldehido en 100 ml de metanol, + 20 ml de ácido ortofosfórico. Las tiras de papel, después de secas, se colocan en las bocas de los tubos sembrados con las bacterias, sobre medio de Sehgal y Gibbons.

RESULTADOS

Presencia de bacterias halófilas estrictas en las sales

El aislamiento de halófilos rojos se resume en el *cuadro 1,* en donde indicamos la presencia de estas bacterias en todas las muestras de sal gema procedentes de la mina y en las recogidas en las salinas; en el 85 % de las sales de cocina; en el 35 % de las refinadas, deshidratadas y purificadas. Entre las últimas, seis muestras de sal de mina son negativas.

Las bacterias son gram-negativas, pleomórficas, móviles y exigen para crecer concentración de ClNa mayor del 12 %, siendo la óptima del 20 al 25 %. Son pigmentadas, de coloración que varía del rosa al escarlata; el pigmento es soluble en metanol, etanol y piridina; no es soluble en agua y poco o nada soluble en bencena, tolueno y éter de petróleo. Todas son catalasopositivas. Según la clasificación de Bergey, se incluyen en el género *Holabacterium,* en la familia Pseudomonadaceae.

Las 46 bacterias aisladas forman indol durante los primeros doce días de incubación y SH_2 en el mismo tiempo, excepto M. 5 y Ru. 6, que han sido negativas.

Cuadro 1. Presencia de bacterias halófilas estrictas en diversas muestras de sales

Sales de la industria				Sales de las salinas			
Cocina		Refinadas		Gema		Marinas	
G.	1 +	BRS.	1 +	A.G.	1 +	Al.	1 +
"	2 +	Cr.	1 +	"	2 +	Pl.	1 +
"	3 +	Cs.M.	1 —	S.G.	1 +		
"	4 +	Ds.	1 +	"	2 +		
Ml.	1 +	"	2 —	"	3 +		
Mr.	1 +	"	3 —				
"	2 —	"	4 —				
"	3 +	"	5 —				
"	4 +	"	6 —				
"	5 +	"	7 —				
"	6 —	"	8 —				
Pn.	1 +	"	9 —				
"	2 —	"	10 —				
"	3 +	Jv.	1 +				
"	4 +	Lt.M.	1 —				
"	5 —	"	2 —				
"	6 +	"	3 —				
"	7 +	"	4 —				
"	8 —	"	5 —				
SMt.	1 +	P.H.	1 +				
"	2 +	Ru.	1 +				
"	3B +	"	2 +				
"	3R +	"	3 +				
Sr.	1 +	"	4 —				
"	2 +	"	5 +				
T.	1 +	"	6 +				
"	2 +	"	7 —				
"	3 +	"	8 —				
"	4 +						
"	5 +						
"	6 +						
"	7 +						
"	8 +						
"	9 +						

Los signos + indican las muestras de sal que han dado cultivos positivos de bacterais rojas halófilas.

Cuadro 2. Determinación de la actividad proteolítica

Bacterias		Gelatina	Caseína	Leche
Al.	1	— (15)	— (15)	— (15)
A.G.	1	+++ (6)	+++ (6)	+++ (6)
"	2	+++ (6)	+++ (6)	+ (6)
B.R.S.	1	++ (6)	+ (6)	+ (6)
C.	1	+++ (6)	+++ (6)	++ (6)
Ds.	1	+++ (6)	+++ (6)	++ (6)
G.	1	+++ (6)	+++ (6)	+++ (6)
"	2	— (15)	— (15)	— (15)
"	3	+++ (6)	+ (6)	+ (6)
"	4	++ (6)	++ (6)	+ (6)
Jv.	1	— (15)	— (15)	— (15)
Ml.	1	+++ (6)	+++ (6)	+++ (6)
Mr.	2	+++ (6)	++ (6)	++ (6)
"	3	++ (6)	+++ (6)	+++ (6)
"	4	+++ (6)	+++ (6)	+++ (6)
"	5	— (15)	— (15)	— (15)
P.H.	1	+++ (6)	++ (6)	+ (6)
Pl.	1	+++ (6)	+++ (6)	++ (6)
Pn.	1	+ (6)	+++ (6)	+ (6)
"	3	+++ (6)	+++ (6)	++ (6)
"	4	+++ (6)	+++ (6)	+ (6)
"	6	++ (6)	+ (6)	+ (6)
"	7	+++ (6)	+++ (6)	++ (6)
Ru.	1	+++ (6)	+++ (6)	+++ (6)
"	2	++ (6)	++ (6)	++ (6)
"	5	+++ (6)	++ (6)	++ (6)
"	6	+++ (6)	++ (6)	+++ (6)
"	8	++ (6)	++ (6)	+ (6)
S.Mt.	1	+++ (6)	+++ (6)	+++ (6)
"	2	+++ (6)	++ (6)	+ (6)
"	3B	++ (6)	+ (6)	+ (6)
"	3R	+++ (6)	++ (6)	+ (6)
Sr.	1	+++ (6)	+++ (6)	+ (6)
"	2	+++ (6)	+++ (6)	+ (6)
S.G.	1	+++ (6)	++ (6)	+ (6)
"	2	+++ (6)	++ (6)	+ (6)
"	3	+++ (6)	+ (6)	+ (6)
T.	1	— (15)	— (15)	— (15)
"	2	+++ (6)	+++ (6)	+++ (6)
"	3	+++ (6)	++ (6)	+ (6)
"	4	+++ (6)	+++ (6)	+ (6)
"	5	+++ (6)	+++ (6)	+ (6)
"	6	+++ (6)	+++ (6)	+ (6)
"	7	+++ (6)	+++ (6)	+ (6)
"	8	+++ (6)	++ (6)	+ (6)
"	9	+ (15)	+ (15)	+ (15)

Los números entre paréntesis indican los días de incubación del cultivo al hacer la lectura de la reacción. Los signos +, grados diferentes de positividad. Se consideran no proteolíticos los cultivos que después de quince días de incubación son negativos.

Resistencia al calor

Treinta y nueve bacterias resistieron un minuto a 80 °C; los cultivos fueron viables después del tratamiento, al resembrarlos en medio nuevo; siete han muerto.

Resistencia al envejecimiento de las sales

Las muestras positivas guardadas en el laboratorio durante uno-dos años, fueron de nuevo positivas al resembrarlas en el medio de aislamiento.

Actividad proteolítica

En el *cuadro 2* resumimos la actividad proteolítica de estas estirpes; cuarenta y una hidrolizan enérgicamente la gelatina, caseína y leche a los seis días de cultivo, siendo la gelatina más fácilmente hidrolizada; cinco bacterias han sido negativas en los tres medios.

DISCUSION

Los resultados demuestran la contaminación de las sales de nuestra industria, ya sean refinadas o de cocina, con halófilos rojos proteolíticos activos, formadores de indol y de SH_2, y las sales de mina son igualmente portadoras de la infección. El envejecimiento de la sal sugerido por Dussault (6) para disminuir la población de halófilos, práctica corriente entre los industriales, no soluciona el problema; la población puede disminuir, pero la esterilización no se consigue por este procedimiento. La incorporación de antimicrobianos a la sal o al pescado, o de sales de amonio cuaternario, antibióticos, compuestos de cloro (4, 15, 19 y 24), o del ácido 4(2,4-diclorofenoxibutírico) ensayado previamente como inhibidor del crecimiento y estimulante de la autólisis en aerobios esporulados (18) y bactericida enérgico *in vitro* para *Halobacterium salinarium* y *H. cutirrubrum* (17), no ofrecen resultados esperanzadores por perder actividad en contacto con el producto salado y solamente retarda la aparición de la infección experimental. La supervivencia de los halófilos del "rojo" durante más de un año en salmueras saturadas desprovistas de otros elementos nutritivos (3-4), sugiere como método de lucha eficaz la este-

rilización de la sal por calor húmedo a más de 90 °C, o por acidificación de las salmueras a pH = 3, que destruye esta población (10). Lamentablemente, estos métodos no son más que preventivos, pero la contaminación de la sal estéril con productos infectados puede evitarse con un buen lavado de éstos en agua corriente, antes de salarlos.

El problema del "rojo" considerado como infección que modifica los caracteres organolépticos de los productos salados, en nuestra opinión debe tener consideración más amplia; la presencia de enzimas proteolíticas que Gibbons vio en cuarenta y cinco halófilos de cuarenta y nueve investigados (9), y Norberg y Hofsten (11) destacan al estudiar recientemente la formación de gelatinasa y caseinasa en estirpes de *Halobacterium salinarium*, además de nuestros resultados al encontrar en la sal cuarenta y una halobacterias proteolíticas activas entre cuarenta y seis aisladas, obliga a considerar que la coloración y el mal olor de los productos infectados es la primera fase de proceso putrefactivo que se inicia al tratar de conservar el pescado.

RESUMEN

Se estudia la presencia de bacterias rojas halófilas en muestras de sal, aislándose dichas bacterias en el 100 % de las muestras procedentes directamente de las salinas; en el 85 % de las sales de cocina y en el 35 % de las sales de mesa refinadas (purificadas y deshidratadas).

En los medios de aislamiento, la concentración óptima de sal varía entre un 20 y un 25 %.

Las bacterias aisladas pertenecen al género *Halobacterium;* son resistentes al calor (un minuto a 80 °C) y al envejecimiento de las sales. Forman indol, SH_2 y son proteolíticas activas.

Se destaca la amplia distribución de estas bacterias en todas las muestras estudiadas, así como su actividad proteolítica que contribuye a la putrefacción de los productos contenidos en las salmueras y a la de los pescados salados.

SUMMARY

The presence of red halophilic bacteria has been studied in samples of salt. The isolation of these red bacteria was positive in 100 % of samples taken directly from salt marshes, in 85 % of samples taken from

kitchen salt, and in 35 % of samples taken from the finest salt (purified and dehydrated).

The optimum salt concentration in isolation media varies between 20 and 25 %. The isolated bacteria belong to the genus *Halobacterium.* They are heat-resistant (1 minute at 80 °C), and resistant to salt senescense (i. e. they remain alive for many years in salt). They produce indol, SH_2, and they are actively proteolytic. Their wide distribution in all samples studied, and their proteolytic activity contribute to the putrefaction of products contained in brines and to spoilage of salted fish.

BIBLIOGRAFIA

1. BERTULIO, V. B. 1954. An. Fac. Vet. Repúb. Orient. Urug., VI, 39.
2. BROWNE, W. W. 1922. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 19, 321.
3. CASTELL, C. H. 1950. Fish. Res. Bd. Can. Progr. Rep. Atl. Coast Sta., 50, 9.
4. CASTELL, C. H., y MAPPLEBECK, E. G. 1952. J. Fish. Res. Bd. Can., 9, 377.
5. DUSSAULT, H. P. 1953. Fish. Res. Bd. Can. Progr. Rep. Atl. Coast Sta., 55, 7.
6. DUSSAULT, H. P. 1954. J. Fish. Res. Can., 11, 261.
7. FARLOW, W. G. 1880. Rep. U. S. Com. Fish Fish., 969.
8. GIBBONS, N. E. 1937. J. Fish. Res. Bd. Can., 3, 70.
9. GIBBONS, N. E. 1957. Can. J. Microbiol., 3, 249.
10. KUSHNER, D. J.; MASSON, G., y GIBBONS, N. E. 1965. Appl. Microbiol., 13, 288.
11. NORBERG, P., y HOFSTEN, B. C. 1969. J. Gen. Microbiol., 55, 251.
12. PETROWA, E. K. 1933. Arch. Hyg. Bakteriol., 4, 326.
13. PETROWA, E. K. 1935. Ann. Inst. Pasteur, 2, 255.
14. POULSEN, V. A. 1879-1880. Medd. Dan. Naturhist. Foren., 31, 422, 231. Ref.: BERTULLO.
15. REJAS, F. 1961. An. Fac. Vet. León, 7, 281.
16. RODRÍGUEZ, M., y GONZÁLEZ, C. 1967. Rev. Patr. Biol. Animal, 11, 155.
17. RODRÍGUEZ, M., y GONZÁLEZ, C. 1969. Can. J. Microbiol., 15, 309.
18. ROMÁN, M., y GONZÁLEZ, C. 1967. Microbiol. Españ., 20, 63.
19. ROWAN, M. K. 1960. Fish. Ind. Res. Inst. Ann. Rep., 13, 12.
20. SCHNEIDER, I. S., y MORENO, A. G. 1964. Arq. Brasil. Nutr., 20, 77.
21. SEHGAL, S. N., y GIBBONS, N. E. 1960. Can. J. Microbiol., 6, 165.
22. SHEWAN, J. M. 1938. Gt. Brit. Dep. Sci. Ind. Res. Food Invest. Board Spec. Rep., 113.
23. SOUDAN, F. 1955. Tesis Doctoral. Institut Scientifique et Technologique des Peches Maritimes, París.
24. TROPA, E., y GALAMBA, A. 1955. Bacterias Halofilas do Vermelho do Bacalhau, Lisboa.

INSTITUTO DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS (C S I C). SEVILLA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA Y MICROBIOLOGÍA

ESPECIES DE *PROPIONIBACTERIUM* RELACIONADAS CON LA «ZAPATERIA». FACTORES QUE INFLUYEN EN SU DESARROLLO

por

F. GONZALEZ-CANCHO, M. NOSTI-VEGA, M. J. FERNANDEZ-DIEZ y N. BUZCU

1. INTRODUCCION

Entre los microorganismos que se consideran asociados con la alteración de aceitunas verdes aderezadas (9), conocida con el nombre de "zapatería", destacan como más importantes, diferentes especies de los géneros *Clostridium* y *Propionibacterium.*

En publicaciones anteriores nos hemos ocupado del género *Clostridium* (4-6). Sin embargo, el desarrollo de estos microorganismos en salmueras zapateras no explica satisfactoriamente la alteración, ya que ésta ntinúa, aunque se inhiba su crecimiento en las mismas. Por ello, se tinuaron las investigaciones para demostrar la presencia, en dichas ueras, de *Propionibacterium.*

n la presente comunicación se hace, en primer lugar, un estudio nico de las diferentes especies de *Propionibacterium* aisladas. Por e, es conveniente conocer el efecto que tienen sobre su desarro-, el pH y contenido de cloruro sódico, por ser la salmuera el medio de cultivo donde se desarrollan.

Finalmente, se estudian la resistencia térmica de los cultivos y el efecto sobre el desarrollo, de los antisépticos, salicílico, benzoico, sorbato potásico y del antibiótico lactato de tilosina.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Toma de muestras y aislamiento

La toma de muestras se realiza bajo condiciones asépticas, del fondo y medio de bocoyes de aceitunas aderezadas y alteradas, pertenecientes a las variedades carrasqueña y manzanilla.

Se utiliza el siguiente medio de enriquecimiento (8):

Extracto de levadura (Difco)	10 g
Lactato sódico	20 g
Agua destilada	1.000 ml

El lactato sódico se prepara a partir de ácido láctico puro, neutralizado con NaOH al 10 % hasta pH = 7,0, y se añade carbonato cálcico en exceso. Después de filtrado y esterilizado a 121 °C durante quince minutos, al pH del mismo varía entre 5,2 y 5,4.

Tubos que contienen 10 ml del citado medio, se inoculan con las salmueras correspondientes, se cubren con vaspar e incuban en estufa a 30 °C. Los cultivos, que presentan abundante turbidez y formación de gas, se transfieren sucesivamente al mismo medio de cultivo, siendo necesarios unos seis o siete pases consecutivos para la purificación de los mismos.

Para el aislamiento de los correspondientes cultivos purificados se emplea el siguiente medio de cultivo (8):

Extracto de levadura	10 g
Glucosa	20 g
Carbonato cálcico	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.000 ml

Las siembras se hacen en placas de Petri, por extensión y agotamiento, y se incuban en jarros anaeróbicos en atmósfera de 90 % de nitrógeno y 10 % de anhídrido carbónico, a 30 °C.

Por dicho procedimiento se aislan 41 cultivos puros de bacilos cortos gram-positivos, a veces con apariencia difteroide, catalasopositivos, y que producen ácido propiónico, ácido acético y anhídrido carbónico.

2.2. Identificación de ácidos grasos volátiles por cromatografía gaseosa

Para determinar los ácidos volátiles (7) de los cultivos se utiliza un cromatógrafo de gases Aerograph, modelo 1520, provisto de detector de ionización de llama. La columna es de acero inoxidable de 1,5 m de longitud y 1/8" de diámetro, rellena con ácido sebácico al 20 % sobre Chromosorb W, lavado al ácido, de 80-100 mallas.

Las condiciones de trabajo son las siguientes:

Temperatura de la columna, 135 °C; detector, 200 °C, e inyector, 200 °C. Flujo de gas portador (helio), 35 ml/min. Muestra inyectada, 1,0 μl.

Para estas determinaciones se colocan 20 ml de cultivo en un aparato de arrastre con vapor y se le añaden 0,5 g de ácido tartárico. El destilado se recoge en un matraz conteniendo 10 ml de agua destilada y 4 ml de NaOH 0,2N. El volumen total de destilado recogido es de 250 ml.

Este destilado se evapora a sequedad en un baño de María.

El residuo se disuelve en un pequeño volumen de agua (2 ml) y se pasa cuidadosamente a un frasco con tapón esmerilado.

En el momento en que va a ser tomada la muestra para inyectarla en el cromatógrafo se liberan los ácidos con ácido fosfórico.

2.3. Estudio taxonómico

El estudio taxonómico se hace según las normas del manual de Bergey (2).

Para la fermentación de carbohidratos se utiliza un medio basal que contiene 1 % de extracto de levadura en agua destilada. Dichos carbohidratos, en concentración del 2 %, se esterilizan por filtro Millípore. Una vez desarrollados los cultivos, se valoran 10 ml de los mismos con solución 0,2N de NaOH, empleando fenolftaleína como indicador.

2.4. Resistencia al pH y cloruro sódico

El estudio de la resistencia (5), a distintos valores de pH y a diferentes concentraciones de cloruro sódico, se hace en el medio ya indicado, extracto de levadura-lactato sódico, ajustando el pH a 7,0 unidades. Los cultivos correspondientes en cantidades de 0,1-0,2 ml, se transfieren sucesivamente al mismo medio de cultivo a los valores de pH:

6,0; 5,45; 5,35; 5,0; 4,8; 4,6; 4,4; 4,3 y 4,2, sin sal y a las concentraciones: 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11 y 12 % de cloruro sódico, a valores de pH = 7,0; 5,0 y 4,5, respectivamente.

2.5. Termorresistencia

Para la resistencia térmica (4) se emplean tubos de ensayo de 12 × 180 mm, con 5 ml del medio de cultivo ya indicado y se inoculan con 0,1 ml de los correspondientes cultivos adaptados, siendo la concentración de gérmenes/ml, aproximadamente, de 10^9. A continuación se sumergen en un baño de agua, calentado eléctricamente a diferentes temperaturas constantes y durante períodos variables de tiempo, enfriándose rápidamente en agua después del calentamiento e incubándose posteriormente en estufa a 30 °C. El desarrollo se observa diariamente, durante veinte días.

Para cada tiempo de calentamiento y temperatura se utiliza un número de replicados comprendido entre 4 y 8, considerando como puntos de destrucción, únicamente aquellos en que todos los replicados dan resultados negativos, y puntos de supervivencia, aquellos en que al menos uno de los tubos da resultado positivo.

2.6. Efecto de antisépticos y antibióticos sobre el desarrollo

Se prueba la acción de los antisépticos, salicílico, benzoico y sorbato potásico, así como del antibiótico, lactato de tilosina, sobre las diferentes especies en el medio de cultivo ya indicado. Los valores de pH, 5,5 y 4,8 ensayados, especialmente el último, son representativos porque se pueden encontrar en aceitunas que no han sufrido la fermentación láctica característica y, consiguientemente, están expuestas a la acción de estos microorganismos.

Las dos cepas que se incluyen de cada especie, se diferencian entre sí por la diferente capacidad fermentativa sobre los carbohidratos ensayados.

Para ambos valores de pH se emplean dos clases de testigos: unos inoculados, pero sin antisépticos; otros, sin inocular, con las mismas concentraciones de antisépticos empleados en los diferentes ensayos.

No se emplean concentraciones superiores a la de 2.000 ppm, porque comercialmente no son aceptables.

2.7. Resultados y discusión

Utilizando la técnica de cromatografía de gases anteriormente descrita se determinan los ácidos volátiles de los cultivos puros preparados con las 41 capas de *Propionibacterium,* aisladas. De este modo se encuentra que todos estos cultivos contienen ácidos acético y propiónico. En los cromatogramas obtenidos se mide la altura de los picos y se calculan las relaciones de las correspondientes al ácido propiónico y al acético en cada uno de ellos.

En la *figura 1* se muestra un ejemplo típico de dichos cromatogramas.

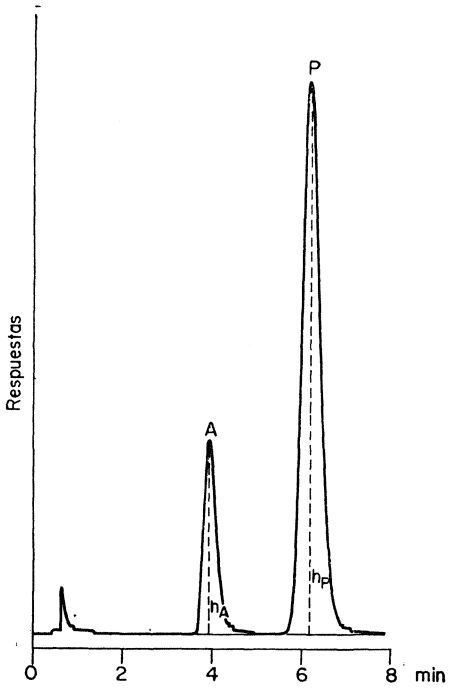

Figura 1. Cromatograma correspondiente al cultivo 47 de P. pentosaceum. $h_A = 60{,}5$;

$$h_P = 173;\ \frac{h_P}{h_A} = 2{,}9$$

Los resultados obtenidos se recogen en el *cuadro 1*.

Cuadro 1. Relación entre los ácidos propiónico y acético para las diferentes especies de Propionibacterium

Especie	Número de cultivos	Propiónico/acético, valor medio de la relación entre las alturas	Desviación típica
P. zeae	28	2,7	0,22
P. pentosaceum	10	2,9	0,13
P. sp.	3	2,5	0,07

Si bien los valores medios encontrados para cada especie son estadísticamente distintos entre sí (valores de t comprendidos entre 4 y 5 para 11, 29 y 36 grados de libertad, respectivamente), las diferencias de los valores individuales para distintas cepas de una misma especie, son del mismo orden, por lo que es razonable suponer que dichas diferencias no tengan significación práctica alguna.

El estudio taxonómico de las 41 cepas aisladas se resume en el *cuadro 2*.

Como se observa, la especie más representativa, con veintiocho cultivos puros aislados, es *Propionibacterium zeae,* que tiene como propiedades características el color crema del desarrollo en superficie sobre azar-extracto de levadura-lectato, la fermentación positiva de l-arabinosa, y ramnosa y negativa de d-arabinosa y xilosa. Le sigue en importancia el *P. pentosaceum,* con diez cepas, y que se caracteriza por las formas de involución que se desarrollan en extracto de levadura-glucosa, y la capacidad para fermentar d- y l-arabinosa, xilosa y ramnosa. Finalmente, en tres de los cultivos aislados, los caracteres morfológicos y fisiológicos no coinciden con los que se especifican en el manual de Bergey.

Todos los cultivos coagulan la leche tornasolada, no producen indol, no reducen los nitratos y no licúan la gelatina.

La distribución de las diferentes especies se expone en el *cuadro 3*. Como complemento del mismo se puede indicar que el 69 % de las salmueras de las que se aislan los cultivos de *Propionibacterium zeae,*

Cuadro 2. Taxonomía de las diferentes especies de Propionibacterium

Núm. de cepas	Desarrollo sobre picadura en agar-extracto de levadura-lactato	Color del desarrollo sobre picadura en agar-extracto de levadura-lactato	Morfología en extracto de levadura-lactato	Fermentación de carbohidratos															Diagnóstico
				D-arabinosa	L-arabinosa	Xilosa	Ramnosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Lactosa	Maltosa	Almidón	Dextrina	Glicógeno	Manitol	Sorbitol	Salicina	
28	Abundante	Crema	Cortos bacilos de apariencia difteroide	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	*P. zeae*
10	Abundante	Crema	Frecuentes bacilos irregulares, hinchados, con apariencia de formas de involución	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	*P. pentosaceum*
3	Abundante	Crema	Bacilos con apariencia difteroide. Pocas veces redondeados	+	+	—	—	+	+	+	+	+				(*)			*Propioni-bacterium* sp.

(*) No determinados.

tienen pH superiores a 4,2, siendo dicho valor del 66 % y 100 % en las de *P. pentosaceum* y *Propionibacterium* sp, respectivamente.

La existencia de dichos microorganismos en salmueras cuyo pH es inferior a 4,2, puede ser debida a un tratamiento realizado en las salmueras, para disminuir dicho pH.

Cuadro 3. Distribución de las diferentes cepas de Propionibacterium

Especies aisladas	Número total de cepas	Variedad de aceitunas	Intervalo de pH	pH medio	Intervalo de acidez volátil
P. zeae	28	Carrasqueña Manzanilla	3,95-4,70	4,40	0,25-0,63
P. pentosaceum	10	Carrasqueña Manzanilla	4,20-4,70	4,50	0,29-0,50
Propionibacterium sp.	3	Carrasqueña Manzanilla	4,25	4,25	0,32-0,52

La tolerancia de las diferentes especies a distintos valores de pH y al tanto por ciento de cloruro sódico se indica en los *cuadros 4-6.*

De su observación se deduce que el límite de pH para el desarrollo de *Propionibacterium zeae* y *Propionibacterium* sp. es de 4,4 unidades y para el *P. pentosaceum* de 4,3 unidades.

Por lo que respecta a la tolerancia al tanto por ciento de cloruro sódico se puede indicar que, como es lógico suponer, es menor a medida que se disminuye el pH. Así, a un pH de 7,0 unidades, valor que se puede considerar óptimo para el desarrollo, todas las cepas de *Propionibacterium zeae* y *Propionibacterium* sp. se desarrollan con el 10 % de sal y con el 9 % el *P. pentosaceum.*

Aunque dicha tolerancia es ligeramente inferior a un pH de 5,0 unidades, sin embargo, es a valores de pH inferiores a 4,6, donde el efecto de la concentración de cloruro sódico es más acentuado. En efecto, a pH 4,5 únicamente algunas cepas de *Propionibacterium zeae* toleran el 5 % de sal, y el 4 % y 2 %, algunos cultivos de *Propionibacterium* sp. y *P. pentosaceum,* respectivamente. Asimismo, ninguna capa se desarrolla a un pH de 4,4 y 2 % de cloruro sódico.

Por otra parte, merece destacarse que *Propionibacterium pentosaceum* se desarrolla a valores límites de pH inferiores a los de *P. zeae* y *Pro-*

Cuadro 4. Eefcto del pH y porcentaje de ClNa sobre el desarrollo de **P. zeae**

ClNa, % / pH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
7,0	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+ (*)	—
6,0	+++												
5,6	+++												
5,3	+++												
5,0	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	— (**)	—	—
4,8	+++												
4,6	++												
4,5	+	+	+	+	+	+ (***)	—	—					
4,4	+	+	—	—									
4,3	—												
4,2	—												

+++, desarrollo abundante; ++, regular; +, escaso; —, sin desarrollo.

(*) En 7 cepas, sin desarrollo. (**) En 5 cepas, con desarrollo. (***) En 15 cepas, sin desarrollo.

Cuadro 5. Efecto del pH y porcentaje de ClNa sobre el desarrollo de P. pentosaceum

ClNa, % / pH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
7,0	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	—	—	—
6,0	+++												
5,6	+++												
5,3	+++												
5,0	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+ (*)	—	—		
4,8	++												
4,6	+												
4,5	+	+	+ (**)	—	—								
4,4	+	+	—	—									
4,3	+												
4,2	—												

+++, desarrollo abundante; ++, regular; +, escaso; —, sin desarrollo.
(*) En 3 cepas, sin desarrollo. (**) En 5 cepas, sin desarrollo.

Cuadro 6. Efecto del pH y porcentaje de ClNa sobre el desarrollo de Propionibacterium *sp*

ClNa, % / pH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
7,0	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+ (*)	—
6,0	+++												
5,6	+++												
5,3	+++												
5,0	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	—	—		
4,8	++												
4,6	++												
4,5	+	+	+	+	+ (*)	—	—						
4,4	+	+	—	—									
4,3	—												
4,2	—												

+++, desarrollo abundante; ++, regular; +, escaso; —, sin desarrollo.
(*) En 1 cepa, sin desarrollo.

pionibacterium sp., mientras que es más sensible a las concentraciones de cloruro sódico, que las otras dos especies.

De ello se deduce la importancia que tienen el pH y la concentración de cloruro sódico sobre el desarrollo de *Propionibacterium,* que producen alteraciones en aceitunas aderezadas, y cómo la combinación adecuada de ambos factores impide su desarrollo.

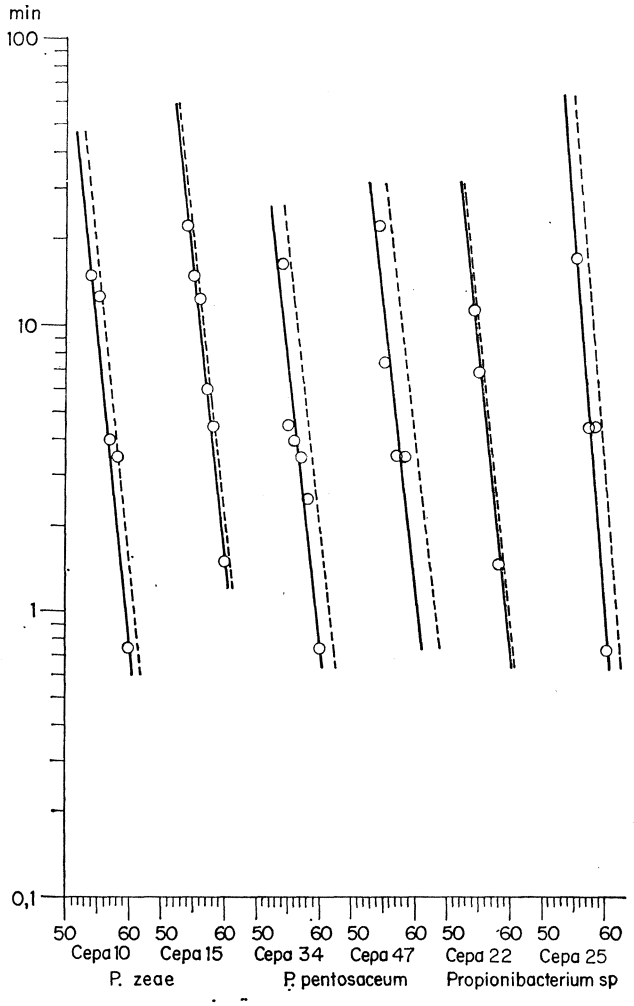

Figura 2. Termorresistencia de diferentes especies de Propionibacterium. *O, valores medios experimentales. —, línea de regresión. - - -, línea superior (99,7 %)*

Cuadro 7. Termorresistencia de las distintas especies

Especie	Cepa	Coeficiente de correlación	Significación	Línea de regresión Y = a + bX		Desviación típica de los valores estimados de Y	Parámetros de la línea límite superior	
				a	b		UP_{60} (min) (*)	z (°C) (**)
P. zeae	10	— 0,9800	0,01 > P > 0,001	12,772	— 0,215	0,144	1,5	4,5
	15	— 0,9978	P < 0,001	12,097	— 0,198	0,034	2,1	5,0
P. pentosaceum	34	— 0,9546	0,01 > P > 0,001	11,323	— 0,190	0,139	2,0	5,0
	47	— 0,9333	0,10 > P > 0,05	11,582	— 0,192	0,174	3,8	5,0
Propionibacterium sp.	22	— 0,9857	0,01 > P > 0,001	12,486	— 0,211	0,065	0,8	5,0
	25	— 0,9770	0,05 > P > 0,02	15,620	— 0,261	0,145	2,5	4,0

(*) Número de minutos necesarios para destruir el microorganismo a 60 °C. (**) Grados centígrados necesarios para que la línea de destrucción térmica atraviese un ciclo logarítmico.

Cuadro 8. Efecto del ácido salicílico sobre el desarrollo de las distintas especies

Especie	Cepa	pH	Concentración antiséptico (ppm)						Testigo
			100	250	500	1.000	1.500	2.000	
P. zeae	10	5,5	+++	++	++	+	—	—	+++
	15		+++	+++	++	+	+	—	+++
P. pentosaceum	47		+++	++	++	++	+	—	+++
	34		+++	+++	++	+	—	—	+++
Propionibacterium sp.	25		+++	++	++	+	—	—	+++
	22		+++	+++	++	+	+	—	+++
P. zeae	10	4,8	++	+	—	—	—	—	+++
	15		+++	++	+	—	—	—	+++
P. pentosaceum	47		++	+	—	—	—	—	++
	34		+	+	+	—	—	—	+
Propionibacterium sp.	25		++	+	—	—	—	—	++
	22		+	+	+	—	—	—	+

+++, abundante desarrollo. ++, regular. +, escaso. —, sin desarrollo.

Cuadro 9. Efecto del ácido benzoico sobre el desarrollo de las distintas especies

Especie	Cepa	pH	Concentración antiséptico (ppm)						Testigo
			100	250	500	1.000	1.500	2.000	
P. zeae	10	5,5	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
	15		+++	+++	+++	+++	++	+	+++
P. pentosaceum	47		+++	+++	+++	+++	++	++	+++
	34		+++	+++	+++	+++	++	+	+++
Propionibacterium sp.	25		+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
	22		+++	+++	+++	+++	++	+	+++
P. zeae	10	4,8	++	++	++	+	+	+	++
	15		++	++	++	+	+	+	++
P. pentosaceum	47		++	++	++	+	+	+	++
	34		+	+	+	+	+	—	+
Propionibacterium sp.	25		++	+	+	+	+	+	++
	22		+	+	+	+	+	—	+

+++, desarrollo abundante; ++, regular; +, escaso; —, sin desarrollo.

Cuadro 10. Efecto del sorbato potásico sobre el desarrollo de las distintas especies

Especie	Cepa	pH	Concentración antiséptico (ppm)						Testigo
			100	250	500	1.000	1.500	2.000	
P. zeae	10	5,5	+++	+++	+++	++	++	++	+++
	15		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
P. pentosaceum	47		+++	+++	+++	++	++	++	+++
	34		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Propionibacterium sp.	25		+++	+++	+++	+++	++	++	+++
	22		+++	+++	+++	+++	++	++	+++
P. zeae	10	4,8	++	++	++	+	+	+	++
	15		++	++	++	+	+	+	++
P. pentosaceum	47		++	+	+	+	+	+	++
	34		+	+	+	+	+	+	+
Propionibacterium sp.	25		++	+	+	+	+	+	++
	22		+	+	+	+	+	+	+

+++, desarrollo abundante; ++, regular; +, escaso; —, sin desarrollo.

Cuadro 11. Efecto del lactato de tilosina sobre el desarrollo de las distintas especies

Especie	Cepa	pH	Concentración antibiótico				Testigo
			10	30	60	90	
P. zeae	10	5,5	+	+	+	+	+++
	15		+	+	+	—	+++
P. pentosaceum	47		+	+	+	+	+++
	34		++	++	++	++	+++
Propionibacterium sp.	25		+	+	+	+	+++
	22		+	+	+	+	+++
P. zeae	10	4,8	+	+	—	—	+++
	15		+	+	+	—	++
P. pentosaceum	47		—	—	—	—	++
	34		+	+	+	—	+
Propionibacterium sp.	25		+	+	+	—	++
	22		+	+	+	—	+

+++, desarrollo abundante; ++, regular; +, escaso; —, sin desarrollo.

En el *cuadro 7* y *figura 2* se resumen los resultados obtenidos en la determinación de la termorresistencia de dos cepas de cada una de las especies. Las líneas de regresión se han obtenido según el criterio de Ball y Olson (1) utilizado por los autores en trabajos anteriores (3-4). Los parámetros fundamentales, UP_{60} y z, se han calculado a partir de la línea límite superior para una seguridad del 99,7 %.

Como puede observarse, la resistencia térmica es, en general, bastante baja, oscilando entre 0,8 y 2,5 minutos a 60 °C, y presentando una cierta variabilidad para cepas de una misma especie. La pendiente, para todas ellas, está comprendida entre 4° y 5 °C, siendo del mismo orden que las encontradas para el resto de las especies de microorganismos presentes en las aceitunas, con excepción de las del género *Clostridium* (4), que presentan valores muy superiores.

La correlación logaritmo del tiempo-temperatura presenta un alto grado de significación, salvo en las cepas 47 y 25, lo cual es debido al menor número de grados de libertad empleados en su construcción.

En los *cuadros 8-11* se indica la acción de los distintos antisépticos y antibióticos ensayados sobre las diferentes especies.

De los antisépticos, el salicílico es el único eficaz, ya que inhibe el desarrollo de todas las cepas ensayadas, a pH = 5,5, y concentración de 2.000 ppm, y en algunos cultivos, a 1.500 ppm. En cambio, a pH = 4,8, dicha inhibición tiene lugar siempre a 1.000 ppm y a veces a 500 ppm.

De los otros dos antisépticos, benzoico y sorbato potásico, únicamente el primero tiene poder inhibidor en dos cepas, a pH = 4,8 y 2.000 ppm. Hay que indicar que estos dos cultivos, a dicho pH presentan ya escaso desarrollo en los testigos.

Por lo que respecta al lactato de tilosina, en todos los cultivos la inhibición se presenta a pH = 4,8 y concentración de 90 ppm, y en dos a 60 ppm. Una cepa de *Propionibacterium pentosaceum* no se desarrolla a ninguna de las concentraciones empleadas.

AGRADECIMIENTO

Uno de los autores (N. Buzcu) agradece a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) la beca concedida.

A las señoras María Josefa Revillas de Montes y Mercedes Bodineau de Ruiz, por su eficaz colaboración.

RESUMEN

Se realiza el estudio taxonómico de 41 cepas de *Propionibacterium,* aisladas de salmueras de aceitunas verdes aderezadas y alteradas.

La especie más representativa es el *Propionibacterium zeae,* con 28 cultivos puros aislados, seguida de *P. pentosaceum,* con 10 cepas. Las características de los otros 3 cultivos aislados no coinciden con las especificadas en el manual de Bergey.

Como productos volátiles producidos por estos cultivos, han sido identificados por cromatografía gaseosa los ácidos propiónico y acético, en una proporción P/A que oscila entre 2,5 y 2,9.

El límite de pH para el desarrollo de *Propionibacterium zeae* y *Propionibacterium* sp. es de 4,4 unidades, y para el *P. pentosaceum,* de 4,3 unidades. La tolerancia de sal es menor a medida que disminuye el pH descendiendo los límites desde 9-10 % a un pH de 7 unidades, hasta 5 %, y 4 %, e incluso 2 % a valores de pH de 4,4 - 4,5 unidades.

El ácido salicílico es el único antiséptico eficaz entre los ensayados, oscilando la concentración necesaria entre 2.000 y 500 ppm, dependiente del valor de pH mantenido en el medio. El antibiótico lactato de tilosina inhibe el desarrollo en concentraciones comprendidas entre 60 y 90 ppm cuando el pH se mantiene en 4,8 unidades.

La resistencia térmica es, en general, bastante baja, oscilando entre 0,8 y 2,5 minutos, a 60 °C, el tiempo necesario para destruir el microorganismo.

SUMMARY

A taxonomic study of 41 strains of *Propionibacteria,* isolated from brines of spoiled pickled green olives was undertaken.

The most representative species is *Propionibacterium zeae,* with 28 isolated pure cultures, followed by *P. pentosaceum,* with 10 strains. The other 3 cultures do not fix with Bergey's specifications.

Among volatile products produced by these cultures, propionic and acetic acids are identified by gas chromatography. Relationship P/A shows values oscillating between 2.5 and 2.9.

A pH limit of 4.4 units was found for *Propionibacterium zeae* and *Propionibacterium* sp., and a pH limit of 4.3 units for *P. pentosaceum.*

Salt tolerance decreases when pH value also decreases. So, at a pH value of 7 units, salt tolerance limits reach up to 9-10 % NaCl, meanwhile this limit goes down to 5 %, 4 %, and even 2 % for pH values of 4.4 - 4.5 units.

Salicylic acid is the only effective antiseptic among those which were tested. Inhibitory concentration oscillates between 2,000 and 500 ppm depending upon the pH value. Tylosine lactate antibiotic product inhibits growth at 60-90 ppm for a pH value of 4.8 units.

Thermal resistance is generally quite low. Time necessary to destroy microorganism, at 60 °C, varies between 0.8 and 2.5 minutos for different strains.

BIBLIOGRAFIA

1. BALL, C. O., y OLSON, F. C. W. 1957. Sterilization in Food Technology. Mc Graw-Hill Co. Inc., Nueva York.
2. BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D., y SMITH, N. R. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Co.. Baltimore.
3. FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J., y GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1967. Rev. Cienc. Apl., 115, 117-20.
4. GONZÁLEZ-CANCHO, F., y FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J. 1967. Microbiol. Españ., 20, 73-80.
5. GONZÁLEZ-CANCHO, F., y FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J. 1968. Microbiol. Españ., 21, 129-41.
6. GONZÁLEZ-CANCHO, F.; FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J., y NOSTI-VEGA, M. 1970. Comunicación presentada a la VI Asamblea de Miembros del Instituto de la Grasa y sus Derivados, Sevilla.
7. NOSTI-VEGA, M. Pendiente de publicación.
8. PLASTOURGOS, S., y VAUGHN, R. H. 1957. Appl. Microbiol., 5, 267-71.
9. RODRÍGUEZ DE LA BORBOLLA, J. M.; GÓMEZ-HERRERA, C.; GONZÁLEZ-CANCHO, F.; FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J.; GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ-QUIJANO, R.; IZQUIERDO, A.; GONZÁLEZ-PELLISO, F.; VÁZQUEZ-LADRÓN, R., y GUZMÁN, R. 1961. El Aderezo de Aceitunas Verdes. Patronato "Juan de la Cierva", de Investigación Técnica. Madrid.

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

CHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL CHANGES IN FUNGI DURING AUTOLYSIS

XI. The exponential law in the induced autolysis of *Aspergillus terreus*

by

R. LAHOZ, F. REYES, R. BELTRA, JUANA GONZALEZ-IBEAS,
ANA M.ª BALLESTEROS and MAGDALENA MIRALLES

The autolytic process in the filamentous fungi has been induced by a variety of different methods and conditions. A brief account of these methods found in the literature are described by Lahoz et al. (1). One of these methods of inducing autolysis has, for the first time, been described and applied in this laboratory to the study of some aspects of autolysis in mycelium of *Aspergillus flavus,* and it was reported (1).

Operating in analogous conditions as we did for *Aspergillus flavus* we describe in the present communication the induced autolysis of *A. terreus* drawing our attention the quantitative relation between the loss in the mycelial dry weight and the time of autolysis.

Aspergillus terreus Thom (our collection no. 2,426) was grown in a modified Czapek-Dox medium (10 l) containing 50 g/l anhydrous glucose in which the source of nitrogen ($NaNO_3$) was replaced by its equivalent amount of $(NH_4)_2SO_4$. Hundred ml of a 24 or 48 hr. culture of *A. terreus* grown on a reciprocating shaker (90 strikes/min, 10 cm elongation, 25 °C) was used as inoculum. Incubation of the fungus was performed in submerged culture with continuous aeration (4 l/min) and

mechanical stirring (150 rev/min) in a 14 l fermentor (NBS Continuous Culture Apparatus, model CF 500, New Brunswick Scientific Co., Inc., New Brunswick, New Jersey) at 24°-26 °C for 6 days. At that time culture fluid was discarded, and the mycelium throughout washed in steril conditions and suspended in distilled water.

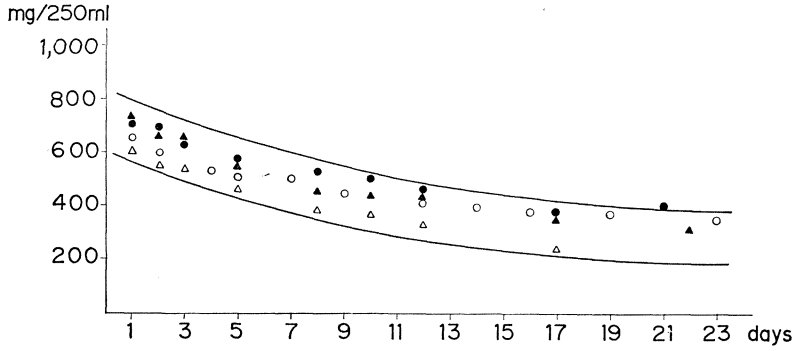

Figure 1. The induced autolysis of A. terreus. *Mycelium decay with time of autolysis. Results are expressed as miligrammes dry weight mycelium/250 ml of culture. Experiments I, II, III and IV are represented as* ○, ●, △ *and* ▲ *respectively*

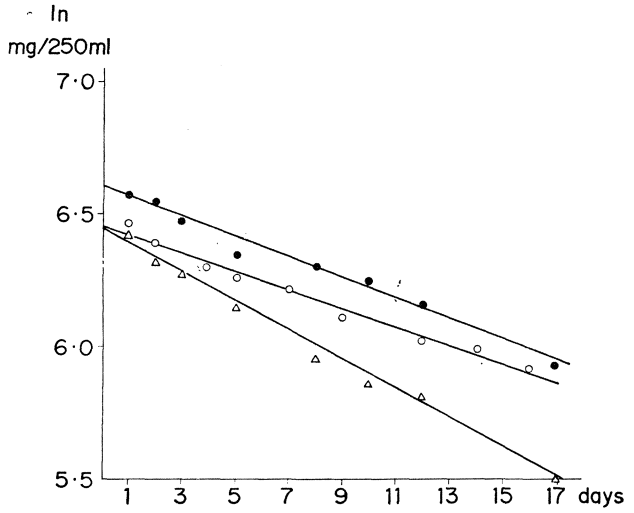

Figure 2. The induced autolysis of A. terreus. *Logarithm of the dry weight of mycelium plotted against time of autolysis. Experiments I, II and III are represented by* ○, ● *and* ▲ *respectively*

The induced autolysis of *Aspergillus terreus* mycelium was provoked by subjecting this suspension to a combined action of a continuous flow of air and agitation, similarly to the conditions we used for the growth of the fungus (4 l/min of air, and 150 rev/min agitation) for a variable lenth of time.

Full details of this procedure are described elsewhere (1).

At convenient intervals samples (250 ml of culture) were collected and the mycelium free from suspending fluid by filtration, washed with water, and dried in an oven at 70 °C to constant weight.

The decrease in the dry weight of mycelium of *Aspergillus terreus* in the four experiments carried out are shown in *figure 1.*

In these conditions the decrease of mycelial dry weight during the induced autolysis apparently approximated to an exponential law *(figure 2).*

We thank Prof. L. Vilas and to Dr. A. Alemany for helpful discussion. We also thank Miss Teresa Raposo for skillful technical assistance.

SUMMARY

The induced autolysis of *Aspergillus terreus* was provoked by subjecting an aqueous suspension of mycelium to a combined action of a continuous flow of air and mechanical stirring for a variable lenth of time.

The decrease in the dry weight of mycelium of *Aspergillus terreus* autolysed in these conditions apparently followed an exponential law.

RESUMEN

Se inducía la autólisis en el *Aspergillus terreus* sometiendo una suspensión acuosa de micelio a la acción simultánea de un flujo continuo de aire y de agitación mecánica durante el período variable de tiempo que dura el proceso. Trabajando en estas condiciones, las pérdidas en el peso seco que experimenta el micelio de *Asprgillus terreus* durante la autólisis parecen seguir una ley exponencial.

REFERENCES

1. LAHOZ, R.; REYES, F., and MARTÍNEZ, B. 1969. Mycopathol. Mycol. Appl., 38, 199-207.

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

CONTRIBUCION AL ESTUDIO *IN VITRO* DE LA MINERALIZACION BACTERIANA DE FOSFATOS

por

J. M. BAREA, A. RAMOS (*) y V. CALLAO

INTRODUCCION

La fracción orgánica del fósforo es considerada (15) la forma cuantitativamente mayoritaria de dicho elemento en la mayor parte de los suelos de cultivo.

Teniendo en cuenta (5) que el fósforo de los compuestos orgánicos no es fácilmente utilizable por la acción directa del vegetal, la conocida participación de los microorganismos en la reacción reversible: P orgánico $\rightleftarrows$ P asimilable se convierte en un fenómeno fundamental para el aprovechamiento agrícola de dichos substratos fosforados.

A esta última idea colaboran algunos investigadores (4 y 6), mientras otros (7) atribuyen principalmente la actividad fosfatásica de la rizoplana a la acción de la propia raíz, aunque admiten la cooperación de los microbios del suelo en dicho fenómeno.

Desde que Stoklasa (17) descubrió la mineralización microbiana de fosfatos se han realizado numerosísimas investigaciones para estudiar el aislamiento y el mecanismo de acción de gérmenes del suelo con tales características, siendo su principal objeto concretar su participación en los fenómenos de mineralización y dirigir su actuación a un mejoramiento de la nutrición vegetal (1).

(*) Dirección actual: Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Barcelona.

das en suelos de la provincia de Granada, en relación con la mineralización

El presente trabajo forma parte de una serie de experiencias realiza-de fosfatos por bacterias. En él se pretende la normalización de las técnicas de aislamiento de bacterias del suelo con las citadas características, y el estudio de la capacidad fosfatásica *in vitro* de dichos microorganismos frente a tres compuestos orgánicos fosforados, normalmente presentes en suelos agrícolas, como son: lecitina, fitato y glicerofosfato.

MATERIAL Y METODOS

Constituye nuestro material de partida muestras de suelo de la provincia de Granada tomadas en parcelas de vega y secano.

Las técnicas seguidas se describen a continuación.

A) Técnicas de aislamiento

1) Solubilización bacteriana en placa

Se sembraron diluciones de suelo en medio de cultivo R-C (14), adicionado de los fosfatos orgánicos en estudio, previamente preparados de la forma siguiente:

a) Emulsión de yema de huevo; para estudiar la mineralización del fósforo lecitínico. Seguimos la técnica de Harrigans y McCance (10).

b) Suspensión de fitato cálcico. Técnica de Szember modificada por Greaves y Webley (9).

c) Suspensión de glicerofosfato cálcico. Preparada por nosotros por técnica análoga a la del fitato, pero en proporción del 3 % de glicerofosfato en solución acuosa de goma arábiga al 0,5 %.

Estos fosfatos se adicionaron estérilmente, en proporción 1/10, al medio de cultivo R-C fundido y enfriado a unos 45 °C.

Las placas así preparadas fueron incubadas cinco días a 28 °C.

Las bacterias de acción fosfatásica manifiesta frente a alguno de los fosfatos (acción reconocible por la formación de halos en torno a la colonia) fueron coleccionadas y estudiadas frente a los dos restantes fosfatos en experiencia, mediante siembra masiva en sectores.

Nota. Uno de los constituyentes del medio R-C es glucosa al 2 %. Fue estudiada la influencia y necesidad de dicho azúcar en la solubilización del fósforo de los citados fosfatos orgánicos. Para ello, estas expe-

riencias en placa fueron realizadas de dos formas: con el medio R-C completo y con el medio R-C sin glucosa.

2) Aislamiento en placa y selección de solubilizadores en medio líquido

Placas con medio de cultivo R-C fueron inoculadas con las mismas diluciones de suelo anteriormente utilizadas, pero el medio en este caso no fue adicionado de fosfato orgánico. Incubadas estas placas a 28 °C durante cinco días, fue elegida una, con un contenido aproximado de 100 colonias, de las cuales eran tomadas 50 al azar, con las que fueron realizadas, en medio líquido, las pruebas de selección que se indican seguidamente.

a) Mineralización del fósforo de la lecitina. Se utilizó el siguiente medio de cultivo:

Extracto de levadura	2 g
Agua destilada	1.000 ml

pH = 7

Esterilización durante veinte minutos al autoclave, a 117 °C.

A 9 ml de este medio se adiciona estérilmente 1 ml de emulsión de yema de huevo (preparada por la técnica citada en apartado A-1).

Las bacterias fueron cultivadas cinco días a 28 °C.

b) Hidrólisis del fitato. Fue seguida la técnica descrita por Greaves y colaboradores (9), que emplean como substrato fitato sódico resublimado. Nosotros empleamos la sal cálcica (en suspensión). Para lograr homogeneidad y favorecer el contacto enzima-substrato, la incubación durante las tres horas que prescribe la técnica original fue realizada en constante agitación.

La estimación cualitativa de la liberación de fósforo de la lecitina o del fitato fue efectuada en una parte alícuota de los cultivos correspondientes centrifugados (4.500 r/m para el fitato y 20.000 r/m para lecitina), siguiendo posteriormente la técnica de Jackson (11). El desarrollo de color azul, por formación del complejo fosfomolíbdico, indica acción positiva.

c) Degradación del glicerofosfato. Se determinó en el medio de Lonchead y Chase (12), modificado por Greaves y Webley (8).

La detección del crecimiento, tras cinco días de incubación a 28 °C, indica positividad.

Las bacterias seleccionadas por técnicas en medio líquido (apartado A-2) fueron ensayadas por técnicas de solubilización en placa (apartado A-1), con objeto de realizar un estudio comparativo de ambos grupos de técnicas.

Todas las bacterias seleccionadas fueron posteriormente investigadas cuantitativamente.

B) Técnicas cuantitativas

a) y b) Mineralización del fósforo de la lecitina y fitato

Seguimos las técnicas descritas en el apartado A-2 para la selección en medio líquido, valorando posteriormente el fósforo mineralizado según el método de Jackson (11).

Las medidas fueron efectuadas en el absorciómetro Speker de Hilger. La curva patrón fue construida de acuerdo con el método de Bray y Kurz (3).

c) Degradación de glicerofosfato

Fue considerada técnica cuantitativa la medida nefelométrica del crecimiento bacteriano tras cinco días de incubación a 28 °C, en el medio de Lonchead y Chase modificado por Greaves y Webley (8).

RESULTADOS Y DISCUSION

En los *cuadros 1-3* exponemos los resultados obtenidos en la mineralización de lecitina, fitato y glicerofosfato, tanto por técnicas en placa como por técnicas en medio líquido, convertidas estas últimas en cuantitativas.

El *cuadro 1* corresponde a la lecitina. En él se aprecia que la reacción positiva en placa se relaciona con una liberación de fósforo en medio líquido.

Hemos de hacer notar que todas las bacterias estudiadas sólo mostraron reacción lecitinásica típica frente a la emulsión de yema de huevo, cuando prescindimos del 2 % de glucosa constituyente del medio R-C.

Cuadro 1. Lecitina

Germen	Placa	P, %	Germen	Placa	P, %
Aeromonas sp. (44)	+	25	*Pseudomonas* sp. (42)	+	30
Pseudomonas sp. (8)	+	10	*Pseudomonas* sp. (Am)	+	10
Sarcina sp. (45-1)	—	—	*Acinetobacter* sp. (45-2)	+	34
Acinetobacter sp. (3 a)	+	8	*Acinetobacter* sp. (1)	+	33
Pseudomonas sp. (4)	+	29	*Pseudomonas* sp. (49)	+	25
Pseudomonas sp. (2 a)	+	18	*Pseudomonas* sp. (2)	—	—
Pseudomonas sp. (B-6)	+	36	*Arthrobacter* sp. (B-2)	+	34
Pseudomonas sp. (B-8)	—	—	*Cellulomonas* sp. (26)	+	21
Flavobacterium sp. (11)	+	26	*Streptomyces* sp. (12)	+	17
Micrococcus sp. (4)	+	16	*Agrobacterium* sp. (37)	+	25
Pseudomonas sp. (40)	—	—	*Corynebacterium* sp. (46)	—	—
Aerobacter sp. (A)	+	22	*Cellulomonas* sp. (28)	+	32
Acinetobacter sp. (31)	+	35	*Kurthia* sp. (41)	+	18
Kurthia sp. (34)	—	—	*Coryneforme* sp. (VI)	+	18
Pseudomonas sp. (29)	+	35	*Pseudomonas* sp. (30)	+	28
Xanthomonas sp. (35)	+	19	*Agrobacterium* sp. (36)	—	—
Achromobacterium sp. (38)	—	—	*Corynebacterium* sp. (B b)	+	25
Pseudomonas sp. (9)	+	25	*Bacillus* sp. (0_1)	—	—
Streptomyces sp. (St)	+	31	*Bacillus* sp. (0_7)	—	—
Bacillus sp. (B-1)	+	50	*Bacillus* sp. (H_5)	—	—
Bacillus sp. (27)	+	24	*Bacillus* sp. (B-4)	—	—
Bacillus sp. (50)	+	34	*Bacillus* sp. (PB)	+	18
Bacillus sp. (32)	+	18	*Bacillus* sp. (33)	+	20
Bacillus sp. (6)	—	—	*Bacillus* sp. (13)	—	—
Bacillus sp. (3)	—	—	*Bacillus* sp. (5)	—	—

Placa = solubilización en placa sin glucosa. + = actuación positiva (halo de solubilización). — = actuación negativa (ausencia de halo). P, % = tanto por ciento de fósforo libre (liberado y no utilizado por el germen a los cinco días de actividad). La parte alícuota valorada, 0,1 ml, corresponde a un fósforo total de 25 γ.

Estudiada la liberación de fósforo en medio líquido, las bacterias positivas no liberaron fósforo cuando el medio ensayado (apartado A-2-a de "Material y Métodos") era adicionado de glucosa. Los azúcares constituyentes de la yema de huevo (13) parecen ser suficientes para las actividades metabólicas de estas bacterias del fósforo, inhibiéndose la liberación del nutriente ante una adición "extra" de glucosa.

Cuadro 2. Fitato

Germen	Placa	P, %	Germen	Placa	P, %
Aeromonas sp.	+	10	*Pseudomonas* sp.	+	8
Pseudomonas sp.	+	3	*Pseudomonas* sp.	+	—
Sarcina sp.	—	—	*Acinetobacter* sp.	+	—
Acinetobacter sp.	+	—	*Acinetobacter* sp.	+	18
Pseudomonas sp.	+	—	*Pseudomonas* sp.	—	--
Pseudomonas sp.	+	19	*Pseudomonas* sp.	+	10
Pseudomonas sp.	+	12	*Arthrobacter* sp.	—	1
Pseudomonas sp.	+	18	*Cellulomonas* sp.	—	1
Flavobacterium sp.	—	—	*Streptomyces* sp.	+	—
Micrococcus sp.	+	14	*Agrobacterium* sp.	+	15
Pseudomonas sp.	+	--	*Corynebacterium* sp.	+	3
Aerobacter sp.	+	15	*Cellulomonas* sp.	+	1
Acinetobacter sp.	+	21	*Kurthia* sp.	+	—
Kurthia sp.	+	21	*Coryneforme* sp.	+	—
Pseudomonas sp.	+	15	*Pseudomonas* sp.	+	16
Xanthomonas sp.	—	—	*Agrobacterium* sp.	+	14
Achromobacter sp.	+	10	*Corynebacterium* sp.	+	2
Pseudomonas sp.	+	24	*Bacillus* sp.	+	17
Streptomyces sp.	—	17	*Bacillus* sp.	—	17
Bacillus sp.	—	17	*Bacillus* sp.	—	15
Bacillus sp.	—	27	*Bacillus* sp.	—	32
Bacillus sp.	—	18	*Bacillus* sp.	—	19
Bacillus sp.	—	28	*Bacillus* sp.	—	30
Bacillus sp.	—	26	*Bacillus* sp.	—	27
Bacillus sp.	—	29	*Bacillus* sp.	—	28

Placa = solubilización en placa con glucosa. + = actuación positiva (halo de solubilización). — = actuación negativa (ausencia de halo). P, % = tanto por ciento de fósforo liberado por el germen del contenido total en fósforo durante tres horas de actividad biológica.

El *cuadro 2* corresponde al fitato. En él se expresa como valor cuantitativo el porcentaje de fósforo liberado durante las tres horas de actividad bacteriana, teniendo en cuenta que la parte alícuota valorada fotocolorimétricamente, corresponde a un contenido total de fósforo de 100 γ.

Los resultados nos llevan a las siguientes consideraciones:

1) Bacterias positivas en placa y negativas en la prueba cuantitativa

fitásica. Estas bacterias realizan, presumiblemente, la solubilización del fitato cálcico indirectamente, por actuación previa sobre la glucosa presente en el medio R-C (en ausencia del carbohidrato, ninguna de las bacterias investigadas fue capaz de solubilizar fitato en placa).

Greaves y Webley (8) analizan el pH de los halos de solubilización de fitato cálcico en placa, y lo encuentra comprendido entre 6,8 y 4,10, lo que induce a pensar a dichos autores que la solubilización ocurre por formación de ácidos orgánicos a partir de la glucosa. Es abundante la bibliografía [recientemenet revisada (16)], en la que se estudia la solubilización de fosfatos insolubles por producción de ácidos orgánicos en el metabolismo glucídico bacteriano, acción atribuible a una bajada del pH (quizás por necesidades de funcionalismo de una determinada enzima) y más importantemente a un mecanismo de quelación que llevan a efecto los referidos ácidos orgánicos.

Por otra parte, los citados Greaves y Webley analizan el contenido en fósforo inorgánico en las zonas de solubilización, encontrando que no aparece incrementado con respecto al de las zonas no inoculadas de la placa, sugiriendo que el fitato haya sido solubilizado, pero no hidrolizado.

El resultado negativo que hemos encontrado al efectuar con este grupo de gérmenes la prueba cuantitativa fitásica confirma el hecho de una solubilización sin liberación de fósforo inorgánico. Estos gérmenes carecen del equipo enzimático fitásico, pero apuntamos que la solubilización del substrato es útil para la asimilación del nutriente por la planta, aunque no podemos opinar sobre su interés para la economía del vegetal, ya que esto sería problema de experiencia de inoculación en invernadero o campo.

2) Bacterias negativas en placa y positivas en la prueba cuantitativa fitásica. Es manifiesta la solubilización por mecanismo enzimático puro.

3) Bacterias negativas en ambas técnicas.

4) Bacterias positivas en ambas técnicas. A la vista de los puntos 1 y 2, nos inclinamos por un mecanismo mixto de solubilización, indirecto por intervención de ácidos orgánicos, y directo de naturaleza enzimática.

En el *cuadro 3* exponemos la mineralización de glicerofosfato. En primer lugar, se aprecia una correspondencia entre positividad en la lectura nefelométrica (claro exponente de actuación por mecanismo enzimático) y una típica reacción de solubilización en placa con medio de

Cuadr

Germen	Placa		Nef.
	Con glucosa	Sin glucosa	
Aeromonas sp.	—	+pp	42
Pseudomonas sp.	+pp	+pp	—
Sarcina sp.	+	—	—
Acinetobacter sp.	+	+pp	40
Pseudomonas sp.	+pp	+pp	—
Pseudomonas sp.	+	—	—
Pseudomonas sp.	+	+pp	27
Pseudomonas sp.	+	+pp	54
Flavobacterium sp.	+pp	+pp	38
Micrococcus sp.	+pp	+pp	9
Pseudomonas sp.	+	+pp	6
Aerobacter sp.	+	+pp	4
Acinetobacter sp.	+	—	—
Kurthia sp.	+	—	—
Pseudomonas sp.	+	+pp	38
Xanthomonas sp.	+	+pp	13
Achromobacter sp.	+	—	—
Pseudomonas sp.	+	+pp	26
Streptomyces sp.	+	+pp	+
Bacillus sp.	—	±	58
Bacillus sp.	—	±	54
Bacillus sp.	—	—	—
Bacillus sp.	+	+pp	15
Bacillus sp.	—	+pp	17
Bacillus sp.	+pp	+pp	31

Placa = solubilización (y precipitación), con y sin glucosa en el medio. + = actuación positiva (halo de solubilización). — = actuación negativa (ausencia de halo). ± =

erofosfato

Germen	Placa		Nef.
	Con glucosa	Sin glucosa	
udomonas sp.	—	+pp	14
udomonas sp.	+	+pp	6
inetobacter sp.	—	+pp	17
inetobacter sp.	+	+pp	5
udomonas sp.	+	—	—
udomonas sp.	+	+pp	22
hrobacter sp.	+	+pp	34
llulomonas sp.	+	+pp	9
eptomyces sp.	+	+pp	+
robacterium sp.	+	+pp	55
rynebacterium sp.	+	+	50
llulomonas sp.	+	—	—
rthia sp.	—	—	—
ryneforme sp.	+pp	+pp	—
udomonas sp.	+	+pp	45
robacterium sp.	+	+pp	30
rynebacterium sp.	—	—	—
cillus sp.	—	±	28
cillus sp.	—	±	45
cillus sp.	—	+pp	15
cillus sp.	—	±	68
cillus sp.	—	+pp	12
cillus sp.	+	+pp	16
cillus sp.	—	+pp	16
cillus sp.	—	+pp	26

actuación tardía y débil. + pp = actuación típica en placa sin glucosa (solubilización y precipitación). Nef. = lectura en el nefelómetro.

cultivo carente de glucosa. Esta reacción consiste en una precipitación en torno a la colonia bacteriana y formación de un halo solubilizador que rodea al precipitado *(figura 1)*.

Sugerimos que el precipitado corresponde a glicerato cálcico, ya que la relación con el mecanismo enzimático (medio de Lonchhead-Chase) aboga por una utilización de fósforo dejando al glicerofosfato cálcico como glicerato.

Esta típica reacción en placa sin glucosa no la dan ciertos gérmenes (todos ellos pertenecen al género *Bacillus),* los cuales ofrecen una actuación débil en placa, pero muy satisfactoria en el medio de Lonchhead-Chase, particularidad quizás debida a las necesidades nutricionales de estos gérmenes.

En cuanto a la comparación de resultados de solubilización en placa con glucosa y prueba enzimática en Lonchhead-Chase obtenemos unas consecuencias semejantes a las expuestas anteriormente en este capítulo al discutir la minralización de fitato. Estas consecuencias nos permiten clasificar a las basterias positivas frente a glicerofosfato, según su mecanismo de acción, así tenemos:

a) Bacterias positivas en placa con glucosa y negativas en medio de Lonchhead-Chase: mecanismo indirecto de solubilización.

b) Bacterias negativas en placa con glucosa y positivas en medio de Lonchhead-Chase: mecanismo de acción directo, enzimático.

c) Bacterias positivas en ambas técnicas: mecanismo mixto de los dos anteriores.

Concluimos en resumen: consideramos fundamentales las pruebas de aislamiento bacteriano basadas en mecanismo de acción enzimático, pero apuntamos que la solubilización (sin liberación de fósforo) por mecanismo indirecto, medido por ácidos orgánicos, pese a su inespecificidad, puede ser un principio muy valioso en Nutrición Vegetal.

Nota. Las bacterias seleccionadas en el presente estudio han sido identificadas por nosotros (2). En el *cuadro 1* (lecitina) anotamos entre paréntesis la sigla correspondiente al germen en nuestra colección bacteriana, y así se puede localizar en el aludido trabajo de identificación. (Prescindimos de esta anotación en los *cuadros 2-3,* ya que repetimos exactamente la ordenación arbitraria con que exponemos los gérmenes en el *cuadro 1.*)

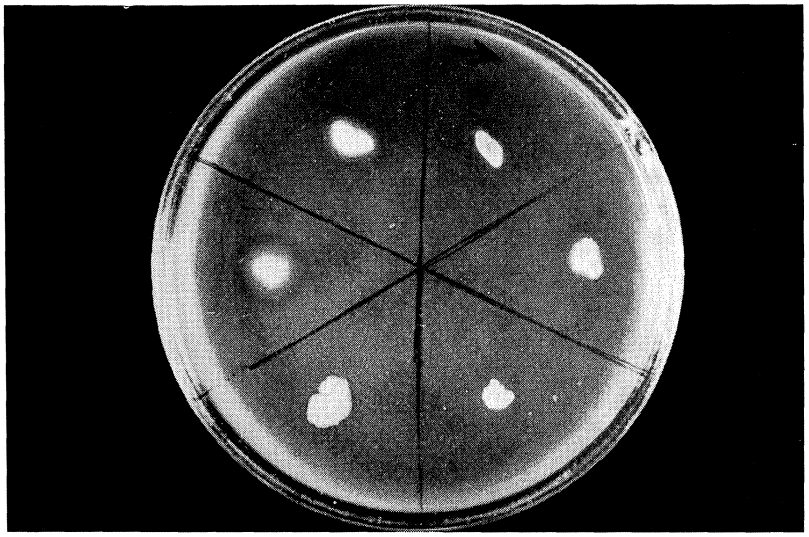

Figura 1. Solubilización de glicerofosfato en placa sin glucosa (comenzando por el germen marcado con flecha, y siguiendo el sentido de la misma). Germen 0: Bacillus *sp. (±). G. 42:* Pseudomonas *sp. (+ pp). G. 45-1:* Sarcina *sp. (—). G. 50:* Bacillus *sp. (—). G. A:* Aeromonas *sp. (+ pp). G. 27:* Bacillus *sp. (+ pp)*

Las razas cuantitativamente superiores en cuanto a liberación de fósforo serán ensayadas en experiencias de invernadero.

RESUMEN

Se estudia la actuación *in vitro* sobre lecitina, glicerofosfato y fitato de diferentes microorganismos del suelo, cualitativa y cuantitativamente. Se ha observado una inhibición en la solubilización de lecitina (de yema de huevo), al adicionar glucosa al medio de cultivo, fenómeno que no se ha apreciado en los otros dos substratos.

Es notable el mecanismo de solubilización, en placa, de glicerofosfato en ausencia de glucosa, manifestado por la aparición de un precipitado interno dentro de la zona de solubilización.

SUMMARY

A study of microorganisms isolated from soil, was made to determine the ability to attack *in vitro* lecithin (egg yolk), glycerophosphate and phytate.

The survey was carried out both qualitative as well as quantitatively.

Inhibition of lecithinase reactions was observed when glucose was added ot the cultural media; this, was not found against the another two phosphates.

The glycerophosphate breakdown mecanism was noteworthy, by using a plate technique, in absence of glucose from the medium. This typical reaction is characterized for a precipitation around microbial colonies within the solubilization (cleared) zones.

BIBLIOGRAFIA

1. Barea, J. M. 1969. Estudio sobre gérmenes del suelo capaces de mineralizar los fosfatos orgánicos. I. Introducción y revisión bibliográfica. Ars Pharm., X, 117.
2. Barea, J. M.; Ramos, A., y Callao, V. 1969. Identificación de microorganismos del suelo mineralizadores de fosfato. Ars Pharm., XI, 407.
3. Bray, R. H., y Kurtz, L. T. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. Soil Sci., 59, 39.

4. CHIRIKOV, F. V., y VOLKOVA, V. V. 1941. Vest. Udobr. Agrotekh. Agropochvoved, 3, 115. Ref.: MCLAREN y PETERSON. 1967. Soil Biochemistry, cap. 9, 216. Dekker, Nueva York.
5. DE TURK. 1965. Ref.: SAUCHELLI.
6. EID, M. T.; BLACK, C. A., y KEMPTHORNE. 1951. Importance of soil organic and inorganic phosporus to plant growing at low and high soil temperatures. Soil Sci., 71, 361.
7. ESTERMANN, E. F., y MCLAREN. 1961. Contribution of rhizoplane organisms to the total capacity of plants to utilise organic nutrients. Plant Soil, 15, 243.
8. GREAVES, M. P., y WEBLEY, D. M. 1965. A study of the breakdown of organic phosphates by the root region of certain pastures grasses. J. Appl. Bacteriol., 28, 454.
9. GREAVES, M. P.; WEBLEY, D. M., y ANDERSON, G. 1963. A rapid method for determining phytase activity of soil microorganism. Nature, 200, 1.231.
10. HARRIGANS, W. F., y MCCANCE, M. E. 1966. Laboratory Methods in Microbiology, 64. Academic Press, Nueva York.
11. JACKSON, M. L. 1958. Chemical Analysis, cap. VII. Prentice Hall Inc., Englevood. Cliffs. N. J.
12. LOONCHHEAD, A. G., y CHASE, F. E. 1943. Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. Soil Sci., 55, 185.
13. LONG, C. 1961. Biochemists' Handbook. E. L. F. N. Spon Ltd., Londres.
14. RAMOS, A., y CALLAO, V. 1967. El empleo de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana. Microbiol Españ., 20, 1.
15. SAUCHELLI, V. 1965. Phosphates in Agriculture. Reinhold Publishing Corporation, Nueva York.
16. STEVENSON, F. J.; MCLAREN y PETERSON. 1967. Soil Biochemistry, cap. 5. Dekker, Nueva York.
17. STOKLASA. 1908. Ref.: O. VERONA. Microbiología Agraria. Edit. U. T. E. T.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGIA
SECCION DE FIJACION DIRECTA DEL NITROGENO

INFLUENCE OF SOME PESTICIDES ON *AZOTOBACTER* (*)

por

ISABEL GIL, J. MORALES, A. MARTIN, C. RUANO and F. ARAGONES

INTRODUCTION

We all know the extent of the use of pesticides as killers of unwanted weeds, nematods, insects and fungi. We must consider too, the side-effect on the microorganisms that form the flora of the soil and play a beneficial role in maintaining its fertility.

Reports have been published on the effect of various pesticides (2-3, 6-7, 10 and 12) upon several microorganisms, and some of them deal with *Azotobacter* and *Rhizobium* (4 and 8-9), so important in the Nitrogen-fixation.

We thought it important to study the effect of some pesticides on the growth of *Azotobacter*.

MATERIALS AND METHODS

The organism used was *Azotobacter chroococcum* 1602 from Göttingen. The growth medium was the N_2 free mineral salt solution of Burk with 1.5 % mannitol added.

(*) Un resumen de este trabajo se presentó al XXIX Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas (Londres), septiembre de 1969.

1. Pesticides tested

Time hours	Blanks				Conc. ppm	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	T	T_1	T_2	T_3											
					4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0	0.00	0.00	0.00	0.00	40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
					400	0.02	0.14	0.23	0.38	0.39	0.00	0.00	0.00	0.07	0.02
					4	0.09	0.17	0.30	0.34	0.34	0.12	0.22	0.12	0.44	0.26
24	0.09	0.07	0.20	0.20	40	0.00	0.00	0.39	0.22	0.39	0.09	0.06	0.10	0.22	0.33
					400	0.03	0.13	0.34	0.70	0.52	0.28	0.20	0.09	0.08	0.19
					4	0.52	0.60	1.00	1.00	1.00	0.65	0.58	0.74	0.88	0.77
48	0.77	1.00	1.30	1.00	40	0.02	0.02	0.79	0.85	1.00	0.56	0.77	0.41	0,72	0.72
					400	0.04	0.12	0.49	0.82	0.49	0.96	0.79	0.45	0.40	0.72
					4	1.00	1.00	1.15	1.09	1.22	1.00	1.22	0.96	1.04	0.92
72	1.09	1.22	1.22	1.15	40	0.01	0.01	1.09	1.09	1.09	1.00	1.09	1.00	1.00	1.04
					400	0.04	0.15	0.82	1.04	0.79	1.04	1.09	0.96	0.88	1.04
					4	1.09	0.92	1.09	1.22	1.15	1.04	1.30	0.88	0.96	0.82
144	1.04	1.22	1.15	1.09	40	0.02	0.01	1.15	1.09	1.15	1.15	1.22	0.88	1.00	0.82
					400	0.04	0.13	0.82	1.09	1.30	1.09	1.22	0.92	1.15	1.00

T, Blank. T_1 1 % alcohol test. T_2, 0.5 % detergent + 1 % benzene. T_3, 2 % NaKtartrate. A, 50 % solution of copper oxychloride. B, a second sample of copper oxychloride. C, 40 % butylester of 2, 4-dichlorophenoxiacetic acid- WHO/SHT/5. D, 80 % isobutylester of 2, 4-dichlorophenoxiacetic acid - WHO/SHT/5. E, isooctylester of 2, 3, 5 trichlorophenoxyacetic acid - WHO/SHT/6. F, (DDT) WHO/SIF/$4R_2$. G, viddem D (dichloropropano-dichloropropene). H, folidol (20 % parathion) WHO/SIT/$11R_1$ I, phospherne (methylparathion). J, pellitory extract WHO/SIT/7.

The incubation was at 28 °C. The organism was grown on a shaker in 100 ml flasks with a side tube with 35 ml of medium.

The optical density was measured in a Spectronic 20 spectrophotometer, at 600 mμ. The pesticides tested are recorded in *table 1*. Every pesticide was tested at concentrations of 400, 40 and 4 ppm. We chose these concentrations because they are those used in the fields.

Solutions were obtained by adding substances harmless for *Azotobacter*. Sodium potasium tartrate was used for copper oxychloride. The esters of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,3,4-trichlorophenoxyacetic acid were dissolved first in alcohol and the alcoholic solution diluted with water, the final concentration of alcohol being 1 %. DDT was dissolved in benzene and then emulsified in water with a polyoxyethylenic detergent (final concentrations 1 % benzene, 0.5 % detergent).

We studied the effect on growth of *Azotobacter*:

a) In liquid medium, following the changes of optical density at 0, 24, 48, 72 and 144 hours.

b) In Petri dishes with Burk medium with 2 % agar added, inoculated with *Azotobacter*, placing the pesticides on holes (as in antibiotics technique) and measuring the inhibition ring.

RESULTS

a) Effect on growth

could see that copper oxychloride of the *table 1* inhibited the growth
trations of 400 and 40 ppm. It had no effect at 4 ppm. The
sobutyl esters of 2,4-D and 2,3,5-T gave an initial turbidity at
creasing the growth in some degree at all the concentrations
ffect of DDT, viddem D and folidol is shown in the table.
itial turbidity. Phospherne and pellitory extract had initial
-D esters.
e show the effect of copper oxychloride. It inhibited the
pletely at 400 and 40 ppm. It had no effect at 4 ppm.
figure 2 the butylester of 2,4-D, at a concentration of 400 ppm decreased the growth in some degree. At 40 and 4 ppm it had no effect.

Finally, *figure 3* shows the growth without being affected by pellitory extract at any tested concentration (400, 40 and 4 ppm).

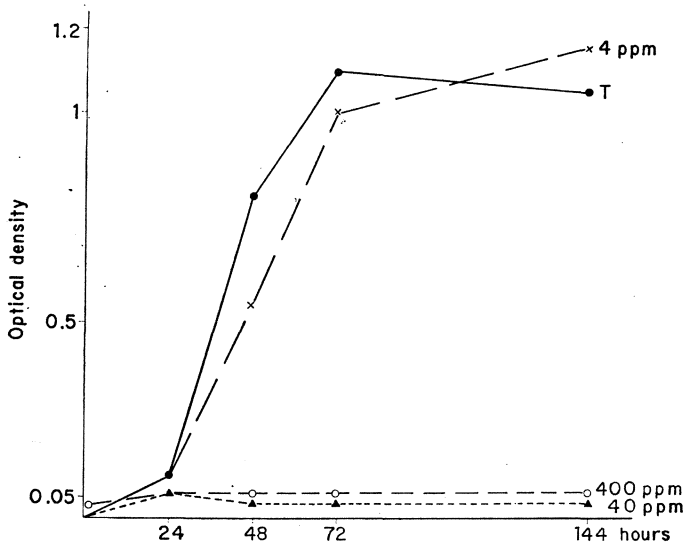

Figure 1. Effect of copper oxycloride

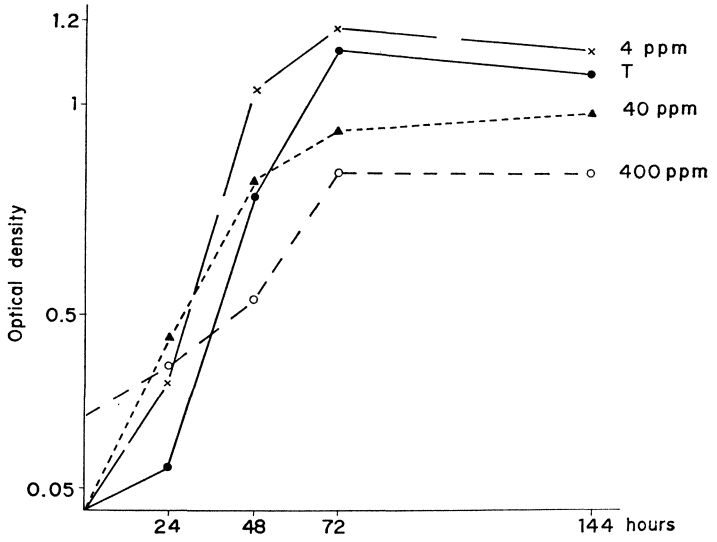

Figure 2. Effect of 2,4 - D butylester

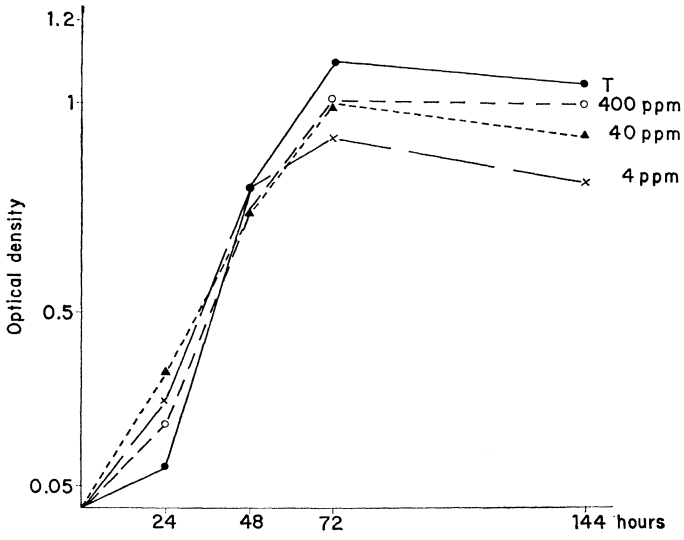

Figure 3. Effect of pellitory extract

b) Experiments in Petri dishes

In Petri dishes prepared in the way already explained, we could detect that copper oxychloride inhibited the growth from a concentration of 40 ppm. At 400 ppm folidol supported growth even if there was no carbon source present.

DISCUSSION

We are not prepared to discuss the effect of pesticides upon the microflora of the soil as a whole but upon an isolated bacteria, studying its reactions *in vitro* when growing in a defined medium, under controlled conditions.

We could see, agreeing with Hoover (6) and Colmer (4) that the esters of 2,4-D have no effect when used at concentrations of 4 and 40 ppm but, as Colmer concluded, they have inhibitory effects as they reached 400 ppm (he observed the inhibitory effect at 200 ppm). But

as these concentrations are much higher than any which it is possible to find in the flelds we can say that they are harmless for the *Azotobacter* in Agriculture.

We could see that copper oxychloride had the higher toxicity for *Azotobacter* but, even so, a concentration higher than 4 ppm was needed to suppres the growth. All the other pesticides tested were harmless under our experimental conditions.

About the observations on the growth of *Azotobacter* in Petri dishes, they only confirm the results in liquid medium.

The stimulative effect of 2,4-D that Colmer fixed at the concentration of 200 ppm could be detected by us in the Petri dishes where the ring of inhibition was followed by another of stimulated growth.

Te folidol produced growth even if no carbon sources was present. We suggest that folidol (20 % parathion solution) was degraded, liberating C_2H_5OH that could be used as carbon source by *Azotobacter*.

SUMMARY

Several pesticides were tested against *Azotobacter chroococcum*. Copper oxycloride was the only that inhibited its growth completly, at some concentrations, both in liquid and solid media; the esters of 2,4 and 2,3,5 di- or triphenoxyacetic acid, DDT, folidol, etc., had no effect at the concentrations tested.

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de varios pesticidas sobre *Azotobacter chroococcum*.

Solamente el oxicloruro de cobre mostró efecto inhibitorio total sobre el crecimiento, tanto en medio líquido como en medio sólido a 400 y 40 ppm. Los otros pesticidas probados, a las concentraciones estudiadas, no influyen, al menos en forma apreciable, en el desarrollo del microorganismo.

REFERENCES

1. BLOODWORTH, M. E. 1966. Pesticides and Their Effect on Soils and Water. ASA. Spec. Pub.
2. CARINI, S. 1963. The action of selective herbicides on microorganisms of grass swards. I. Herbicides and soil microflora. Ann. Microbiol. Enzimol., 13, 1-9.
3. CASELEY, J. C., and BROADOENT, F. E. 1968. The effect of five fungicides on soil respiration and some nitrogen transformation in Yolo fine sandy loam. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 3, 58-64.
4. COLMER, A. R. 1953. The action of 2,4-D upon the *Azobacter* on some sugar cane soils. Appl. Microbiol., 1, 184-87.
5. EVANS, W. C. 1968. Biochemical transformations of pesticides by soil microorganisms. Biochem. J., 109.
6. HOOVER, M. E. 1952. The action of some herbicides upon the microflore of the soil. M. S. Thesis. Louisiana State Univ.
7. JENSEN, H. L. 1954. The magnesium requirements of *Azobacter* and *Rhizobium* with some additionals notes on the latter genus. Acta. Agr. Scand., 4, 224-36.
8. JOHNSON, E. J., and COLMER, A. R. 1957. Relationship between magnesium and the physiological effect of 2,4-D acid on *Azobacter vinelandii* and *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol., 73, 139-43.
9. MASHTAKOV, S. M.; GURINOVICH, E. S.; ZINMENKO, T. L., and KABAILOVA, I. V. 1962. Effect of herbicides on soil microflora. Mikrobiologiya, XXXI, 85.
10. Organización Mundial de la Salud. 1961. Especificaciones para Plaguicidas. Ginebra.
11. PANTOS, G.; GYORKO, P., and TAKATS, T. 1964. Study of the soil microbiological effect of herbicides used in practical farming. Agrokem. Talajtan, 13 suppl., 63. Ref.: Biol. Abstr., 46, 15-67, 590.

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES FARMACOLOGICAS. BARCELONA

ESTUDIO DE LA ACCION CONJUNTA DE CLORANFENICOL Y FRAMICETINA

por

F. GUERRERO, A. GIRÁLDEZ y A. HOSTA

INTRODUCCION

Tanto el cloranfenicol como la framicetina son antibióticos de utilización reciente en el tratamiento de infecciones intestinales, existiendo bibliografía de su uso clínico por separado (1-2 y 23-26) y conjuntamente (13 y 19) con excelentes resultados.

En el terreno experimental, exceptuando los trabajos de Lutz (15-18), no existe una mayor información sobre las características de la asociación de cloranfenicol y framicetina, por lo que hemos creído de interés estudiar más profundamente las posibilidades de esta asociación, pues debido a tratarse de un antibiótico bacteriostático y otro bactericida, resulta más difícil juzgar su actividad *a priori.*

En muchas ocasiones, diferentes autores se han preocupado de las posibles reglas generales que rigen la actividad de las asociaciones (7-9 y 20), pero, realmente, en cada caso concreto se impone un estudio detallado de cada asociación. Así, son muchos los trabajos existentes dedicados al estudio de diferentes asociaciones de antibióticos, enfrentando cada una de ellas a una serie de gérmenes seleccionados (10-11, 14 y 21-22).

Nosotros, en este sentido, hemos programado el trabajo experimental en los términos siguientes:

Primero, para saber si existe entre el cloranfenicol y la framicetina:

antagonismo, indiferencia, sumación o sinergía, hemos planteado una serie de experiencias para determinar la concentración mínima inhibidora (c.m.i.) de cada uno de los antibióticos, viendo luego cómo estas concentraciones se modifican al actuar conjuntamente ambos antibióticos.

En segundo lugar, conociendo la importancia que en la justificación de una asociación puede tener su capacidad de disminuir la posibilidad de aparición de resistencias, hemos planteado unas experiencias de adaptación de los gérmenes a concentraciones crecientes de los antibióticos, por separado y conjuntamente, estableciendo las concentraciones máximas a las que puede hacerse resistente un germen —en las condiciones empleadas por nosotros— y comparando luego las concentraciones obtenidas para cada uno de los antibióticos, con la conseguida al emplear la asociación.

En tercer lugar, y para determinar el mecanismo de acción de esta asociación, hemos recurrido a las técnicas de trasplante de gérmenes, que permiten estudiar la viabilidad de éstos, después de haber permanecido en contacto con el antibiótico, con deducción del modo de acción —bacteriostático, bactericida— de éste.

Por último, siendo el cloranfenicol fácilmente absorbible por el intestino y la framicetina prácticamente inabsorbible, características éstas muy interesantes para el tratamiento de infecciones intestinales, hemos querido determinar *in vivo,* en animales de experimentación, las velocidades de absorción intestinal de ambos antibióticos, por separado y conjuntamente, para comprobar si estas características son alteradas por la presencia simultánea de ambos antibióticos.

MATERIAL Y METODOS

I. Determinación de la concentración mínima inhibidora

1) Mediante la técnica del gradiente de concentraciones en placa seguida por Szybalski (28), consistente en obtener la gama deseada de concentraciones de antibiótico, o antibióticos, en medio sólido y en una sola placa de Petri.

Previo unos ensayos de tanteo para determinar el orden de concen-

traciones que permitía determinar la c.m.i., las concentraciones de antibióticos empleadas fueron:

Cloranfenicol	10 μg/ml en capa base
Framicetina base	10 μg/ml en capa base
Cloranfenicol + framicetina base	10 μg + 10 μg/ml en capa base

En cada uno de los ensayos efectuados con cada germen se emplearon cuatro placas:

1.ª con cloranfenicol

2.ª con framicetina

3.ª con cloranfenicol y framicetina

4.ª como testigo; sin antibiótico

Los gérmenes empleados en este ensayo fueron: *Escherichia coli* CMFFB 60, *Bacillus subtilis* NCIB 8054, *Staphylococcus aureus* NCIB 8625, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 8344, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Proteus vulgaris* CMFFB 100, *Salmonella tiphymurium* CMFFB 79 y *Bacillus pumilus* ATCC 8241.

2) Con objeto de determinar las c.m.i. con mayor sensibilidad que en los métodos que emplean medios sólidos, se realizaron numerosas turbidimetrías (12), utilizándose como reactivo biológico la *Escherichia coli.*

Se emplearon tres series de seis tubos aforados, de 10 ml, con concentraciones crecientes de antibiótico: una serie con cloranfenicol, otra con framicetina y otra con cloranfenicol y framicetina, y dos tubos testigos: uno con caldo estéril, sin antibiótico ni inóculo, y otro inoculado y sin antibiótico. El primer testigo servía como referencia al leer la transmisión de los tubos en el colorímetro, y el segundo para comprobar el crecimiento límite del germen, cuando éste no era sometido a la acción de antibiótico alguno, durante el mismo tiempo de incubación que las series con antibiótico.

Las concentraciones empleadas de cloranfenicol y framicetina, o de la suma de ambos, oscilaron entre 0,5 y 8 μg/ml. Con objeto de no diluir el medio al agregar las soluciones de antibióticos, dichas soluciones

se prepararon empleando como disolvente el mismo medio de cultivo (bacto-antibiotic medium 3, de Difco).

La incubación se efectuó en baño de María, a 37 °C, durante cinco horas. Pasado dicho tiempo, la transmisión de luz de los tubos era leída en un colorímetro, con filtro 70, y basándonos en que los valores de transmisión son inversamente proporcionales al crecimiento del germen y, por lo tanto, directamente proporcionales a la actividad antibiótica, deducíamos los resultados de la acción individual y conjunta de los antibióticos frente al germen.

II. Ensayo sobre desarrollo de resistencia adquirida

Para determinar la concentración máxima de antibiótico a que llega a hacerse resistente el germen en ensayo, hemos ido resembrándolo en medio sólido en presencia de concentraciones crecientes de antibióticos, con el fin de determinar el grado de resistencia adquirida a los antibióticos empleados por separado y conjuntamente, según la técnica descrita en un trabajo precedente por uno de nosotros (6).

El presente ensayo se efectuó con *Escherichia coli*. Este se comenzó sembrando en estría en la superficie de un medio sólido, con unas concentraciones iniciales de antibiótico (cloranfenicol, framicetina y cloranfenicol + framicetina) que permitiesen su crecimiento, e incubando seguidamente en estufa, a 37 °C, durante unas dieciséis-dieciocho horas. Las concentraciones de antibiótico empleadas inicialmente fueron:

Cloranfenicol	0,62 μg/ml
Framicetina base	0,43 μg/ml
Cloranfenicol + framicetina base	0,62 y 0,43 μg/ml

A partir de éstas se iniciaron las sucesivas resiembras en concentraciones crecientes de antibiótico. El número total de resiembras efectuadas fue:

37 resiembras en medio con cloranfenicol
45 resiembras en medio con framicetina
24 resiembras en medio con cloranfenicol + framicetina

Simultáneamente, se hizo una prueba que nos permitía comprobar, con mayor seguridad, que el germen se había hecho progresivamente

resistente al antibiótico. Dicha prueba consistió en sembrar el germen original, que nunca había sido puesto en contacto con antibiótico alguno, en un medio con concentraciones de antibiótico inferiores a las toleradas por el mismo, después de haber sido sometido a concentraciones sucesivamente crecientes de antibiótico, comprobando la ausencia de crecimiento.

El ensayo se dio por terminado cuando el germen dejó de crecer frente a cada uno de los antibióticos y a la suma de ambos, o bien la concentración de antibiótico que permitía el crecimiento del germen era sumamente elevada, considerándose por lo tanto que éste se había vuelto definitivamente resistente a cualquier concentración de este antibiótico.

III. Ensayos sobre mecanismo de acción de los antibióticos

Para estudiar el mecanismo de acción de los antibióticos, acción bacteriostática o bactericida, y la posible interacción entre los mismos: indiferencia, sumación, antagonismo y sinergia, se recurrió a las técnicas de trasplante. Nuestras primeras pruebas las realizamos mediante el sistema de transferencia sobre celofán (3-4), pero obtuvimos mejores resultados al emplear la técnica de transferencia mediante tampón de terciopelo (5). Esta técnica consiste en trasplantar el microorganismo crecido en un medio sólido, en cuya superficie se han colocado o bien discos embebidos en antibiótico (en este caso, 2 discos embebidos en cloranfenicol y 2 en framicetina), o bien tiras de papel colocadas en ángulo recto, a otra placa con medio de cultivo sólido estéril y sin discos ni tiras de antibiótico. La disposición de los discos es diferente, según quiera ponerse de manifiesto la existencia de una probable acción sinérgica o antagónica (5).

La transferencia del germen se lleva a cabo mediante un tampón, cuya parte inferior está forrada de terciopelo. Dicho tampón, previamente esterilizado, se presiona sobre la superficie de la primera placa (sembrada e incubada), y a continuación se presiona similarmente en la superficie de la segunda, incubándola a continuación.

Una vez incubadas las placas en las que se hizo el trasplante del germen crecido en las primeras, se interpreta la figura producida por los halos de inhibición y el crecimiento del germen trasplantado, el cual si la acción inhibidora de los antibióticos de la primera placa (por separado y conjuntamente) era de tipo bacteriostático, vuelve a crecer, y si era de tipo bactericida no vuelve a reproducirse.

IV. Ensayos sobre absorción intestinal

Para el estudio de la influencia mutua del cloranfenicol y la framicetina sobre sus respectivas absorciones intestinales, hemos verificado ésta mediante la técnica de absorciones sucesivas de Sols y Ponz (27), en rata, situando en un asa intestinal (de 20-30 cm) una solución del antibiótico, o de ambos, a la concentración de 1 mg/ml de cada uno de ellos; los períodos de absorción fueron 4, sucesivos, de treinta minutos cada uno. Después de cada absorción se lavó el asa intestinal con suero fisiológico, hasta completar 100 ml; en esta solución se determinaba el antibiótico residual para conocer, por diferencia, la cantidad absorbida. En el caso del cloranfenicol, la valoración se realizó diluyendo en agua convenientemente la solución, y leyendo directamente en espectrofotómetro la extinción producida a 278 mμ. Para la framicetina se siguió el método microbiológico, en placas de agar sembradas con *Staphylococcus aureus,* situando las soluciones en pocillos excavados en el agar y comparando los halos de inhibición obtenidos, después de la incubación, con una escala de patrones, según técnica acostumbrada.

RESULTADOS

I. Determinación de la concentración mínima inhibidora

1) Los resultados obtenidos en los ensayos para la determinación de la c.m.i. por el método del gradiente de concentraciones en placa, así como los gérmenes utilizados en los mismos, aparecen en el *cuadro 1,* resumiéndose gráficamente en la *figura 1.*

La selección de los gérmenes objeto de ensayo se hizo por su adaptación al método o, fundamentalmente, por su habitat intestinal y posible patogenicidad.

La tabulación de estos resultados demuestra cómo las c.m.i. de cada antibiótico, para cada uno de los gérmenes, disminuyen cuando los antibióticos se emplean asociados.

En el caso de *Escherichia* y *Salmonella* el efecto de la acción conjunta es más destacado, obteniéndose las mayores diferencias entre las c.m.i. de los antibióticos aislados y la de su asociación.

Cuadro 1

Germen	Antibiótico	Crecimiento de la estría mm	C. m. i. µg/ml
Escherichia coli (CMFFB 60)	Clor.	92	> 10,0
	Fram.	44	4,8
	Clor. + Fram.	16	1,7 + 1,7
	Testigo	92	(no hay antibiótico)
Bacillus subtilis (NCIB 8054)	Clor.	28	3,1
	Fram.	56	6,1
	Clor. + Fram.	16	1,7 + 1,7
	Testigo	92	(no hay antibiótico)
Staphylococcus aureus (NCIB 8625)	Clor.	30	3,3
	Fram.	28	3,1
	Clor. + Fram.	0	trazas
	Testigo	92	(no hay antibiótico)
Bordetella bronchiseptica (ATCC 8344)	Clor.	18	2,0
	Fram.	34	3,7
	Clor. + Fram.	16	1,7 + 1,7
	Testigo	92	(no hay antibiótico)
Sarcina lutea (ATCC 9341)	Clor.	36	3,9
	Fram.	62	6,8
	Clor. + Fram.	24	2,6 + 2,6
	Testigo	92	(no hay antibiótico)
Proteus vulgaris (CMFFB 100)	Clor.	50	5,5
	Fram.	56	6,1
	Clor. + Fram.	30	3,2 + 3,2
	Testigo	92	(no hay antibiótico)
Salmonella typhimurium (CMFFB 79)	Clor.	92	> 10,0
	Fram.	30	3,3
	Clor. + Fram.	16	1,7 + 1,7
	Testigo	92	(no hay antibiótico)
Bacillus pumilus (ATCC 8241)	Clor.	36	3,9
	Fram.	40	4,4
	Clor. + Fram.	32	3,4 + 3,4
	Testigo	92	(no hay antibiótico)

2) Los resultados más significativos observados en las diversas turbidimetrías se exponen en el *cuadro 2*, y se resumen en la *figura 2*.

En los resultados obtenidos se observan tres tipos de acción:

a) Concentraciones insuficientes de cloranfenicol y framicetina, para

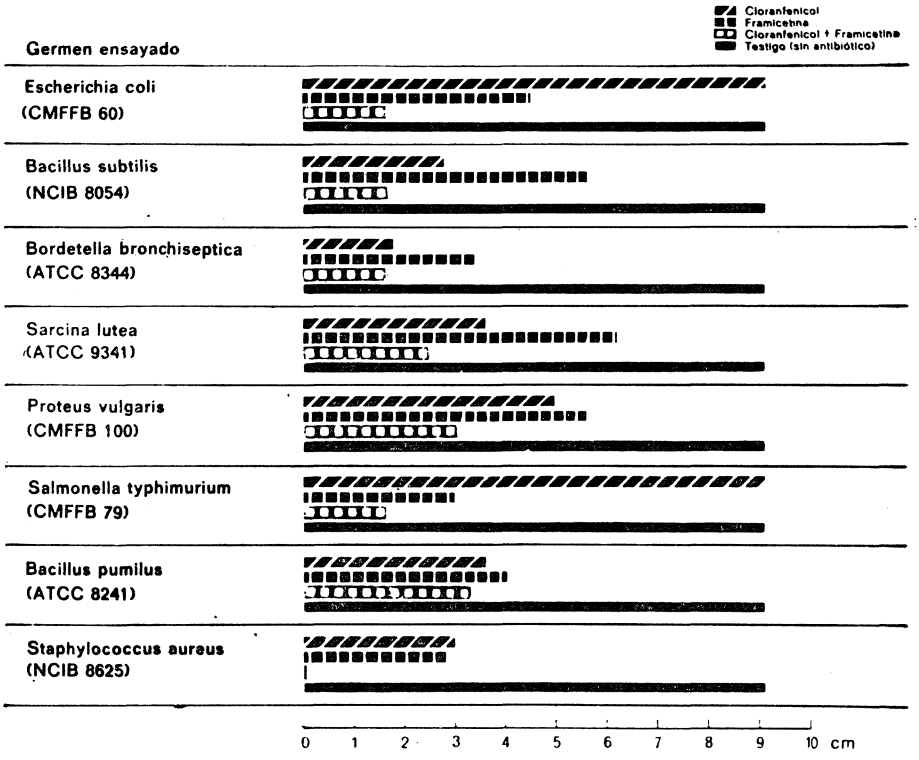

Figura 1. Crecimiento, en centímetros, de la estría de la siembra en el método del gradiente de concentraciones en placa. 10 μg/cm³ de cada antibiótico (capa base)

inhibir el crecimiento de *Escherichia coli,* son claramente activas cuando actúan conjuntamente.

b) Cuando sólo la concentración de uno de los antibióticos se muestra activa, la presencia del otro antibiótico, a la concentración que ha resultado insuficiente, aumenta claramente la actividad del primero.

c) Cuando las concentraciones de ambos antibióticos, por separado, resultan activas, éstas muestran, al menos, un efecto de sumación al actuar conjuntamente.

El hecho de que en ningún caso se observe antagonismo entre cloranfenicol y framicetina y de que, por el contrario, se pongan de manifiesto

Cuadro 2

Transmisión del tubo testigo sin antibiótico	Clor.		Fram.		Clor. + Fram.		Tipo de efecto observado
	Concentración μg/10 ml	Transmisión	Concentración μg/10 ml	Transmisión	Concentración μg/10 ml	Transmisión	
32	1	38	1	34	0,5 + 0,5	41	b)
	1	38	1	34	1 + 1	43	b)
	2	40	2	33	2 + 2	55	b)
	4	66	4	57	4 + 4	98	c)
	8	91	8	90	4 + 4	98	c)
28	1	30	1	30	0,5 + 0,5	30	concs. insftes.
	1	30	1	30	1 + 1	40	a)
	2	42	2	31	2 + 2	45	c)
	4	50	4	40	4 + 4	98	c)
	6	65	4	40	4 + 4	98	c)
	6	65	4	40	(*) 5 + 5	99	c)
34	4	40	3	36	4 + 3	81	b)
	4	40	3	36	(*) 5 + 3	55	b)
	8	72	5	30	8 + 5	95	b)
28	2	39	2	31	2 + 2	40	indiferencia
	4	46	3	32	4 + 3	66	c)
	4	46	3	32	(*) 5 + 3	72	c)
	6	75	4	62	6 + 4	86	c)
	8	88	5	33	8 + 5	100	c)
34	2	33	2	32	2 + 2	40	a)
	4	46	3	32	4 + 3	54	b)
	4	46	3	32	5 + 3	65	b)
	6	62	3	32	(*) 5 + 3	65	b)
	6	62	4	31	6 + 4	85	b)
	8	77	5	28	8 + 5	82	b)

Se considera que hay acción inhibidora a partir de una diferencia en la transmisión de 3 unidades con respecto al testigo. Las concentraciones señaladas con asterisco deben interpretarse por interpolación.

los efectos señalados en los apartados a), b) y c), demuestra que *in vitro,* y frente a *Escherichia coli,* esta asociación es altamente eficaz.

Estos resultados vienen a corroborar los obtenidos anteriormente por el procedimiento en placas con medio sólido.

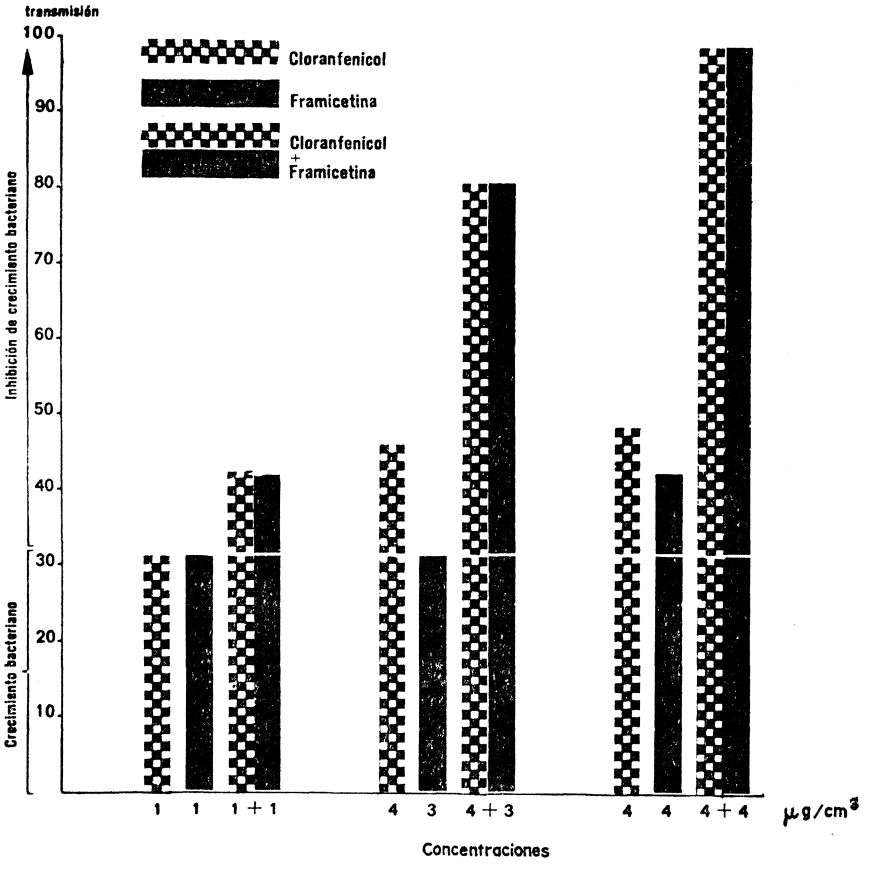

Figura 2. Inhibiciones de crecimiento expresadas en transmisión de luz, obtenidas con el método turbidimétrico

II. Ensayos sobre desarrollo de resistencia adquirida

De los resultados expuestos en el *cuadro 3* se deduce que la resistencia adquirida por *Escherichia coli* frente a cloranfenicol y framicetina, disminuye notablemente con el empleo conjunto de ambos antibióticos.

Siembra original

Siembra por transporte

Figura 3. Imagen del crecimiento bacteriano en una experiencia de transporte de gérmenes. Obsérvese la ampliación de los halos producidos por la framicetina al ser transportado el cultivo

Cuadro 3

Concentración máxima de cloranfenicol tolerada por el germen resistente	Concentración de framicetina que aún permitía el crecimiento del germen resistente	Concentración máxima de cloranfenicol + framicetina tolerada por el germen resistente
233 μg/ml	10.980 μg/ml	58 + 40 μg/ml

III. Ensayos sobre mecanismo de acción de los antibióticos

A lo largo de los ensayos realizados mediante tampón de terciopelo hemos podido comprobar una curiosa ampliación de los halos de inhibición producidos por la framicetina al ser trasplantado el cultivo, aumento que se comprobó no era debido a una posible lentitud en la difusión. Este hecho podría interpretarse como si la framicetina en la zona en que se halla a concentraciones insuficientes para ser bactericida ya desde el comienzo de la incubación, llegara a serlo en función del tiempo que permanece en contacto con los gérmenes *(figura 3)*.

La interpretación de las figuras obtenidas en los numerosos ensayos realizados con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus,* no llevaron, de una manera clara, a conclusiones que permitiesen definir el tipo de interacción de los antibióticos frente a estos gérmenes. Este aspecto sigue en estudio y sus resultados podrían ser objeto de una nueva publicación.

IV. Ensayos sobre absorción intestinal

Como puede deducirse de los resultados del *cuadro 4,* la conocida ausencia de absorción intestinal de la framicetina no es alterada por la presencia de cloranfenicol; por otra parte, la absorción intestinal del cloranfenicol no varía al administrarlo conjuntamente con la framicetina.

Cuadro 4. Miligramos absorbidos por asa intestinal

Absorción	I	II	III	IV
Antibiótico	Fram.	Clor. + Fram.	Fram.	Clor. + Fram.
Rata				
23	0	2,85 0	0	2,65 0
24	0	4,64 0	0	2,25 0
27	0	1,85 0	0	2,00 0
28	0	2,60 0	0	1,95 0
37	0	2,90 0	0	2,25 0
38	0	3,20 0	0	2,35 0

Antibiótico	Clor. + Fram.	Fram.	Clor. + Fram.	Fram.
4,54 0	25	0	3,60 0	0
2,15 0	26	0	— —	—
2,58 0	39	0	3,20 0	0
3,50 0	40	0	3,35 0	0

CONCLUSIONES

1) Los resultados obtenidos en todos los ensayos de determinación de las c.m.i. dentro de la gama de concentraciones, gérmenes y métodos usados, evidencian la acción sinérgica de la asociación de cloranfenicol y framicetina.

2) Los ensayos sobre adquisición de resistencia bacteriana demuestran que el empleo conjunto de cloranfenicol y framicetina evita muy notablemente la aparición de resistencias.

3) El modo de acción de la asociación de cloranfenicol y framicetina, experimentada con las técnicas de trasplante de gérmenes, sigue en estudio, destacando por el momento la observación del incremento de los halos de inhibición debidos a la framicetina al ser trasplantados.

4) Las absorciones intestinales propias del cloranfenicol y de la framicetina no resultan alteradas con el empleo conjunto de ambos antibióticos.

5) El conjunto de conclusiones obtenidas en este trabajo permite afirmar la idoneidad de la asociación de cloranfenicol y framicetina.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. L. Arcalís sus valiosos consejos e indicación de técnicas.

RESUMEN

Para poner de manifiesto las características de la asociación de cloranfenicol y framicetina, se han determinado las c.mi. de cada antibiótico y de ambos simultáneamente, por el método del gradiente de concentraciones en placa y por turbidimetría. También se ha estudiado la capacidad de la asociación para disminuir la resistencia adquirida, estableciendo las concentraciones máximas a las que puede hacerse resistente el germen y comparando luego las concentraciones obtenidas para cada uno de los antibióticos con la conseguida al emplear ambos conjuntamente.

Para determinar el mecanismo de acción de la asociación se han utilizado también las técnicas de trasplante de gérmenes. Habiéndose comprobado a su vez que la absorción intestinal de ambos antibióticos no varía con su empleo simultáneo.

El conjunto de conclusiones obtenidas con las diferentes técnicas permite afirmar la idoneidad de la asociación de cloranfenicol y framicetina.

SUMMARY

In order to study the interaction of chloramphenicol and framycetin the m.i.c. of each antibiotic were determined, separately and simultaneously, using the gradient concentration method in plate and by turbidimeter.

The capacity of the association to reduce acquired antibiotic resistance was also studied, maximum concentrations at which germs can prove resistance were established comparing concentrations obtained with each antibiotic to those achieved on using antibiotics ensemble.

Germ transplant techniques were also employed to determine the active mechanism of the association. It has been ascertained that the intestinal absorption of both antibiotics does not change with its simultaneous use.

The conclusions attained through the various techniques permit to assert that cloramphenicol and framycetin used ensemble constitutes and advantageous association.

BIBLIOGRAFIA

1. BRYAN, C.; STRATFORD, M. D., y SHIRLEY DIXSON, A. A. 1964. Med. J. Aust., 1, 74.
2. CATHALA, J., y colaboradores. 1954. Nourrison, 5, 198.
3. CLUZEL, R.; VAURS, R.; CLUZEL-NIGAY, M., y VERNER, M. 1960. Ann. Inst. Pasteur París, 98, 928.
4. CHAMBERT, Y. 1957. Ann. Inst. Pasteur París, 93, 289.
5. ELEK, S. D.; HILSON, G. R., y JEWELL, P. 1953. Brit. Med. J., IV, 1.298.
6. HOSTA, A. 1968. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.
7. JAWETZ, E. 1968. Antimicrob. Ag. Chemother. 1967, 203.
8. JAWETZ, E. 1968. Ann. Rev. Pharmacol, 8, 151.
9. JAWETZ, E., y GUNNISON, J. B. 1953. Pharmacol. Rev., 5, 175.
10. JONES, W. F., y FINDLAND, M. 1957. New England J. Med., 256, 115.
11. JONES, W. F., y FINDLAND, M. 1957. New England J. Med., 256, 869.
12. KLEIN, M., y SCHORR, S. E. 1953. J. Bacteriol., 65, 454.
13. LAPLANE, R.; DEBRAY, P., y DUCHÉ, D. J. 1955. Arch. Fr. Pédiat., 12, 861.
14. LAWRENCE, P., y GARROD, M. D. 1965. Med. J., 607.
15. LUTZ, A. 1954. Bull. Acad. Med., 138, 28.
16. LUTZ, A. 1955. Strasbourg Med., 6, 338.
17. LUTZ, A., y HOFFERER, M. J. 1954. Strasbourg Med., 9, 451.
18. LUTZ, A., y HOFFERER, M. J. 1955. Strasbourg Med., 6, 633.
19. MARQUEZY, R. A.; DEBRAY, P., y colaboradores. 1955. Arch. Fr. Pédiat., 12, 859.
20. MCCABE, W. 1968. Antimicrob. Ag. Chemother. 1967, 225.
21. MICHEL, J.; CLUZEL-NIGAY, M.; VAURS, R., y CLUZEL, R. 1963. Compt. Rend. Soc. Biol., 157, 548.

22. PORTOLÉS, A. 1966. An. Real Acad. Farm., 32, 6.

23. REIMANN, H. A., y LIAN, P. T. 1955. Arch. Intern. Med., 96, 777.

24. ROSS, S.; BURKE, F. G.; RICE, E. C.; WASHINGTON, J. A., y STEVENS, S. 1950. New England J. Med., 242, 145.

25. ROSS, S.; BURKE, F. G.; RICE, E. C.; WASHINGTON, J. A., y STEVENS, S. 1950. J. Amer. Med. Ass., 143, 1.459.

26. SCHNEEGANS, E.; HARRSCHER, A., y LEVY, M. 1955. Sem. Hop., 737, 3.956.

27. SOLS, A., y PONZ, F. 1946. Rev. Españ. Fisiol., 2, 283.

28. SZYBALSKI, W. 1952. Science, 116, 46.

X CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Orientado por la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología y organizado directamente por la Sociedad Mejicana de Microbiología, tuvo lugar en Ciudad de México el X Congreso Internacional de la especialidad, que reunió cerca de 4.000 participantes de todo el mundo. Es muy de destacar la extraordinaria, difícil y laboriosa tarea realizada por los organizadores mejicanos, presididos por el Prof. C. Casas-Campillo, para encuadrar las 610 comunicaciones presentadas, las cerca de 250 conferencias o charlas repartidas en los 11 simposios y 8 coloquios programados, las 5 mesas redondas y los 2 seminarios, en unas densas sesiones de trabajo sobre temas muy actuales y a cual más interesante.

Sorprende realmente la gran capacidad del Secretario-General, Dr. L. F. Bojalil, para coordinar tan extenso programa científico en colaboración con los Dres. Ruiz-Herrera y M. Servín-Massieu con las demás actividades sociales y culturales y con las reuniones de las Comisiones y Subcomisiones de la Asociación Internacional. No menos admirable que la meticulosa y cuidada edición del programa de 179 páginas y la elegante del Libro de Resúmenes con sus otras 278 páginas de apretadas comunicaciones, que llevaron a cabo los Profs. A. Pérez-Miravete y D. Peláez en jornadas agotadoras, o que la labor de tesorería que estuvo a cargo de la Dra. E. Pizarro-Suárez. Importante, también, el despliegue espectacular de la Prensa alrededor del Congreso, con información cotidiana y entrevistas diarias a numerosos congresistas, bajo la programación y dirección del Prof. P. Mendoza y del Dr. R. Mangas-Alfaro. A los Dres. D. Bessudo, V. M. Bojalil, E. Cabrera-Suárez, J. Campos, G. Carvajal, F. Esparza, J. Losa, G. Marván, M. Moncada, C. del Río, M. Rodríguez, M. Rusal y otros muchos correspondieron otras tantas e importantes misiones en la organización de los temas pre-Congreso, finanzas, exposición, etc., sin olvidar la gentil colaboración de la Comisión de Damas

formada por las Sras. de Casas-Campillo, de Bojalil, de Moncada, de Fernández y R. M. Guerrero.

El Congreso se dividió fundamentalmente en 10 Secciones, que dirigieron y organizaron con especial competencia los distintos Presidentes de cada una de las Comisiones encargadas del desarrollo de las Sesiones Científicas: Microbiología General, Presidente: Dr. J. Ruiz-Herrera. Fisiología Microbiana, Presidente: Dr. J. Ruiz-Herrera. Genética Microbiana, Presidentes: Dres. M. Servín-Massieu y F. Bastarrachea. Inmunología, Presidentes: Dres. E. Ortigoza y S. Estrada-Parra. Microbiología Médica, Presidentes: Dres. J. Olarte y A. Pérez-Miravete. Microbiología Industrial y Agrícola, Presidentes: Dres. A. Sánchez-Marroquín y C. Casas-Campillo. Epidemiología, Presidente: Dr. P. Mendoza. Micología, Presidente: Dr. A. González-Mendoza. Virología, Presidentes: Dres. L. E. Sánchez-Torres y E. Pizarro-Suárez. Enseñanza de la Microbiología, Presidente: Dr. M. Servín-Massieu.

Es evidente que en tan numeroso grupo de actividades apareciesen comunicaciones de gran interés para los especialistas de las distintas ramas y que se diese cuenta de la ejecución de brillantísimos trabajos de doctrina e investigación, que dieron lugar a animadas discusiones. Pero no es menos evidente que nuestra reseña no puede abarcar ni siquiera abordar una mínima parte de los temas tratados, sin desmerecer otros de tanto o mayor interés. Por esta razón, nos limitaremos a exponer sucintamente aquellos que puedan despertar cierta curiosidad general, como la que despertó en su momento entre la inmensa mayoría de los Congresistas.

Fue novedad, por ejemplo, el capítulo dedicado a la Microbiología del Espacio, que corrió a cargo de los investigadores americanos de la NASA. Así, tomando como base la suposición de que la Luna puede alojar organismos viables indígenas o transportados hasta ella de otros entes siderales, dieron cuenta de la investigación realizada para conocer la posible presencia de microorganismos en las muestras traídas por el Apolo XI. Con este material se realizaron pruebas bajo condiciones únicas de incubación que incluían hasta 324 combinaciones de temperatura, composición atmosférica, medios de cultivo y concentraciones salinas. Aportaron también sus conclusiones sobre la valoración gnotobiológica de la dieta alimenticia utilizada en el proyecto Apolo, realizada paralelamente con ratones nacidos y criados en condiciones que les libran de contaminación microbiana en el curso de su vida y con ratones normales. Las experiencias

demostraron que, a la par que reducían su poder reproductor, la mortalidad de estos últimos alcanzaba un 50 % a los cincuenta días al serles suministrada la "dieta Apolo" esterilizada por radiación, mientras que los primeros soportaban la dieta en condiciones aceptables. La posterior inoculación oral de los animales con determinadas bacterias dio un efecto más perjudicial para los "libres de gérmenes", que llegaron a alcanzar en algunos casos el 80 % de mortalidad. En la continuación de este interesante trabajo se venía a concluir que el aprovechamiento de la dieta suministrada a los astronautas del proyecto Apolo está íntimamente condicionada por las características de la microflora intestinal.

De valor práctico en la era aeroespacial son también los aislamientos del hongo *Cladosporium resinae* y de las bacterias *Micrococcus caseolyticus* y *Vibrio faecalis,* como agentes de corrosión —especialmente el primero— de las aleaciones de aluminio con que se fabrican los tanques de combustible de los turborreactores. Trabajo, que junto con el ensayo de más de veinte compuestos antimicrobianos de utilidad en este caso, se debe al paciente trabajo de investigadores japoneses.

Otro trabajo científico-especulativo basado en la presencia de CO_2 en Marte llamó mucho la atención, por haberse reproducido experimentalmente ciertas condiciones —anaerobiosis, oscuridad y medio heterótrofo— que se presume serían las que harían prevalecer determinados aspectos fisiológicos en el desarrollo de la vida que pueda existir en aquel planeta.

No faltó valiosa información sobre el tema de los virus oncógenos cada día más actual y prometedor en los estudios que llevan hacia la etiología del cáncer. La mayor supervivencia y retraso en la aparición de tumores en ratones hembras afectados de cáncer de mama tratados con moroxidina, en relación con otros no tratados; la inmunología del huésped, con la producción de anticuerpos neutralizantes y citotóxicos frente a los virus leucémico y sarcómico del ratón; el efecto represor de algunas bacterias —*Bordetella pertussis* y *Corynebacterium anaerobium,* junto al *Mycobacterium tuberculosis,* variedad BCG— sobre neoplasmas víricos; y otras muchas comunicaciones de este carácter fueron tratadas con singular acierto y esperanza en las sesiones especializadas de trabajo y en un interesante coloquio entre distinguidos investigadores en la materia.

Como era de esperar, la parte del león se la llevaron los trabajos sobre fisiología y genética microbianas, junto a otros aspectos de biología mo-

lecular. Todos ellos materias sugestivas y de gran porvenir, aunque también, por ser temas de moda, señuelo de iniciados y de avezados en el arte de la política científica, pues no siempre son tan originales.

Después de tímidas o brillantes apariciones de avanzada en otras reuniones, la matemática y la metafísica microbianas empezaron a tomar estado en este Congreso y a formar cuerpo de doctrina. El aula llena, con gente de pie en pasillos y puertas, habla bien del acierto del Prof Skerman al programar un simposio sobre Taxonomía Numérica. El uso de computadores y la aplicación del número a la clasificación de los microbios se unió a los nuevos conceptos sobre el valor del dato experimental y a la característica fenotípica o genética, a la evolución y, en suma, a la filosofía. Así pudo verse en la conferencia de Starr y Heise, binomio simbiótico de microbiólogo y filósofo, que la ciencia del pensamiento pegada a la ciencia práctica venía a perfilar la comparación de conceptos, para en golpes precisos, no exentos de humor, señalar que hay cosas iguales que se diferencian sólo por las palabras.

La Asamblea general celebrada el viernes día 14 de agosto, último del Congreso, alzó su voz para en nombre de cerca de 60.000 microbiólogos de todo el mundo, representados por casi todas las Sociedades de Microbiología agrupadas en la Asociación Internacional, condenar la "guerra biológica" y todas las que puedan derivar de los agresivos químicos y físicos. A esta condena precedió una serie de contactos mantenidos en los años pre-Congreso entre representantes de varias sociedades, y otra serie de reuniones secretas de delegados especialmente designados para este fin que tuvieron lugar durante los días del Congreso.

Los discursos de la sesión inaugural, celebrada, como las demás sesiones, en el amplio y funcional marco del Centro Médico de la Seguridad Social, el día 9 de agosto, estuvieron a cargo del Presidente del Comité Organizador, Prof. Carlos Casas-Campillo, del Presidente de AISM, Prof. André M. Lwoff, y del representante de la UNESCO, Dr. Burgers. La lección magistral fue pronunciada por el Prof. S. Luria, sobre el tema "Biología Molecular, Pasado, Presente y Futuro".

España estuvo presentada por una delegación presidida por el Prof. Agustín Pumarola Busquets, Vicepresidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, compuesta de cerca de 60 miembros, que aportaron no menos de 25 comunicaciones o participaron en coloquios y simposios. Fue muy de agradecer la gentileza de los organizadores mejicanos al ofrecer las presidencias de ocho sesiones a otros tantos españoles, que

se distribuyeron así: Regulación del crecimiento celular, E. Cabezas de Herrera. Factores no específicos de la inmunidad, A. Chordi. Anticuerpos, B. Fidalgo. Fisiología y Genética de hongos patógenos, R. Martín-Rueda. Infecciones respiratorias, A. Pumarola. Morfogénesis y morfología comparada, A. Rodríguez-Burgos. Microbiología Agrícola, R. de Vicente-Jordana. Protoplastos y esferoplastos, J. R. Villanueva. Una de las conferencias del Coloquio sobre "Enfermedades de Plantas Causadas por Micoplasmas" estuvo a cargo del Dr. M. Rubio-Huertos.

Nos queda para concluir decir que, el Congreso acordó dar por terminadas estas reuniones masivas. Decisión necesaria, aunque aceptada de mejor o peor grado, hace de este Congreso el último de la serie comenzada en París, en 1930, bajo la presidencia de dos insignes y famosos hombres de ciencia, el Dr. Roux y el Prof. Bordet, al que asistieron como representantes de España entre otros, el Prof. D. Francisco Tello, D. Antonio Ruiz-Falcó, D. Francisco Murillo y D. Arnaldo Socías. Con satisfacción decimos, que salvo en los dos Congresos celebrados durante nuestra guerra civil —Londres, 1936, y Nueva York, 1939, de los que por el momento carecemos de datos—, nuestro país ha estado siempre presente en estas manifestaciones científicas, y que se da la coincidencia de que el Dr. Jorge López-Tello, nieto del Prof. Tello —voz de la alocución de las gentes de habla española en el primer Congreso de París— ha sido el primer cronista español del que ha cerrado el ciclo en Ciudad de México un día de agosto de 1970. Congreso del más grato recuerdo para todos los delegados españoles, que tantas atenciones y deferencias recibieron tanto de los organizadores del mismo, como de los microbiólogos del país y del fraterno pueblo mejicano.

R. DE VICENTE-JORDANA

TRABAJOS DE AUTORES ESPAÑOLES EN EL CONGRESO DE MEJICO

COLOQUIOS

Rubio-Huertos, M.: Ultrastructure of stable pathogenic L-forms of *Agrobacterium tumefaciens* inside tumors.

SIMPOSIOS

Villanueva, J. R.: The phenomenon of regeneration of cell wall in fungal protoplasts.

SECCIONES

Arcos, J. M.; *González,* M. D., y *García,* A.: Comunidad antigénica entre *Trifolium* y *Rhizobium* previa a su simbiosis.

Bada, J. L.; *Fernández-Calvo,* J. L., y *Rodríguez-Burgos,* A.: Distribución de anticuerpos antipoliovirus en Liberia.

Beltrá, R.; *Rodríguez de Lecea,* J., and *Rosa,* C. de la: Tumor formation by nucleic acids from phytopathogenic bacteria.

Cabezas de Herrera, E., y *Tejerina,* G.: Efecto de la luz ultravioleta sobre *Erwinia carotovora.*

Callao, V.: Efecto de los movilizadores de fósforo del suelo sobre la fijación simbiótica de nitrógeno.

Chordi, A.; *Alvarez-Moreno,* C., y *Lledias,* T.: Agregación macromolecular de tiroglobulina: modificaciones antigénicas e inducción de autoinmunidad.

Díaz, R., y *Medrano,* M. P.: Estudio de la reacción cruzada de aglutinación entre *Yersinia enterocolitica* y *Brucella abortus.*

Garro, J.: Antigenicidad de las proteínas dentarias.

Jareño, M. A., y *Pérez-Silva,* J.: Ultraestructura de los esferoplastos de *Spirillum itersonii.*

Lahoz, R.; *Ballesteros,* A. M., and *González-Ibeas,* J.: Changes in the concentration of polyol in autolysing cultures of fungi.

López, R.; *Espinosa,* M., y *Portolés,* A.: Alteraciones cromogénicas, por mutación, en diferentes especies de *Pseudomonas.*

López-Tello, J., y *Jiménez-Muñoz,* B.: Sensibilidad de gérmenes patógenos a la ampicilina benzatina.

Lozano, J. M., and *Velasco,* F.: Microbiological population and types of humus in semiarid soils.

Martín-Rueda, R.; *Cáceres,* P.; *Vallejo,* F., y *Chordi,* A.: Composición antigénica de *Candida albicans*: modificación por factores extracromosomales.

Morales, J.; *Gil,* I., y *Martín,* A.: Fijación aerobia del nitrógeno por bacterias libres atípicas.

Pérez-Ureña, M. T., y *Espinosa,* M.: Acción inmunosupresora de distintos metabolitos cromógenos procedentes de *Pseudomonas* patógenos.

Pumarola, A., y *Rodríguez-Torres,* A.: Virosis respiratorias, encuesta serológica en una colectividad infantil.

Ramos, A.: The response of microflora to soil desinfection.

Ramos, F.; *Portolés,* A., e *Hidalgo,* A.: Características moleculares de los carotenoides sintetizados por *Sarcina lutea.*

Rodríguez, V., and *Fidalgo,* B.: Experimental rheumatoid factor (R. F.).

Ronda-Laín, C., y *Gil-Fernández,* C.: Formación de placas infectivas con los virus vacunal y Sindbis en ausencia de atmósfera de CO_2.

Tejerina, G., y *Cabezas de Herrera,* E.: Síntesis enzimática de *Erwinia carotovora* con relación al medio de cultivo.

Vadillo, E., y *Rodríguez-Burgos,* A.: Unicidad antigénica de la cápside del virus polioma.

Velasco, F., and *Lozano,* J. M.: Microbiological activity of humus in analogous soils.

Vicente-Jordana, R. de, and *Avendaño,* I.: Study on the cytoarjic effect in bulbs of gladiolus and hyacinth.

SIMPOSIO SOBRE FERMENTACION

Se proyecta celebrar el IV Simposio Internacional sobre Fermentación, en Kioto (Japón), del 19 al 25 de marzo de 1972.

La correspondencia debe dirigirse al Prof. Gyozo Terui, Chairman of the Organizing Committee, 4th International Fermentation Symposium, c/o Department of Fermentation Technology, Osaka University, Yamadakami, Suita-shi, Osaka 565, Japón.

NUEVO DEPARTAMENTO

En el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología se ha creado un Departamento de Protozoología, del que ha sido nombrado Jefe el Dr. Julio Pérez Silva. El nuevo Departamento consta de dos Secciones, Citología de Protozoos y Ecología, de cuyas jefaturas se han hecho cargo los Dres. J. Pérez Silva y Domingo Rodríguez, respectivamente.

CAMBIO DE NOMBRE DE LA SOCIEDAD

Por acuerdo reglamentario, la Sociedad de Microbiólogos Españoles ha cambiado su denominación por la de Sociedad Española de Microbiología.

CURSO SOBRE MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Del 19 de octubre al 13 de noviembre, la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de Madrid, en colaboración con el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, ha desarrollado un curso teórico-práctico sobre Microbiología de los Alimentos (Sección de Carnes), del que han sido, Director técnico, la Dra. Cándida González, del Instituto "Jaime Ferrán", y Profesores participantes, el Prof. L. Vilas (Director del Instituto) y el Dr. V. Martínez Piqueras, de la Facultad de Farmacia; el

SIMPOSIO SOBRE FERMENTACION

Se proyecta celebrar el IV Simposio Internacional sobre Fermentación, en Kioto (Japón), del 19 al 25 de marzo de 1972.

La correspondencia debe dirigirse al Prof. Gyozo Terui, Chairman of the Organizing Committee, 4th International Fermentation Symposium, c/o Department of Fermentation Technology, Osaka University, Yamadakami, Suita-shi, Osaka 565, Japón.

NUEVO DEPARTAMENTO

En el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología se ha creado un Departamento de Protozoología, del que ha sido nombrado Jefe el Dr. Julio Pérez Silva. El nuevo Departamento consta de dos Secciones, Citología de Protozoos y Ecología, de cuyas jefaturas se han hecho cargo los Dres. J. Pérez Silva y Domingo Rodríguez, respectivamente.

CAMBIO DE NOMBRE DE LA SOCIEDAD

Por acuerdo reglamentario, la Sociedad de Microbiólogos Españoles ha cambiado su denominación por la de Sociedad Española de Microbiología.

CURSO SOBRE MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Del 19 de octubre al 13 de noviembre, la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de Madrid, en colaboración con el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, ha desarrollado un curso teórico-práctico sobre Microbiología de los Alimentos (Sección de Carnes), del que han sido, Director técnico, la Dra. Cándida González, del Instituto "Jaime Ferrán", y Profesores participantes, el Prof. L. Vilas (Director del Instituto) y el Dr. V. Martínez Piqueras, de la Facultad de Farmacia; el

SIMPOSIO SOBRE FERMENTACION

Se proyecta celebrar el IV Simposio Internacional sobre Fermentación, en Kioto (Japón), del 19 al 25 de marzo de 1972.

La correspondencia debe dirigirse al Prof. Gyozo Terui, Chairman of the Organizing Committee, 4th International Fermentation Symposium, c/o Department of Fermentation Technology, Osaka University, Yamadakami, Suita-shi, Osaka 565, Japón.

NUEVO DEPARTAMENTO

En el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología se ha creado un Departamento de Protozoología, del que ha sido nombrado Jefe el Dr. Julio Pérez Silva. El nuevo Departamento consta de dos Secciones, Citología de Protozoos y Ecología, de cuyas jefaturas se han hecho cargo los Dres. J. Pérez Silva y Domingo Rodríguez, respectivamente.

CAMBIO DE NOMBRE DE LA SOCIEDAD

Por acuerdo reglamentario, la Sociedad de Microbiólogos Españoles ha cambiado su denominación por la de Sociedad Española de Microbiología.

CURSO SOBRE MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Del 19 de octubre al 13 de noviembre, la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de Madrid, en colaboración con el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, ha desarrollado un curso teórico-práctico sobre Microbiología de los Alimentos (Sección de Carnes), del que han sido, Director técnico, la Dra. Cándida González, del Instituto "Jaime Ferrán", y Profesores participantes, el Prof. L. Vilas (Director del Instituto) y el Dr. V. Martínez Piqueras, de la Facultad de Farmacia; el

SIMPOSIO SOBRE FERMENTACION

Se proyecta celebrar el IV Simposio Internacional sobre Fermentación, en Kioto (Japón), del 19 al 25 de marzo de 1972.

La correspondencia debe dirigirse al Prof. Gyozo Terui, Chairman of the Organizing Committee, 4th International Fermentation Symposium, c/o Department of Fermentation Technology, Osaka University, Yamadakami, Suita-shi, Osaka 565, Japón.

NUEVO DEPARTAMENTO

En el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología se ha creado un Departamento de Protozoología, del que ha sido nombrado Jefe el Dr. Julio Pérez Silva. El nuevo Departamento consta de dos Secciones, Citología de Protozoos y Ecología, de cuyas jefaturas se han hecho cargo los Dres. J. Pérez Silva y Domingo Rodríguez, respectivamente.

CAMBIO DE NOMBRE DE LA SOCIEDAD

Por acuerdo reglamentario, la Sociedad de Microbiólogos Españoles ha cambiado su denominación por la de Sociedad Española de Microbiología.

CURSO SOBRE MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Del 19 de octubre al 13 de noviembre, la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de Madrid, en colaboración con el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, ha desarrollado un curso teórico-práctico sobre Microbiología de los Alimentos (Sección de Carnes), del que han sido, Director técnico, la Dra. Cándida González, del Instituto "Jaime Ferrán", y Profesores participantes, el Prof. L. Vilas (Director del Instituto) y el Dr. V. Martínez Piqueras, de la Facultad de Farmacia; el

SIMPOSIO SOBRE FERMENTACION

Se proyecta celebrar el IV Simposio Internacional sobre Fermentación, en Kioto (Japón), del 19 al 25 de marzo de 1972.

La correspondencia debe dirigirse al Prof. Gyozo Terui, Chairman of the Organizing Committee, 4th International Fermentation Symposium, c/o Department of Fermentation Technology, Osaka University, Yamadakami, Suita-shi, Osaka 565, Japón.

NUEVO DEPARTAMENTO

En el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología se ha creado un Departamento de Protozoología, del que ha sido nombrado Jefe el Dr. Julio Pérez Silva. El nuevo Departamento consta de dos Secciones, Citología de Protozoos y Ecología, de cuyas jefaturas se han hecho cargo los Dres. J. Pérez Silva y Domingo Rodríguez, respectivamente.

CAMBIO DE NOMBRE DE LA SOCIEDAD

Por acuerdo reglamentario, la Sociedad de Microbiólogos Españoles ha cambiado su denominación por la de Sociedad Española de Microbiología.

CURSO SOBRE MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Del 19 de octubre al 13 de noviembre, la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de Madrid, en colaboración con el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, ha desarrollado un curso teórico-práctico sobre Microbiología de los Alimentos (Sección de Carnes), del que han sido, Director técnico, la Dra. Cándida González, del Instituto "Jaime Ferrán", y Profesores participantes, el Prof. L. Vilas (Director del Instituto) y el Dr. V. Martínez Piqueras, de la Facultad de Farmacia; el

Prof. D. Fernández-Galiano, de la Facultad de Ciencias; y la Dra. R. Beltrá y los Dres. J. Morales, A. Portolés, C. Ramírez y M. Rodríguez Rebollo, del Instituto "Jaime Ferrán".

CURSOS EN LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

En el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Salamanca y bajo la dirección del Prof. J. R. Villanueva, se celebrará, a partir del día 1 de marzo próximo, durante cuatro semanas, un curso de Fermentaciones Industriales —organizado por dicho Departamento y el Instituto de Biología Celular, del CSIC—, dado por técnicos de esta rama de la Industria e investigadores.

Asimismo, se desarrollará, del 19 al 24 de abril, un curso intensivo por el Prof. M. H. Richmond, sobre The Genetics Basis of Microbial Variation, cuya organización corre a cargo de los dos Centros españoles citados en colaboración con el British Council.

Informes e inscripciones, en el Departamento de Microbiología.

Prof. D. Fernández-Galiano, de la Facultad de Ciencias; y la Dra. R. Beltrá y los Dres. J. Morales, A. Portolés, C. Ramírez y M. Rodríguez Rebollo, del Instituto "Jaime Ferrán".

CURSOS EN LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

En el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Salamanca y bajo la dirección del Prof. J. R. Villanueva, se celebrará, a partir del día 1 de marzo próximo, durante cuatro semanas, un curso de Fermentaciones Industriales —organizado por dicho Departamento y el Instituto de Biología Celular, del CSIC—, dado por técnicos de esta rama de la Industria e investigadores.

Asimismo, se desarrollará, del 19 al 24 de abril, un curso intensivo por el Prof. M. H. Richmond, sobre The Genetics Basis of Microbial Variation, cuya organización corre a cargo de los dos Centros españoles citados en colaboración con el British Council.

Informes e inscripciones, en el Departamento de Microbiología.

Depósito legal: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid