
VOLUMEN 24. 1971

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

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

Vicedirector: Dr. David Vázquez, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Vocales: Dr. Antonio Portolés, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó, Dr. Gonzalo Sierra y Prof. Julio R. Villanueva.

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, 240 PTA; extranjero, 340 PTA

Número: España, 70 PTA; extranjero, 100 PTA

RECOMENDACIONES A LOS AUTORES

“Microbiología Española” publicará fundamentalmente trabajos y notas de investigación, dentro del campo de la Microbiología, y también trabajos doctrinales que se estimen de interés especial. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquiera otra revista. Los que aparezcan en “Microbiología Española” podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, deberán estar escritos a máquina, en papel de tamaño holandesa, por una sola cara, a doble espacio y márgenes de 2 cm a cada lado como mínimo. Los dibujos, con tinta china y en papel vegetal; las cifras, letras y leyendas, a lápiz. Para orientación de los autores, las dimensiones de la caja son 18 × 11,5 cm.

En la cabecera de la primera página se harán constar: Centro en que se ha realizado el trabajo, título (conciso), nombre del autor (o inicial) en letras minúsculas y apellido, en mayúsculas. Al pie de la página deberá figurar la dirección postal del autor.

En líneas generales, los trabajos de investigación constarán de: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Resumen en la otra lengua y Bibliografía. Las notas y trabajos doctrinales se redactarán con arreglo a su naturaleza.

Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. Cuando se adopten abreviaturas no corrientes deberán advertirse en el texto. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. Los datos se presentarán en forma de cuadro o de figura; cuadros y figuras, independientemente, estarán numerados y citados en el texto.

El resumen en la otra lengua, de un máximo de doscientas palabras, deberá contener el título del trabajo, un breve esquema del mismo y las conclusiones (abreviadas, en su caso).

La bibliografía se reducirá a la que esté directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabéticas, se ajustarán al siguiente orden:

Revistas: apellido del autor, inicial del nombre, año, título del trabajo, nombre abreviado de la revista (según Chemical Abstracts), número del tomo o volumen y páginas inicial y final.

Libros: apellido del autor e inicial del nombre [en su caso, del recopilador (“editor”)], año, título de la obra, tomo o volumen, capítulo (en su caso), página, editorial y población.

Los autores recibirán pruebas que deberán devolver en el plazo máximo de diez días para los residentes en España, y en el de veinte, para el extranjero. Transcurridos dichos plazos sin devolución de pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha de envío se anulará. Las modificaciones hechas por el autor que excedan del 2 % del texto serán abonadas por él.

Cada autor tendrá derecho a treinta separatas gratuitas; si deseara más, deberá indicarlo por escrito cuando devuelva las pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

La responsabilidad de los conceptos escritos corresponde a los autores.

Los trabajos se enviarán al Secretario de “Microbiología Española”, Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo Rector de la Revista.

INDICE

	Página
Purificación y propiedades químicas del antibiótico debarioidina, por <i>F. Lanzuela, J. Pérez-Silva y D. Rodríguez</i>	209
Cromatografía del pigmento carotenóide de <i>Sarcina lutea</i> sobre sephadex LH-20, por <i>F. Ramos</i>	221
Estructura y función de los mesosomas, por <i>C. Hardisson</i>	227
Estructura y composición química del lipopolisacárido del <i>Agro-</i> <i>bacterium tumefaciens</i> , por <i>M. Santaolalla</i>	243
Purificación y propiedades de la β -(1-3)-glucanasa de <i>Rhizopus</i> <i>arrhizus</i> , por <i>J. P. García-Ballesta</i>	257
Factores que intervienen en la formación de placas infectivas con el virus herpes simplex en ausencia de CO ₂ , por <i>Concepción Ron-</i> <i>da-Laín y Carmen Gil-Fernández</i>	271
Significado higiénico de la presencia de estafilococos patógenos o sus toxinas, en leche en polvo, por <i>S. Ovejero, G. Suárez y</i> <i>A. Santos</i>	287

CONTENTS

	Page
Purification and chemical properties of the antibiotic debarioidine, by <i>F. Lanzuela, J. Pérez-Silva and D. Rodríguez</i>	209
Chromatography of carotenoid pigments from <i>Sarcina lutea</i> on sephadex LH-20, by <i>F. Ramos</i>	221
Structure and function of mesosomes, by <i>C. Hardisson</i>	227
The structure and chemical composition of lipopolysaccharide from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , by <i>M. Santaolalla</i>	243
Purification and properties of a β -(1-3)glucanase from <i>Rhizopus</i> <i>arrhizus</i> , by <i>J. P. García-Ballesta</i>	257
Factors affecting plaque formation with herpes simplex virus in the absence of CO ₂ atmosphere, by <i>Concepción Ronda-Laín</i> and <i>Carmen Gil-Fernández</i>	271
Hygienic significance of pathogenic staphylococci and staphylococ- cal enterotoxins in powdered milk, by <i>S. Ovejero, G. Suárez</i> and <i>A. Santos</i>	287

Microbiología Española

Revista

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



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

Vicedirector: Dr. David Vázquez, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Vocales: Dr. Antonio Portolés, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó, Dr. Gonzalo Sierra y Prof. Julio R. Villanueva.

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, 240 PTA; extranjero, 340 PTA

Número: España, 70 PTA; extranjero, 100 PTA

INDICE

	Página
<i>Alonso, M.^a Luisa: véase Gil-Fernández, Carmen</i>	23
<i>Bernárdez, I., y Regueiro, B.: Caracteres comparativos entre una raza psicrófila y otra mesófila de <i>Arthrobacter</i></i>	69
<i>Castañón, M., e Iñigo, B.: Estudio microbiológico de margarinas alteradas. I. Aislamiento e identificación de especies: Levaduras</i>	39
<i>Castañón, M., e Iñigo, B.: Estudio microbiológico de margarinas alteradas. II. Aislamiento e identificación de especies: Bacterias</i>	49
<i>Castro, Serafina; Moreno, R., y Rubio-Huertos, M.: Algunas virosis de <i>Dianthus caryophyllus</i> cultivados en España y los virus que las producen</i>	135
V Congreso Latinoamericano de Microbiología	208
Congreso Nacional de Microbiología	67
III Congreso Nacional de Microbiología	207
Curso de Cultivo de tejidos	133
Curso de Virología	134
<i>Dámaso, D.: véase Perea, E. J.</i>	13
<i>Dámaso, D.: véase Moreno-López, M.</i>	79
<i>Fernández-Puentes, Carmen, y Rodríguez, D.: Metabolismo oxidante en <i>Polystictus versicolor</i></i>	159
<i>García-Ballesta, J. P.: Purificación y propiedades de la β-(1-3)-glucanasa de <i>Rhizopus arrhizus</i></i>	257
<i>García-Gancedo, A.: véase Gil-Fernández, Carmen</i>	23
<i>Gil-Fernández, Carmen: véase Ronda-Láin, Concepción</i>	271
<i>Gil-Fernández, Carmen; Alonso, M.^a Luisa; García-Gancedo, A., y Ronda, E.: Hemadsorción inespecífica y específica sobre células de riñón de cerdo normales e infectadas con el virus de la peste porcina africana</i>	23
<i>Hardisson, C.: Estructura y función de los mesosomas</i>	227
<i>Hechelmann, H.: véase Rodríguez-Rebollo, M.</i>	171
<i>Iñigo, B.: véase Castañón, M.</i>	39

	Página
<i>Iñigo, B.</i> : véase <i>Castañón, M.</i>	49
Junta Directiva de la Sociedad	207
<i>Lanzuela, F.</i> ; <i>Pérez-Silva, J.</i> , y <i>Rodríguez, D.</i> : Purificación y propiedades químicas del antibiótico debariocidina	209
<i>Leistner, L.</i> : véase <i>Rodríguez-Rebollo, M.</i>	171
Los doctores Feduchy y Rubio, en Sudamérica	133
<i>Manso, M.^a</i> del Rosario, y <i>Vicente, C.</i> : Acción del L-usnato sódico sobre la actividad ureásica de <i>Proteus mirabilis</i>	123
<i>Martínez, M.^a</i> Luisa: véase <i>Moreno-López, M.</i>	79
<i>Martínez, M.^a</i> Luisa: véase <i>Moreno-López, M.</i>	79
<i>Mishra, R. R.</i> : véase <i>Srivastava, V. B.</i>	115
<i>Mishra, R. R.</i> : véase <i>Srivastava, V. B.</i>	193
<i>Moreno, R.</i> : véase <i>Castro, Serafina</i>	135
<i>Moreno-López, M.</i> : véase <i>Perea, E. J.</i>	13
<i>Moreno-López, M.</i> ; <i>Dámaso, D.</i> ; <i>Perea, E. J.</i> ; <i>Sousa, A. S.</i> ; <i>Martínez, M.^a</i> Luisa, y <i>Marco, M.^a</i> Luisa: Fosfonomicina (MK-955). Espectro de sensibilidad cuantitativa de diversas cepas hospitalarias a este nuevo antibiótico	79
<i>Nogueira, C.</i> : véase <i>Vaamonde, R.</i>	87
<i>Nogueira, C.</i> : véase <i>Vaamonde, R.</i>	103
Nueva entidad biológica	67
<i>Ovejero, S.</i> ; <i>Suárez, G.</i> , y <i>Santos, A.</i> : Significado higiénico de la presencia de estafilococos patógenos o sus toxinas, en leche en polvo	287
<i>Peña-Iglesias, A.</i> , y <i>Rubio-Huertos, M.</i> : Ultraestructura de hojas de <i>Chenopodium quinoa</i> Wild infectadas con el virus Entrenudo corto infeccioso de la vid	183
<i>Perea, E. J.</i> : véase <i>Moreno-López, M.</i>	79
<i>Perea, E. J.</i> ; <i>Dámaso, D.</i> , y <i>Moreno-López, M.</i> : Estafilococos hospitalarios resistentes a las betalactaminas	13
<i>Pérez-Silva, J.</i> : véase <i>Lanzuela, F.</i>	209
<i>Pérez-Silva, M. G.</i> : véase <i>Sternfeld, E.</i>	177
<i>Ramos, F.</i> : Cromatografía del pigmento carotenoide de <i>Sarcina lutea</i> sobre sephadex LH-20	221
<i>Regueiro, B.</i> : véase <i>Bernárdez, I.</i>	69
<i>Regueiro, B.</i> : véase <i>Vaamonde, R.</i>	87
<i>Regueiro, B.</i> : véase <i>Vaamonde, R.</i>	103
<i>Rodríguez, D.</i> : véase <i>Fernández-Puentes, M.^a</i> del Carmen	159
<i>Rodríguez, D.</i> : véase <i>Sternfeld, E.</i>	177
<i>Rodríguez, D.</i> : véase <i>Lanzuela, F.</i>	209

	Página
<i>Rodríguez-Rebollo, M.; Tamura, K.; Hechelmann, H., y Leistner, L.: Aislamiento del <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en España ...</i>	171
<i>Ronda, E.: véase Gil-Fernández, Carmen ...</i>	23
<i>Ronda-Lain, Concepción, y Gil-Fernández, Carmen: Factores que intervienen en la formación de placas infectivas con el virus herpes simplex en ausencia de CO₂ ...</i>	271
<i>Rubio-Huertos, M.: véase Castro, Serafina ...</i>	135
<i>Rubio-Huertos, M.: véase Peña-Iglesias, A. ...</i>	183
<i>Santaolalla, M.: Estructura y composición química del lipopolisacárido del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...</i>	243
<i>Santos, A.: véase Ovejero, S. ...</i>	287
II Simposio sobre aplicaciones de la Espectroscopía molecular en Biología microbiana ...	134
<i>Sousa, A. S.: véase Moreno-López, M. ...</i>	79
<i>Srivastava, V. B., y Mishra, R. R.: Investigaciones sobre la microflora de la rizosfera. III. Influencia del período de recogida de muestras ...</i>	115
<i>Srivastava, V. B., y Mishra, R. R.: Investigaciones en la microflora de la rizosfera. I. Sucesión de la microflora en las diferentes zonas de la raíz de <i>Oryza sativa</i>, L. ...</i>	193
<i>Sternfeld, E.; Pérez-Silva, M. G., y Rodríguez, D.: Hidrogenación y deshidroxilación del ácido cafeico por varias especies de bacterias ...</i>	177
<i>Suárez, G.: véase Ovejero, S. ...</i>	287
<i>Tamura, K.: véase Rodríguez-Rebollo, M. ...</i>	171
<i>Vaamonde, R.; Nogueira, C., y Regueiro, B.: Producción y propiedades de mutantes de estafilococos ...</i>	87
<i>Vaamonde, R.; Nogueira, C., y Regueiro, B.: Lisis y estudio de lisados de estafilococos ...</i>	103
<i>Vela, Amparo: Presencia de virus en nódulos de leguminosas producidos por <i>Rhizobium</i> ...</i>	1
<i>Vicente, C.: véase Manso, M.^a del Rosario ...</i>	123

CONTENTS

	Page
A course on Tissue culture ...	133
A course on Virology ...	134
A new biological organization ...	67

	Page
<i>Alonso, M.^a Luisa: see Gil-Fernández, Carmen</i>	23
<i>Bernárdez, I., and Regueiro, B.: Study on psychrophilic and mesophilic strains of <i>Arthrobacter</i></i>	69
<i>Castañón, M., and Iñigo, B.: Microorganisms in spoiled margarines. I. Isolation and identification of yeasts</i>	39
<i>Castañón, M., and Iñigo, B.: Microorganisms in spoiled margarines. II. Isolation and identification of bacteria</i>	49
<i>Castro, Serafina; Moreno, R., and Rubio-Huertos, M.: An study of some carnation virus diseases in Spain</i>	135
<i>Dámaso, D.: see Perea, E. J.</i>	13
<i>Dámaso, D.: see Moreno-López, M.</i>	79
Directive Board of the Society	207
Doctors Feduchy and Rubio in South America	133
<i>Fernández-Puentes, Carmen, and Rodríguez, D.: Oxidative metabolism in <i>Polystictus versicolor</i></i>	159
<i>García-Ballesta, J. P.: Purification and properties of a β-(1-3)-glucanase from <i>Rhizopus arrhizus</i></i>	257
<i>García-Gancedo, A.: see Gil-Fernández, Carmen</i>	23
<i>Gil-Fernández, Carmen: see Ronda-Lain, Concepción</i>	271
<i>Gil-Fernández, Carmen; Alonso, M.^a Luisa; García-Gancedo, A., and Ronda, E.: Specific and non-specific hemadsorption by pig kidney cells infected and non-infected with African swine fever virus</i>	23
<i>Hardisson, C.: Structure and function of mesosomes</i>	227
<i>Hechelmann, H.: see Rodríguez-Rebollo, M.</i>	171
<i>Iñigo, B.: see Castañón, M.</i>	39
<i>Iñigo, B.: see Castañón, M.</i>	49
<i>Lanzuela, F.; Pérez-Silva, J., and Rodríguez, D.: Purification and chemical properties of the antibiotic debariocidine</i>	209
V Latinamerican Congress of Microbiology	208
<i>Leistner, L.: see Rodríguez-Rebollo, M.</i>	171
<i>Manso, M.^a del Rosario, and Vicente, C.: Action of sodium (L)-urate on the urease activity of <i>Proteus mirabilis</i></i>	123
<i>Marco, M.^a Luisa: see Moreno-López, M.</i>	79
<i>Martínez, M.^a Luisa: see Moreno-López, M.</i>	79
<i>Mishra, R. R.: see Srivastava, V. B.</i>	115
<i>Mishra, R. R.: see Srivastava, V. B.</i>	193
<i>Moreno, R.: see Castro, Serafina</i>	135
<i>Moreno-López, M.: see Perea, E. J.</i>	13

	Page
<i>Moreno-López, M.; Dámaso, D.; Perea, E. J.; Sousa, A. S.; Martínez, M.^a Luisa, and Marco, M.^a Luisa: Phosphonomycin (MK-955). Quantitative sensitivity spectra of various hospital strains to this new antibiotic</i>	79
National Congress of Microbiology	67
III National Congress of Microbiology	207
<i>Nogueira, C.: see Vaamonde, R.</i>	87
<i>Nogueira, C.: see Vaamonde, R.</i>	103
<i>Ovejero, S.; Suárez, G., and Santos, A.: Hygienic significance of pathogenic staphylococci and staphylococcal enterotoxins in powdered milk</i>	287
<i>Peña-Iglesias, A., and Rubio-Huertos, M.: Ultrastructure of Chenopodium quinoa plants infected with Grapevine fanleaf virus.</i>	183
<i>Perea, E. J.: see Moreno-López, M.</i>	79
<i>Perea, E. J.; Dámaso, D., and Moreno-López, M.: Beta-lactamine resistant hospital staphylococci</i>	13
<i>Pérez-Silva, J.: see Lanzuela, F.</i>	209
<i>Pérez-Silva, M. G.: see Sternfeld, E.</i>	177
<i>Ramos, F.: Chromatography of carotenoid pigments from Sarcina lutea on sephadex LH-20</i>	221
<i>Regueiro, B.: see Bernárdez, I.</i>	69
<i>Regueiro, B.: see Vaamonde, R.</i>	87
<i>Regueiro, B.: see Vaamonde, R.</i>	103
<i>Rodríguez, D.: see Fernández-Puentes, M.^a del Carmen</i>	159
<i>Rodríguez, D.: see Sternfeld, E.</i>	177
<i>Rodríguez, D.: see Lanzuela, F.</i>	209
<i>Rodríguez-Rebollo, M.; Tamura, K.; Hechelmann, H., and Leister, L.: Isolation of Vibrio parahaemolyticus in Spain</i>	171
<i>Ronda, E.: see Gil-Fernández, Carmen</i>	23
<i>Ronda-Láin, Concepción, and Gil-Fernández, Carmen: Factors affecting plaque formation with herpes simplex virus in the absence of CO₂ atmosphere</i>	271
<i>Rubio-Huertos, M.: see Castro, Serafina</i>	135
<i>Rubio-Huertos, M.: see Peña-Iglesias, A.</i>	183
<i>Santaolalla, M.: The structure and chemical composition of lipopolysaccharide from Agrobacterium tumefaciens</i>	243
<i>Santos, A.: see Ovejero, S.</i>	287
<i>Sousa, A. S.: see Moreno-López, M.</i>	79
<i>Srivastava, V. B., and Mishra, R. R.: Investigations into rhizosphere microflora. III. Influence of sampling time</i>	115

	Page
<i>Srivastava, V. B., and Mishra, R. R.</i> : Investigations into rhizosphere microflora. I. Succession of microflora on root regions of <i>Oryza sativa</i> L.	193
<i>Sternfeld, E.; Pérez-Silva, M. G., and Rodríguez, D.</i> : Hydrogenation and dehydroxylation of caffeic acid by some bacteria species	177
<i>Suárez, G.</i> : see <i>Ovejero, S.</i>	287
II Symposium on Molecular Spectroscopy applied to Microbial Biology	134
<i>Tamura, K.</i> : see <i>Rodríguez-Rebollo, M.</i>	171
<i>Vaamonde, R.; Nogueira, C., and Regueiro, B.</i> : Study on staphylococci mutants	87
<i>Vaamonde, R.; Nogueira, C., and Regueiro, B.</i> : Staphylococci lysis.	103
<i>Vela, Amparo</i> : Virus infection within <i>Rhizobium</i> induced nodules.	1
<i>Vicente, C.</i> : see <i>Manso, M.^a del Rosario</i>	123



INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE PROTOZOOLOGIA
SECCION DE ECOLOGIA

PURIFICACION Y PROPIEDADES QUIMICAS DEL ANTIBIOTICO DEBARIOCIDINA

por

F. LANZUELA, J. PEREZ-SILVA y D. RODRIGUEZ

INTRODUCCION

En 1958, Pérez Silva y Lahoz (15) describían la presencia de una nueva sustancia antibiótica, debariocidina, en los sobrenadantes libres de células de cultivos de una cepa de *Bacillus subtilis* aislado de una muestra de pimentón. El antibiótico es activo frente a todas las especies de levaduras de *Debaryomyces* ensayadas.

Pérez Silva y Gil (14) ensayaron la acción *in vitro* de la debariocidina frente a diferentes levaduras aisladas de afecciones del tracto urinario, de personas tratadas por antibióticos, encontrándose que 33 estirpes de *Candida albicans* eran las únicas sensibles, de 68 estirpes de levadura aisladas.

Ramírez y colaboradores (16) estudiaron la acción inhibitoria de la debariocidina sobre *Candida albicans*, *C. clausenii*, *C. langeronii*, *C. stellatoidea* y *C. viswanathii* y encontraron que el antibiótico podía ser usado para la rápida identificación de *C. albicans*.

La producción de sustancias antibióticas es un proceso muy conocido en bacterias esporuladas. Studer (20) ha realizado una completa revisión de la literatura científica sobre este aspecto. Los péptidos antibióticos pro-

ducidos por *Bacillus subtilis* actúan principalmente contra hongos y bacterias gram-positivas. Sólo el vivicil (3) es activo también frente a bacterias gram-negativas.

Studer (20) ha confeccionado una lista de péptidos antibióticos producidos por *Bacillus subtilis*, incluyendo sus características y una amplia bibliografía sobre los mismos.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio más detallado sobre purificación y propiedades químicas de la debariocidina.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Los microorganismos productores de debariocidina fueron aislados por nosotros a partir de muestras de pimentón de diferentes localidades y marcas comerciales españolas.

El aislamiento se realizó suspendiendo porciones de unos 0,5 g de cada uno de los pimentones en 10 ml de agua destilada y sembrando en estría, hasta agotamiento, en placas con agar-malta. La incubación se realizó a 26 °C, durante 48 horas.

Los microorganismos sobre los que se ensayó la actividad antibiótica procedían de los centros siguientes:

Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS). Holanda.

Colección Española de Cepas Tipo (CECT). Actualmente, en Salamanca.

Sección de Microbiología de las Clínicas "Puerta de Hierro", "Concepción" y de "La Paz". Madrid.

National Collection of Types Cultures (NCTC). Londres.

Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología. Madrid.

Para la identificación del bacilo B-2 hemos seguido las claves de Bergey (2) y las técnicas y claves recomendadas por Smith y colaboradores (19), según las cuales hemos llegado a la conclusión de que se trata del *Bacillus subtilis*.

Medios de cultivo

Para la producción de antibióticos por *Bacillus subtilis* se empleó el medio sintético siguiente: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$, 1 g; ClK, 0,2 g; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g;

glucosa, 20 g, y glutamato sódico, 2,5 g, para 1 l de agua destilada. pH = 6. Este medio es el descrito por Pérez-Silva y Gil (14).

Ensayo del poder antibiótico

Microorganismo testigo

Se empleó la estirpe de levadura *Debaryomyces hansenii* 1.086.

Ensayo

Se añadían volúmenes conocidos de los líquidos metabólicos en pocillos de 7 mm, practicados en placas de Petri, de agar-malta, sembradas en masa, con unos 2 ml de suspensión de *Debaryomyces hansenii* 1.086, y se medían los halos de inhibición producidos tras incubación a 26 °C durante 48 horas.

Separación y purificación de la sustancia antibiótica mediante técnicas cromatográficas

El líquido metabólico se centrifugó y se concentró a vacío hasta un cuarto de su volumen. A este concentrado se añadió un tercio de su volumen de resina amberlita IR-4B, manteniendo en agitación durante 1 hora. Se centrifugó y, al sobrenadante, se añadió un tercio de su volumen de resina dowex 50W. Se centrifugó y en el sobrenadante se determinó la actividad antibiótica.

Cromatografía sobre columna de resina dowex 50

El sobrenadante anterior se pasó en porciones de 1 ml por una columna de resina, empleando como eluyentes soluciones tampón de citratos según recomiendan Moore y Stein (11-12). El eluato se recogió en porciones de 10 ml, en las que se ensayaba su actividad antibiótica. La columna empleada era de 25 × 1,5 cm.

Diálisis

En otros experimentos, el líquido metabólico, libre de células y concentrado, se sometió a diálisis frente a agua destilada durante 24 horas.

Cromatografía sobre papel whatman núm. 3 MM

El dializado, una vez concentrado, se sometió a cromatografía descendente sobre papel whatman núm. 3 MM, empleando como disolvente butanol-ácido acético-agua (4:1:2). La sustancia antibiótica se localizó incubando tiras estrechas del cromatograma sobre placas de Petri sembradas en masa con *Debaryomyces kloeckeri* 1.086.

Hidrólisis de la sustancia antibiótica

Análisis de aminoácidos

La sustancia antibiótica, una vez purificada, se hidrolizó con ClH 6N, a 100 °C, en ampollas cerradas, durante intervalos de 6, 8, 12, 18 y 24 horas, siguiendo la técnica descrita por Eastone (5).

Los hidrolizados, libres de ácido por evaporaciones sucesivas a vacío en presencia de lentejas de sosa, se sometieron por tres veces consecutivas a cromatografía descendente sobre papel whatman núm. 1, empleando como disolvente butanol-ácido acético-alcohol de 96°-agua (4:1:1:2). Los aminoácidos se localizaron con ninhidrina o isatina.

También se hicieron cromatografías sobre placas de 20 × 20 cm, cubiertas de una capa fina de celulosa G, empleando como disolvente butanol-metanol-benceno-agua (2:1:1:1) y revelando con ninhidrina.

Análisis de hidratos de carbono

Diferentes muestras de sustancia purificada se hidrolizaron con SO₄H₂ 2N, a 100 °C, en ampollas cerradas, durante períodos variables entre 3 y 6 horas. El exceso de ácido se eliminó mediante tratamiento con la cantidad adecuada de hidróxido bórico.

Los hidrolizados se sometieron posteriormente a cromatografía descendente sobre papel whatman núm. 1. El disolvente empleado fue el recomendado por Gottschalk (6), y consta de butanol-piridina-ácido clorhídrico 0,1N (5:3:2).

La detección de los distintos azúcares se realizó con el reactivo de nitrato de plata y también con anilina-difenilamina-ácido fosfórico, descritos por Smith (18).

Análisis de aminoazúcares.

Muestras de la solución antibiótica purificada se hidrolizaron con ClH 4N, a 100 °C, durante 4 horas, en ampollas cerradas. Los hidrolizados, libres de ácido por evaporación a vacío, se cromatografiaron sobre papel whatman núm. 1, empleándose como disolvente butanol-piridina-ácido clorhídrico 0,1N (5:3:2), que se dejó actuar durante unas 16 horas.

La localización de los aminoazúcares se realizó mediante el reactivo de Elson-Morgan, según describe Smith (18).

Análisis de N-acetil aminoazúcares

Se realizó según la técnica descrita por Neuberger y Marshall (13).

Reacciones coloreadas de la sustancia antibiótica

Con la sustancia antibiótica purificada se practicaron las siguientes reacciones: Millon, biuret, xantoproteica, ácido glioxílico (Hopkins-Cole) y Molish, según las técnicas descritas por Hawk y colaboradores (7).

Determinaciones químicas

Se realizaron determinaciones de nitrógeno, según la técnica descrita por Willits (21); de proteínas, según Lowry y colaboradores (10); de fósforo, según Lowry y López (9), y Chen y colaboradores (4); y de hidratos de carbono, según la técnica de la antrona, de Scott y Melvin (17).

RESULTADOS

Selección de estirpes productoras de antibiótico

Se aislaron 92 estirpes de *Bacillus subtilis*, que se cultivaron en 10 ml de medio, a 26 °C, durante 10 días y se probó la actividad antibiótica de los líquidos metabólicos frente a las 5 estirpes de *Debaryomyces kloeckeri*, 1.083, 1.084, 1.085, 1.086 y 1.087.

En el *cuadro 1* se exponen, en milímetros, los diámetros de los halos de inhibición producidos por 0,1 ml de cada líquido metabólico frente a cada una de las estirpes de *Debaryomyces kloeckeri*.

Cuadro 1. Diámetro en milímetros del halo de inhibición que sobre el crecimiento de *D. kloeckeri* ocasionan 0,1 ml de líquido metabólico, de diferentes estirpes de *Bacillus subtilis*

<i>Bacillus</i>	Estirpe de <i>D. kloeckeri</i>				
	1.083	1.084	1.085	1.086	1.087
A-1	19	15	20	26	
A-3	18	15	22	24	
B-1	16	14		23	
B-2	20	20	25	29	
B-3	16	16		20	
C-1	25	30	21	24	25
C-2	22	15	19	23	24
C-3	21			25	
D-1	17	18	23	25	16
D-2	15	12		22	12
D-4	18	17	23	25	19
D-5	25	16		24	
E-1	14			17	
E-2	21	15		21	16
G-1	15	13		22	
G-2	17	14	21	20	

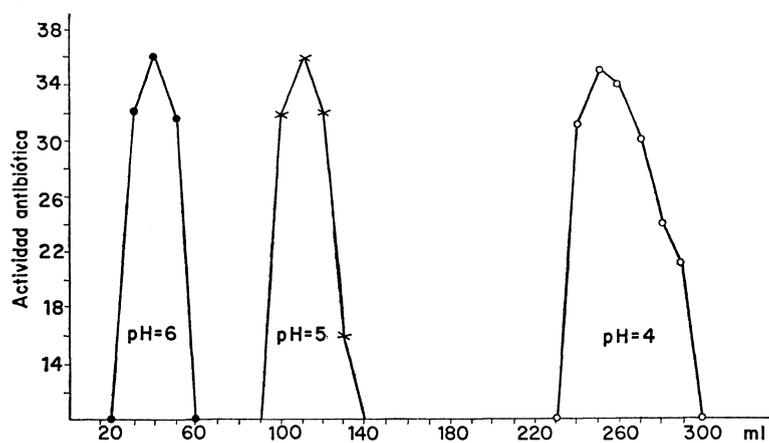


Figura 1

Aislamiento de la sustancia antibiótica

Se emplearon matraces de 2 l de capacidad, con 500 ml de medio, para la inoculación con la estirpe B-2 de *Bacillus subtilis*. El líquido metabólico libre de células, concentrado y libre de sales, se pasó por una columna de resina dowex-50.

Se emplearon como eluyentes soluciones reguladoras de citratos 0,1M, a pH de 4, 5 y 6, y también agua destilada. En las gráficas de la *figura 1* se expone la actividad antibiótica de las distintas fracciones eluidas. Cuando se empleó agua destilada, la actividad apareció desde la fracción 6 hasta la 19, ambas inclusive.

Purificación mediante diálisis y cromatografía de papel

Porciones del líquido metabólico, libres de células y concentradas, se sometieron a diálisis sucesivas frente a agua destilada. La sustancia antibiótica, que dializa fácilmente, quedó disuelta en el agua destilada y se concentró por evaporación a vacío. El concentrado se cromatografió. La sustancia antibiótica quedó localizada en una zona relativamente estrecha del cromatograma. Se eluyó con agua destilada y se concentró a vacío. Este proceso se repitió tres veces.

Método elegido para el aislamiento y purificación

El procedimiento finalmente adoptado para el aislamiento y purificación de la sustancia antibiótica comprende las etapas siguientes:

- a) Cultivo de la estirpe B-2; b) centrifugación; c) concentración;
- d) tratamiento con resinas; e) diálisis, y f) cromatografía sobre papel.

Los resultados obtenidos al aplicar este procedimiento a un cultivo de 2 l, son los que se exponen en el *cuadro 2*.

Cuadro 2. Halos de inhibición provocados por muestras de 0,1 ml de solución antibiótica frente a D. kloeckeri

Muestra de líquido metabólico	Halos de inhibición
Centrifugado	30-35
Concentrado	30-35
Tratado con resinas	33-34
Dializado	24
Cromatografiado	24

Hidrólisis de la sustancia purificada

Muestras de 1 ml de sustancia antibiótica purificada se hidrolizaron con ClH 6N. En los hidrolizados se detectaron, por cromatografía sobre papel, los siguientes aminoácidos: cistina (o cisteína), lisina, serina (o glicocola), ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, un compuesto no identificado, alanina, prolina, tirosina, valina, fenilalanina y leucina.

En cromatografía del hidrolizado sobre capa fina de celulosa G se detectaron los mismos aminoácidos.

Otras muestras de sustancia antibiótica purificada se hidrolizaron con ácido SO₄H₂ 2N. En estos hidrolizados no se detectó la presencia de ningún hidrato de carbono.

En hidrólisis realizadas con ClH 4N para investigar la presencia de aminoazúcares no se consiguió detectar ninguno.

Los mismos resultados negativos obtuvimos para localizar N-acetil-aminoazúcares.

Otras pruebas analíticas

La sustancia antibiótica purificada dio negativas las reacciones de Millon, biuret, xantoproteica y Hopkins-Cole, y positivas las de Molisch, antrona y ninhidrina. Contiene un porcentaje de nitrógeno del 2,2 %, da negativa la reacción de proteínas y no se ha encontrado fósforo en su molécula.

Muestras de 1 ml de la misma sustancia purificada se sometieron durante 30 minutos a temperaturas de 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90° y 100 °C, sin que se observara pérdida de actividad en ninguna de las muestras.

La sustancia antibiótica conserva igualmente la actividad después de ser liofilizada.

DISCUSION

En la revisión realizada por Studer (20) sobre péptidos antibióticos producidos por *Bacillus subtilis*, y por Bodansky y Perlman (1) sobre péptidos antibióticos en general, exponen que de unos 225 péptidos antibióticos descritos, en la actualidad sólo se conocen las estructuras completas de unos pocos. Por tanto, la comparación de los distintos péptidos antibióticos tendrá que hacerse basándose en otras características, tales

como espectro antimicrobiano, aminoácidos encontrados en los hidrolizados, solubilidad, resistencia al calor, etc.

La debarioidina se diferencia de otros péptidos producidos por *Bacillus subtilis*, tanto en su espectro antimicrobiano (8 y 15) como por los aminoácidos constituyentes. Así, por ejemplo, en los hidrolizados hemos identificado 12 aminoácidos y, además, observamos la presencia de otra sustancia isatinopositiva, con Rf entre la treonina y la alanina. Con esta composición de aminoácidos no ha sido descrito ningún péptido procedente de *B. subtilis*.

Asimismo, otras propiedades, como la estabilidad al calor, espectro antimicrobiano, reacciones xantoproteica, biuret, Millon, etc., no coinciden con las de ninguno de los antibióticos producidos por *Bacillus subtilis*.

El método de purificación adoptado se eligió, como el más eficaz, entre muchos ensayados y no descritos en este trabajo. A pesar de obtener una sustancia cromatográficamente pura, no se ha conseguido todavía cristalizarla.

Las reacciones de Millon y xantoproteica son típicas de la tirosina; sin embargo, la debarioidina no da reacciones positivas a pesar de encontrar tirosina en los hidrolizados, lo que nos hace pensar que este aminoácido se encuentra en muy pequeña proporción. Asimismo, la reacción del biuret (típica de enlaces peptídicos) es negativa con la debarioidina, lo que hace pensar que, de modo análogo a lo que ocurre con muchos péptidos antibióticos, los enlaces son de tipo estérico y no peptídico.

RESUMEN

El antibiótico debarioidina es activo frente a levaduras de los géneros *Candida*, *Debaryomyces* y *Saccharomyces*.

De 92 estirpes ensayadas de *Bacillus subtilis*, aisladas de pimentón, se seleccionó una, a la que denominamos B-2, como la mejor productora de antibiótico.

Se estudian las propiedades químicas del antibiótico purificado. Se demuestra la estructura peptídica de la debarioidina. En hidrólisis ácida se detectan los aminoácidos siguientes: cistina, lisina, serina, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, fenilalanina y leucina.

SUMMARY

Purification and chemical properties of the antibiotic debariocidine

Debariocidine is an antibiotic active against yeasts of the genera *Candida*, *Debaryomyces* and *Saccharomyces*.

The strain B-2, one of the 92 strains of *Bacillus subtilis* isolated from spanish red-pepper, is a good producer of debariocidine.

The chemical properties of the purified antibiotic are studied.

Debariocidine is a peptide. Upon acid hydrolysis the following amino acids are detected: cystine, lysine, serine, aspartic acid, glutamid acid, threonine, alanine proline, tyrosine, valine, phenylalanine and leucine.

BIBLIOGRAFIA

1. BODANSZKY, M., y PERLMAN, D. 1969. Peptide antibiotics. *Science*, 163, 352.
2. BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D., y SMITH, N. R. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
3. CARVAJAL, F. 1952. Vivicil: an antibiotic effective against pathogenic bacteria and fungi. *Bacteriol. Proc.*, 25.
4. CHEN, P. S.; TORIBORAT, Y., y WARNER, H. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 28, 175.
5. EASTONE, J. E. 1966. Aminoacid analysis of glycoproteins. *Glycoproteins*, vol. 5, cap. 5. B. B. A. Library.
6. GOTTSCHALK, A. 1963. The basic structure of glycoproteins and problems of their chemical and physicochemical analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 106, 168.
7. HAWK, P.; OSER, B., y SUMMERSON, W. 1949. *Química Fisiológica Práctica*
8. LANZUELA, F. 1970. Aislamiento y purificación de un nuevo antibiótico producido por *Bacillus subtilis*. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid.
9. LOWRY, O. H., y LÓPEZ, J. A. 1946. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, 162, 421.
10. LOWRY, O. H.; ROSEBROUG, N. J.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
11. MOORE, S., y STEIN, W. H. 1951. Chromatography of aminoacids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, 192, 663.
12. MOORE, S., y STEIN, W. S. 1956. Column chromatography of peptides and proteins. *Advan. Protein Chem.*, 11, 191.

13. NEUBERGER, A., y MARSHALL, P. D. 1966. Methods for the qualitative and quantitative analysis of the component sugars. Glycoproteins, vol. 5, cap. 8. B. B. A. Library.
14. PÉREZ-SILVA, J., y GIL, R. 1960. Estudios sobre la debarioidina. I. Acción *in vitro* sobre levaduras aisladas de enfermos tratados con antibióticos. Microbiol. Españ., 13, 323.
15. PÉREZ-SILVA, J., y LAHOZ, R. 1958. Nota previa acerca de un nuevo antibiótico. Microbiol. Españ., 11, 255.
16. RAMÍREZ, C.; LANZUELA, F., y RODRÍGUEZ, D. 1970. Rapid diagnosis of *Candida albicans*. Mycopathol. Mycol. Appl., 40, 107.
17. SCOTT, T. A., y MELVIN, E. H. 1953. Determination of dextran with anthrona. Anal. Chem., 25, 1.656.
18. SMITH, I. 1960. Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Heinemann, Londres.
19. SMITH, N. R.; GORDON, R. E., y CLARK, F. E. 1946. Aerobic mesophilic spore-forming bacteria. Dep. Agr. Miscellaneous publication, núm. 559. U. S.
20. STUDER, R. O. 1967. Polypeptide antibiotics of medicinal interest. Progr. Med. Chem., 5, 1.
21. WILLITS, C. O., y OGG, C. I. 1950. Report on standardization of microchemical methods. Microkjeldahl nitrogen determination. J. Ass. Offic. Agr. Chem., 33, 179.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA DE INFECCIONES BACTERIANAS

CHROMATOGRAPHY OF CAROTENOID PIGMENTS FROM *SARCINA LUTEA* ON SEPHADEX LH - 20

by

F. RAMOS

INTRODUCTION

Several chromatographic methods, with variation of the adsorbents, have been reported for the separation of the carotenoid pigments from *Sarcina lutea*. On a chromatography column with magnesium oxide and calcium carbonate (3) two pigments were obtained while with silicagel G thin-layer chromatography (1 and 5) seven fractions have been obtained. Actually, the application of sephadex LH-20 gels to the separation of bacterial carotenes is under investigation.

EXPERIMENTAL

The total carotenoid pigments of *Sarcina lutea* (ATCC 9341), cultivated in Penassay (Difco), was extracted using boiling methanol (4). The pigment-containing supernatant fluids were combined, concentrated and stored under nitrogen at 0 °C in the dark.

Column chromatography

Elution patterns from the sephadex LH-20 gel filtration columns SR 1.5/30, flow rate 30 ml/h, were scanned with a Beckman spectrophotometer DB-G equipped with a liquid micro-aperture flowcell (mod. 97460).

Eluted fractions were recovered on a Beckman automatic fraction collector. In these cases the absorbancy at 415 $m\mu$ was used to control pigment variations.

Aliquots from each fraction (5 ml) were analyzed through its visible spectra. They were recorded with a Beckman spectrophotometer model DB-G and 96 % methanol (Merck) was used as solvent.

The results obtained in this experiment are given in *figure 1* and *table 1*.

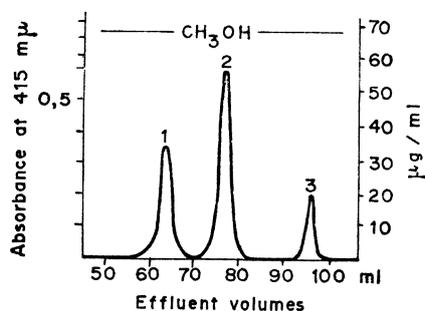


Figure 1. Elution patterns on sephadex LH-20 of total carotenoid pigments from *S. lutea*. 1, 2 and 3 = fractions carotenoids isolated. Column 1.530

Table 1. Characteristics of the pigments from *Sarcina lutea* obtained on sephadex LH-20 column gel

Carotenoid fractions	Colour	Abs. max. methanol ($m\mu$)
1	Yellow	—, 413, 436, 466
2	Yellow	—, 415, 439, 469
3	Yellow-orange	—, 440, 465, 495

Thin-layer chromatography

It was used for the separation and identification of the three fractions obtained on the sephadex LH-20 column. TLC plates were prepared by spreading a slurry of silicagel G (Em, 30 g) in water (60 ml) over clean glass plates (20 × 20 cm) using a Desaga [Camlab (Glass) Ltd] applicator

so as to obtain a layer of 250 μ thickness. The plates were activated by heating at 110 °C for 1 hour, then stored in a desiccator over anhydrous calcium chloride.

The solvent systems used, that gave the best results, are the followings:

A) benzene-petroleum ether-methanol (47:47:6).

B) benzene-methanol (70:30).

The individual fractions were removed from the plates into methanol and the visible spectra determined with a Beckman spectrophotometer and the possible structure an HCl test (2).

The results of the tests carried out on the individual fractions are given in tables 2-3.

Table 2. Separation on silicagel G thin-layer chromatography of the three carotenoid fractions obtained with the solvent A

Pigments sephadex LH-20 Abs. max. methanol (m μ)	Pigments silicagel G Abs. max. methanol (m μ)	Rf	Colour with HCl	Type
1 —, 413, 436, 466				
2 —, 415, 439, 469	—, 415, 439, 469	0.76		Carotene
	—, 415, 439, 469	0.38		Carotene monohydroxy
	—, 415, 439, 469	0.24		Carotene dihydroxy
	331, 413, 436, 466	0.07		Carotene dihydroxy
3 —, 440, 465, 495	—, 440, 465, 495	0.96		Carotene

As with solvent A employed there was not possibility of resolution for the pigment 1, obtained on sephadex LH-20 chromatography column, the separation was done using the solvent B as the aptest for hydroxylate carotenes.

Table 3. Separation on silicagel G thin-layer chromatography of the pigment fraction 1

Pigments sephadex LH-20 Abs. max. methanol (m μ)	Pigments silicagel G Abs. max. methanol (m μ)	Rf	Colour with HCl	Type
1 —, 413, 436, 466	331, 413, 436, 466	0.31		Carotene poly-OH
	—, 415, 439, 469	0.22		Carotene poly-OH
	331, 413, 436, 466	0.08		Carotene poly-OH

DISCUSSION

The chromatography column on sephadex LH-20 provide an excellent method with the solvent used for the preparative isolation of three pigments from *Sarcina lutea*. The method appears to depend on the degree of hydroxylation of the carotenes. When these three pigments were chromatographed on the thin-layer with silicagel G eight fractions were obtained: three of them correspond to pigment 1, and the other four, to the pigment 2. The last fraction, is the pigment 3.

It is evident that with sephadex LH-20, the carotenes were perfectly separated from the xanthophylls, with different spectral characteristics. By other hand, in spite of having the same visible spectra, the carotenes strongly polyhydroxylates could be also separated from another less hydroxylates.

By their visible spectra, obtained for pigment 1 and 2, and because of their behaviour on column and thin-layer chromatography, we can admit the presence of three pigments perfectly separated on sephadex LH-20 (one carotene, one xanthophyll and one intermediate substance more in connection with the last one). The different fractions isolated on thin-layer chromatography might be variations of these three compounds which are conditioned by the molecular differences produced by some substitutions of radicals and by the different molecular oxidation degree and possibly because they have a different degree of polymerization.

SUMMARY

Chromatographic separation of the carotenoid pigments obtain from *Sarcina lutea* ATCC 9341 strain were studied on sephadex LH-20 gel. Three different compounds were isolated and identified.

Our results suggest that the conditions used provided an excelent preparative technique to separate pigments in organic solvents.

RESUMEN

Cromatografía del pigmento carotenoide de Sarcina lutea sobre sephadex LH-20

Se investiga la utilización del sephadex LH-20 para la separación de los pigmentos carotenoides de *Sarcina lutea*. Se aislaron perfectamente

tres pigmentos con características espectrofotométricas diferentes. Uno de ellos, de color amarillo-anaranjado, supone un hallazgo, ya que no se había aislado hasta ahora. Posiblemente su molécula presente un mayor grado de oxidación en comparación con las otras dos que son, respectivamente, una xantofila y un compuesto intermedio que está más relacionado con la xantofila que con el caroteno anaranjado.

Es evidente que, por un lado, con sephadex LH-20 se separan los carótenos de las xantofilas, con características espectrales diferentes y que, por otro, aunque con menos resolución, los carótenos fuertemente hidroxilados de los menos hidroxilados, aún teniendo igual espectro visible, como se demuestra en este experimento.

BIBLIOGRAPHY

1. JENSSEN, L. 1967. Identity of the C₅₀-carotenoid dehydrogenans-P₄₃₉ a sarcinoxanthin. *Nature*, 214, 379-80.
2. KARRER, P., and SUCKER, E. 1950. Carotenoids, p. 7. Elsevier, Amsterdam.
3. SOBIN, B., and STAHLY, G. L. 1942. The isolation and absorption spectrum maxima of bacterial carotenoid pigments. *J. Bacteriol.*, 44, 265-76.
4. STARR, M. P., and STEPHENS, S. 1964. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.*, 87, 293-302.
5. THIRKELL, D., and STRANG, R. H. 1967. Analysis and comparison of the carotenoids of *Sarcina flava* and *S. lutea*. *J. Gen. Microbiol.*, 49, 53-57.

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS MESOSOMAS

por

C. HARDISSON

INTRODUCCION

Cuando en la década de los cincuenta se observaron por primera vez cortes ultrafinos de bacterias en el microscopio electrónico sorprendió grandemente la ausencia de orgánulos. En efecto, no se observaron ninguna de las estructuras y orgánulos visibles en cortes de células eucarióticas, aunque en la célula bacteriana tendría que existir un sistema organizado para el transporte de electrones y un mecanismo capaz de asegurar el reparto equitativo del material nuclear entre las dos células hijas durante el proceso de división.

Hace unos diez años, con el empleo de técnicas adecuadas, se observaron por primera vez estructuras membranosas en el citoplasma de diferentes especies bacterianas (12, 19-20, 55 y 61). Estas estructuras membranosas recibieron diferentes nombres: "condrioide" (31); "membrana intracitoplasmática" (21); "plasmalemosoma" (8), y "mesosoma" (12). El término mesosoma ha sido generalmente aceptado y es el que ha tenido difusión más amplia en la literatura.

ESTRUCTURA

Los mesosomas de las bacterias gram-positivas se presentan generalmente en secciones como una bolsa, formada por una invaginación de la membrana citoplasmática, repleta de vesículas o túbulos (12, 51 y 54).

Si las bacterias se colocan en un medio hipertónico, los mesosomas son expulsados del citoplasma, quedando en el espacio comprendido entre la membrana citoplasmática y la pared celular (13,53 y 67). Cuando se digiere la pared celular por la acción de la lisozima se obtienen protoplastos, lo que va acompañado de la liberación de los túbulos mesosomales (13, 54 y 56). Estos apéndices son muy frágiles y presentan una estructura característica en "cuentas de rosario", observables mediante tinción negativa, por la técnica de sombreado y también por la técnica de criocorrosión (43, 46, 50 y 52) (figura 1).

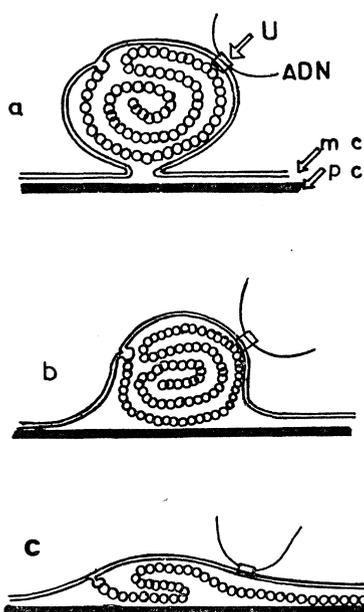


Figura 1. Representación esquemática de un mesosoma de una bacteria gram-positiva y del proceso de expulsión del mesosoma al colocar la bacteria en un medio hipertónico. pc, pared celular; mc, membrana citoplasmática; U, punto de unión entre el núcleo y el mesosoma. Obsérvese que el punto de unión se sitúa sobre la membrana que forma la bolsa mesosomal, de modo que cuando el mesosoma desaparece la unión se localiza sobre la propia membrana citoplasmática [según Ryter (55)]

No se conoce aún exactamente cómo se forman los mesosomas, pero parece probable que se originen por invaginación de la membrana citoplasmática (12 y 28). Tanto la bolsa mesosomal como los túbulos mesosomales presentan en cortes la triple capa característica de la "unidad de membrana" (51 y 57). Ryter y Jacob (53) y Fuhs (16), han demostrado mediante reconstrucción tridimensional de células de *Bacillus subtilis* en crecimiento, realizadas mediante secciones seriadas, que los mesosomas están siempre en contacto con la membrana citoplasmática. También numerosas observaciones permiten afirmar que los mesosomas se encuentran normalmente asociados a la región nuclear y a los tabiques de separación en formación.

Los mesosomas no son orgánulos estables y desaparecen en determinadas condiciones, así los mesosomas de *Bacillus subtilis* se destruyen por completo cuando se coloca el microorganismo a 4 °C y sin aireación durante dos horas (50). Es posible que la membrana citoplasmática también sea afectada por factores como la anaerobiosis y el frío, que provocan frecuentemente la lisis de *B. subtilis* (51).

La morfología de los mesosomas varía según el procedimiento de fijación utilizado. Ryter (51) ha realizado un estudio comparativo con varios procedimientos y ha observado que la fijación con osmio transforma la estructura típica en "cuentas de rosario" en una estructura tubular, lo que explica el aspecto laminar de los mesosomas observados comúnmente después de utilizar este tipo de fijación. La fijación con glutaraldehído preserva mejor la forma vesicular, aunque el procedimiento mejor parece ser la fijación doble con glutaraldehído-osmio. En opinión de este autor, las variaciones en la morfología de los mesosomas de especies bacterianas diferentes podrían deberse a la calidad de la fijación.

En las bacterias gram-negativas no se aprecian estas estructuras tan bien desarrolladas como en las bacterias gram-positivas; aunque bajo condiciones de cultivo especiales, por ejemplo, cultivando cepas de *Escherichia coli* a 40 °C (64), o en ciertas cepas mutantes de *E. coli* (36 y 60), estas estructuras se hacen más patentes. Su aspecto en secciones sugiere que no están formadas por túbulos, sino por membranas plegadas. Estas estructuras no son expulsadas del citoplasma durante la plasmólisis o durante la formación de esferoplastos, lo que parece indicar que en este grupo de organismos los mesosomas se forman por simples repliegues de la membrana, los cuales pueden abrirse y desarrollarse según la presión osmótica del medio externo (figura 2) (5 y 54). La información

que se posee sobre los mesosomas de las bacterias gram-negativas es bastante limitada, por lo que nos extenderemos sobre las funciones de los mesosomas de las bacterias gram-positivas, que han sido intensamente estudiadas en los últimos años.

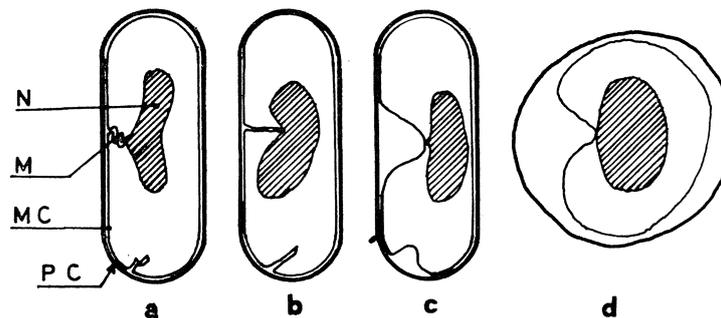


Figura 2. Representación esquemática del proceso de desaparición de los mesosomas de una bacteria gram-negativa. a, célula normal; b, plasmólisis suave; c, plasmólisis fuerte; d, esferoplasto. PC, pared celular; MC, membrana citoplasmática; M, mesosoma; N, núcleo [según Ryter y Jacob (53)]

Estas estructuras pueden distinguirse claramente de los extensos sistemas membranosos intracelulares encontrados en bacterias nitrificantes (42 y 47), fotosintéticas (1, 7 y 24-25) y en bacterias marinas (10), que están relacionadas con las funciones específicas de estos organismos.

FUNCIONES

Función respiratoria

Desde su descubrimiento, su origen membranoso y la presencia de túbulos inclinó a muchos investigadores a considerar a los mesosomas como orgánulos semejantes a las mitocondrias. La función respiratoria de los mesosomas ha sido muy estudiada y es generalmente aceptada (12, 18-19, 21 y 29). El telurito potásico que se deposita en forma de agujas densas a los electrones sobre las crestas mitocondriales de las células superiores (3), se observa en la misma forma a lo largo de la membrana citoplasmática (30-31 y 33). Estudios más recientes (15) parecen indicar

que la membrana citoplasmática y especialmente la región que forma la bolsa mesosomal, presenta una reacción redox análoga a la que tiene lugar sobre las crestas mitocondriales. Recientemente, diversos investigadores han introducido técnicas que permiten obtener túbulos mesosomales aislados (11, 14 y 15). El análisis de esta fracción demostró que la mayoría de los citocromos se localizan en la fracción mesosomal (11 y 14). Estos resultados concuerdan con las observaciones previas de Weibull y Gyllang (68), que habían encontrado que las formas L de las bacterias gram-positivas, que no presentan mesosomas, tampoco tienen citocromos. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con ciertas precauciones, ya que es posible que durante la obtención de los protoplastos, los citocromos se desprendan de la membrana y se recojan junto con la fracción mesosomal. También se han realizado análisis enzimáticos de fracciones de membrana y de mesosomas por separado (15 y 58). Estos análisis han puesto de manifiesto que la succino-deshidrogenasa se localiza en ambas fracciones, mientras que la NADH-deshidrogenasa abunda en la fracción membrana y falta casi por completo en la mesosomal.

En el estado actual de nuestros conocimientos no se puede atribuir una función respiratoria específica a los mesosomas, aunque los análisis citológicos y los enzimáticos parecen demostrar una diferente composición enzimática entre la membrana y los mesosomas. Debemos esperar a la introducción de técnicas más apropiadas para la separación de estas fracciones para concluir sobre la existencia de una función respiratoria de los mesosomas, diferente de aquella de la membrana.

Síntesis de la pared celular

Numerosas observaciones de cortes ultrafinos de bacterias gram-positivas en el microscopio electrónico, han demostrado que los mesosomas se asocian frecuentemente con el tabique de división (9, 12, 27, 29 y 69). Además, Ryter y Jacob (53) han demostrado mediante reconstituciones tridimensionales de células de *Bacillus subtilis*, que los tabiques en formación están en contacto con uno o dos mesosomas, mientras que los tabiques ya formados no presentan frecuentemente asociación con estas estructuras. Estas observaciones sugieren que los mesosomas participan en la formación del *septum* de división, posiblemente suministrando los precursores de la pared celular. Sin embargo, no podemos afirmar que la síntesis de la pared sea una función específica de los mesosomas, ya que otros experimentos demuestran que la presencia de los mesosomas no es

indispensable para la síntesis de esta envoltura celular. La obtención de protoplastos va unida a la desaparición de los mesosomas, y los túbulos mesosomales que pueden quedar unidos a la membrana pueden desprenderse fácilmente por lavado (13, 22, 38 y 56). Los protoplastos resultantes son capaces de multiplicarse, como formas L, en un medio hipertónico de agar semisólido, conservando las características morfológicas típicas de los protoplastos: ausencia de pared celular y de mesosomas (56).

Se pensó que esta incapacidad de los protoplastos para formar la pared celular mientras crecen en un medio de agar semisólido se debía a la ausencia de mesosomas. El descubrimiento realizado por Landman y colaboradores (38), de que protoplastos colocados en un medio solidificado por adición de gelatina al 25 % sintetizan de nuevo su pared celular, permitió comprobar la veracidad de esta hipótesis. El experimento consistió esencialmente en introducir en el medio de gelatina protoplastos de *Bacillus subtilis* cuidadosamente lavados, con objeto de eliminar todos los fragmentos de mesosomas y observar a diferentes tiempos muestras en el microscopio electrónico. Durante el proceso de reversión, los mesosomas se observan sólo muy raramente y los pocos que se forman se encuentran cuando el proceso ha comenzado, pero nunca en protoplastos que aún no han comenzado el proceso de reversión.

El hecho de que los mesosomas aparezcan solamente después de la formación de la primera capa de la pared y que muchas células revertientes no los presenten, sugiere que los mesosomas no desempeñan un papel esencial en la síntesis de la pared.

Función nuclear

Estudios morfológicos realizados con el microscopio electrónico han establecido que el núcleo bacteriano aparece en secciones como una superficie poco densa a los electrones, de forma y tamaño variable, ocupada por delicados filamentos y sin estar separada del citoplasma por una membrana, como ocurre en las células eucarióticas. Después de los trabajos de Kleinschmidt y colaboradores (34) y de Cairns (6) sabemos que el material genético bacteriano, denominado frecuentemente por conveniencia cromosoma o núcleo bacteriano, está formado por una sola molécula gigante de ADN de unos 25 Å de diámetro y aproximadamente 1 mm de longitud. El cromosoma presenta las características de una estructura circular cerrada sobre sí misma, como si fuera un anillo. Estudios morfológicos y genéticos (6, 39 y 65) han demostrado que los genes se en-

cuentran localizados a lo largo del cromosoma en un determinado orden, que la replicación del ADN es secuencial, es decir, que las nuevas cadenas se sintetizan a medida que las antiguas se separan y que aunque el cromosoma sea circular, el lugar por donde se inicia cualquier ciclo replicativo es siempre el mismo y corresponde siempre a los mismos genes.

Observaciones de la división nuclear, realizadas en el microscopio óptico con preparaciones teñidas (40 y 48-49) o en el microscopio de contraste de fases con células vivas en división (41), habían demostrado que el material nuclear se divide en dos y a continuación los dos núcleos resultantes se separan gradualmente. Este mecanismo, que a primera vista resulta mucho menos complicado que la división mitótica, se complica considerablemente cuando se estudia a nivel molecular. Esquemáticamente, el proceso de división nuclear bacteriana se puede dividir en dos etapas: 1.^a, replicación del cromosoma; 2.^a, separación de los cromosomas hijos.

La primera etapa del proceso se conoce relativamente bien. Cairns (6), utilizando ADN marcado con timina radiactiva y técnicas de autorradiografía, demostró que la replicación es de tipo secuencial. Lark (39), utilizando una estirpe de *Escherichia coli* deficiente en timina y triptófano, y basándose en que la síntesis proteica es imprescindible para la iniciación de un ciclo replicativo, pero no es necesaria para que continúen los ciclos ya iniciados, demostró que el sitio por donde comienza cualquier ciclo replicativo es constante. Por otra parte, Sueoka y Yoshikawa (65) demostraron mediante la técnica que llamaron de "análisis de la frecuencia relativa de marcas genéticas", que el lugar por donde comienza el ciclo replicativo es siempre el mismo, no sólo físicamente sino también genéticamente.

La segunda etapa del proceso, separación de los dos cromosomas resultantes, es menos conocida. En 1963, Jacob y colaboradores (32) emitieron una hipótesis sobre un posible mecanismo de separación. Esta hipótesis consta de dos proposiciones: a) el cromosoma bacteriano está unido a la membrana citoplasmática; b) la separación de los dos cromosomas resultantes de cada ciclo replicativo se realiza mediante síntesis de nuevo material de membrana en el sitio de unión de los cromosomas (figura 3).



Figura 3. Representación esquemática de la separación de los núcleos hijos mediante síntesis de membrana [según Jacob y colaboradores (32)]

Respecto a la primera proposición, Ryter y Jacob (53) y Fuhs (16) demostraron mediante reconstituciones tridimensionales de células de *Bacillus subtilis* que los núcleos están en contacto con uno o dos mesosomas. Este contacto se mantiene también durante el proceso de esporulación, en el que uno de los mesosomas permanece en contacto con el núcleo del esporangio, mientras que el otro está en contacto con el núcleo de la espora (53). De estas observaciones se deduce que los mesosomas desempeñan el papel de intermediarios entre el núcleo y la membrana (50).

En cuanto a la segunda proposición de la hipótesis de Jacob y colaboradores (32), el análisis de la reconstitución tridimensional de células de *Bacillus subtilis* en crecimiento ha hecho posible la representación esquemática del proceso de división (53). Cuando comienza la división, los dos núcleos de la bacteria están conectados cada uno a un mesosoma; durante la replicación aumenta el volumen nuclear, los mesosomas se dividen en dos y luego se alejan progresivamente, llevando cada uno consigo uno de los dos núcleos hijos; el tabique de división se termina al mismo tiempo (figura 4). En bacterias mononucleadas, como *Mycobacterium phlei*, este

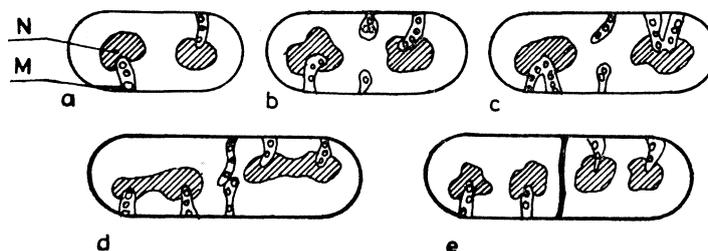


Figura 4. Representación esquemática del proceso de división nuclear en *Bacillus subtilis*, M, mesosoma; N, núcleo [según Ryter y Jacob (51)]

proceso sufre algunas modificaciones, sobre todo en cuanto al orden de algunas secuencias; así, en este caso, la formación del tabique de división precede a la separación de los mesosomas (44) (figura 5). Pero en ambos

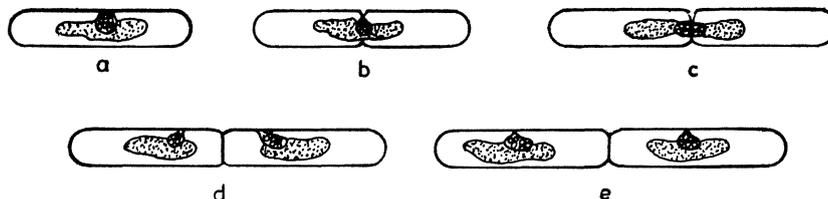


Figura 5. Representación esquemática del proceso de división nuclear en una bacteria mononucleada, *Mycobacterium phlei* [según Petitprez y colaboradores (44)]

modelos la separación de los cromosomas hijos se realiza mediante síntesis de nueva membrana en la región existente entre los dos mesosomas. Fitz-James (14) ha publicado resultados muy interesantes sobre la síntesis de lípidos. Añadió a un cultivo de *B. cereus* pequeñas cantidades de precursores de lípidos marcados e inmediatamente después separó la fracción mesosoma de la fracción membrana citoplasmática, encontrando que gran parte de la radiactividad estaba en la fracción mesosoma. La radiactividad se desplaza con el tiempo hacia la fracción membrana, sugiriendo que los mesosomas pueden ser el lugar de síntesis de la membrana, de acuerdo con la hipótesis de Jacob y colaboradores (32). Sin embargo, estas experiencias no han podido ser confirmadas hasta el presente.

Los datos citados sugieren la participación de los mesosomas, con una función específica, en el proceso de división nuclear. Sin embargo, otros datos experimentales demuestran que estas estructuras no son indispensables; así, los protoplastos bacterianos y las formas L que carecen de mesosomas, colocados en medios y condiciones de cultivo apropiados crecen y se multiplican normalmente. No obstante, hay que subrayar que en todas estas estructuras carentes de mesosomas, esferoplastos, protoplastos, formas L, etc., estudios morfológicos realizados con el microscopio electrónico han demostrado que siempre que desaparecen los mesosomas el núcleo entra en contacto directo con la membrana (16, 50, 53-54 y 56) (figuras 1-2). Este comportamiento se puede explicar admitiendo que el punto de unión entre el cromosoma y el mesosoma se sitúa sobre la bolsa mesosomal, de modo que una vez que desaparecen los túbulos mesosomales por cualquier causa, la conexión se localiza sobre la membrana citoplasmática propiamente (50) (figura 1).

La relación entre el núcleo y la membrana, bien directa o por intermedio de un mesosoma, está bien establecida por observaciones morfológicas y también por el hecho de que numerosos investigadores han encontrado una asociación entre el ADN y la membrana durante el aislamiento de fracciones de membranas (2, 63 y 66). Ganesan y Lederberg (17) demostraron experimentalmente que la unión entre el ADN y la membrana se realiza en el punto de replicación. Recientemente, Knippers y Stratling (35) y Smith y colaboradores (62) han aportado nuevas pruebas de que la replicación del ADN tiene lugar estando asociado a la membrana y que en estas condiciones la replicación tiene lugar en ausencia de la ADN-polimerasa. Estos sistemas constituyen probablemente

el ensayo *in vitro* más parecido al mecanismo de replicación que tiene lugar *in vivo*.

Transformación bacteriana

Wolstenholme y colaboradores (70) observaron en células de *Bacillus subtilis* en "fase de competencia" que los mesosomas eran más numerosos y grandes que en células normales. Sugirieron que los mesosomas pueden ser el lugar de penetración del ADN exógeno y que intervienen en el proceso de transformación sintetizando las enzimas necesarias para la incorporación del ADN exógeno en el genoma bacteriano. Si estas enzimas de integración se formaran en los mesosomas se podría explicar por qué no hay transformación en protoplastos (26).

Secreción de enzimas

Lampen sugirió en 1965 (37), que los mesosomas u otras invaginaciones de la membrana pueden desempeñar un papel en la producción y liberación de exoenzimas en bacterias. Posteriormente han sido publicados varios trabajos (4, 23 y 58-59) que confirman la participación de los mesosomas en la síntesis y secreción de enzimas inducibles.

RESUMEN

Podemos afirmar que los mesosomas no son meros artefactos, sino verdaderas estructuras presentes en todas las bacterias gram-positivas cultivadas en condiciones normales de crecimiento, como demuestran las observaciones realizadas utilizando las técnicas de sombreado y de criocorrosión. En las bacterias gram-negativas es más difícil afirmar, en parte debido a que han sido menos estudiadas en este aspecto, la presencia universal de los mesosomas, pero, al menos, podemos decir que en las bacterias estudiadas se han observado estructuras que aunque de morfología diferente, corresponden a los mesosomas de las bacterias gram-positivas y desempeñan probablemente funciones análogas.

El estudio de la función o funciones de estas estructuras en la célula viva presenta enormes dificultades; en primer lugar, debido a que los mesosomas no se pueden observar *in vivo* y las técnicas de fijación y tinción pueden provocar cambios importantes, y en segundo lugar, a que las actuales técnicas de separación de estas estructuras pueden provocar alteracio-

nes de la membrana, liberando enzimas ligadas a la membrana *in vivo* que pasarían a la fracción mesosomal falseando los resultados.

En todo caso, parece evidente que no se puede atribuir ninguna función específica vital para la célula a los mesosomas, ya que células desprovistas de estas estructuras crecen y se multiplican normalmente. Probablemente, las funciones que desempeñan los mesosomas en la célula normal pueden ser realizadas en su ausencia por la membrana citoplasmática. Tal vez los mesosomas sean simplemente un medio utilizado por la célula bacteriana para aumentar la superficie de la membrana y en consecuencia su contenido enzimático; así, se ha sugerido que las bacterias forman nuevos mesosomas según sus necesidades enzimáticas.

SUMMARY

Structure and function of mesosomes

It can be stated that mesosomes are not merely artefacts, but true structures present in all gram-positive bacteria grown under normal conditions. That has been demonstrated by Electron Microscopy using shadowing and freeze-etching techniques. With regard to gram-negative bacteria it is more difficult to say that mesosomes are present in all of them partly because they have been less studied but at least in the ones which have been studied, they have been observed structures corresponding to the mesosomes of gram-positive bacteria, and despite of their different morphology they probably play a similar function.

The study of the function or functions of these structures presents enormous difficulties firstly because mesosomes cannot be observed *in vivo* and the fixation and staining techniques can induce important changes in them and secondly because the normal techniques of cell fractionation can alter the membrane causing the release of some enzymes attached to the membrane *in vivo* which could pass to the mesosomal fraction biasing the results.

In any case, it seems evident that it cannot be assigned to the mesosomes any specific essential function because cells lacking these structures can grow and divide normally. Probably the role played by the mesosomes in the normal cell could be played by the cytoplasmic membrane when they are absent. Perhaps mesosomes are simply the way used by the bac-

terial cell to increase the surface of the membrane and its enzymatic content; thus it has been suggested that the bacterial cell forms new mesosomes according to their enzymatic necessities.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, M. M. 1968. Photosynthetic membrane-system in *Anacystis nidulans*. J. Bacteriol., 96, 836-41.
2. ALTENBURG, B.; BRINKLEY, B. R., y SUIT, J. 1970. Electron microscopic studies of DNA-membrane associations in *E. coli*. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol. 70th, G. P. 41.
3. BARRETT, R. J., y PALADE, G. E. 1957. Histochemical demonstration of the sites of activity of dehydrogenase systems with the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol., 3, 577-88.
4. BEATON, C. D. 1968. An electron microscope study of the mesosomes of a penicillinase-producing *Staphylococcus*. J. Gen. Microbiol., 50, 37-42.
5. BIRSELL, D. C., y COTA-ROBLES, E. H. 1967. Production and ultrastructure of lysozyme and ethylenediaminetetraacetate-lysozyme spheroplasts of *E. coli*. J. Bacteriol., 93, 427-37.
6. CAIRNS, J. 1963. The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. J. Mol. Biol., 6, 208-13.
7. COHEN-BAZIRE, G., y KUNISAWA, R. 1963. The fine structure of *Rhodospirillum rubrum*. J. Cell. Biol., 16, 401-19.
8. EDWARDS, M. R., y GORDON, M. H. 1962. Membrane system of *Actinomyces bovis*. Electron Microsc. Proc. Int. Congr. 5th, 2, UU-3.
9. ELLAR, D. J.; LUNDGREN, D. G., y SLEPECKY, R. A. 1967. Fine structure of *B. megaterium* during synchronous growth. J. Bacteriol., 94, 1.189-205.
10. FELTER, R. A. 1970. Intracytoplasmic membrane structures in *Vibrio marinus*. J. Bacteriol., 102, 552-60.
11. FERRANDEZ, B.; CHAIX, P., y RYTER, A. 1966. Localisation des cytochromes de *B. subtilis* dans les structures mesosomiques. C. R. Acad. Sci. Ser. D, 263, 1.632-35.
12. FITZ-JAMES, P. C. 1960. Participation of the cytoplasmic membrane in the growth and the spora formation of bacilli. J. Biophys. Biochem. Cytol., 8, 507-28.
13. FITZ-JAMES, P. C. 1964. Fate of the mesosomes of *B. megaterium* during protoplasting. J. Bacteriol., 87, 1.483-91.
14. FITZ-JAMES, P. C. 1968. The collection of mesosome vesicles extruded during protoplasting. Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-forms, 124-143. Williams & Wilkins Co.
15. FREHEL, C.; RYTER, A.; FERRANDEZ, B., y CHAIX, P. 1968. Localisation des deshydrogenases chez *B. subtilis*. Electron Microsc. Proc. Eur. Reg. Conf. 4th, 441-42.

16. FUHS, G. W. 1965. Fine structure and replication of bacterial nucleoids. *Bacteriol. Rev.*, 29, 277-98.
17. GANESAN, A. T., y LEDERBERG, J. 1965. A cell membrane bound fraction of bacterial DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18, 824-35.
18. GELMAN, N. S.; LUKOYANOWA, M. E., y OSTROUSKI, D. N. 1967. *Respiration and Phosphorylation of Bacteria*. Plenum Press, Nueva York.
19. GIESBRECHT, P. 1960. Über organisierte Mitochondrien und andere Feinstrukturen von *B. megaterium*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1*, 179, 538-82.
20. GLAUERT, A. M., y HOPWOOD, D. A. 1959. A membrane component of the cytoplasm in *Streptomyces coelicor*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6, 515-16.
21. GLAUERT, A. M., y HOPWOOD, D. A. 1960. The fine structure of *Streptomyces coelicor*. I. The cytoplasmic membrane system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7, 479-88.
22. GOSH, B. K., y MURRAY, R. G. E. 1967. Fine structure of *Listeria monocytogenes*, in relation to protoplast formation. *J. Bacteriol.*, 93, 411-26.
23. GOSH, B. K.; SARGENT, M. G., y LAMPEN, J. O. 1968. Morphological phenomena associated with penicillinase induction and secretion in *B. licheniformis*. *J. Bacteriol.*, 96, 1,314-28.
24. HICKMAN, D. D., y FRENKEL, A. W. 1959. The structure of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6, 277-84.
25. HICKMAN, D. D., y FRENKEL, A. W. 1965. Observations on the structure of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Cell. Biol.*, 25, 261-78.
26. HIROKAWA, H., e IKEDA, Y. 1966. Genetic recombination of transforming deoxyribonucleic acid molecules with the recipient genome and among themselves in protoplasts of *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, 92, 455-63.
27. HOLT, S. C., y LEADBETTER, E. R. 1969. Comparative ultrastructure of selected aerobic spore-forming bacteria: a freeze-etching study. *Bacteriol. Rev.*, 33, 346-78.
28. IMAEDA, T., y OGURA, M. 1963. Formation of intracytoplasmic membrane system of mycobacteria related to cell division. *J. Bacteriol.*, 85, 150-63.
29. ITERSON, W. van. 1961. Some features of a remarkable organelle in *B. subtilis*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 183-91.
30. ITERSON, W. van. 1965. Bacterial cytoplasm. *Bacteriol. Rev.*, 29, 299-325.
31. ITERSON, W. van, y LEENE, W. 1964. A cytochemical localization of reductive sites in a Gram positive bacterium. *J. Cell Biol.*, 20, 361-75.
32. JACOB, F.; BRENNER, S., y CUZIN, F. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 329-48.
33. KAWATA, T., e INOUE, T. 1965. Reduction sites of telurite and tetrazolium salts in *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 11, 115-28.
34. KLEINSCHMIDT, R. M.; LAND, D., y ZAHN, R. K. 1961. Über die intrazelluläre Formation von Bakterien DNS. *Z. Naturforsch. B*, 16, 730-39.
35. KNIPPERS, R., y STRATLING, W. 1970. The DNA replication capacity of isolated *E. coli* cell wall-membrane complexes. *Nature*, 226, 713-15.

36. KOHJAMA, M.; COUSIN, D.; RYTER, A., y JACOB, F. 1966. Mutants thermostables d'*E. coli*, K 12. Isolement et caractérisation rapide. Ann. Inst. Pasteur, 110, 465-86.
37. LAMPEN, J. O. 1965. Secretion of enzymes by microorganisms. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 15, 115-33.
38. LANDMAN, O.; RYTER, A., y FREHEL, C. 1968. Gelatin-induced reversion of protoplasts of *B. subtilis* to the bacillary form: Electron microscopic and physical study. J. Bacteriol., 96, 2.154-70.
39. LARK, K. G. 1966. Regulation of chromosome replication and segregation in bacteria. Bacteriol. Rev., 30, 3-32.
40. LARK, K. G.; MAALOE, O., y ROSTOCK, O. 1955. Cytological studies of nuclear division in *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol., 13, 318-26.
41. MASON, D. J., y POWELSON, D. M. 1956. Nuclear division as observed in live bacteria by a new technique. J. Bacteriol., 71, 474-79.
42. MURRAY, R. G. E., y WATSON, S. W. 1965. Structure of *Nitrocystis oceanus* and comparison with *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. J. Bacteriol., 89, 1.594-609.
43. NANNINGA, N. 1968. Mesosomes and plasma membranes in *B. subtilis* after application of the freeze-etching technique. Electron Microsc. Proc. Eur. Reg. Conf. 4th, 443-44.
44. PETITPREZ, A.; ROOS, P., y TACQUET, A. 1967. Aspect ultra-structural de *Mycobacterium phlei*. J. Microsc., 6, 229-31.
45. REAVELEY, D. A. 1968. The isolation and characterisation of cytoplasmic membranes and mesosomes of *B. licheniformis*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 30, 649-55.
46. REMSEN, C. C. 1968. Fine structure of the mesosome and nucleoid in frozen-etched *B. subtilis*. Arch. Mikrobiol., 61, 40-47.
47. REMSEN, C. C.; VALOIS, F. W., y WATSON, S. W. 1967. Fine structure of the cytomembrane of *Nitrocystis oceanus*. J. Bacteriol., 94, 422-23.
48. ROBINOW, C. F. 1956. The chromatin bodies of bacteria. Bacteriol. Rev., 20, 207-42.
49. ROBINOW, C. F. 1962. Morphology of the bacterial nucleus. Brit. Med. Bull., 18, 31-35.
50. RYTER, A. 1968. Association of the nucleus and the membrane of bacteria: a morphological study. Bacteriol. Rev., 32, 39-54.
51. RYTER, A. 1969. Structure and functions of mesosomes of Gram positive bacteria. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 49, 149-77.
52. RYTER, A.; FREHEL, C., y FERRANDEZ, B. 1967. Comportement des mesosomes lors de l'attaque de *B. subtilis* par le lysozyme au milieu hypo- et hypertonique. C. R. Acad. Sci. Ser. D, 265, 1.259-62.
53. RYTER, A., y JACOB, F. 1964. Etude au microscope électronique de la liaison entre noyau et mesosome chez *B. subtilis*. Ann. Inst. Pasteur, 107, 384-400.
54. RYTER, A., y JACOB, F. 1966. Etude morphologique de la liaison du noyau à la membrane chez *E. coli* et chez les protoplasts de *B. subtilis*. Ann. Inst. Pasteur, 110, 801-12.

55. RYTER, A., y KELLENBERGER, E. 1958. Etude au microscope electronique du plasma contenant de l'ADN. I. Les nucleoids de bactéries en croissance exponentielle. *Z. Naturforsch.*, 13, 597-605.
56. RYTER, A., y LANDMAN, O. E. 1964. Electron microscope study of the relationship between mesosome loss and the stable L state (or protoplast state) in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, 88, 457-67.
57. SALTON, M. R. J. 1967. Structure and function of bacterial cell membranes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21, 417-42.
58. SARGENT, M. G.; GHOSH, B. K., y LAMPEN, J. O. 1968. Localization of cell-bound penicillinase in *B. licheniformis*. *J. Bacteriol.*, 96, 1.329-38.
59. SARGENT, M. G., y LAMPEN, J. O. 1970. A mechanism for penicillinase secretion in *B. licheniformis*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 65, 962-69.
60. SCHNAITMAN, C., y GREENWALT, J. W. 1966. Intracytoplasmic membranes in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 92, 780-83.
61. SHINOHARA, C.; FUKUSHI, K., y SUZUKI, I. 1957. Mitochondria like structures in ultrathin sections of *Mycobacterium avium*. *J. Bacteriol.*, 74, 413-15.
62. SMITH, D. W.; SCHALLER, H. E., y BONHOEFFER, F. J. 1970. DNA synthesis *in vitro*. *Nature*, 226, 711-13.
63. SROGL, M., y MALEK, I. 1970. Genetic properties of a membrane-bound fraction of DNA in the culture of *B. subtilis* with synchronously replicating chromosomes. *Folia Microbiol.*, 15, 73-75.
64. STEED, P., y MURRAY, R. G. E. 1966. The cell wall and cell division of Gram negative bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 12, 263-70.
65. SUEOKA, N., y YOSHIKAWA, H. 1963. Regulation of chromosome replication in *B. subtilis*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 47-54.
66. TREMBLAY, G. Y., y NIVELAU, A. 1968. Mise en evidence d'un complexe DNA-RNA ribosomes isolé de bacteries. *Electron Microsc. Proc. Eur. Reg. Conf.* 4th, 443-44.
67. WEIBULL, C. 1965. Plasmolysis in *B. megaterium*. *J. Bacteriol.*, 89, 1.151-54.
68. WEIBULL, C., y GYLLANG, H. 1965. Metabolic properties of some L-forms derived from Gram positive and Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 89, 1.441-47.
69. WILDERMUTH, H., y HOPWOOD, D. A. 1970. Septation during sporulation in *Streptomyces coelicor*. *J. Gen. Microbiol.*, 60, 51-59.
70. WOLSTENHOLME, D. R.; VERMEULEN, C. A., y VENEMA, G. 1966. Evidence for the involvement of membranous bodies in the processes leading to genetic transformation in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, 92, 1.111-21.

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

ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DEL LIPOPOLISACARIDO DEL *AGROBACTERIUM* *TUMEFACIENS*

por

M. SANTAOLALLA

INTRODUCCION

Continuando el estudio de la estructura y composición química de la pared celular de distintos microorganismos, en particular de los patógenos de plantas (22-24), estudiamos en el presente trabajo la estructura y los distintos componentes químicos del lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*, uno de los componentes básicos de la pared celular de este microorganismo.

El interés que actualmente presenta el estudio del lipopolisacárido de los microorganismos gram-negativos, sobre todo en las Enterobacteriáceas (género *Salmonella*), se debe a ser un componente integral de la endotoxina, que como sabemos, es el complejo proteína-lípido-lipopolisacárido responsable de los efectos fisiológicos producidos por la inyección en animales de bacterias muertas por el calor; tales como fiebre, choque, diarrea, edema, hemorragias internas, etc. Presenta un alto poder antigénico, y su contenido específico de antígeno O ha servido a diversos investigadores para un esquema de la clasificación serológica de las Enterobacteriáceas.

Químicamente, el lipopolisacárido es una macromolécula compleja que por hidrólisis parcial da origen a una parte lipídica, denominada lípido A

y un polisacárido complejo; la estructura y composición química particular de estos dos componentes y principalmente la del polisacárido parece ser la responsable de la especificidad antigénica del lipopolisacárido.

En el presente estudio, creemos demostrar la aparente similitud, tanto en estructura submicroscópica como en composición química básica, entre los distintos lipopolisacáridos de los géneros *Salmonella* y *Coli*, que han sido los más estudiados, y la encontrada por nosotros en el lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*, microorganismo gram-negativo y patógeno de plantas.

MATERIAL Y METODOS

Empleamos el *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe núm. 13, amablemente suministrada por la Dra. Beltrá, del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología. Lo cultivamos en caldo común a 25 °C, en fermentador, con aireación, durante cuarenta y ocho horas, al cabo de las cuales separamos los microorganismos por centrifugación, y los lavamos con agua estéril, también por centrifugación, tres veces consecutivas; a continuación, liofilizamos.

Obtención del lipopolisacárido

Obtenemos el lipopolisacárido bruto por el método del fenol-agua, según describen Westphal y Jann (27). Después de una parcial purificación por ultracentrifugación, disolvemos el lipopolisacárido en una solución de ClNa 0,1 M que contenga PO_4Na_2 0,01 M, pH = 7, y le añadimos ribonucleasa, dializando esta solución a 25 °C con el mismo tampón, según indican Leive y colaboradores (14). Este lipopolisacárido purificado lo liofilizamos.

Durante todo el proceso de purificación vamos comprobando su grado de pureza mediante curvas de máxima absorción en la zona de 200 a 400 $\text{m}\mu$, empleando el espectrofotómetro Unicam S.P. 500.

Microscopía electrónica

Hacemos la tinción positiva sobre rejillas portaobjetos preparadas con carbón, usando para la tinción una solución acuosa de acetato de uranilo al 2 %, recientemente preparada y filtrada; colocamos una pequeña gota de la suspensión del lipopolisacárido sobre la rejilla, y añadimos otra gota de la solución de acetato de uranilo, manteniendo así la rejilla durante

treinta minutos; lavamos con agua destilada, secamos y ponemos la rejilla en contacto con otra solución de citrato de plomo, según la técnica de Reynolds (20) y a continuación volvemos a lavar.

Empleamos el microscopio electrónico Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica, del Centro de Investigaciones Biológicas, de Madrid.

Lípido A

Separamos la parte lipídica, denominada lípido A, por hidrólisis con ácido acético al 1 %, a reflujo, durante setenta y cinco minutos. Después de frío, el residuo insoluble blanco, constituido por el lípido A, lo lavamos con cloroformo y agua.

Realizamos el análisis de la parte lipídica por cromatografía sobre capa fina, según el método de Kelley (13).

Hidrólisis suave del polisacárido y obtención de los oligosacáridos correspondientes

El polisacárido separado del lípido A lo hidrolizamos con SO_4H_2 0,5 N, en tubo cerrado, a 100 °C, durante quince-veinte minutos. Neutralizamos el exceso de SO_4H_2 con $(\text{HO})_2\text{Ba}$, separamos el precipitado de SO_4Ba por centrifugación, evaporamos el líquido en vacío, disolvemos en una pequeña cantidad de agua y hacemos cromatografía de los oligosacáridos y posibles componentes aminados.

Hidrólisis de los oligosacáridos

Los oligosacáridos separados por cromatografía sobre papel fueron hidrolizados, recortando el sitio correspondiente a la mancha, que determinamos revelando con el reactivo apropiado una muestra correspondiente a la parte lateral del cromatograma, eluyendo con agua, e hidrolizándola con ClH 2N en tubo cerrado, durante dos horas, a 100 °C; eliminamos el exceso de ClH en vacío, diluimos con agua y hacemos dos evaporaciones consecutivas también en vacío; finalmente, disolvemos el residuo en pequeña cantidad de agua y hacemos cromatografía.

Cromatografía sobre papel

Empleamos papel whatman núm. 1. Disolventes: A) butanol, ácido acético y agua (40:10:50, v/v); B) butanol, piridina y agua (60:40:30, v/v). Reveladores: Solución de hidrato de plata, según Trevelyan (26);

ftalato de anilina, según Partridge (19). Reactivo de Anderson (5), para el ácido 3-desoxi-d-mano-octulosónico. Para azúcares aminados empleamos el reactivo de Elson y Morgan (7).

Cromatografía en capa fina

Empleamos placas preparadas con silicagel G, según Stahl, de unas 300 m μ de espesor; empleando distintos disolventes y reveladores para la identificación de los correspondientes monosacáridos, según el método de Gal (8).

La parte lipídica correspondiente al lípido A la analizamos siguiendo el método de Kelley (13), revelando las manchas con 2'-7'-diclorofluoresceína.

Investigación de heptosas

La realizamos por cromatografía sobre papel whatman núm. 1, según el procedimiento seguido por Adams y colaboradores (2), hidrolizando con SO₄H₂ N durante ocho horas, a 100 °C, en tubo cerrado y precipitando el exceso de SO₄H₂ con (HO)₂ Ba; con la solución concentrada a presión reducida hacemos la cromatografía empleando como disolvente acetona y agua (95:5, v/v). Revelando con el reactivo de Greene y Morris (11), las aldoheptosas originan una mancha de color rosa. También determinamos heptosas en el polisacárido sin hidrolizar, muy diluido, siguiendo el método de Dische, modificado por Osborn (18), usando el espectrofotómetro Unicam S.P. 500.

RESULTADOS

Partimos de 23 g de microorganismos liofilizados, de los que después del tratamiento con fenol-agua, siguiendo el método señalado anteriormente, obtenemos 0,7 g de lipopolisacárido bruto, equivalente a un 3 % del producto seco de que partimos.

Este lipopolisacárido, impurificado principalmente por ácidos nucleicos lo purificamos primeramente por ultracentrifugación y después por tratamiento con ribonucleasa, hasta eliminación total de los ácidos nucleicos según observamos en las curvas de máxima absorción, en el espectrofotómetro (*figura 1*), obteniendo, después de liofilizado al estado de hielo seco, un peso de 0,32 g de lipopolisacárido puro, equivalente al 1,39 %

del peso seco del microorganismo. Estos resultados coinciden muy aproximadamente con los señalados por Westphal y Jann (27) para los lipopolisacáridos microbianos estudiados.

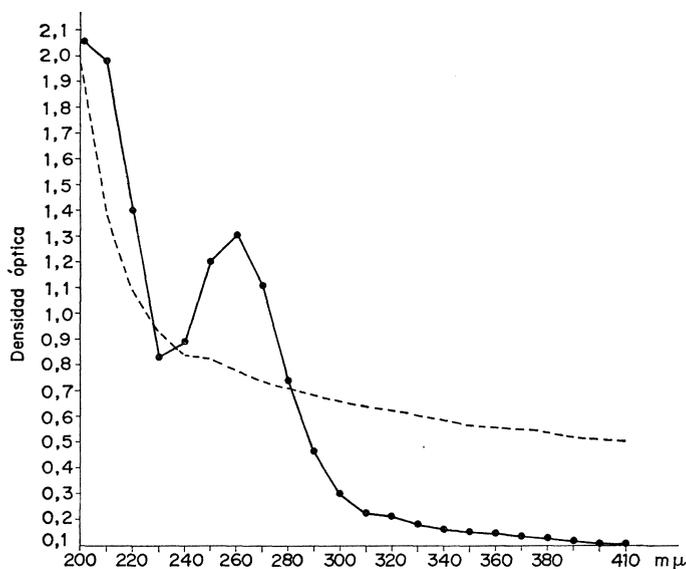


Figura 1. Curvas de máxima absorción: —, lipopolisacárido bruto; ----, lipopolisacárido purificado por ultracentrifugación y ribonucleasa

La ultraestructura al microscopio electrónico del lipopolisacárido, tanto bruto como purificado, observado en forma de tinción positiva, aparece como una cinta trilaminar formando anillos imperfectos; esta cinta tiene una anchura de unos 75 a 90 Å, la capa intermedia menos densa a los electrones tiene un espesor aproximado de 50 Å, y las exteriores, más densas, de unos 15 Å (figura 2).

Análisis del lípido A

Separamos el lípido A del lipopolisacárido por hidrólisis suave, según indicamos anteriormente. En la fracción clorofórmica, por cromatografía sobre capa fina de silicagel G, siguiendo el método de Kelley (13), identificamos ácidos grasos libres e indicios de glicéridos.

En la fracción acuosa encontramos glucosamina, etanolamina, ion fosfórico e indicios de ramnosa.

Análisis del polisacárido

La parte glucídica del lipopolisacárido que queda después de separar el lípido A, sometida a análisis cromatográfico sobre papel whatman número 1, en el disolvente A), al revelar con plata alcalina, da lugar a cuatro manchas: la de menor Rf, queda de un color semejante al originado por la glucosa; le siguen otras dos, con un color blanco grisáceo, y la última tira a rosa. En otro cromatograma similar, revelado con el reactivo de Anderson (5), se observan unas manchas positivas a desoxiazúcares.

Este polisacárido complejo lo hidrolizamos con SO_4H_2 0,5 N en tubo cerrado, durante quince-veinte minutos, a 100 °C, neutralizamos el exceso de SO_4H_2 con $(\text{HO})_2\text{Ba}$ y hacemos cromatografía sobre papel whatman número 1 con el disolvente A), apareciendo al ser revelado con plata alcalina siete manchas correspondientes a distintos oligosacáridos, y cuyos Rfg y reacciones a otros reveladores indicamos en el *cuadro 1*.

Cuadro 1

Oligosacáridos	Rfg	Reveladores					Mayor proporción
		Plata alcalina	Ftalato de anilina	Ninhidrina	Elson y Morgan	Anderson	
A	0,29	+	—	+	+	+	—
B	0,75	+	+	+	+	+	m _p
C	1,10	+	+	—	—	indicios	m _p
D	1,36	+	+	+	+	—	m _p
E	1,64	+	+	—	—	—	m _p
F	1,96	+	+	—	—	—	m _p
G	2,78	+	+	—	—	—	—

+ = reacción positiva al revelador; — = reacción negativa al revelador; m_p = mayor proporción.

Hacemos sucesivos cromatogramas con objeto de localizar el sitio correspondiente a las distintas manchas de los respectivos oligosacáridos, y recortar este espacio para eluir los diferentes oligosacáridos e hidrolizarlos. Se hicieron dos clases de hidrólisis, como indicamos anteriormente, para

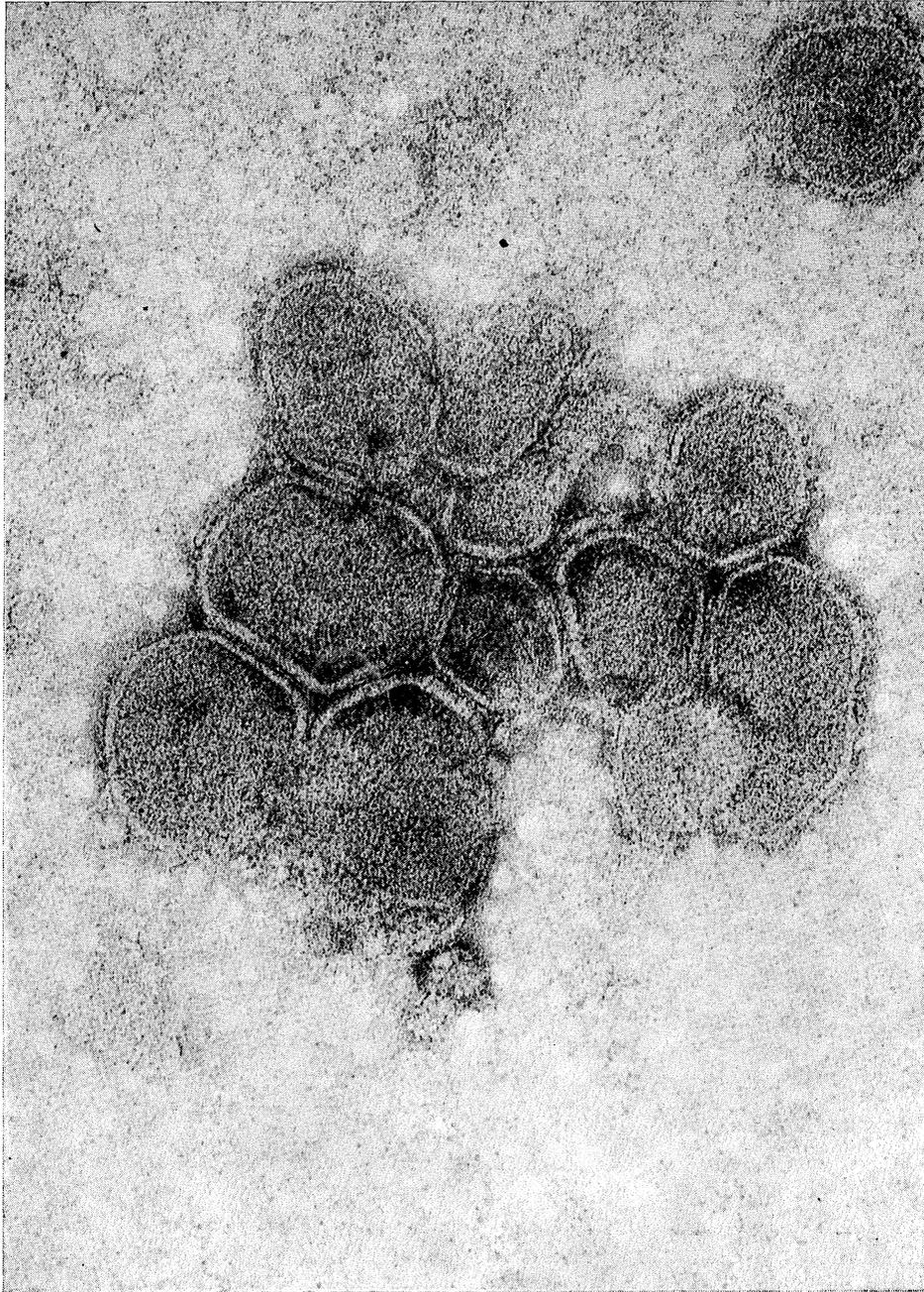


Figura 2. Microfotografía electrónica del lipopolisacárido del A. tumefaciens, tinción positiva. $\times 264.000$

tratar de esclarecer los distintos monosacáridos que integran cada uno de ellos, utilizando la cromatografía sobre papel y capa fina; en el *cuadro 2*, exponemos los resultados encontrados.

Cuadro 2

Oligosacáridos	Rfg	Monosacáridos
A	0,29	2-ceto-3-desoxi-d-mano-octulosonato Glucosamina Xilosa Fucosa Ramnosa
B	0,75	2-ceto-3-desoxi-d-mano-octulosonato Glucosamina Xilosa Fucosa Ramnosa
C	1,10	2-ceto-3-desoxi-d-mano-octulosonato (indicios) Xilosa Fucosa Ramnosa
D	1,36	Glucosamina Xilosa Glucosa Ramnosa
E	1,64	Fucosa Ramnosa
F	1,96	Glucosamina Glucosa Ramnosa
G	2,78	Fucosa Ramnosa

Las heptosas fueron identificadas espectrofotométricamente en el polisacárido sin hidrolizar, muy diluido, por el método de Dische, modificado por Osborn (18), con resultado positivo; y por cromatografía, según indicamos anteriormente, identificando una con un Rfg de 0,83.

DISCUSION

Obtenemos inicialmente 0,7 g de lipopolisacárido bruto, que después de purificar por centrifugación y tratamiento con ribonucleasa nos quedan reducidos a 0,32 g, que equivalen al 1,39 % de lipopolisacárido puro referido al peso seco de los microorganismos de que partimos; este resultado coincide aproximadamente con otro obtenido en un ensayo anterior, donde obtuvimos el 1,33 % de lipopolisacárido puro, realizando la purificación con cetavlon (bromuro de cetil-trimetil-amonio); ambos lipopolisacáridos se encuentran exentos de ácidos nucleicos, como indican las curvas de máxima absorción en el espectrofotómetro (*figura 1*).

En la ultraestructura observada por microscopía electrónica de la suspensión acuosa del lipopolisacárido en tinción positiva, aparecen unas formas cóncavas más o menos irregulares, aplastadas, de color gris, rodeadas de una cinta trilaminar de un espesor total de unos 74 Å; esta cinta trilaminar está formada por una capa intermedia menos densa a los electrones y de un espesor aproximado de 45 Å, y una a cada lado, más densas a los electrones y finas, de unos 15 Å. La estructura trilaminar del lipopolisacárido de otros microorganismos ya fue señalada por algunos investigadores y fundamentalmente por Shands y colaboradores (25), en estudios sobre la ultraestructura morfológica del lipopolisacárido de diversas estirpes de *Salmonella typhimurium*.

No conocemos ningún trabajo sobre ultraestructura de lipopolisacáridos de microorganismos patógenos de plantas, pero nuestros resultados parecen coincidir con los encontrados por otros autores sobre el lipopolisacárido de *Escherichia coli* (15-16 y 21) y sobre *Salmonella* (25).

En el lípido A, separado del lipopolisacárido por hidrólisis suave, separamos dos fracciones, una, clorofórmica y, otra, acuosa; en la primera, clorofórmica, encontramos ácidos grasos libres, y en la segunda, acuosa, después de hidrolizada, glucosamina, etanolamina, ion fosfórico e indicios de ramnosa. Estos resultados son semejantes a los encontrados en estudios sobre el lípido A de *Escherichia coli* por Burton y Carter (6) y por Adams y Singh (4) también en *E. coli* y *Shigella flexneri*. Gmeiner y colaboradores (9), en el lípido A de una estirpe rugosa de *Salmonella*, identifican glucosamina, ácidos grasos, y ortoforiletanolamina; Adams y colaboradores (3) estudian el lipopolisacárido de dos microorganismos, *Moraxella duplex* y *Micrococcus calca-acéticus*, hallando en la

fracción correspondiente al lípido A, glucosa, galactosa, hexosaminas, etanolamina y derivados, ácidos grasos libres y diversos aminoácidos; esto parece demostrar que los lipopolisacáridos de todos los microorganismos, aunque parecidos en cuanto a su estructura química fundamental, en determinadas especies de microorganismos presentan diferencias manifiestas.

Respecto a la composición del lípido A del *Agrobacterium tumefaciens*, nuestras investigaciones demuestran que su estructura química es semejante a la de la mayoría de los lípidos A separados de *Escherichia coli* y *Salmonella*, que son los que hasta la fecha han sido más estudiados.

Mediante la hidrólisis del polisacárido con SO_4H_2 , 0,5N en tubo cerrado, durante dieciocho minutos y posterior cromatografía, separamos siete oligosacáridos con distintos Rfg (véase *cuadro 1*), correspondiendo la mayor proporción a cinco de ellos, cuyos Rfg son 0,75, 1,10, 1,36, 1,64 y 1,96; estos cinco oligosacáridos, además de otro que aparece en menor proporción y con un Rfg 0,29, contienen ramnosa como monosacárido predominante, monosacárido ya señalado por nosotros (23) como el mayor componente glucídico de la pared celular del *Agrobacterium tumefaciens* y, posteriormente, identificado por Manasse y Corpe (17) como componente del lipopolisacárido de diversas especies de *A. tumefaciens*; en 1968, lo encuentran Grahan y O'Brien (10) en el lipopolisacárido de todas las estirpes de *A. tumefaciens* que estudian.

El ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico, también encontrado por Manasse y Corpe (17) en el lipopolisacárido de todas las estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* que estudian, lo hallamos nosotros como componente de dos oligosacáridos que tienen un Rfg de 0,29 y 0,75, y que además contienen glucosamina, xilosa, fucosa y ramnosa.

La fucosa, otro monosacárido predominante en el lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*, lo hemos encontrado en seis de los siete oligosacáridos del lipopolisacárido, como señalamos en el *cuadro 2*; Manasse y Corpe (17) lo encuentran entre los monosacáridos del lipopolisacárido hidrolizado de las ocho estirpes del *A. tumefaciens* que estudian, y Grahan y O'Brien (10) en cuatro de siete estirpes.

Grahan y O'Brien (10) no señalan la presencia de heptosas en ninguno de los lipopolisacáridos de distintas estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium*; sin embargo, Manasse y Corpe (17) la encuentran en una de las estirpes estudiadas por ellos; nosotros encontramos una heptosa en el polisacárido, aunque no podemos indicar a qué oligosacárido corresponde.

No conocemos hoy la forma en que están unidos estos monosacáridos que forman los diversos oligosacáridos de la parte polisacárida del lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens* estudiado por nosotros, ni tampoco su cantidad, pero nuestros resultados parecen indicar la similitud entre este lipopolisacárido obtenido de un microorganismo patógeno de plantas y aquellos otros más estudiados por diversos investigadores, como son los de los géneros *Salmonella* y *Coli*.

RESUMEN

Estudiamos el lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe núm. 13, obtenido por el método de Westphal y Jann y purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa.

Observado mediante tinción positiva al microscopio electrónico, aparece en forma de círculos más o menos irregulares rodeados por una cinta trilaminar perfectamente definida, y de un espesor aproximado entre 75 y 90 Å.

El lípido A, separado por hidrólisis suave, está constituido por ácidos grasos libres, glicéridos, etanolamina, glucosamina, ion fosfórico e indicios de ramnosa.

En la hidrólisis del polisacárido encontramos siete oligosacáridos, siendo los mayores componentes de estos oligosacáridos la ramnosa y fucosa. También señalamos la presencia de una heptosa y 2-ceto-3-desoxid-mano-octulosonato.

De nuestros resultados podemos deducir que este lipopolisacárido, correspondiente a un microorganismo gram-negativo y patógeno de plantas, tiene una estructura morfológica y química similar a aquellos más estudiados pertenecientes a los géneros *Salmonella* y *Escherichia*.

SUMMARY

The structure and chemical composition of lipopolysaccharide from Agrobacterium tumefaciens

The lipopolysaccharide from *Agrobacterium tumefaciens* was obtained by the method of Westphal and Jann and purified by ultracentrifugation and ribonuclease treatment.

Electron microscopy by positive staining showed irregular flat discs bounded by a trilaminar ribbon of 75 to 90 Å thick.

The lipid A was separated by gentle hidrolisis and by thin layer chromatography was found to be formed by free fatty acids, glycerids, ethanolamine, glucosamine, phosphoric ions and traces of rhamnose.

After hidrolisis of the polysaccharide, seven olygosaccharides were found, among them KDO, rhamnose and fucose were the major components of the polysaccharide. A non identified heptose was also found.

The chemical and structure features of this lipopolysaccharide from a Gram negative, phytopathogenic bacterium seems to be very similar to those obtained from bacteria pathogenic to humans and animals such as *Salmonella* and *Escherichia coli*.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, G. A.; KATES, M.; SHAW, D. H., y YAGUCHI, M. 1968. Studies on the chemical constitution of cell-wall lipopolysaccharides from *Neisseria perflava*. Can. J. Biochem., 46, 1.175-84.
2. ADAMS, G. A.; QUADLING, C., y PERRY, M. B. 1967. D-glyceromanno-heptose as a component of lipopolysaccharide from Gram negative bacteria. Can. J. Microbiol., 13, 1.605-13.
3. ADAMS, G. A.; QUADLING, C.; YAGUCHI, M., y TORNABENE, T. G. 1970. The chemical composition of cell-wall lipopolysaccharides from *Moraxella duplex* and *Micrococcus calco-aceticus*. Can. J. Microbiol. 16, 1-8.
4. ADAMS, J. M., y SINGH, P. P. 1970. Structural features of lipid A preparations isolated from *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. Biochim. Biophys. Acta, 202, 553-55.
5. ANDERSON, P. J. 1966. A sensitive reagent for detecting 2-deoxysugars and 3-deoxypolyols. J. Chromatogr., 21, 163-64.
6. BURTON, A. J., y CARTER, H. E. 1963. Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. Biochemistry, 3, 411-18.
7. ELSON, L. A., y MORGAN, W. T. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and condrosamine. Biochem. J., 27, 1.824-28.
8. GAL, A. E. 1968. Separation and identification of monosaccharides from biological materials by thin layer chromatography. Anal. Biochem., 24, 452-61.
9. GMEINER, J.; LUDERITZ, O., y WESTPHAL, O. 1968. Biochemical studies on lipopolysaccharides of *Salmonella* R mutants. Investigations on the structure of the lipid A component. Eur. J. Biochem., 7, 370-79.
10. GRAHAM, P. H., y O'BRIEN, M. A. 1968. Composition of lipopolysaccharides from *Rhizobium* and *Agrobacterium*. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol., 34, 326-30.

11. GREENE, F. L., y MORRIS, P. 1958. Urea phosphate reagent as a specific test for heptoses on paper chromatograms. *Anal. Chem.*, 30, 1.164.
12. HÄMMERLING, G.; LUDERITZ, O., y WESTPHAL, O. 1970. Structural investigations on the core polysaccharide of *Salmonella typhimurium* and the mode of attachment of the O-specific chains. *Eur. J. Biochem.*, 15, 48-56.
13. KELLEY, T. F. 1966. Separation with unidimensional TLC of all neutral lipid classes. *J. Chromatogr.*, 22, 456-57.
14. LEIVE, L.; SHOVLIN, U. K., y MERGENHAGEN, L. E. 1968. Physical chemical and immunological properties of lipopolysaccharide released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate. *J. Biol. Chem.*, 243, 6.384-91.
15. LOPES, J., e INNISS, W. E. 1969. Electron microscopy of effect of polymyxin on *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 100, 1.128-30.
16. LOPES, J., e INNISS, W. E. 1970. Electron microscopy study of lipopolysaccharide from an avian strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 103, 238-43.
17. MANASSE, R. J., y CORPE, W. A. 1967. Chemical composition of cell envelopes from *Agrobacterium tumefaciens*. *Can. J. Microbiol.*, 13, 1.591-603.
18. OSBORN, M. J. 1963. Studies on the Gram negative cell-wall. I. Evidence for the role of 2 keto-3-deoxyactonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 50, 499-506.
19. PARTRIDGE, S. M. 1949. Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugar. *Nature*, 164, 443.
20. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high put as an electron-opaque in electron microscope. *J. Cell Biol.*, 17, 208-12.
21. ROTHFIELD, L., y HORNE, R. W. 1967. Reassociation of purified lipopolysaccharide and phospholipid of the bacterial cell envelope: Electron microscopic and monolayer studies. *J. Bacteriol.*, 93, 1.705-21.
22. SANTAOLALLA, M. 1963. Obtención y análisis químico de paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas L fijas. *Microbiol. Españ.*, 14, 25-39.
23. SANTAOLALLA, M. 1965. Estudio comparativo del componente graso del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas. I. Aislamiento de distintas fracciones lipídicas. *Microbiol. Españ.*, 18, 13-21.
24. SANTAOLALLA, M. 1966. Estudio comparativo del componente graso del *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas L fijas. II. Variaciones según el medio de cultivo y estudio de los fosfolípidos. *Microbiol. Españ.*, 19, 1-9.
25. SHANDS, J. W.; GRAHAM, J. A., y NATH, K. 1967. The morphologic structure of isolated bacterial lipopolysaccharide. *J. Mol. Biol.*, 25, 15-21.
26. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P., y HARRISON, J. S. 1950. Detection of sugar on paper chromatograms. *Nature*, 166, 444.
27. WESTPHAL, O., y JANN, K. 1965. *Methods Carbohydr. Chem.*, 5, 83.

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE
LA β -(1-3)-GLUCANASA
DE *RHIZOPUS ARRHIZUS*

por

J. P. GARCIA-BALLESTA

INTRODUCCION

La utilización de enzimas que atacan específicamente determinados enlaces de los polímeros que forman la pared celular de los microorganismos, es una técnica muy valiosa para el estudio de la composición de dichas estructuras celulares. Esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores con resultados positivos en el estudio de la pared celular de levaduras y hongos (11, 13 y 16).

Obviamente, el éxito de la técnica, es decir, la posibilidad de una interpretación inequívoca de sus resultados, depende totalmente de la pureza y especificidad de las enzimas utilizadas.

La pared celular de las levaduras, contiene, entre otros componentes, polímeros de glucosa unidos con enlaces del tipo β -(1-3) (12). Como paso previo para el estudio de la función desempeñada por este polímero en la estructura de la pared celular, nos propusimos la purificación y estudio de una enzima que hidrolizara este tipo de enlaces.

La existencia de enzimas que atacan enlaces de glucosa del tipo β -(1-3) o β -(1-3)-glucanasas es bastante común, especialmente entre microorganismos de la microflora del suelo (4 y 14). Su purificación a partir de diferentes fuentes ha sido también publicada por varios autores (1, 7, 10 y 17). Sin embargo, aquellas fuentes de enzima, utilizadas por los anteriores autores, que producen un producto más puro, adolecen de presentar un rendimiento bastante bajo.

En un estudio de la distribución de actividad β -(1-3)-glucanásica entre

especies de hongos de la microflora del suelo, Reese y Mandels (14) encontraron que *Rhizopus arrhizus* la excretaba al medio de cultivo en cantidades muy notables y relativamente libre de otras actividades enzimáticas contaminantes. Se eligió, pues, este organismo como fuente de la enzima y su purificación se describe a continuación.

MATERIAL Y METODOS

Organismo y condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de *Rhizopus arrhizus* QM 1032, procedente del US Army Laboratory, Natick, Massachusetts.

El organismo creció en el medio basal descrito por Reese y Mandels (14), el cual era suplementado con una fuente de carbono adecuada, según se describe más adelante, a una concentración del 0,5%. Se utilizaron matraces de 300 ml con 125 ml de medio, incubados a 28 °C, con agitación continua. Al cabo del tiempo apropiado, normalmente 3 días, los cultivos eran filtrados y el caldo de cultivo inmediatamente sometido al proceso de purificación.

Valoraciones enzimáticas

Las siguientes actividades enzimáticas se determinaron sobre los substratos detallados en cada caso:

β -(1-3)-glucanásica: se determinaba sobre una solución de laminarina [polímero de glucosa con enlaces β -(1-3)], al 1%, en tampón de citrato-fosfato 0,05 M, pH = 4,5.

β (1-6)-glucanásica: valorada sobre pustulán [polímero de glucosa con enlaces β -(1-6)] en condiciones similares a las utilizadas para la actividad β -(1-3)-glucanásica.

Celulásica: sobre carboximetilcelulosa (CMC), al 1%, en tampón de citrato 0,05, pH = 5,4.

Quitinásica: utilizando quitina coloidal suspendida en tampón de fosfato 0,05 M, pH = 6,5, con una densidad óptica de 0,8-600 m μ .

α -amilásica: sobre una suspensión de almidón soluble, al 3%, en tampón de citrato-fosfato, antes descrito.

Las condiciones normales de hidrólisis eran: 1 ml de enzima cruda o 50 μ g de la preparación purificada/1 ml de substrato, incubados a 45 °C, durante 1 hora.

La valoración de la actividad en la preparación se hacía por determinación de los azúcares reductores liberados, usando el método del ácido dinitrosalicílico, descrito por Sumner y Somers (15).

En algún caso se utilizó el método de la glucoxidasa, preparado por Worthington Biochemical Corporation.

Procedimientos cromatográficos

Los productos del ataque enzimático eran cromatografiados en papel whatman núm. 1, utilizando como disolvente butanol - acetona - agua (4:5:1, v/v). Las manchas de los azúcares eran reveladas con una solución de ftalato de anilina (370 mg de ácido ftálico y 0,22 ml de anilina en 24 ml de butanol, con 1,5 ml de agua).

Unidades enzimáticas

Se ha considerado como una unidad de cualquiera de las actividades valoradas, la cantidad de enzima capaz de liberar 50 μ g de azúcares reductores/hora.

RESULTADOS

Efecto del medio de cultivo en la producción de β -(1-3)-glucanasa por Rhizopus arrhizus

El hongo creció en el medio basal suplementado, descrito anteriormente (Material y métodos).

La producción total de diferentes actividades enzimáticas, determinadas en el medio de cultivo a los 25 días de crecimiento, se detalla en el *cuadro 1*. Los resultados concuerdan en general con los encontrados por Reese y Mandels (14), que determinaron únicamente la actividad β -(1-3)-glucanásica en una serie de hongos del suelo.

De acuerdo con estos datos, la mejor fuente de carbono para la producción de la actividad β -(1-3)-glucanásica es celobiosa, dímero de glucosa, con una unión β -(1-4). Sin embargo, podemos apreciar que la contaminación de esta actividad con β -(1-6), α -(1-4)-glucanasa y quitinasa es bastante notable. Desde el punto de vista de la purificación de la enzima estas condiciones no son las óptimas, siendo preferible una menor contaminación, aún a costa del rendimiento total de la enzima. Por razones dis-

cutidas posteriormente, era especialmente interesante el poder partir de un preparado con el menor contenido posible en la actividad β -(1-6).

Cuadro 1. Efecto de la fuente de carbono en la producción de carbohidrasas por R. arrhizus

Enzima	Unidades de actividad enzimática/mililitro de cultivo cuando crece en					
	Maltosa	Glicerol	Glucosa	Celobiosa	Almidón	Laminarina
β -(1-3)-glucanasa	15	15	7	27	6	14
β -(1-6)-glucanasa	5	12	8	4	4	9
β -(1-4)-glucanasa (carboximetilcelulasa)	1	1	3	0	0	0
α -(1-4)-glucanasa	7	11	7	16	5	3
Quitinasa	0	0	1	2	0	0

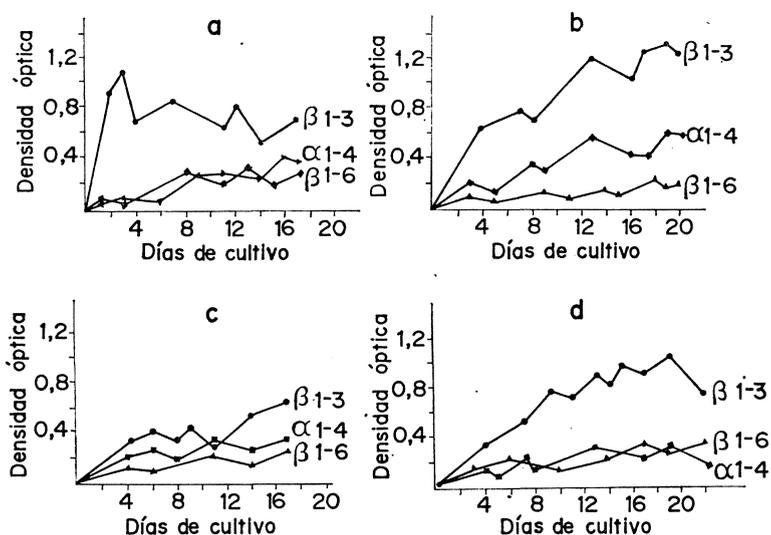


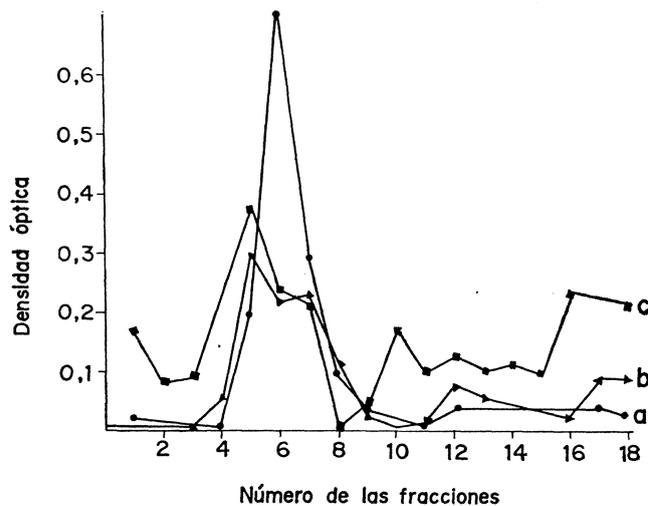
Figura 1. Actividades enzimáticas en cultivos de Rh. arrhizus. Las actividades se determinaron a diferentes tiempos, durante el crecimiento del hongo. Medio basal suplementado con 0,5 % de los siguientes compuestos como única fuente de carbono: a, glicerol; b, celobiosa; c, almidón, y d, laminarina

Cuando se siguió la producción de las diferentes actividades enzimáticas a lo largo de todo el período de crecimiento (*figura 1*), se encontró que cuando el hongo crecía utilizando glicerol como fuente de carbono (*figura 1 a*), se producía un aumento muy rápido de la actividad β -(1-3)-glucanásica durante los primeros días de cultivo, que después se estabilizaba e incluso disminuía con el tiempo. Durante esos primeros días, sin embargo, las otras actividades apenas si alcanzaban niveles detectables.

En vista de estos resultados, se utilizaron como condiciones de crecimiento normales una incubación de 3 días en el medio básico descrito, suplementado con 0,5 % de glicerol.

*Purificación de la actividad β -(1-3)-glucanásica a partir del caldo de cultivo del *Rhizopus arrhizus**

El caldo de cultivo del hongo crecido en las condiciones arriba descritas, fue precipitado con sulfato amónico, al 45 % de saturación, dejándolo en reposo a 4 °C durante 4 horas. A continuación se centrifugó a 10.000 r/m, durante 24 horas, desechándose el precipitado. El sobrenadante, ajustado con sulfato amónico sólido hasta el 75 % de saturación, se dejó durante 12 horas, a 4 °C. Al cabo de este tiempo, el precipitado



*Figura 2. Elución de las distintas actividades presentes en el cultivo de *Rh. arrhizus* filtrado a través de una columna de sephadex G-200. ●—●, actividad β 1-3 glucanásica; ▲—▲, actividad β 1-6 glucanásica; ■—■, actividad α -amilásica*

fue recogido utilizando las mismas condiciones de centrifugación antes descritas y disuelto en tampón de acetato 0,01 M, a pH = 5,4, en una centésima parte del volumen inicial del cultivo.

La posterior purificación de la enzima se llevó a cabo por filtración en sephadex G-200. En una columna de 25 × 2 cm se cargaron 10 mg de proteína obtenida de la precipitación del medio de cultivo con sulfato amónico, y fueron eluidos con agua destilada con un flujo de 12 ml/h, recogándose fracciones de 3 ml.

La *figura 2* muestra cómo en estas condiciones no se consiguió la separación de las distintas actividades hidrolíticas que componían el precipitado. Este paso, sin embargo, consiguió una notable concentración de las actividades, como lo indica el gran aumento en la actividad específica conseguido (*cuadro 2*).

Cuadro 2. Purificación de la actividad glucanásica

	β -(1-3)-glucanasa		β -(1-6)-glucanasa		α -(1-4)-glucanasa	
	Actividad específica unid./mg	Rendimiento %	Actividad específica unid./mg	Rendimiento %	Actividad específica unid./mg	Rendimiento %
Caldo de cultivo	2,5	100	0,4	100,0	0,6	100,0
Precipitado $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	28,0	91	4,6	94,0	7,0	94,0
Sephadex G-200	230,0	69	32,0	59,0	52,0	65,0
DEAE-celulosa	297,0	60	3,0	3,8	10,0	8,4

Las fracciones correspondientes al pico de actividad β -(1-3)-glucanásica fueron reunidas y liofilizadas. El material resultante se disolvió en tampón de citrato-fosfato 0,01, pH = 4,5, filtrándose a través de filtro millipore para separar el material insoluble.

El material con actividad β -(1-3)-glucanásica obtenido de la filtración a través de sephadex G-200, fue a continuación aplicado a una columna de 25 × 1 cm de DEAE-celulosa y eluido con un gradiente de concentración de tampón de citrato-fosfato, desde 0,01M hasta 1M.

La *figura 3* muestra los resultados de este tipo de cromatografía en columna. Puede verse cómo en estas condiciones pudo separarse la activi-

dad β -(1-3) de la β -(1-6)-glucanásica, quedando, sin embargo, ligada a ella un resto de actividad amilásica, que no pudo separarse modificando las condiciones de la elución. Se ensayó, sin éxito, la elución con un gradiente de ClNa, así como el uso de un gradiente de pH, en vez de gradiente de concentración.

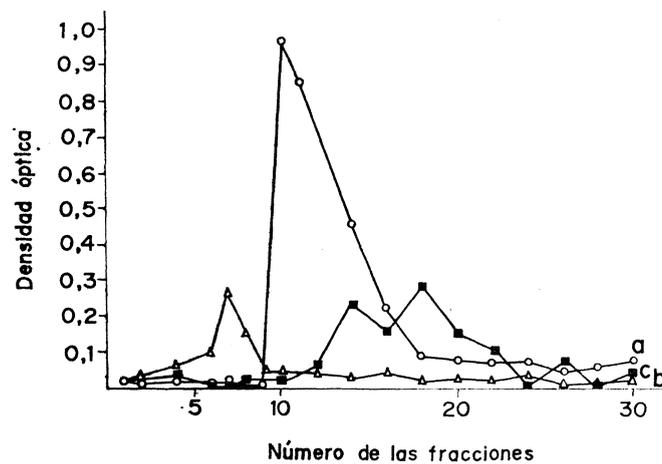


Figura 3. Elución de las distintas actividades presentes en el cultivo de *Rh. arrhizus* filtrado a través de una columna de DEAE-celulosa. \circ — \circ actividad β -1-3 glucanásica; Δ — Δ actividad β -1-6 glucanásica; \blacksquare — \blacksquare actividad α -amilásica.

El cuadro 2 resume el proceso de purificación de la enzima. Vemos cómo se consiguió una purificación de unas 120 veces la actividad inicial del caldo de cultivo, con un rendimiento del 60 %, apareciendo la actividad β -(1-3)-glucanásica prácticamente libre de β -(1-6)-glucanásica y con una ligera actividad amilásica.

El material así purificado se utilizó para estudiar las características propias de la β -(1-3)-glucanasa. El pH óptimo de la enzima aparece entre 4,5 y 5,0, disminuyendo muy rápidamente al pasar a valores más bajos (figura 4). La temperatura óptima se presenta alrededor de los 60 °C, desactivándose rápidamente la enzima por encima de los 65 °C (figura 5).

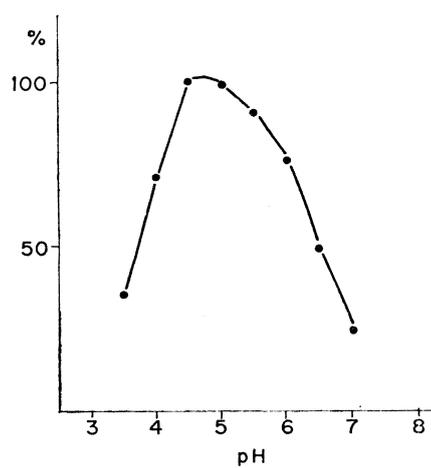


Figura 4. Actividad de la enzima purificada, en función del pH

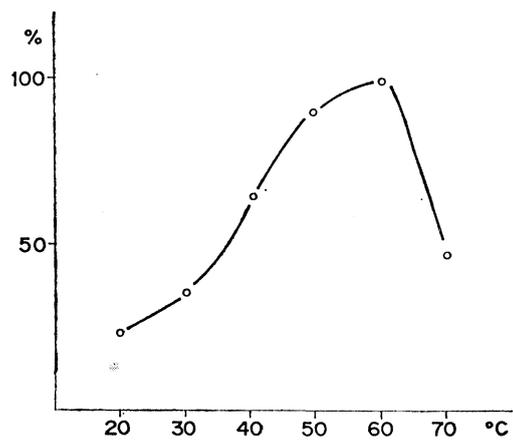


Figura 5. Actividad de la enzima purificada, en función de la temperatura

Modo de acción de la enzima

El trabajo previamente realizado con este tipo de enzimas (14) indicaba que su modo de acción era fundamentalmente endolítico, es decir, que rompía las cadenas del polímero en posiciones internas, liberando oligómeros preferentemente.

La enzima purificada según el procedimiento arriba descrito, aunque, efectivamente, produce gran cantidad de dímeros y trímeros, revelados por cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis, también libera cantidades apreciables de glucosa, detectada, tanto por cromatografía como enzimáticamente, mediante el ensayo con la glucoxidasa. Estos hechos claramente indican que en nuestro preparado enzimático existe también una actividad exolítica.

Es interesante a este respecto el notar que las actividades endo y exo β -(1-3)-glucanásicas mostraron una diferente respuesta al tratamiento con temperatura y pH. Así, a temperaturas superiores a los 65 °C, a las que del 30 al 60 % de la actividad total, determinada mediante la valoración de azúcares reductores liberados, se había perdido, no podía apreciarse por cromatografía la acumulación de glucosa. Por el contrario, a pH superiores a 7,5, a los que prácticamente el 90 % de la actividad total de la enzima había desaparecido, sólo se destacaba la presencia de glucosa en los hidrolizados.

DISCUSION

El caldo de cultivo del hongo *Rhizopus arrhizus* es una fuente clásica para la obtención de β -(1-3)-glucanasa, dado que el organismo excreta al medio la enzima en grandes cantidades y relativamente libre de otras carbohidrasas (14).

La producción de la enzima parece ser constitutiva; sin embargo, la cantidad de enzima producida es muy afectada por la fuente de carbono en que el hongo está creciendo, como se ve en el *cuadro 1*.

El efecto de la fuente de carbono no sólo se aprecia en el rendimiento final de la enzima, sino igualmente en el modo de su excreción al medio, lo cual posiblemente es un reflejo de su síntesis en el citoplasma. Haciendo un estudio de la producción de β -(1-3)-glucanasa a lo largo del período de crecimiento del hongo en diferentes fuentes de carbono (*figura 1*), hemos

visto cómo es posible el encontrar condiciones de crecimiento que producen un material óptimo para iniciar una purificación de la enzima. Al crecer en glicerol, el *Rhizopus arrhizus* libera en el medio de cultivo cantidades muy notables de la enzima, mientras que en esas condiciones la síntesis de otras enzimas contaminantes aún está muy reprimida. Se consigue así un caldo de cultivo con una actividad alta de β -(1-3)-glucanasa /ml, a la vez que debido a la juventud del cultivo, únicamente 3 días, la acumulación de proteína inespecífica, muy notable en cultivos más viejos, es despreciable, haciendo que la actividad específica de la glucanasa sea relativamente alta.

Con el proceso de purificación aquí detallado se ha conseguido liberar la actividad β -(1-3)-glucanásica de la β -(1-6). Este punto es del máximo interés, dado que el objetivo final de la purificación de esta enzima es su utilización en el estudio de la estructura y composición de la pared celular de levaduras. Estos organismos poseen en su pared celular polímeros de glucosa con enlaces β -(1-3) y β -(1-6) (12), por lo cual es posible utilizar las enzimas que rompen específicamente estos enlaces, como instrumentos para su estudio. Por esta razón, es obviamente importante que esas actividades no estén contaminadas entre sí.

El pequeño resto de actividad amilásica que se detecta en nuestro material purificado no estorba para nuestro objetivo, ya que polímeros de glucosa con enlaces α -(1-4) no existen en la pared celular de levaduras.

La purificación parcial de enzimas con actividad β -(1-3)-glucanásica ha sido conseguida también partiendo de cultivos de otros organismos (8). En el caso descrito por estos autores, la separación de la actividad β -(1-3)-glucanásica de la celulásica existente en su material, requirió el uso de electroforesis en papel o en bloque de almidón, que en nuestro caso no es necesaria. En general, los resultados aquí descritos concuerdan con los de estos autores en cuanto al tamaño de la molécula de la enzima, que por su comportamiento en la filtración por gel de sephadex indica poseer un peso molecular superior a 100.000 daltons.

Las características de la enzima purificada por nuestro procedimiento son las propias de las enzimas de este tipo (2), presentando un pH óptimo sensiblemente ácido, alrededor de 4,5, y una resistencia alta a la temperatura, con el óptimo para su acción alrededor de los 60 °C.

La localización de diferentes actividades enzimáticas en una misma proteína es un fenómeno relativamente anormal en la célula. Se conocen, sin embargo, casos muy bien documentados de este hecho, y quizá el más

conocido sea el de la ADN-polimerasa, descrita por Kornberg (9). Esta enzima, además de la obvia actividad polimerizante de ADN, muestra actividad hidrolítica del mismo polímero. En el campo que aquí nos interesa de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos, Brock (3) encuentra que en el citoplasma de diferentes especies de levaduras existen actividades enzimáticas hidrolizantes de enlaces β -(1-3) y β -(1-6), que no es posible resolver en dos componentes distintos por los métodos por él utilizados. Este autor las considera parte de una misma molécula.

Aunque no podemos dar una prueba concluyente de que las actividades endo y exolítica que se detectan en nuestra preparación purificada de β -(1-3)-glucanasa correspondan a dos enzimas diferentes, el hecho de que la sensibilidad de dichas actividades al pH y a la temperatura sea diferente, parece indicar que ese es el caso, o, al menos, que si se trata de la misma enzima, los centros activos responsables de cada una de las dos formas de acción radican en lugares diferentes de la molécula.

Chesters y Bull (5) y Bacon y colaboradores (1), estudiando el modo de acción de una β -(1-3)-glucanasa no purificada, encuentran también actividad exo y endolítica, que, en su caso, es posible separar mediante cromatografía (1). Dichas actividades, como en nuestra enzima, presentan una diferente sensibilidad a cambios de pH (6). Estos resultados parecen, pues, confirmar nuestra creencia de que las actividades exo y endolítica detectadas en nuestra preparación responden de hecho a dos enzimas diferentes.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la valiosa ayuda prestada por el Prof. J. R. Villanueva para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Se han investigado las condiciones óptimas de cultivo del hongo *Rhizopus arrhizus*, para obtener una producción máxima de la enzima β -(1-3)-glucanasa, que es excretada por este organismo al medio de cultivo. Cuando el hongo crece con glicerol como única fuente de carbono, se produce un máximo de actividad β -(1-3)-glucanasa, con un mínimo de otras actividades enzimáticas contaminantes, a los 3 días de cultivo. A par-

tir del caldo de cultivo, se ha purificado la enzima 120 veces, con un 60 % de recuperación, lográndose la separación de todas las enzimas contaminantes, excepto de un 1 % de actividad α -amilásica.

La enzima purificada tiene un pH óptimo entre 4,5 y 5,0, y presenta su máxima actividad alrededor de los 60 °C.

La preparación purificada presenta actividad endo y exolítica, con acumulación de glucosa libre y de oligómeros como productos de hidrólisis. La respuesta de estos dos modos de acción a varios tratamientos sugiere que son debidos a dos enzimas diferentes.

SUMMARY

*Purification and properties of a β -(1-3) glucanase from *Rhizopus arrhizus**

Conditions for an optimum production of β -(1-3)-glucanase by the fungus *Rhizopus arrhizus* are described.

When glycerol is used as sole carbon source a maximum of β -(1-3)-glucanase activity is detected in the medium after 3 days of growth. Under these conditions a minimum of contaminating enzymatic activities are found in the culture.

By using, DEAE-celulose and sephadex, a 120 fold purification of the β -(1-3)-glucanase activity was achieved. The contaminating activities could be removed at the same time, except for a 1 % of α -amylase.

The purified preparation has an optimum pH between 4.5 and 5.0 and optimum temperature around 60 °C. It shows endo and exo-lytic activities that respond in a different way to changes in pH, temperature, suggesting the presence of two different enzymes.

BIBLIOGRAFIA

1. BACON, J. S. D.; GORDON, A. H.; JONES, D.; TAYOR, I. F., y WEBLEY, D. M. 1970. *Biochem. J.*, 120, 67.
2. BERNFELD, P. 1962. *Polisaccharidases*. In M. FLORKIN y H. S. MASON (ed.). *Comparative Biochemistry*, III. Academic Press.
3. BROCK, T. D. 1965. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 623.
4. CHESTERS, C. G. C., y BULL, A. T. 1963. *Biochem. J.*, 86, 28.
5. CHESTERS, C. G. C., y BULL, A. T. 1963. *Biochem. J.*, 86, 31.
6. CHESTERS, C. G. C., y BULL, A. T. 1963. *Biochem. J.*, 86, 38.

7. HORIKOSHI, K.; KOFFLER, H., y ARIMA, K. 1963. *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 268.
8. JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, A., y NOVAES-LEDIEU, M. 1969. *Microbiol. Españ.*, 22, 63.
9. KORNBERG, A. 1969. *Science*, 163, 1.410.
10. MONREAL, J. 1961. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid.
11. MONREAL, J.; URUBURU, F. de, y VILLANUEVA, J. R. 1967. *J. Bacteriol.*, 94, 241.
12. PHAFF, H. J. 1963. *Annu. Rev. Microbiol.*, 17, 15.
13. POTGIETER, H. J., y ALEXANDER, M. 1966. *J. Bacteriol.*, 91, 1.526.
14. REESE, E. T., y MANDELS, M. 1959. *Can. J. Microbiol.* 5, 173,
15. SUMNER, J. R., y SOMERS, G. F. 1944. *Lab. Exp. Biol. Chem.*, 3.435.
16. TANAKA, M., y PHAFF, H. J. 1965. *J. Bacteriol.*, 89, 1.570.

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

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA FORMACION DE PLACAS INFECTIVAS CON EL VIRUS HERPES SIMPLEX EN AUSENCIA DE CO₂

por

CONCEPCIÓN RONDA - LAIN y CARMEN GIL - FERNANDEZ

INTRODUCCION

La técnica de formación de placas infectivas en cultivos celulares introducida por Dulbecco (8), abre nuevos horizontes en el estudio de la Virología, ya que hace posible el recuento de partículas víricas infectivas incorporando un nuevo método en la titulación de los virus; por otro lado, simplifica las técnicas clásicas al no tener que emplear animales de laboratorio o huevos embrionados y proporciona asimismo una excelente herramienta de trabajo en Genética de virus animales, al poder aislar clones a partir de las placas infectivas.

El empleo de los métodos de Dulbecco (8) y de Cooper (6) para los cuales se hace necesario una atmósfera de CO₂, con el fin de mantener constante el pH de los cultivos celulares, tropezó pronto con inconvenientes en la práctica de laboratorio. Para obviar tales problemas, varios investigadores han propuesto modificaciones de dicha técnica, entre ellos Porterfield y Allison (18), que introdujeron el uso del tampón tris.

Otro factor a tener en cuenta es la acción inhibidora de los polisacáridos aniónicos o polianiónicos existentes en el agar, que tienen un efecto inhibidor sobre determinados virus, entre los que se incluyen picornavirus (1-2), arbovirus (4 y 23), mixovirus (27) y herpes simplex (9 y 19). Para eliminar este inconveniente, se buscaron otras sustancias que pudieran sustituir al agar, entre ellas la metil-celulosa (12), carboximetil-celulo-

sa (22), agarosa (17), gel de almidón (7), ionagar (5), mientras que otros autores adicionan al medio de cultivo diversas sustancias para contrarrestar este efecto inhibitor.

En el presente trabajo vamos a estudiar los factores que intervienen en la formación de placas infectivas con el virus herpes simplex en ausencia de CO₂ usando la técnica descrita anteriormente (21).

MATERIALES Y METODOS

Virus

Herpes simplex, cepa LF. Procedente de la colección del Instituto "Jaime Ferrán", aislada por el Dr. Eduardo Gallardo, de una lesión de comisura labial. De esta cepa original se han realizado 16 pases en cerebro de conejo y posteriormente 10 pases en células HeLa, mantenidas a 37 °C ó 31 °C, con el fin de adaptar el virus al cultivo de tejidos a ambas temperaturas, obteniéndose así la cepa LF 37 °C y su variante LF 31 °C, respectivamente.

Células y medios de cultivo

Hemos utilizado fibroblastos de embrión de pollo, que fueron cultivados en cápsulas de Petri, de vidrio neutro (6 cm de diámetro). El método de obtención de los mismos y los medios de cultivo empleados han sido descritos anteriormente (21).

Aditivos empleados

Los aditivos utilizados en el presente trabajo se añadían a la "capa de recubrimiento", a las concentraciones que a continuación se expresan: a) arginina (NBC): 0,04 mg/cm³; b) L-cisteína (NBC): 1 mM; c) Cl₂Mg (Merck) 25 mM; d) DEAE-dextrano (Pharmacia, Uppsala) 25 µg/cm³, y e) tampón HEPES (Sigma): 6,6 mg/cm³.

Capas de recubrimiento

Se emplean dos tipos de capas de recubrimiento: a) bacto-agar: a 50 cm³ de medio nutritivo doblemente concentrado (MPC) se añadían 50 cm³ de bacto-agar (Difco) al 1,8 %; b) metil-celulosa: a 50 cm³ de

MPC se añadían 50 cm³ de solución de metil-celulosa (Fisher Scientific Co.) de 4.000 centipoises, preparada según indican Schultze y Schlesinger (23).

Inoculación de los cultivos

La marcha general para la infección de los cultivos se describe a continuación, salvo algunos experimentos donde se modificó, según se indica en la parte experimental. Una vez obtenida la monocapa celular por incubación a 37 °C, durante 24 horas, en ausencia de anhídrido carbónico, lavamos las células dos veces con tampón de fosfato y procedemos a la inoculación del virus herpes simplex. La dilución del virus fue hecha en caldo común, ya que resultó ser el diluyente con el cual obtuvimos mayor número de placas infectivas.

El volumen de simiente empleado por cápsula de Petri fue de 0,2 cm³. Una vez inoculados los cultivos, se deja en período de adsorción de 2 horas, a 37 °C. Pasado este tiempo, se elimina el virus no adsorbido y se deposita la primera capa sólida, compuesta por bacto-agar o metil-celulosa con MPC (v/v).

Se dejan las cápsulas de Petri en estufa, durante 4 días, y se añade una segunda capa sólida de bacto-agar, medio nutritivo doblemente concentrado y un colorante vital que en nuestro caso fue el rojo neutro. La lectura de las placas infectivas se realiza 24 horas después de la tinción.

RESULTADOS

Influencia del volumen del inóculo del virus sobre la formación de placas infectivas

Diversos autores preconizan diferentes volúmenes de inóculo de virus para la inoculación de las monocapas celulares en cápsula de Petri, de 60 mm de diámetro. En un principio se tenía la creencia de que los virus debían suspenderse en un volumen grande de líquido, para bañar con amplitud el cultivo. La mayoría de los autores recomiendan de 0,5 cm³ a 1 cm³ como volumen del inóculo empleado. Sin embargo, Watterson (29) apunta que manteniendo constante la cantidad de virus y variando el volumen en que se encuentra suspendido, se obtienen mejores resultados con

Cuadro 1. Efecto del volumen del inóculo sobre el recuento de placas infectivas con el virus herpes simplex, variante LF 31 °C

Volumen de caldo común adicionado a la suspensión de 0,1 ml de virus	Volumen total de la suspensión vírica inoculada en cada cápsula de Petri	Número de placas/cápsula de Petri	Media del número de placas infectivas
	0,1 ml	176, 151, 206, 180, 202	185
0,1 ml	0,2 ml	281, 228, 199, 206, 190	220
0,2 ml	0,3 ml	160, 170, 119, 186, 148	156
0,3 ml	0,4 ml	80, 98, 107, 110, 106	100

Cuadro 2. Efecto del volumen del inóculo sobre el recuento de placas infectivas con el virus herpes simplex, variante LF 37 °C

Volumen de caldo común adicionado a la suspensión de 0,1 ml de virus	Volumen total de la suspensión vírica inoculada en cada cápsula de Petri	Número de placas/cápsula de Petri	Media del número de placas infectivas
	0,1 ml	246, 244, 277, 296, 218	256
0,1 ml	0,2 ml	281, 260, 283, 291, 301	283
0,2 ml	0,3 ml	252, 260, 233, 220, 215	236
0,3 ml	0,4 ml	188, 196, 140, 166, 206	179

volúmenes pequeños. Taniguchi y Yoshino (25), encuentran que empleando volúmenes de 0,05 cm³ como inóculo de virus se obtienen títulos más elevados.

Ante cifras tan dispares, que varían en proporción de 1:10 a 1:20, y con el fin de probar cuál de los volúmenes de inóculo era el más favorable, se realizó la siguiente experiencia: se inocularon lotes de 5 cápsulas de Petri, utilizando la dilución 10⁻³, en la cual se obtuvo un número suficiente de placas infectivas, sin que éstas llegasen a ser confluyentes, lo cual nos dificultaría el recuento posterior. Lo único que variamos es el volumen en que se suspende una cantidad de virus constante.

Según puede observarse en los cuadros 1-2, el mayor número de placas infectivas se obtiene con 0,2 cm³ de diluyente.

En todas las experiencias posteriores se ha elegido este volumen por ser el más idóneo para bañar la monocapa celular.

Influencia de la composición del diluyente empleado en la suspensión del virus en la formación de placas infectivas

Los diluyentes ensayados fueron los siguientes: 1) solución salina fisiológica; 2) solución de Hanks; 3) agua bidestilada estéril, y 4) caldo común, utilizado en bacteriología.

Se han hecho lotes de 5 cápsulas de Petri/diluyente utilizado. La dilución del virus empleado ha sido de 10⁻³ en las diferentes diluciones.

Según se puede observar en la figura 1, los mejores resultados se han obtenido utilizando caldo común como diluyente del virus.

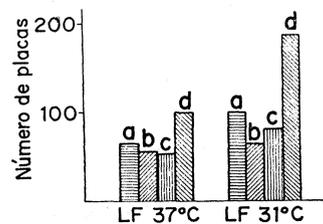


Figura 1. Histograma representativo del número de placas infectivas producidas por el virus herpes simplex, cepa LF 37 °C y variante LF 31 °C. a, solución salina; b, solución de Hanks; c, agua bidestilada, y d, caldo común

El virus herpes simplex, variante LF 31 °C, diluido en caldo común, duplica el número de placas infectivas con respecto a los otros diluyentes. Los resultados son inferiores con la cepa LF 37 °C. La solución salina sigue al caldo común, siendo la solución de Hanks la que da peores resultados. Por ello decidimos escoger como diluyente de la suspensión de virus al caldo común, para posteriores experimentos.

La reducción de cada diluyente para la variante LF 31 °C con respecto al caldo común es de: solución salina, 47 %; solución de Hanks, 68 %, y agua bidestilada, 58 %.

Para la cepa LF 37 °C, la reducción es de 35 % en solución salina, solución de Hanks de un 45 %, y en agua bidestilada, 47 %.

Influencia de diversos aditivos incorporados al medio de cultivo en la formación de placas infectivas

En las *figuras 2-5* se representa el número de unidades formadoras de placas (UFP) obtenidas para los virus LF 37 °C y su variante LF 31 °C, utilizando como capa de recubrimiento bacto-agar o metil-celulosa, cuando se añadieron a las mismas diferentes aditivos.

La *arginina* se ha mostrado desfavorable con el virus herpes simplex, variante LF 31 °C; la reducción con respecto al testigo es bastante considerable, alcanzando al 84 % en metil-celulosa y al 90 % con bacto-agar. Con la cepa LF 37 °C, al emplear metil-celulosa se observa una reducción del 65 % en el número de placas infectivas, y en bacto-agar, aunque menor, llega al 48 %.

La *cisteína* da resultados bastante análogos a los anotados con la arginina; se muestra desfavorable para el virus herpes simplex. La variante LF 31 °C presenta una reducción con respecto al testigo, de 70 % con la metil-celulosa, y de 67 % en bacto-agar. Con la cepa LF 37 °C, la reducción asciende al 53 %, tanto incorporada al medio con metil-celulosa como con bacto-agar.

El *cloruro magnésico*, con la variante LF 31 °C, incorporado a la metil-celulosa, produce un descenso en el número de placas infectivas del 44 %, y del 41 % con el bacto-agar. En la cepa LF 37 °C, con metil-celulosa, el número de placas infectivas queda reducido en un 55 %, y en bacto-agar, en un 93 %.

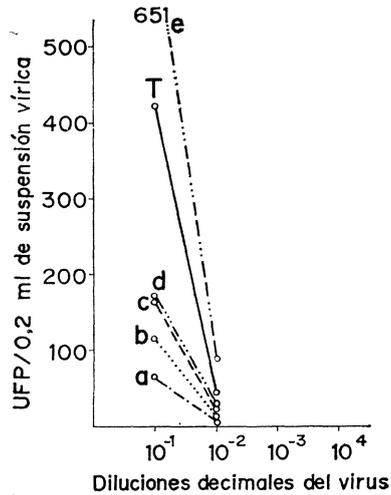


Figura 2. Formación de placas infecciosas en monocapas de fibroblastos de embrión de pollo, inoculados con virus herpes simplex, variante LF 31 °C, usando como capa de recubrimiento metil-celulosa, con y sin aditivos. a, arginina; b, cisteína; c, cloruro magnésico; d, HEPES; e, DEAE-dextrano, y T, testigo

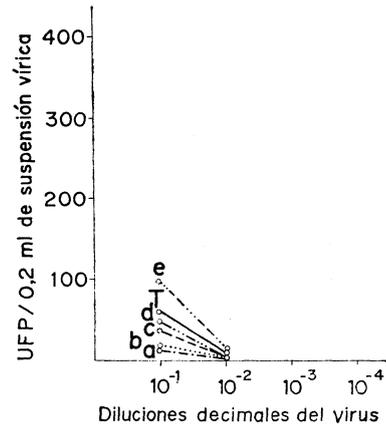


Figura 3. Formación de placas infecciosas en monocapas de fibroblastos de embrión de pollo, inoculados con virus herpes simplex, variante LF 31 °C, usando como capa de recubrimiento bacto-agar, con y sin aditivos

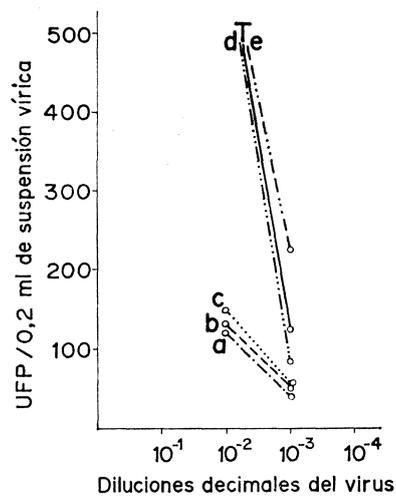


Figura 4. Formación de placas infecciosas en monocapas de fibroblastos de embrión de pollo, inoculados con herpes simplex, cepa LF 37 °C, usando como capa de recubrimiento metil-celulosa, con y sin aditivos

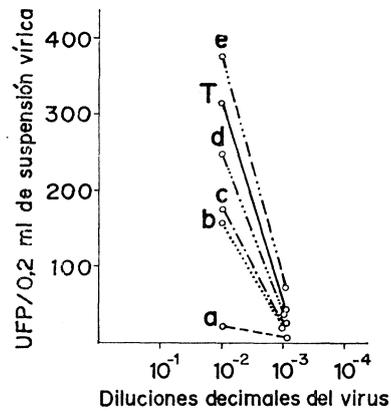


Figura 5. Formación de placas infecciosas en monocapas de fibroblastos de embrión de pollo, inoculados con herpes simplex, cepa LF 37 °C, usando como capa de recubrimiento bacto-agar, con y sin aditivos

DEAE-dextrano

Se han ensayado distintas proporciones de DEAE-dextrano; con la dosis de $62 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, descrita por Pattyn (17) como óptima, las células de fibroblastos de embrión de pollo se destruyeron usando como capa de recubrimiento agar o metil-celulosa; con $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, en el MPC que se añadía tanto a la metil-celulosa como al bacto-agar, se obtuvieron buenos resultados, pudiéndose observar que el tapete celular al final de la experiencia permanecía intacto.

En los resultados obtenidos, por lo que se refiere a la variante LF 31 °C, podemos observar que al incorporarlo a la metil-celulosa aumenta el número de placas infectivas en un 48 %, y en el agar, un 53 %, con respecto a los testigos. En la cepa LF 37 °C, con metil-celulosa, el número de placas infectivas aumenta un 50 %, y en agar, un 46 %.

Con el *tampón HEPES*, usando como capa de recubrimiento la metil-celulosa, podemos observar, con la variante LF 31 °C, que existe una reducción de un 35 % con respecto al testigo. Con la cepa LF 37 °C, reduce en un 23 %.

En el *cuadro 3* se expresan los resultados porcentuales de aumento o disminución sobre las UFP, tomando como 100 % el número de placas infectivas obtenido al emplear en la capa de recubrimiento el medio MPM, descrito por nosotros.

Cuadro 3. Porcentaje de variación en el número de UFP aparecidas en el medio MPM con aditivos, en relación con el mismo medio sin aditivos

Medio MPM, con diferentes aditivos	Virus herpes simplex			
	LF 31 °C		LF 37 °C	
	Metil-celulosa	Bacto-agar	Metil-celulosa	Bacto-agar
Arginina	— 84	— 90	— 65	— 48
Cisteína	— 70	— 64	— 53	— 53
Cloruro magnésico	— 44	— 41	— 55	— 93
DEAE-dextrano	+ 48	+ 53	+ 50	+ 46
HEPES	— 35	— 29	— 23	— 6

+ = aumento; — = reducción.

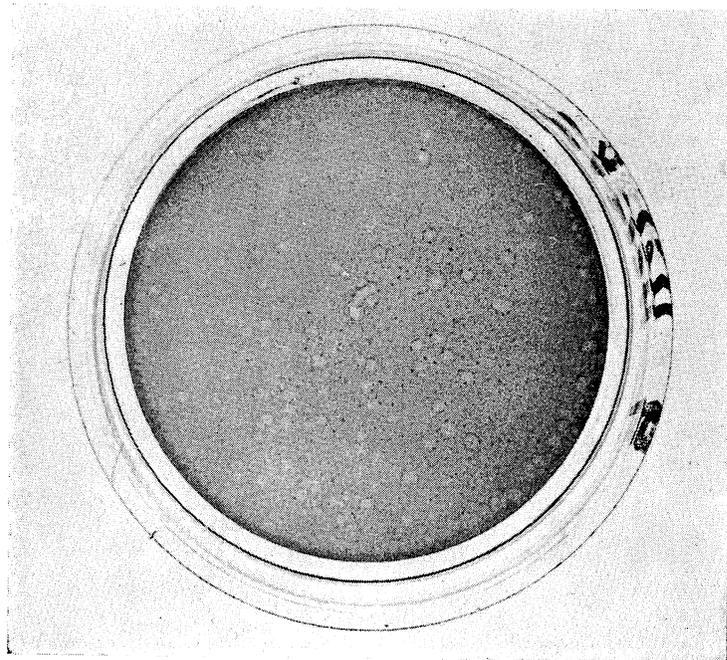


Figura 6. Virus herpes simplex, cepa LF 37 °C. Capa de recubrimiento: metil-celulosa. La tinción ha sido efectuada al cuarto día después de la inoculación

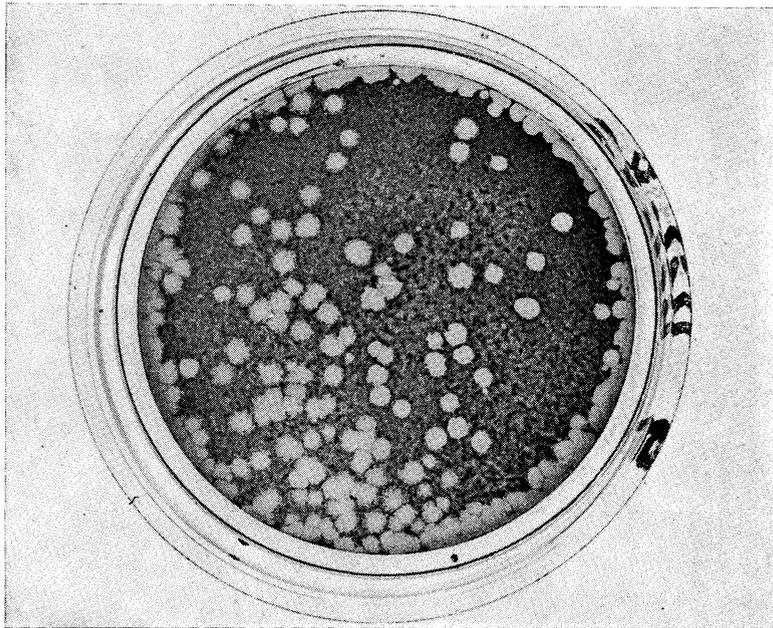


Figura 7. La misma cápsula de Petri de la figura 6 fotografiada a los 10 días después de su inoculación. El número de placas infectivas permanece constante, pero aumenta el tamaño de las mismas

Evolución cronológica de las placas infectivas

Hemos llevado a cabo una experiencia en la que se realizaron estudios sistemáticos, con el fin de estudiar posibles diferencias en el número y tamaño de las placas infectivas en función del tiempo de incubación de las células inoculadas y así determinar el día óptimo en que se tiene que efectuar la tinción.

El experimento se efectuó de la siguiente forma: se inocularon 60 cápsulas de Petri con virus herpes simplex en tres diluciones, 10^{-3} , $10^{-3.5}$ y 10^{-4} , que se distribuyeron en grupos de 5 cápsulas por cada dilución. Se tiñen a las 24 horas un grupo de cada una de estas diluciones, y sucesivamente, las restantes, a las 48, 72 y 96 horas. La lectura del número de placas se realiza 24 horas después de la tinción, por ser éste el momento apropiado para distinguir las placas infectivas sobre la monocapa celular teñida.

No se observan placas infectivas 24 horas después de la inoculación, comenzando su aparición a las 48 horas, siendo puntiformes y en número reducido. Al tercer día puede apreciarse un incremento en el número de placas infectivas. El mayor número aparece cuando se hace la tinción al cuarto día después de la inoculación y la lectura el quinto día. El número de placas infectivas a partir de este momento permanece constante. Su tamaño aumenta progresivamente hasta el día décimo, a partir del cual las células de la monocapa comienzan a destruirse. En las figuras 6-7 se puede observar el tamaño que presentan las placas infectivas a los 5 y 10 días, respectivamente, después de su inoculación.

Habiéndose observado que al cuarto día, el tamaño de las placas infectivas es bien visible y que el número permanece constante, las monocapas se tiñeron siempre a los 4 días después de la infección.

Finalmente, en el cuadro 4 se expresa el tamaño que presentan las placas infectivas para los virus estudiados, usando como capa de recubrimiento metil-celulosa o bacto-agar, con o sin aditivos.

Los mejores resultados para el virus LF 37 °C se obtuvieron cuando se usó metil-celulosa como capa de recubrimiento, sin aditivos o en presencia del tampón HEPES. Para la variante LF 31 °C, el tamaño óptimo se consiguió al usar metil-celulosa como capa de recubrimiento tampónada con HEPES.

Cuadro 4. Tamaño de las placas infectivas, en milímetros, con diferentes aditivos

Medio MPM, con diferentes aditivos	Virus herpes simplex			
	LF 31 °C		LF 37 °C	
	Metil- celulosa	Bacto-agar	Metil- celulosa	Bacto-agar
Testigo (sin aditivos)	2,5	1,2	2,5	1,3
Arginina	2,5	1,2	2,3	1,0
Cisteína	2,2	1,7	2,4	1,4
Cloruro magnésito	1,8	Puntiforme	2,0	1,4
DEAE-dextrano	2,0	1,5	2,3	1,2
HEPES	3,0	1,5	2,5	1,4

DISCUSION

Entre los factores físico-químicos que pueden intervenir en la formación de placas infectivas podemos destacar como muy importante la adsorción del virus por las células, dependiente de la naturaleza del medio en que se encuentran en suspensión y del volumen del inóculo empleado.

En cuanto a los diluyentes que hemos ensayado, los mejores resultados los hemos conseguido con el caldo común; en segundo lugar, la solución salina, mostrándose como la menos apropiada la solución de Hanks. Tampoco hemos obtenido buenos resultados con el agua destilada, a pesar de haber sido señalada por Watterson (29) como el diluyente que mejores resultados proporciona con el virus herpes simplex.

Otro factor que puede influir en la formación de placas infectivas es el volumen del inóculo en que se suspenden los virus que se añade a los cultivos celulares. Watterson (29) estudió la adsorción del virus herpes simplex, inoculando la monocapa celular con el mismo número de partículas, pero suspendidas en diferentes volúmenes de inóculo, y concluye que el inóculo más pequeño es el que mayor número de placas infectivas produce. Este resultado era fácil de prever, pues a igualdad de partículas

infectivas, si se suspenden en mayor cantidad de líquido, se encuentran más diluidas, y el número de ellas que entra en contacto con las células es menor. Por nuestra parte quisimos estudiar si son recomendables efectivamente cantidades muy pequeñas, pues siempre supone un gran ahorro de semilla de virus. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el número de placas infectivas fue mayor cuando se empleó 0,2 cm³ como volumen de inóculo.

Efectivamente, empleando volúmenes de inóculo superiores a 0,2 cm³ se reduce a la mitad el número de placas infectivas. Por otra parte, el empleo de un volumen menor puede acarrear el que la monocapa se seque y degeneren las células.

Para neutralizar el efecto inhibitor de los polisacáridos presentes en el agar, Wallis y colaboradores (28) estudian la acción del Cl₂Mg y cisteína sobre la formación de placas infectivas, con 21 tipos de virus ECHO y 8 tipos de coxackies, demostrando que estos agentes neutralizan el efecto inhibitor del agar noble en mayor grado que los polímeros aniónicos y catiónicos (DEAE-dextrano, sulfato de protamina o dextrano). A través de nuestros resultados observamos que el Cl₂Mg, y la cisteína, tanto si se incorpora a la metil-celulosa como al bacto-agar, reduce considerablemente el número de placas infectivas. Por otra parte, Tankersley (26) muestra que la adición de arginina al medio produce un aumento extraordinario en el número de placas infectivas. Posteriormente, diversos autores, han señalado la necesidad de la arginina en la multiplicación del virus herpes simplex (3, 11-12, 20 y 24). Sin embargo, los resultados obtenidos con este aditivo al utilizar nuestra técnica dan lugar a una drástica reducción en el número de placas infectivas, lo cual está de acuerdo con las experiencias de Gönczöl y colaboradores (10) y Jeney y colaboradores (14). Esto se puede explicar suponiendo que un exceso de arginina puede provocar un desequilibrio con respecto a otros aminoácidos esenciales, que trajese como consecuencia una inhibición en la multiplicación del virus.

Sin embargo, estamos de acuerdo, a través de nuestros resultados, con diferentes autores (15-16 y 23) en cuanto al papel de neutralizante que ejerce el DEAE-dextrano sobre los inhibidores presentes en el agar.

En cuanto al tampón HEPES, Williamson y Cox (30) lo utilizaron con el virus vacunal, obteniendo un incremento en la formación de placas infectivas con este virus; sin embargo, con el virus herpes actúa como reductor en el número de UFP en las distintas capas de recubrimiento empleadas.

Estos datos los juzgamos de interés, si se tiene en cuenta que, a diferencia de los resultados aparecidos en la literatura, con nuestra técnica modificada no se hace necesario el empleo de aditivos, ya que por sí sola permite la obtención de un número de placas infectivas superior al que se forma cuando se emplean los aditivos como estimulantes. Empleando estos últimos, sólo al añadir DEAE-dextrano hemos obtenido un incremento en el número de las mismas, mostrándose desfavorables los otros aditivos estudiados.

RESUMEN

Hemos estudiado la formación de placas infectivas con el virus herpes simplex en células de embrión de pollo usando un medio de cultivo sin bicarbonato sódico y en ausencia de atmósfera de CO₂.

Se han ensayado dos tipos de capas de recubrimiento: bacto-agar y metil-celulosa, con y sin aditivos. El DEAE-dextrano añadido a la capa de recubrimiento incrementa el número de placas infectivas, pero el Cl₂Mg, cisteína, arginina y el tampón HEPES reducen la formación de placas infectivas, aunque este último incrementa el tamaño de las mismas.

Se han estudiado, asimismo, otros posibles factores que intervienen en la formación de placas infectivas. Los mejores resultados se han obtenido empleando: a) caldo común como diluyente del virus; b) un volumen del inóculo de virus de 0,2 cm³/cápsula de Petri de 65 mm; c) tinción de la monocapa 4 días después de su inoculación, y d) lectura de los resultados a los 5 días.

SUMMARY

Factors affecting plaque formation with herpes simplex virus in the absence of CO₂ atmosphere

Plaque formation with Herpes simplex virus on chick embryo fibroblast has been studied using a bicarbonate free medium in the absence of a CO₂ atmosphere.

Two different overlay media have been used, namely, bacto-agar and methyl-cellulose, with and without additives. Plaque count was enhanced by DEAE-dextran in the overlay medium but MgCl₂, cysteine, arginine and HEPES inhibited the plaque formation of the virus although the last one increased the plaque size.

The effect of variable on the plaque count have been determined. Best results were obtained in the following conditions: a) virus suspension prepared in broth; b) volume of virus seed of 0,2 cm³ for a diameter of Petri dish of 65 mm; c) staining of the cultures at the fourth day after monolayer infection, and d) reading the results the day after the staining.

BIBLIOGRAFIA

1. AGOL, V. L., y CHUMAKOVA, N. Y. 1962. *Virology*, 17, 221-23.
2. AGOL, V. L., y CHUMAKOVA, M. Y. *Acta Virol.*, 7, 97-106.
3. BECKER, Y.; OLSHEVSKY, V., y LEVITT, J. 1967. *J. Gen. Virol.*, 1, 471-78.
4. BROWN, L. N., y PACKER, R. A. 1964. *Amer. J. Vet. Res.*, 25, 478-93.
5. CONANT, R. M.; THOMAS, D. C., y HAMPARIAN, V. V. 1970. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 134, 677-82.
6. COOPER, P. 1955. *Virology*, 1, 397-401.
7. DE MAYER, E., y SCHONNE, E. 1964. *Virology*, 24, 13-18.
8. DULBECCO, R. 1952. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 38, 747-52.
9. GERMANOV, A. B., y SOKOLOV, M. L. 1969. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 28, 77-84.
10. GÖNCZÖL, E.; JENEY, E., y VACZI, L. 1967. *Acta Microbiol.*, 14, 39-43.
11. HENLE, W., y HENLE, G. 1968. *J. Virol.*, 2, 182-91.
12. HOTCHIN, J. R. 1955. *Nature (London)*, 175, 352.
13. INGLIS, V. B. M. 1968. *J. Gen. Virol.*, 3, 9-17.
14. JENEY, E.; GÖNCZÖL, E., y VACZI, L. 1967. *Acta Microbiol.*, 14, 31-37.
15. LIEBHABER, H., y TAKEMOTO, K. K. 1961. *Virology*, 14, 502-4.
16. MILES, J. A. R., y AUSTIN, F. J. 1963. *J. Exp. Biol. Med.*, 41, 199-204.
17. PATTYN, S. R., y VLEESSEHAUWER, L. 1967. *Acta Virol.*, 11, 305-11.
18. PORTERFIELD, J. S., y ALLISON, A. C. 1960. *Virology*, 10, 233-44.
19. RAPP, F. 1963. *J. Bacteriol.*, 86, 985-91.
20. ROIZMAN, B. 1965. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119, 1.021-23.
21. RONDA-LAÍN, C., y GIL-FERNÁNDEZ, C. 1970. *Microbiol. Españ.*, 23, 61-67.
22. SALIM, A. R. 1966. *Nature (London)*, 210, 444.
23. SCHULZE, L. T., y SCHLESINGER, R. W. 1963. *Virology*, 19, 40-48.
24. SHARON, N. 1966. *Proc 9th Int. Congr. Microbiol.*, 508.
25. TANIGUCHI, S., y YOSHINO, K. 1964. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 14, 537-52.
26. TANKERSLEY, R. W. 1964. *J. Bacteriol.*, 87, 609-13.
27. TYTELL, A. A.; TOROP, H. A., y MCCARTHY, F. J. 1961. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 108, 723-25.
28. WALLIS, C.; MELNICH, J. L., y BIANCHI, M. 1962. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 20, 693-702.
29. WATTERSON, A. P. 1958. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 8, 592-99.
30. WILLIAMSON, J. D., y COX, P. 1968. *J. Gen. Virol.*, 2, 309-12.

SIGNIFICADO HIGIENICO DE LA PRESENCIA
DE ESTAFILOCOCOS PATOGENOS O SUS TOXINAS
EN LECHE EN POLVO

por

S. OVEJERO, G. SUAREZ y A. SANTOS

INTRODUCCION

A medida que la variación del nivel de vida afecta a los hábitos culinarios se observa un incremento en la incidencia de intoxicaciones alimentarias de origen estafilocócico.

Esta enfermedad, por lo aparatoso de su sintomatología, coincidente, por fortuna, con una baja letalidad, es siempre una desagradable experiencia a que el hombre puede hallarse sometido y, por tanto, viene a resultar un proceso de gran interés sanitario y social.

El papel de la leche en polvo como portador inerte de estafilococos y sus toxinas fue señalado independientemente, y con un intervalo de dos años, por Anderson y Stone (2) y Armijo y colaboradores (3), y a partir de entonces (1957), se han diagnosticado, en distintos países, brotes tóxicos debidos al género *Staphylococcus* y producidos por el consumo de leche en polvo.

Las erupciones tóxicas estudiadas, producidas por el consumo de este alimento, presentan como característica diferencial importante la de afectar con preferencia a poblaciones infantiles en edad escolar.

En España ha venido funcionando, estimulado por la UNICEF, un programa escolar de alimentación infantil, establecido por el Ministerio de

Educación y Ciencia y administrado por el Servicio Escolar de Alimentación de dicho Ministerio y Gerencia de Productos Lácteos. Este Servicio utiliza, en sus fines, muchos miles de toneladas de leche en polvo que le son suministradas por industrias lácteas nacionales.

La ausencia en nuestro país de investigaciones sobre el tema que nos ocupa y la posibilidad de que ciertos trastornos de naturaleza gastroentérica, en colectividades escolares, puedan ser de origen estafilocócico, han sido los motivos que nos impulsaron a la realización de este trabajo (*).

La importancia creciente que en la actualidad se está concediendo a la investigación en el campo de la Microbiología de los alimentos desecados, no hace sino confirmar la oportunidad de elección, en su día, de la materia en estudio.

MATERIALES Y METODOS

Se han estudiado un total de 168 muestras de leche en polvo, procedentes de distintas industrias de transformación láctea, ubicadas todas ellas en el territorio nacional. Las muestras pretenden ser representativas de la producción total de leche en polvo en España y se han obtenido de los distintos tipos y calidades elaborados por las diferentes industrias productoras.

El presente estudio se ha llevado a efecto por medio de las siguientes técnicas:

- a) Determinación del número de colonias de estafilococos.
- b) Estudio bioquímico, afectando a distintas propiedades enzimáticas.
- c) Tipos de enterotoxina.
- d) Curvas de crecimiento de los estafilococos coagulasa-positivos.
- e) Lisotipia o tipificación por bacteriófagos.

Número de colonias

En la determinación del número de colonias de estafilococos se siguió el método descrito por Harrigan y McCance (17), sembrando 1 cm³ de

(*) Subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia con cargo a los créditos destinados al fomento de la investigación en la Universidad.

cada dilución, realizada a partir de leche en polvo en solución Ringer 1:4, en placas de Petri, mezclando, como es norma, con el medio fundido, S-110 (DIFCO, B 297) en este caso y a la temperatura de 45 °C.

El frasco, de cierre hermético, con el resto de la dilución de leche (10 g de leche en polvo y enrase a 100 cm³) se incubaba, en todos los casos, a 37 °C durante cuarenta y ocho horas, junto a las placas de Petri. Expresado en otros términos, se utilizaba la propia solución madre de leche en polvo, en la proporción aproximada en que se utiliza para la alimentación humana, como medio de enriquecimiento y con el fin de descubrir las muestras que por contener un pequeño número de estafilococos no creciesen sobre el medio sólido distribuido en placa, lo que significaba, probablemente, ausencia en 0,1 g de leche en polvo, en cuyo caso se utilizaba el medio líquido de leche en polvo diluida e incubado, para sembrar a partir de él nuevas placas con medio selectivo capaz de poner de manifiesto, en su caso, la presencia de estafilococos.

Las colonias de estafilococos, de distinta apariencia sobre un medio de cultivo a base de cloruro sódico como agente selectivo, lactosado, con fucsina ácida como indicador y potencial de oxidorreducción restringido (21), fueron aisladas y conservadas para su estudio posterior.

Estudio bioquímico

Las estirpes aisladas fueron sometidas a las siguientes pruebas:

- Reducción del telurito potásico (4).
- Determinación de fosfatasa (5).
- Lipólisis en yema de huevo (16).
- Producción de desoxirribonucleasa (26).
- Fermentación anaeróbica de manitol (20).
- Reacción de coagulasa (24).

Estudio de los distintos tipos de enterotoxina

Se utilizó la técnica de microinmunodifusión de Wadsworth (25) adaptada por Casman y colaboradores (10) al estudio y caracterización de las enterotoxinas estafilocócicas. En la producción de enterotoxina se empleó el medio propuesto por Casman (9). Las estirpes que no producían un crecimiento abundante a pH de 5,5 se cultivaron sobre el mismo medio a un pH de 6,8.

Los sueros antitóxicos (frente a los tipos A, B, C y D de toxina) nos

fueron suministrados por los Drs. Casman (Department of Health, Education and Welfare, Washington) y Bergdoll (Food Research Institute, Madison, Wisconsin).

Crecimiento de los estafilococos coagulasa-positivos aislados en leche concentrada

Se comprobó el crecimiento de las estirpes de estafilococos coagulasa-positivos, aislados de leche en polvo, en leches concentradas de 35, 40 y 45 % de extracto seco total, previa incubación a temperaturas de 35°, 40°, 45° y 50 °C por espacio de dos y cuatro horas.

Crecimiento en leche en polvo reconstituida

Se investigó asimismo la característica de crecimiento en leche en polvo desnatada reconstituida en la proporción de 10 g de leche y hasta 100 g de agua potable. Las temperaturas de crecimiento ensayadas fueron 10°, 20°, 25°, 30° y 35 °C, y los tiempos de incubación de dos, cuatro, ocho, dieciséis, veinticuatro y cuarenta y ocho horas.

Tipificación por bacteriófagos

El total de estirpes de estafilococos coagulasa-positivos aisladas fueron sometidas a la acción de la serie de bacteriófagos básicos de uso recomendado por el Comité Internacional de Tipificación Bacteriofágica de Estafilococos. Esta serie de bacteriófagos nos fue remitida en su día por el Cross-Infection Reference Laboratory, de Londres.

Las técnicas seguidas han sido descritas por Blair y Williams (7), quienes recomiendan para la propagación de bacteriófagos la técnica de Swastrom y Adams (22), cultivando la cepa de estafilococo propagadora y el virus huésped sobre agar semisólido.

RESULTADOS

Número de colonias

La determinación del número de gérmenes vivos del género *Staphylococcus* en 168 muestras de leche en polvo arrojó una media de 370/muestra y gramo de producto.

La cifra más elevada de las obtenidas fue de 9.400. De 45 muestras

no se aislaron estafilococos y 30 contenían, probablemente, menos de 10/g (ausencia en 0,1 g).

Pruebas bioquímicas

Se aislaron 104 estirpes del género *Staphylococcus*, Rosenbach 1884, del total de 168 muestras de leche en polvo estudiadas. De las 104 estirpes, solamente 24 resultaron coagulasa-positivas, lo que significa que únicamente el 14 % de las muestras contenían estafilococos coagulasa-positivos.

De las estirpes coagulasa-positivas la totalidad mostró su capacidad para reducir el telurito, así como 30, de 80 coagulasa-negativas.

Resultaron positivas a la prueba de fosfatasa un total de 35 cepas, de las cuales 15 eran coagulasa-positivas y 20, negativas.

La producción de desoxirribonucleasa se pudo precisar en un total de 42 estirpes, de cuyos gérmenes eran coagulasa-positivos únicamente 16.

En medio con yema de huevo mostraron un halo de opacidad debida a lipólisis, 6 estirpes, de las que 5 eran coagulasa-positivas.

Se catalogaron como positivas a la reacción del manitol (fermentación anaeróbica) un conjunto de 26 estirpes, siendo 24 de ellas coagulasa-positivas y 2, negativas.

El resumen de estas propiedades enzimáticas se puede ver en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características bioquímicas de las diferentes estirpes de estafilococos aisladas ()*

Propiedades	Estirpes coagulasa-negativas	Estirpes coagulasa-positivas
Red. telurito	24 (100 %)	30 (37,5 %)
Prod. fosfatasa	15 (62,5 %)	20 (25 %)
Prod. lipasa	5 (20,8 %)	1 (1,25 %)
Prod. desoxirribonucleasa	16 (66,6 %)	26 (32,5 %)
Ferm.manitol	24 (100 %)	2 (2,5 %)

(*) Resumen del estudio enzimático realizado en 104 estirpes del género *Staphylococcus* (80 coagulasa-negativas y 24 coagulasa-positivas).

Tipos de enterotoxina

De las 24 estirpes coagulasa-positivas sometidas a prueba, únicamente 6 han mostrado reacción positiva frente al antisero tipo A y una de ellas, además, al tipo D, previa inmersión durante quince minutos en acetato de cadmio al 1 % (figuras 1-4).

Crecimiento en leche concentrada

Los valores y características de crecimiento en leche concentrada con distintos porcentajes de sólidos lácteos se expresan en el cuadro 2, cuya representación gráfica comprende las figuras 5-7.

Cuadro 2. Concentración inicial de gérmenes: $10^4/cm^3$ de leche concentrada. Incubación: dos y cuatro horas

Extracto seco por ciento	Temperaturas							
	35 °C		40 °C		45 °C		50 °C	
35	2.10^5	5.10^7	10^6	5.10^6	10^5	10^6	10^4	3.10^2
40	10^5	10^7	5.10^5	2.10^6	5.10^4	10^6	5.10^3	10^2
45	7.10^4	9.10^6	10^5	10^6	2.10^4	6.10^5	10^3	8×10

Crecimiento en leche en polvo reconstituida

La proporción de crecimiento, en las condiciones de nuestro estudio, utilizando el mismo *inoculum* que para la leche concentrada, se expresa en el cuadro 3.

Cuadro 3. Cifra inicial de gérmenes: $10^4/cm^3$ de leche reconstituida. Concentración del producto en extracto seco total: 10 g %

Horas	Temperaturas				
	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
2	2.10^4	10^5	3.10^5	5.10^5	8.10^5
4	8.10^4	5.10^5	10^6	7.10^6	10^7
8	10^6	10^7	4.10^7	10^7	5.10^7
16	2.10^8	8.10^8	10^9	5.10^9	9.10^9
24	10^9	5.10^9	8.10^9	2.10^{10}	5.10^{10}
48	2.10^9	7.10^9	1.10^{10}	2.10^{10}	4.10^{10}



Figura 1. Enterotoxina tipo A. Reacción de identidad con concentraciones óptimas de antígeno y suero. Preparación original, sin colorear. $\times 3,3$

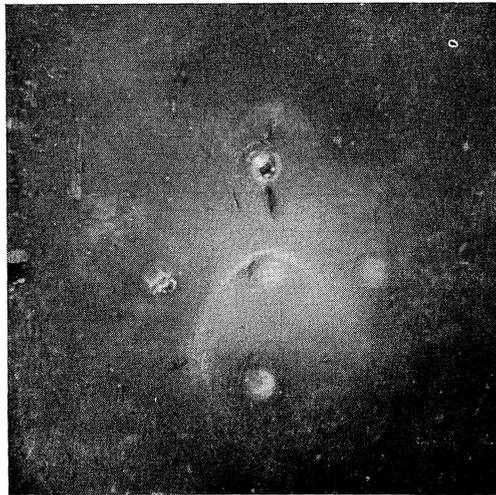


Figura 2. Enterotoxina tipo A. Reacción de identidad con antígeno muy concentrado. Preparación original, sin colorear. $\times 3 3$

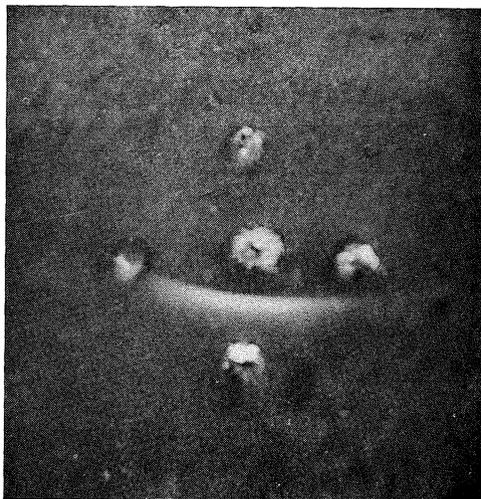


Figura 3. Enterotoxina tipo D. Previa inmersión en acetato de cadmio al 1%. Preparación original, sin colorear. $\times 3,3$



Figura 4. Enterotoxina tipo D. Confirmación por reacción de identidad sin resaltar con acetato de cadmio al 1%. Preparación original, sin colorear. $\times 2,2$

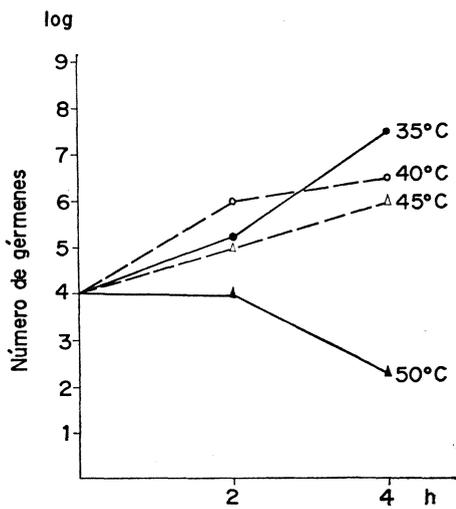


Figura 5. Curvas de crecimiento a 4 temperaturas de incubación diferentes, de *St. aureus* (mezcla de 24 estirpes coagulasa-positivas), en leche concentrada de 35 % de extracto seco

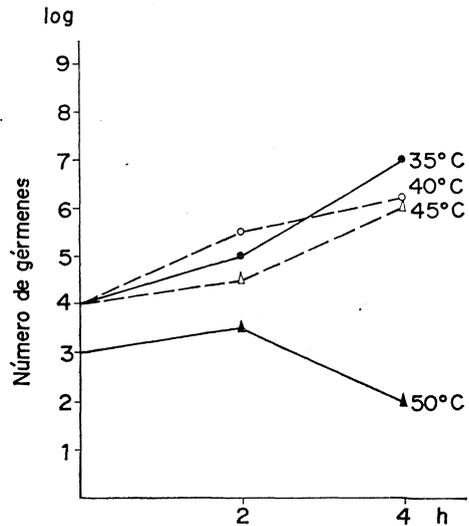


Figura 6. Curvas de crecimiento a 4 temperaturas de incubación diferentes, de *St. aureus* (mezcla de 24 estirpes coagulasa-positivas), en leche concentrada de 40 % de extracto seco

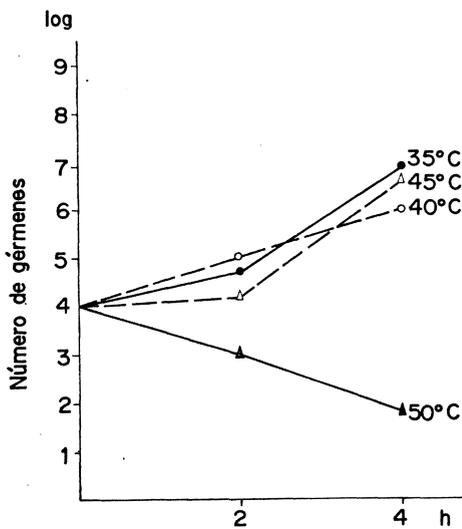


Figura 7. Curvas de crecimiento a 4 temperaturas de incubación diferentes, de *St. aureus* (mezcla de 24 estirpes coagulasa-positivas), en leche concentrada de 45 % de extracto seco

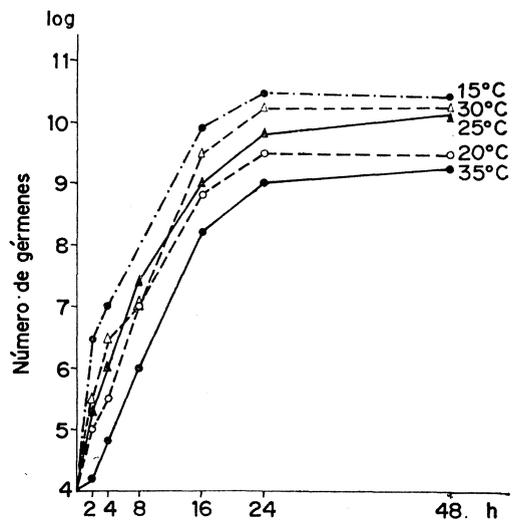


Figura 8. Curvas de crecimiento a 4 temperaturas de incubación diferentes, de un cultivo mixto de *St. aureus* coagulasa-positivos, aislados de leche en polvo utilizando como sustrato leche en polvo diluida al 10 %

Tipificación por bacteriófagos

Al lado de modelos líticos, que parecen indicar un origen humano, con sensibilidad a varios de los tipos 80/6/47/53/75/81, aparecen, con mayor frecuencia aún, otros que son más propios de estirpes de *Staphylococcus* de origen animal, con cuadros de lisis en los que predominan claramente los tipos 42 E y 42 D.

Las reacciones de lisotipia obtenidas de las 24 estirpes de estafilococos coagulasa-positivos han sido las siguientes:

Estirpe
núm.

1. 42 D.
2. 83 A, 54, 47, 42 E, 6, 7, 81.
3. 80, 6, 42 E, 47, 53, 54, 75, 83 A, 85, 81.
4. 54, 42 E, 81.
5. 42 D.
6. 83 A, 42 E, 42 D.
7. 29, 52 A, 52, 79.
8. No tipificable.
9. 79, 52 A, 52, 29, 55, 83 A, 54, 47, 42 E, 18, 80, 6, 7, 42, 81.
10. 29, 52, 52 A, 79, 80, 81.
11. 42 D.
12. 83 A, 6, 47, 75, 80.
13. 54, 42 E.
14. 42 D.
15. 6, 42 E, 47, 53, 54, 75, 83 A, 85, 81.
16. 29, 52, 52 A, 79, 80, 42 E.
17. 42 D, 42 E.
18. 42 E, 81.
19. 52, 52 A, 79.
20. 42 E, 77, 83 A, 42 D.
21. 42 D.
22. 6, 47, 75, 80, 81.
23. No tipificable.
24. 29, 52, 52 A, 80, 6, 7, 42 E.

Las estirpes números 3, 10, 12, 15, 20 y 22 resultaron ser productoras de enterotoxina A y la número 3, además, originó una ligera reacción frente al antisuero tipo D.

Las frecuencias de los distintos bacteriófagotipos encontrados en este grupo de gérmenes serían, por tanto, las que se expresan en el *cuadro 4*

Cuadro 4. Distribución de frecuencias de los distintos bacteriófagotipos en 24 estirpes de Staphylococcus aureus procedentes de la leche en polvo

Bacteriófago	Frecuencia	Bacteriófago	Frecuencia
79	5	53	2
52 A	4	54	6
52	4	47	6
29	5	42 E	10
55	1	80	7
3 A	0	6	6
3 B	0	7	1
3 C	0	42 D	7
83 A	7	71	0
187	0	81	8
75	4	85	2
77	1		

DISCUSION

Comprobada la posibilidad de que la leche en polvo originase intoxicaciones en el hombre, debidas a la presencia de enterotoxina estafilocócica en dicho producto, por Anderson y Stone (2) y Armijo y colaboradores (3), algunos autores señalan que la leche concentrada favorece el crecimiento de estafilococos y probablemente la producción de enterotoxina (11 y 18-19).

Considerado el problema a la luz de los conocimientos actuales sobre las propiedades de los distintos tipos de enterotoxina estafilocócica, así como del proceso de elaboración de leche en polvo, la mayor probabilidad

de contaminación peligrosa del producto puede radicar en los siguientes puntos:

a) Pasterización defectuosa de la leche a concentrar, seguida de una excesiva retención de la leche concentrada antes de la desecación.

b) Contaminación en el propio tanque de retención.

c) Contaminación de la leche en polvo durante el envasado.

En los casos a) y b) no es de esperar que sobrevivan gérmenes del género *Staphylococcus*, ya que la leche concentrada ha de sufrir un calentamiento previo a la pulverización, suficiente en todo caso para destruir dichos gérmenes y además, no debemos olvidar el propio efecto de la desecación con una temperatura del aire a la entrada de la torre de desecación de 180 °C y salida a 90 °C, aproximadamente. En cambio, la enterotoxina estafilocócica, parcialmente termorresistente, puede hallarse presente en el producto final.

En el supuesto c) no puede existir enterotoxina preformada en el alimento y el único peligro, en este caso, es que, al reconstituir la leche en polvo ésta contenga estirpes de estafilococos enterotóxicos en cantidad suficiente para lograr un abundante crecimiento en el medio líquido creado, cuando se mantenga a una temperatura óptima para el desarrollo microbiano. Este peligro ha de ser mayor, naturalmente, en la reconstitución masiva en dispositivos mecánicos y climas cálidos.

En consecuencia con estas ideas hemos planteado nuestro trabajo realizando una amplia investigación sobre el contenido en gérmenes viables del género *Staphylococcus*, de diversas suertes comerciales de leche en polvo, un estudio bioquímico y de tipificación por bacteriófagos, en orden a lograr una caracterización de la microflora estafilocócica de este origen, la detección de los diferentes tipos de enterotoxina de los gérmenes coagulasa-positivos y las posibilidades de crecimiento en leche concentrada-descremada, con las proporciones de extracto seco total usuales en el proceso de desecación y también en leche en polvo reconstituida.

De los resultados del estudio bioquímico y de lisotipia se deduce que la microflora estafilocócica estudiada presenta en su conjunto caracteres diferenciales con la de la leche natural, estudiada anteriormente por uno de nosotros (21), con lo que parece lógico pensar que el tipo de microflora contaminante de origen lácteo, que ha de resultar destruida durante los procesos de calentamiento, se sustituye por otro de origen humano, adicionado en ciertos momentos de la transformación industrial. Si esto es así, el hecho de encontrar un elevado porcentaje de bacteriófagotipos que

revelan un posible origen animal de los estafilococos indicaría, probablemente, la contaminación de los operarios que manejan en la plataforma de recepción leche natural y éstos, a su vez, podrían contaminar de alguna manera a sus compañeros de la sección de transformación en leche en polvo, lo que explicaría la presencia de estafilococos de distinto origen en el producto final.

Dack (12) señalaba que, entre las estirpes toxígenas de estafilococos, la producción de enterotoxina es función del crecimiento y ante las dificultades técnicas que en este caso supone la prueba objetiva de extracción, purificación y valoración de la propia enterotoxina, hemos elegido la característica de crecimiento microbiano como índice de probabilidad de formación de toxina. El mismo autor añadía que los alimentos considerados como causa de intoxicación de este tipo contienen centenares de millones de estafilococos/gramo.

Diferentes autores se han manifestado en parecidos términos. Allison (1) sugiere que el número mínimo de estafilococos coagulasa-positivos que se requiere para juzgar a un alimento como causa de intoxicación es de 500.000/g.

Tanner y Tanner (23) mencionan números que oscilan entre 30 y 1.000 millones/g de alimentos que originaron, bajo condiciones de experimentación, síntomas de intoxicación en voluntarios que ingirieron cantidades de 20 a 60 g.

Frazier (14) indica que niveles de enterotoxina necesarios para producir este tipo de envenenamiento son posibles únicamente con cifras de varios millones de estafilococos/gramo.

Casman y Bennett (10) comunicaron que habían encontrado cifras comprendidas entre 50 y 200 millones de estafilococos/g en jamón y pasteles responsables de incidentes tóxicos de esta clase.

De acuerdo con la doctrina anterior y los resultados obtenidos en las pruebas de crecimiento microbiano, podemos afirmar que, dado el pequeño porcentaje de estirpes enterotóxicas que parecen existir en la población estudiada y la baja proporción en el número de estafilococos /gramo, el único peligro radicaría en mantener a temperatura ambiente, por espacio de varias horas, la leche reconstituida.

Únicamente en casos de retención de la leche concentrada, antes de su desecación, a temperaturas comprendidas entre 35° y 45 °C y durante más de cuatro horas, lo que no es posible en un proceso de fabricación

normal, cabría hablar de posible presencia de enterotoxina estafilocócica en el producto final.

Por último, encuadrado este trabajo en el campo de la Microbiología de los alimentos, y más concretamente de los alimentos desecados, no queremos dejar de citar, aun sin entrar en discusión, los trabajos de Buttiaux y Beerens (8), Bergdoll (6) y Galesloot y Stadhouders (15), presentados al simposio de Microbiología de los Alimentos, celebrado en Bilthoven (Holanda) el pasado año y que versan sobre aspectos del tema que nos ocupa, si bien son tratados de manera general.

RESUMEN

Se han estudiado 168 muestras de leche en polvo procedentes de industrias nacionales con el fin de precisar el alcance del problema de las intoxicaciones por enterotoxina estafilocócica de este origen.

Las determinaciones realizadas con el fin propuesto fueron:

Enumeración de colonias, caracterización bioquímica de las estirpes aisladas (pruebas de coagulasa, fosfatasa, desoxirribonucleasa, fermentación del manitol, lipólisis, reducción del telurito), tipificación por bacteriófagos, estudio de los distintos tipos de enterotoxina, crecimiento de las estirpes coagulasa-positivas en leche concentrada y en leche en polvo reconstituida.

De los resultados obtenidos se infiere que, aún considerando el pequeño porcentaje de estirpes enterotoxígenas que parecen existir en la población estudiada y la baja proporción en el número de estafilococos /gramo, con una media de 370, el mayor peligro radicaría en mantener a temperatura ambiente, por espacio de varias horas, la leche reconstituida.

En un proceso normal de fabricación, con una retención de leche concentrada antes de su desecación inferior a una hora, no existiría posibilidad, cualquiera que fuera la temperatura de la leche retenida, de formar enterotoxina, que por su parcial termorresistencia se hallaría presente en el producto final.

SUMMARY

Hygienic significance of pathogenic staphylococci and staphylococcal enterotoxins in powdered milk

168 spray dried milk samples have been studied from Spanish dairies in order to establish the scope in the problem of food poisoning outbreaks due to staphylococcal enterotoxin of this origin.

The preformed tests to follow this line were: staphylococcal colony counts, biochemical characteristics of the isolated strains (coagulase, fosfatase, deoxyribonuclease, manitol fermentation, lipolitic activity, potasium tellurite reduction), bacteriophage typing, detection of the types of enterotoxin, growth of the coagulase positive strains in evaporated milk and in reconstituted powdered milk.

From the results obtained it has been deduced that despite the small percentage of enterotoxigenic strains among the studied microflora, and the low proportion in the number of staphylococci per gram, with an average of 370, it would be dangerous to maintain, at room temperature, for several hours, the reconstituted milk.

In a normal spray dried milk process, with a holding period of the concentrated milk, before drying, less than one hour, it would not be possible, whatever the temperature might be, to cause enterotoxin to be produced, which avoids its presence in the final product.

BIBLIOGRAPHY

1. ALLISON, V. D. 1949. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 42, 216.
2. ANDERSON, P. H. R., y STONE, D. M. 1955. J. Hyg., 53, 387.
3. ARMIJO, R.; HENDERSON, D. A.; TOMOTHEE, R., y ROBINSON, H. B. 1957. Amer. J. Pub. Health., 47, 1.093.
4. BAIRD-PARKER, A. C. 1962. J. Appl. Bacteriol., 5, 12.
5. BARBER, M., y KUPER, J. W. A. 1951. J. Pathol. Bacteriol., 63, 65.
6. BERGDOLL, M. S. 1969. En E. H. KAMPELMACHER *et al.* (cita 8).
7. BLAIR, J. E., y WILLIAMS, R. E. O. 1961. Bull. W. H. O., 24, 771.
8. BUTTIAUX, R., y BEERENS, H. 1969. En E. H. KAMPELMACHER *et al.* The Microbiology of Dried Foods. National Institute of Public Health, Utrecht.
9. CASMAN, E. P., y BENNET, R. W. 1963. J. Bacteriol., 86, 18.
10. CASMAN, E. P.; BENNET, R. W.; DORSEY, A. F., y STONE, J. E. 1969. Health Lab. Sci., 6, 185.

11. CROSSLEY, E. M., y CAMPLING, M. 1957. *J. Appl. Bacteriol.*, 20, 65.
12. CROWLE, A. J. 1958. *J. Lab. Clin. Med.*, 52, 784.
13. DACK, G. M. 1962. En J. C. AYRES *et al.* *Chemical and Biological Hazards in Food*. Ames, Iowa State University Press.
14. FRAZIER, W. C. 1958. *Food Microbiology*. McGraw-Hill Book Comp., New-York.
15. GALESLOOT, T. E., y STADHOUDERS, J. 1969. En E. H. KAMPELMACHER *et al.* (cita 8).
16. GUILLESPIE, W. A., y ALDER, V. G. 1952. *J. Pathol. Bacteriol.*, 64, 187.
17. HARRIGAN, W. F., y MCCANCE, M. 1968. *Métodos de Laboratorio en Microbiología*. Edit. Academia, León.
18. HEINEMANN, B. 1957. *J. Dairy Sci.*, 40, 1.585.
19. HOBBS, B. C. 1955. *J. Appl. Bacteriol.*, 18, 484.
20. MOSSEL, D. A. 1962. *J. Bacteriol.*, 84, 1.140.
21. SUÁREZ, G. 1966. *An. Fac. Vet. León*, 8, 141.
22. SWANSTROM, M., y ADAMS, M. H. 1951. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 78, 372.
23. TANNER, F. W., y TANNER, L. F. 1953. *Food-borne Infections and Intoxications*. The Garrard Press Publ., Champaign, Illinois.
24. THATCHER, F. S., y CLARK, D. S. 1968. *Microorganisms in Foods*. University of Toronto Press, Toronto.
25. WADSWORTH, C. 1957. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 10, 355.
26. WEECKMAN, B., y CATLIN, B. W. 1957. *J. Bacteriol.*, 73, 747.

Depósito legal: M. 702 - 1968

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid