JG 17

VOLUMEN 25. 1972 ENERO - MARZO. NUMERO 1

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. Fernando Baquero, 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, 300 PTA; extranjero, 400 PTA
Número: España, 85 PTA; extranjero, 120 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 $18 \times 11{,}5$ 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 alfabetizadas, 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 día 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

Ultraestructura de hojas de *Digitalis thapsi* infectadas espontáneamente con dos virus, por *Amparo Vela* y *M. Rubio-Huertos* 1

Efecto del benlate en la fisiología y composición micelial del *Penicillium italicum,* por *J. Coll* y *J. A. Leal* 19

Estudio sobre la cromogénesis de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de distintas moléculas tetraciclínicas, por *M. Espinosa, R. López* y *J. M. López* 31

Valoración de polimixina con *Escherichia coli,* por *F. Fernández* 45

Análisis comparativo de cloroplastos aislados de plantas de *Brassica chinensis* sanas e infectadas con el virus del Mosaico amarillo del nabo, por *Amparo Vela* 51

Valoración de eritromicina con *Bacillus licheniformis,* por *F. Fernández* 61

Bibliografía, por *A. Portolés* y *M. Rodríguez-Rebollo* 67

CONTENTS

Page

Ultrastructure of leaves of *Digitalis thapsi* spontaneously infected with two viruses, by *Amparo Vela* and *M. Rubio-Huertos* 1

Effect of benlate on the physiology and mycelial composition of *Penicillium italicum,* by *J. Coll* and *J. A. Leal* 19

Study on the chromogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of several tetracyclin-derivatives, by *M. Espinosa, R. López* and *J. M. López* 31

Determination of polymyxin with *Escherichia coli,* by *F. Fernández* 45

Comparative studies of isolated chloroplasts from healthy and turnip yellow mosaic virus infected *Brassica chinensis,* by *Amparo Vela* 51

Determination of erythromycin with *Bacillus licheniformis,* by *F. Fernández* 61

Bibliography, by *A. Portolés* and *M. Rodríguez-Rebollo* 67

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

ULTRAESTRUCTURA DE HOJAS DE *DIGITALIS THAPSI* INFECTADAS ESPONTANEAMENTE CON DOS VIRUS

por

AMPARO VELA y M. RUBIO-HUERTOS

INTRODUCCION

El caso de plantas medicinales infectadas espontáneamente por virus no es muy frecuente, o por lo menos no se han descrito muchos virus aislados de plantas medicinales, aunque se sabe que experimentalmente muchas son susceptibles a los virus más comunes, como son el Mosaico del tabaco, el Mosaico del *Arabis,* el Virus X de la patata, etc.; sin embargo, el problema de virus parásitos de este tipo de plantas es de gran interés, primero, por el perjuicio que una fuerte virosis puede causar en las plantaciones de plantas medicinales reduciendo su producción y, segundo, porque algunas virosis no muy patentes puedan tener influencia en la producción de principios activos.

En el presente trabajo hemos estudiado la ultraestructura y otras características de plantas de *Digitalis thapsi,* recogidas en las cercanías de Madrid y que presentan síntomas claros de virosis, para aislar y clasificar el virus infectante y ver la acción de éste sobre las plantas. El estudio

químico de la acción del virus sobre los glucósidos de las plantas infectadas constituye el tema de otro trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Plantas

Se han estudiado plantas de *Digitalis thapsi* infectadas espontáneamente y que presentaban fuerte mosaico y deformación de las hojas. Las muestras fueron recogidas en Colmenar Viejo (Madrid) y se inocularon una serie de plantas testigo: solanáceas, como *Nicotiana glutinosa, N. tabacum* var. White burley y *N. tabacum* var. Turkish; quenopodiáceas, entre ellas *Quenopodium quinoa* y *Q. amaranticolor,* y la amarantácea *Gomphrena globosa.* Las inoculaciones se hicieron mecánicamente con la savia infectada, usando celite como abrasivo.

Microscopía electrónica

Se tomaron muestras de las zonas más afectadas del tejido laminar de *Digitalis thapsi* y se sumergieron en una solución fijadora formada por glutaraldehido al 5 %, en tampón de veronal, a pH 6,9, durante 4 h, a 4 °C. Después de lavadas durante toda la noche con el mismo tampón, se fijaron durante 2 h, a 4 °C, con tetraóxido de osmio, al 2 %, tamponado también con acetato de veronal y al mismo pH, se deshidrataron en acetonas de concentraciones crecientes e incluidas en durcupán fueron endurecidas en estufa a 55 °C, durante las primeras 24 h y a continuación, durante otras 24 h, a 70 °C.

Las secciones se realizaron con ultramicrotomo LKB, con cuchillas de vidrio. Los cortes se recogieron en alcohol al 10 %, se estiraron con vapores de cloroformo y montaron en rejillas protegidas por una película de formwar. Una vez montadas, se tiñeron con una solución de citrato de plomo.

Los cortes fueron los comprendidos entre 500 a 600 Å. El microscopio electrónico ha sido un Siemens Elmiskop I del Servicio de Microscopía Electrónica, del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, operando a 60 kW.

RESULTADOS

Sintomatología

Observamos, que el tejido laminar de las plantas de *Digitalis thapsi* infectadas presentaba un mosaico característico de muchas virosis vegetales, que llenaba por completo la hoja y que cuando la infección era más avanzada, las zonas cloróticas aumentaban en número y tamaño *(figura 1).*

Resultados de las inoculaciones

Todas las plantas inoculadas, exceptuando el *Licopersicum sculentum,* presentaron lesiones necróticas en las hojas inoculadas, pero no infección generalizada.

Microscopía electrónica

La mayor parte de las observaciones han sido realizadas sobre células del parénquima de las hojas de *Digitalis thapsi,* aunque también hemos podido estudiar alguna correspondiente a la epidermis.

Ambos tipos de células presentaron inclusiones correspondientes a dos virus, pero generalmente fueron más abundantes las formadas por el virus Mosaico del tabaco.

Las formaciones de ambos virus han sido observadas dentro de una misma célula; generalmente se encuentran en el citoplasma en zonas aisladas, aunque también han sido observadas dentro de una misma zona, pero nunca entremezcladas unas con otras, como fue observado por Fujisava y colaboradores (6) en infecciones producidas por los virus Mosaico del tabaco y Grabado intenso del tabaco. En ambos casos nos ha sido posible diferenciarlas fácilmente por su diferente estructura *(figuras 2-3 y 7).*

El Mosaico del tabaco se presenta de varias formas concurriendo, a veces, dos de ellas en la misma región citoplásmica.

Puede encontrarse en masas formadas únicamente por partículas orientadas en disposición perfectamente paralela; en otras ocasiones están orientadas también en una sola dirección, pero su ordenación no es tan perfecta *(figuras 2-3).*

También se presenta formando agregados en los que las partículas se encuentran entremezcladas o en capas perpendiculares, en las que las partículas en éstas están en disposición paralela, apareciendo en este último caso cortadas longitudinal y transversalmente *(figuras 4-6)*. Todas estas formaciones están constituidas por partículas de virus libres de componentes del huésped y no delimitadas por membranas.

Otras veces, las partículas se encuentran entremezcladas con elementos celulares. Esto puede verse en la *figura 7*, en la que aparecen grandes masas formadas por capas de partículas en disposición paralela y retículo endoplásmico formando cadenas que guardan cierta regularidad entremezclado con ellos. También Rubio-Huertos y Vela (16) observaron en plantas de *Amaranthus* unas inclusiones en forma de peine o cepillo, que tenían retículo endoplásmico formando cadenas a lo largo de ellas. También se encuentra formando grandes masas semejantes a las observadas por Kolehmainen y colaboradores (9) constituidas por partículas orientadas en distintas direcciones y una matriz formada por citoplasma con abundantes ribosomas *(figura 8)*.

Las formaciones correspondientes al grupo del Virus Y de la patata son similares a las observadas por diversos autores (10, 12, 15 y 19), apareciendo en rosetas, placas y anillos, según sean cortadas tangencial, transversal o longitudinalmente las inclusiones tubulares formadas por este tipo de virus *(figuras 2-3* y *7)*.

Las placas presentaron algunas veces estructura bien manifiesta *(figura 9)*.

Los cloroplastos contienen frecuentemente partículas del Mosaico del tabaco semejantes a las observadas en el citoplasma y ordenadas en disposición paralela. También presentaron alteraciones en su estructura como disminución de grana y presencia de grandes vacuolas *(figuras 3* y *10)*. En el núcleo hemos observado unos túbulos formando agregados en la cromatina nuclear, pero no partículas de virus *(figuras 12-13)*.

Tampoco han sido vistas partículas de virus asociadas en mitocondrias, ribosomas y aparato de Golgi, así como tampoco cuerpos X correspondientes al Mosaico del tabaco.

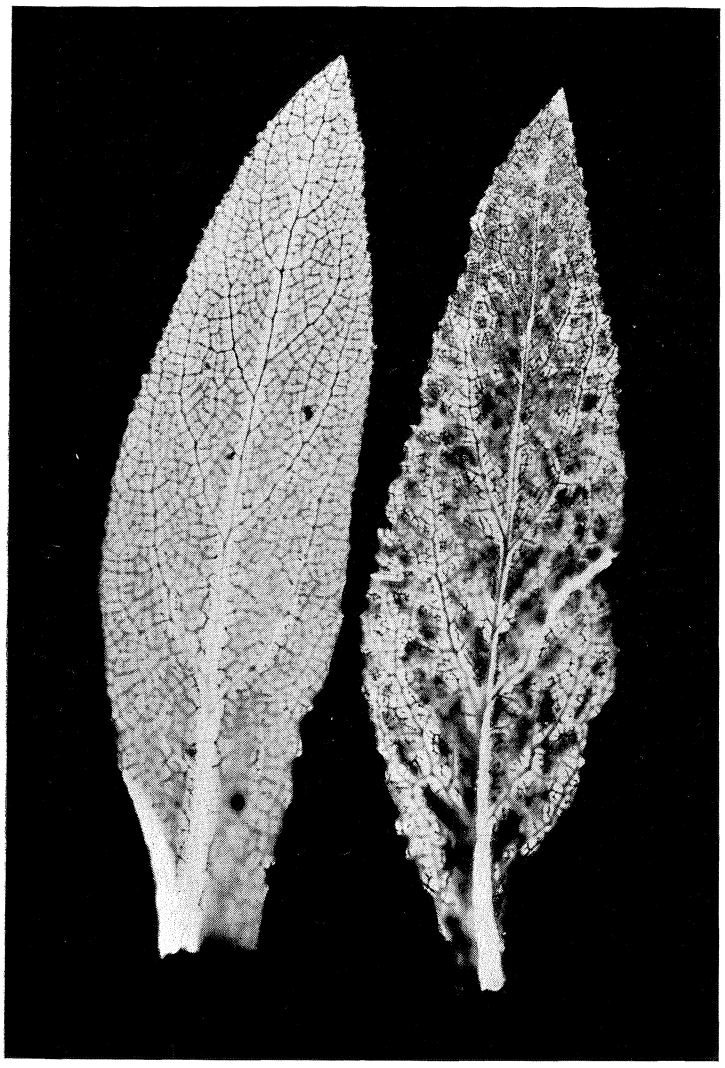


Figura 1. Hojas de D. thapsi, *la de la derecha con síntomas de virosis*

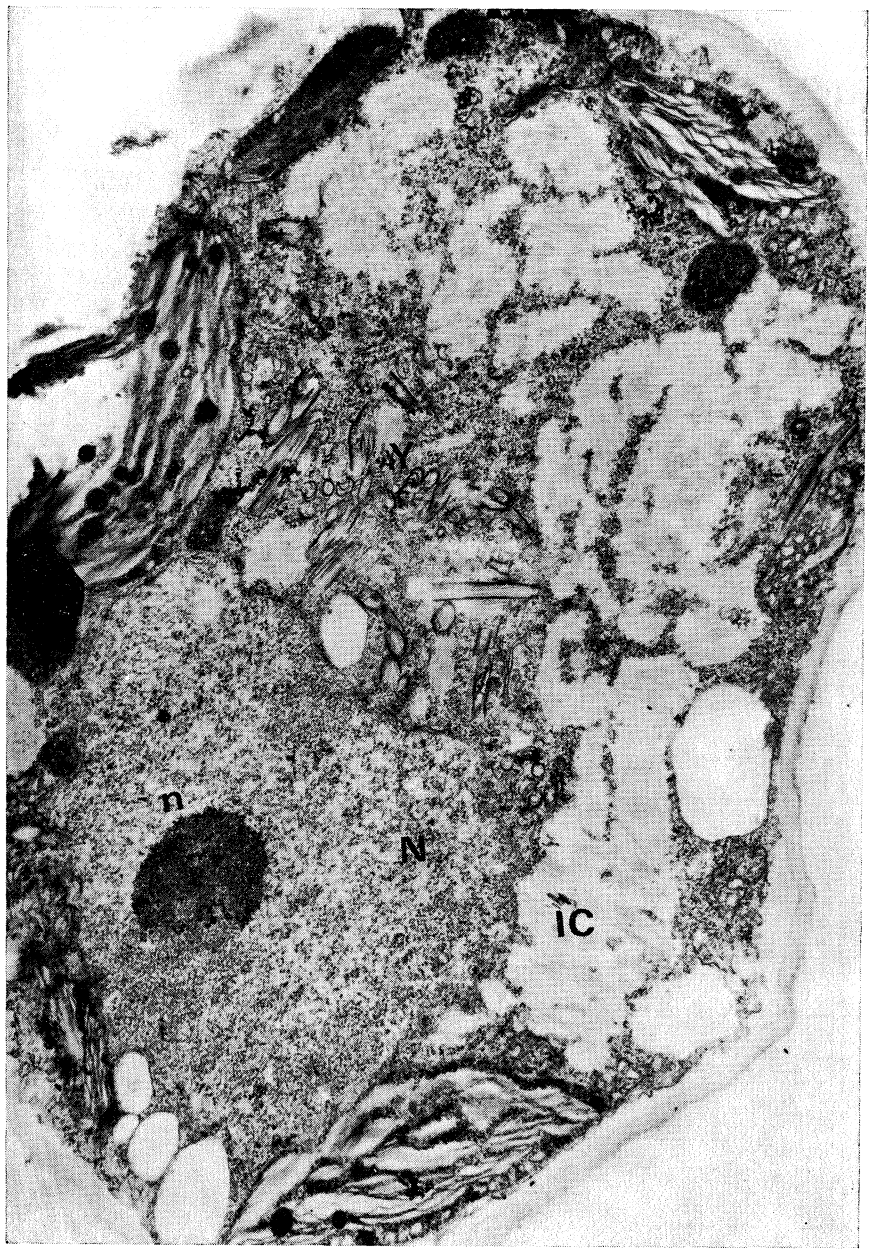


Figura 2. Vista general de una célula con inclusiones cristalinas (IC) del virus del Mosaico del tabaco, inclusiones de virus del grupo Y, núcleo (N) y nucleolo (n). $\times$ *17.600*

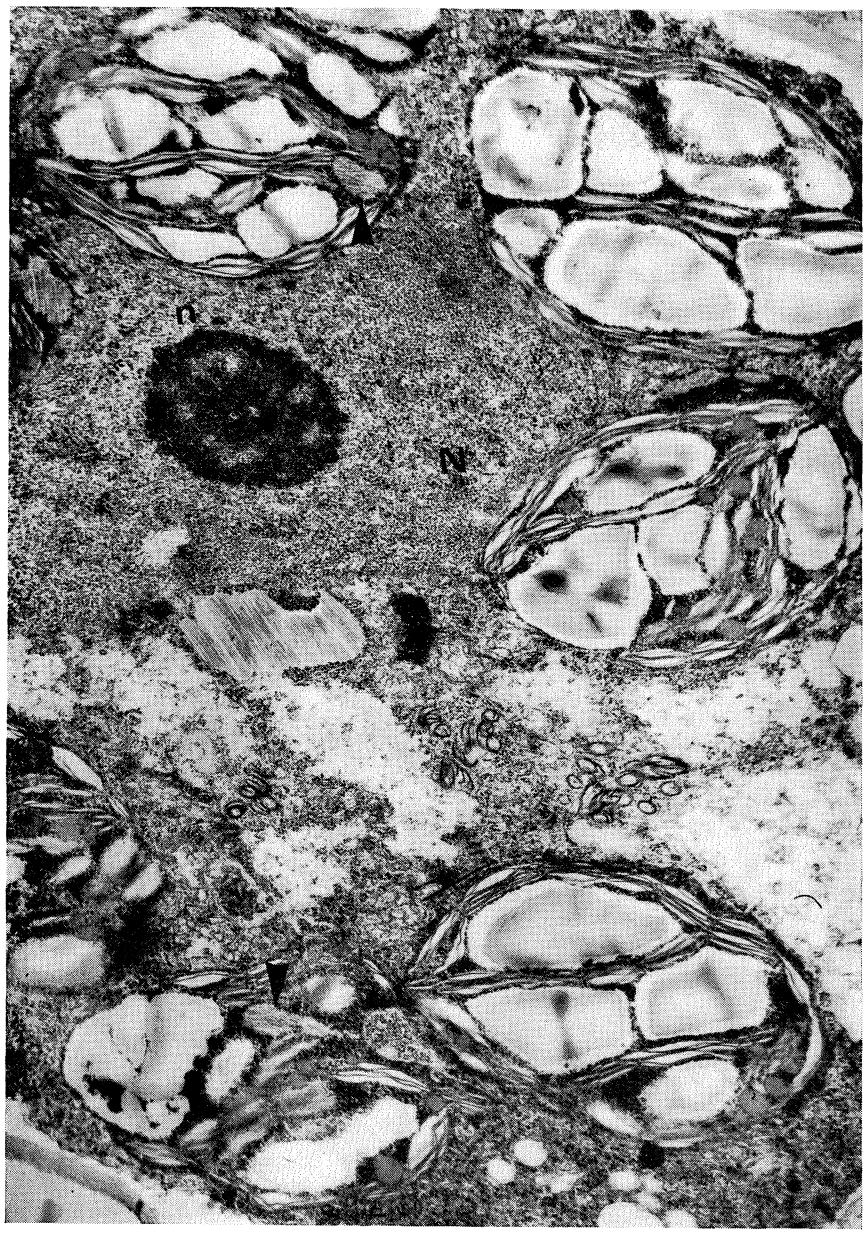
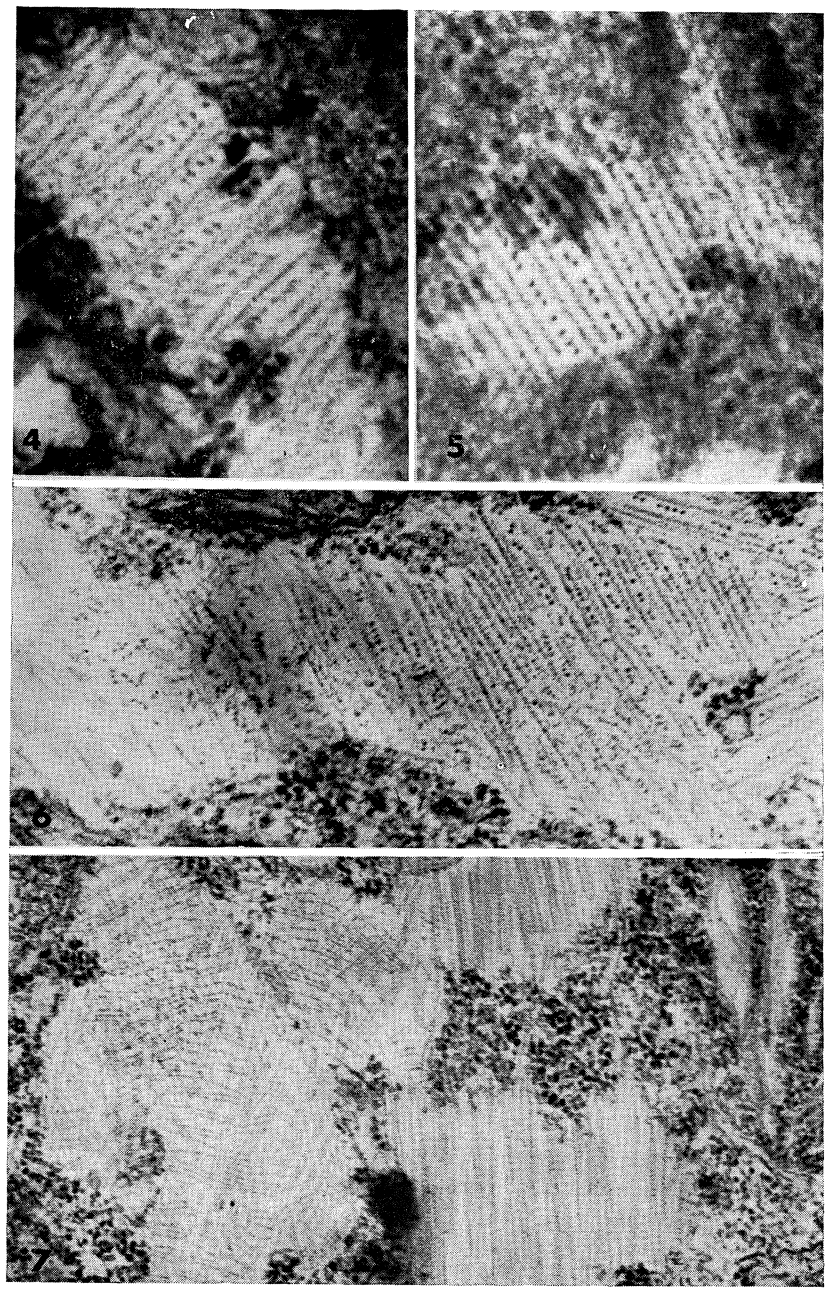


Figura 3. Sección ultrafina de una célula con cloroplastos muy vacuolados y partículas de virus del Mosaico del tabaco en su interior, núcleo (N), nucleolo (n) y en el citoplasma, los dos virus. × 17.600



Figuras 4-7. Disposición de las partículas del virus del Mosaico del tabaco en las inclusiones cristalinas. × 160.000, × 160.000, × 76.000 y × 60.000

Figura 8. Sección ultrafina del citoplasma con inclusiones de ambos virus y cloroplastos (CL) con virus del Mosaico del tabaco en su interior. × 17.600

Figura 9. Partículas del virus del Mosaico del tabaco en distinta posición entremezcladas con citoplasma rico en ribosomas. × 44.000

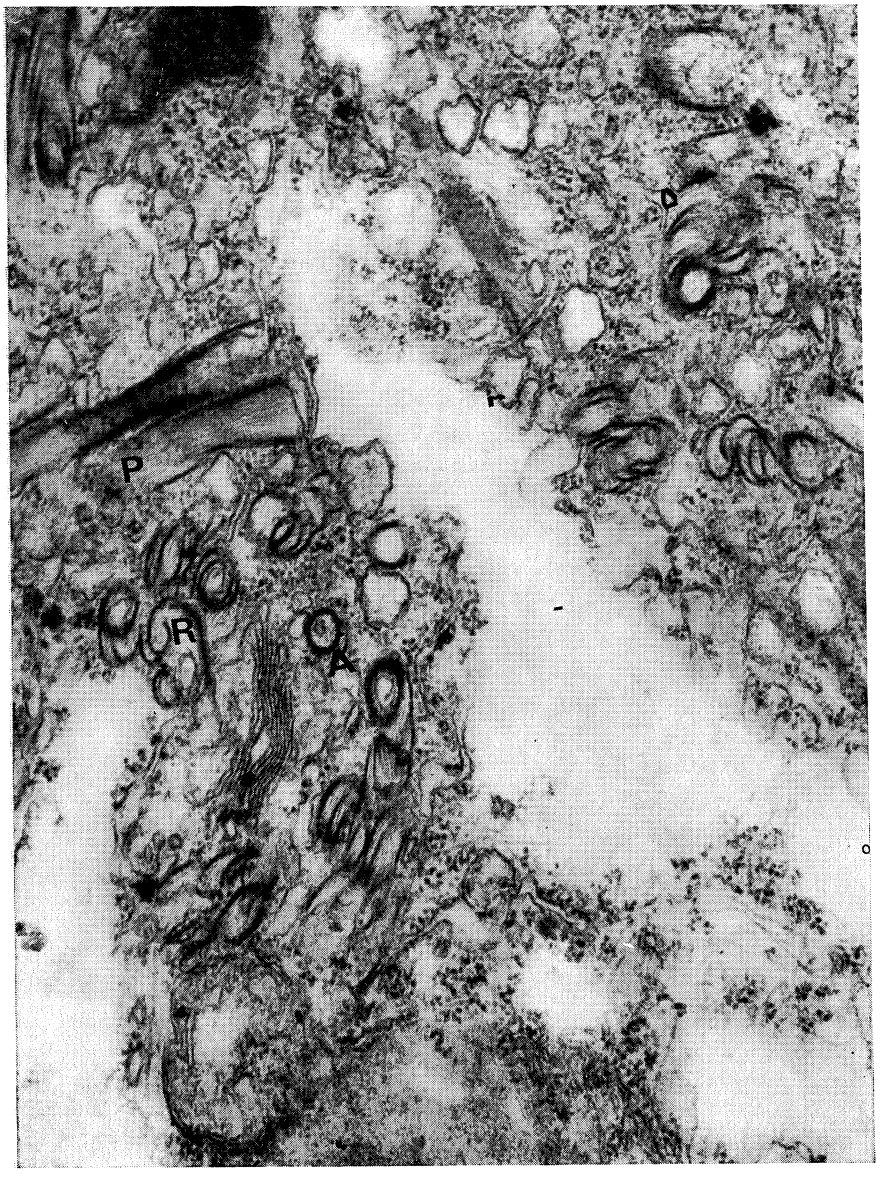


Figura 10. Parte del citoplasma con formaciones en roseta (R), anillos (A) y placas (P), correspondientes al virus del grupo Y. × 46.000

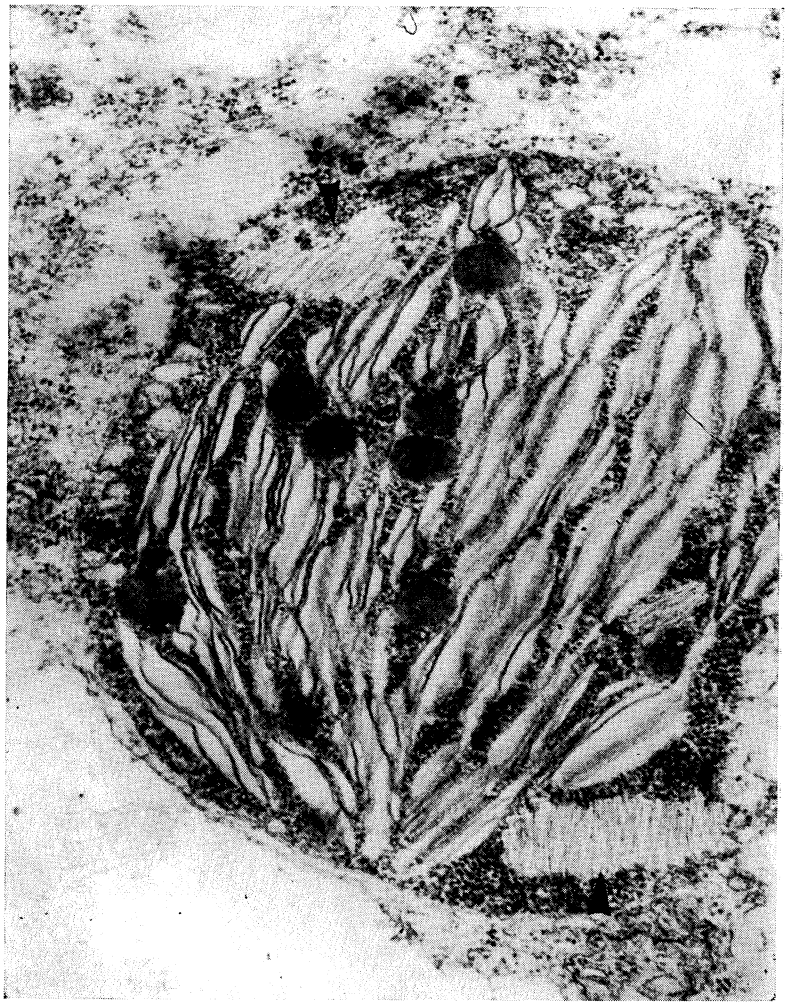


Figura 11. Cloroplasto alterado y con partículas de virus del Mosaico del tabaco en su interior. × 44.000

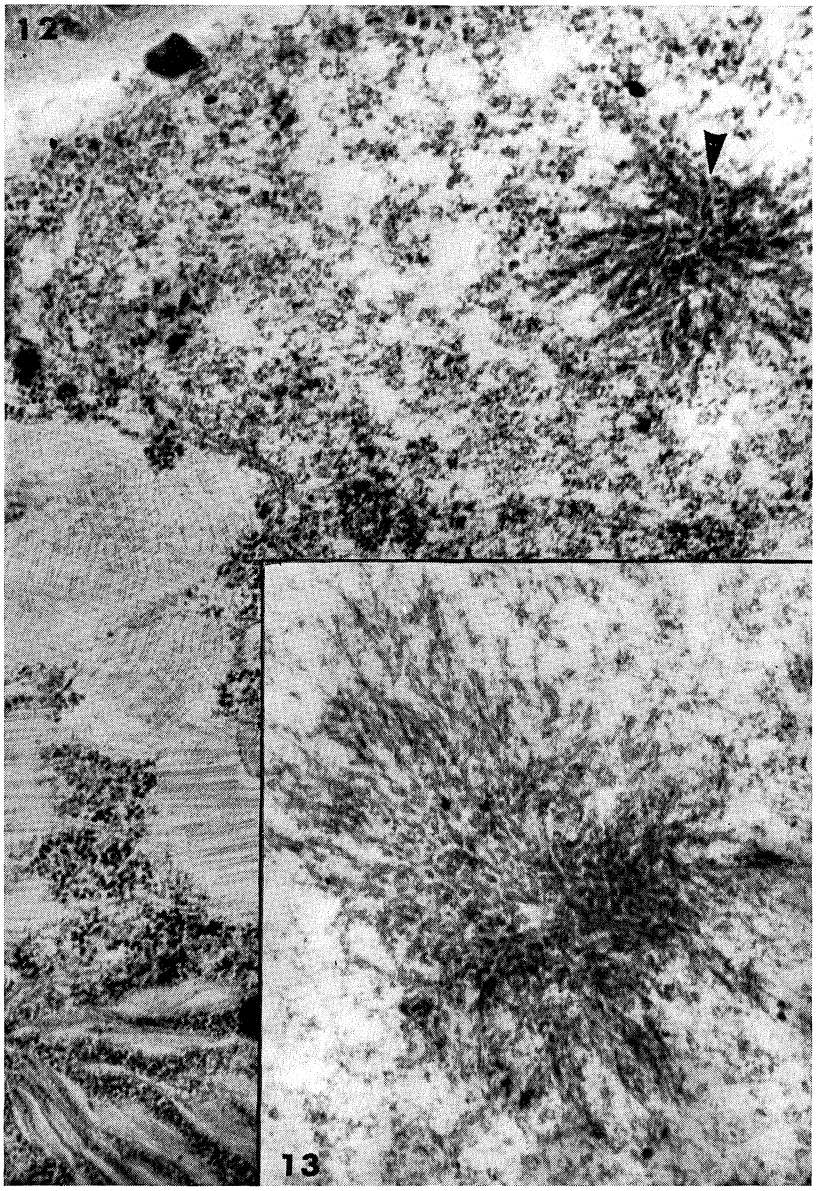


Figura 12. Citoplasma celular con partículas de virus del Mosaico del tabaco y núcleo con formaciones tubulares en su interior. × 44.000. Figura 13. Formaciones tubulares en otro núcleo, a mayor aumento. × 50.000

DISCUSION

La presencia de estos dos virus en plantas de *Digitalis thapsi* es factible, ya que se ha comprobado que virus no relacionados serológicamente pueden aparecer juntos en la misma planta.

En todo momento, las formaciones correspondientes a cada virus ha sido posible diferenciarlas con claridad, por lo tanto, cabe la afirmación de que los dos virus conservan su apariencia intracelular independiente, aún encontrándose ambos en la misma célula.

Las inclusiones correspondientes a los dos virus, que se presentan en ambos tipos de células, observados bien en la misma o indiferente zona intracelular, se presentan de forma similar a la observada por otros autores cuando se encuentran en hojas infectadas por uno de ellos solamente. Esto nos hace pensar que se redupliquen independientemente uno del otro.

El que el virus Mosaico del tabaco se presente unas veces en masas únicamente por partículas de virus y otras asociadas con componentes celulares, podría ser debido a que en este último caso la cristalización no había sido completa, pues Kolehmainen y colaboradores (9) consideraron estas formaciones como un estado intermedio en la condensación de los cristales hexagonales formados por este virus, y que la cristalización podría tener lugar por agregación de las monocapas de virus y sucesiva eliminación de los componentes celulares.

Ha sido muy discutida la posible síntesis del virus Mosaico del tabaco en los cloroplastos. Zaithin y Boardman (21) aislaron partículas del Mosaico del tabaco en los cloroplastos. Milne (11) y Shalla (17) admiten que la presencia de las partículas en los cloroplastos son debidas a invaginaciones del citoplasma. Nosotros no hemos observado invaginaciones, pero al igual que otros autores (5 y 17), hemos visto partículas del virus en su interior, pero no hemos podido llegar a una conclusión evidente, a pesar de que estas partículas se presentan de igual forma que las observadas por Esau y Cronshaw (5), es decir, no presentan asociación con membranas celulares, y que según Chapman y colaboradores (2) y Chen y Wildman (3), los cloroplastos son capaces de sintetizar ARN y proteínas. También el núcleo ha sido considerado como posible lugar de síntesis del virus del Mosaico del tabaco. Así, Hirai e Hirai (7) observaron que, tanto si las plantas eran inoculadas con el ARN del virus como con el virus completo, los núcleos eran los únicos elementos celulares que contenían

proteínas del virus y que sólo cuando éstos estaban ya formados podía ser observada la presencia del virus en el citoplasma.

Reddi (13-14) llegó a la conclusión de que el virus era sintetizado en el núcleo. Otros autores (1 y 22) opinan que el núcleo está relacionado solamente con la síntesis del ARN. También Zech (22) observó en el núcleo, durante la reproducción del virus del Mosaico del tabaco, unos productos intermedios.

Nosotros, hasta el momento, no podemos relacionar la presencia de túbulos en el núcleo con ninguno de los dos virus, pero sí podemos decir que es la única alteración observada que podemos relacionar con la mezcla de infección, pues hasta ahora en estudios realizados sobre células infectadas solamente por uno de ellos no han sido observados.

RESUMEN

Se ha estudiado una virosis espontánea en *Digitalis thapsi,* por inoculaciones a plantas testigo, y microscopía electrónica. Dicha virosis estaba producida por dos virus diferentes, uno, una estirpe necrótica del virus Mosaico del tabaco y otro virus de partículas anisométricas del grupo Y de la patata. Se ha conseguido separar ambos virus por tratamiento térmico. Se describe la ultraestructura de las hojas de *D. thapsi* infectadas por los dos virus.

SUMMARY

Ultrastructure of leaves of Digitalis thapsi *spontaneously infected with two viruses*

An spontaneous virus disease of *Digitalis thapsi* has been studied by inoculation to different hosts plants, and electron microscopy. The virus disease was induced by two viruses which were found together within the infected *D. thapsi* cells. One of the viruses was a necrotic strain of tobacco mosaic virus. The other virus, also of isometric particles, belongs to the potato Y group T. They were separated by thermal treatment.

BIBLIOGRAFIA

1. BALD, J. G., y SOLBERG, R. A. 1961. Apparent release of tobacco mosaic virus in living infected cells. Nature, 190, 651.
2. CHAPMAN, C. J.; NUGENT, N. A., y SCHREIBER, R. W. 1966. Nucleic acid synthesis in the chloroplasts of *Acetabularia mediterranea.* Plant Physiol., 41, 589-92.
3. CHEN, J. L., y WILDMAN, S. G. 1967. Functional chloroplast polyribosomes from tobacco leaves. Science, 55, 1.271-73.
4. EDWARDSON, J. R. 1966. Cylindrical inclusions in the cytoplasm of leaf cells infected with tobacco etch virus. Science, 153, 883-84.
5. ESAU, K., y CRONSHAW, J. 1967. Relation of tobacco mosaic virus to the host cells. J. Cell Biol., 33, 665-77.
6. FUJISAWA, I.; HAYASHI, T., y MATSUI, C. 1967. Electron microscopy of mixed infections with two plant viruses. J. Intracellular interactions between tobacco mosaic virus in tobacco etch virus. Virology, 33, 70-76.
7. HIRAI, T., e HIRAI, A. 1964. Tobacco mosaic virus cytological evidence of synthesis in the nucleus. Science, 145, 589-91.
8. HONDA, Y., y MATSUI, C. 1969. Occurrence of tobacco mosaic virus within the nucleus. Virology, 39, 593-95.
9. KOLEHMAINEN, J.; ZECH, H., y WETTSTEIN, D. von. 1955. The structure of cells during tobacco mosaic virus reproduction. Mesophyle cells containing virus crystal. J. Cell Biol., 25, 77.
10. LEE, P. E. 1965. Electron microscopy of inclusions associated with wheat streak mosaic virus. J. Ultrastruct. Res., 13, 359-66.
11. MILNE, R. G. 1966. Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf palisade cells. Virology, 28, 79-89.
12. PURCIFULL, D. E., y EDWARDSON, J. R. 1967. Watermelon mosaic virus: Tubular inclusions in pumpkin leaves and aggregates in leaf extracts. Virology, 32, 393-401.
13. REDDI, K. K. 1964. Studies on the formation of tobacco mosaic virus in the nucleus of the host cell. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 51, 619.
14. REDDI, K. K. 1964. Studies on the formation of tobacco mosaic virus ribonucleic acid. V. Presence of tobacco mosaic virus in the nucleus of the host cell. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 52, 397.
15. RUBIO-HUERTOS, M., y LÓPEZ-ABELLA, D. 1966. Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. Microbiol. Españ., 19, 77-86.
16. RUBIO-HUERTOS, M., y VELA, A. 1966. Light and electron microscopy of virus inclusions in *Amaranthus lividus* cells. Protoplasma, LXII, 2-3.
17. SHALLA, T. A. 1964. Assembley and aggregation of tobacco mosaic virus in tomato leaflets. J. Cell. Biol., 21, 253-64.

18. SMITH, H. S., y SCHELEGER, D. E. 1964. Incorporation of uridine H^3 into nuclei of virus infected tobacco. Science, 145, 1.058-59.
19. VELA, A. 1970. Ultraestructura de hojas de *Calendula officinalis* infectadas por un virus anisométrico. Microbiol. Españ., 23, 47.
20. WETTSTEIN, D. von, y ZECH, H. 1962. The structure of nucleus and cytoplasm in hair cells during tobacco mosaic virus reproduction. Z. Naturforsch., B, 17, 376.
21. ZAITHIN, M., y BOARDMAN, N. K. 1958. The association of tobacco mosaic virus with plastids. I. Isolation of virus from the chloroplast fraction of diseased-leaf homogenates. Virology, 6, 743-57.
22. ZECH, H. 1960. Intermediary products formed during tobacco mosaic virus reproduction. Virology, 11, 499-502.

INSTITUTO DE BIOLOGIA CELULAR (C S I C)

EFECTO DEL BENLATE EN LA FISIOLOGIA Y COMPOSICION MICELIAL DEL *PENICILLIUM ITALICUM*

por

J. COLL y J. A. LEAL

INTRODUCCION

Benlate es el nombre comercial del carbamato de metil-1-(butil carbamoil)-2-bencimidazol, también conocido como "benomyl" y fungicida "1991" (du Pont). Empezó a utilizarse comercialmente en 1969. Con el tiobendazol, 2-(4-tiazolil)-bencimidazol, forma parte de un grupo de fungicidas de distribución generalizada, muy activos y de amplio campo de acción.

Benlate se emplea con gran éxito para combatir la putrefacción de las naranjas, durante su almacenamiento, causada por especies de los géneros *Penicillium, Gleosporium, Diplodia* y *Phomopsis* (4-5 y 8); en la lucha contra las enfermedades vasculares producidas por los géneros *Fusarium* y *Verticillium* (1 y 5), y contra los hongos del suelo *Rhizoctonia, Sclerotinia* y *Thielaviopsis* (5).

El modo de acción de los fungicidas derivados del bencimidazol no se conoce bien. El tiobendazol inhibe la síntesis de proteínas (16). Sisler (15) sugiere que los derivados del carbamato de bencimidazol afectan a la división celular. A concentraciones de 0,25 y 0,5 mg/l, el benlate induce la segregación de diploides en *Aspergillus* y aumenta la segregación de haploides, pero no se ha obtenido evidencia de que cause mutaciones (11).

En el presente trabajo se estudia el efecto del benlate en la fisiología de *Penicillium italicum* y en la síntesis de los compuestos principales del micelio y la pared celular de *P. italicum*.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo y medio de cultivo

El microorganismo utilizado en este trabajo fue el *Penicillium italicum* (C. E. C. T., núm. 2.294). El medio de cultivo tenía la siguiente composición: glucosa, 20 g; L-asparagina, 0,5 g; K_2HPO_4, 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_1O$, 0,5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 mg; $CUSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,2 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,2 mg y agua destilada hasta completar 1 l. El pH se ajustó a 6,0 antes de esterilizar. El fungicida se añadió a la concentración de 1,3 p.p.m. del producto activo. El medio se distribuyó en matraces de 250 cm^3, 15 cm^3/matraz. Los medios de cultivo se sembraron con una suspensión de esporas obtenida de cultivos recientes del hongo en el mismo medio solificado con agar. Los matraces se incubaron a 28 °C, en agitación.

Toma de muestras

A diferentes tiempos, durante el período de incubación, se retiraron cultivos por duplicado. El micelio se recogió por filtración, se lavó con agua destilada y desecó en vacío sobre cloruro cálcico hasta peso constante. Los valores de estas pesadas se utilizaron para las curvas de crecimiento. Los caldos metabólicos se guardaron en el congelador para su análisis.

Análisis de los caldos metabólicos

La glucosa residual se determinó con el glucostat (Método A, Worthington Biochemical Corp. Freehold, N. J.).

La utilización del aminoácido se siguió por cromatografía en papel whatman núm. 4, utilizando como disolvente n-butanol : ácido acético : agua (80 : 20 : 20, v/v). Los aminoácidos se revelaron con ninhidrina.

Análisis en el micelio completo

Los nucleótidos se determinaron espectrofotométricamente, leyendo densidades ópticas de los extractos en un "unicam 200", a 260 mμ. Una

densidad óptica de 2,8 se corresponde con 100 μg de nucleótidos/cm^3. Los nucleótidos de 4 mg de micelio desecado se extrajeron por dos veces con 2 cm^3 de ácido perclórico 0,2 N, en frío, durante 30 min.

Los carbohidratos totales se determinaron por el método de la antrona (7). Las proteínas totales se determinaron por el método de Lowry y colaboradores (12) en los extractos con 1 cm^3 de NaOH N durante 16 h, de 3 mg de micelio desecado, empleando caseína para la curva patrón.

Paredes celulares

Células recogidas a las 39 h de incubación, fueron rotas mecánicamente mediante el homogenizador celular de Braun, usando polvo de vidrio "ballotini" núm. 12. La ruptura de las células y salida de su contenido fue seguida por observaciones al microscopio de contraste de fases. Las paredes se separaron del "ballotini" por decantación y se purificaron mediante centrifugación y lavados con soluciones de sacarosa al 60 y 10 %, seguida de lavados con soluciones de NaCl al 10 y 1 %. Finalmente fueron lavados varias veces con agua destilada y secados en vacío.

Análisis

Las determinaciones del contenido de carbohidratos totales y proteínas se hicieron por los métodos anteriormente descritos.

Los lípidos se determinaron por gravimetría. Las paredes celulares fueron tratadas con metanol al 80 %, a 70 °C, durante 1 h. Después de desecar, el residuo se extrajo con éter.

El fósforo total se determinó por el método de Fiske y Subarow modificado por Vambutas y Racker (17), valorándose el fósforo inorgánico obtenido por digestión de la materia orgánica con H_2SO_4 10 N en horno a 160 °C, durante 1 h.

Cromatografía de los azúcares

Para la identificación de los monosacáridos que forman los azúcares complejos de la pared celular, 4 mg de este material desecado se hidrolizaron con 0,2 cm^3 de HCl N en ampolla cerrada, a 105 °C, durante 6 h.

Para la identificación de dímeros y trímeros se realizaron hidrólisis parciales siguiendo el procedimiento anterior, pero manteniendo las muestras a 105 °C durante 30, 60, 120 y 180 min. Después de hidrolizar, se eliminó el HCl y el residuo se disolvió en agua destilada. Se empleó papel

whatman núm. 1 y como disolvente n-butanol : acetona : agua (40 : 50 : 10, v/v), dejando desarrollar el cromatograma 24 h. Para revelar los azúcares se empleó ftalato de anilina.

Determinación de quitina

Paredes celulares desecadas (4 mg) se resuspendieron en 0,5 cm^3 de tampón de acetato amónico 0,03 M, pH de 5, 8 a 6, y se añadió 1 mg de quitinasa. La suspensión se incubó en agitación, a 37 °C, 6 h. Mediante centrifugación se separó el sobrenadante y el sedimento que se lavó con 0,5 cm^3 de agua destilada. Se volvió a centrifugar y el sobrenadante se unió al anterior y se desecó al vacío; el residuo de la desecación se resuspendió en HCl 2N y se hidrolizó en ampollas cerradas, a 100 °C, durante 3 h. El hidrolizado se desecó en vacío sobre NaOH, y el residuo se pasó por una columna de resina catiónica (dowex 50-X8) preparada por el método de Boas (3), para eliminar azúcares y aminoácidos neutros que pudiesen contaminar las hexosaminas. La glucosamina liberada por la hidrólisis ácida se determinó cuantitativamente por el método de Roudle y Morgan, modificado por Ghuysen y colaboradores (10), utilizando como control glucosamina HCl. La identificación de los aminoazúcares del hidrolizado se hizo mediante cromatografía en papel whatman núm. 1, utilizando como disolvente n-butanol : piridina : HCl 0,1 N (5 : 3 : 2, v/v) y para detectar las manchas el reactivo de Elson-Morgan, modificado por Partridge (14).

RESULTADOS

Efecto del benlate en el crecimiento

En el medio de cultivo-base, el crecimiento de *Penicillium italicum* en peso seco fue de 145 mg/matraz, a las 39 h de incubación. Cuando el medio contenía el fungicida se obtuvo un peso seco de 95 mg/matraz. Los resultados del crecimiento se presentan en la *figura 1*, donde pueden apreciarse las diferencias en el crecimiento en función del tiempo. La *figura 2* muestra el aspecto de *P. italicum* crecido en presencia de benlate, a las 39 h de incubación.

La utilización de la glucosa fue más lenta cuando el medio contenía benlate, que en los controles. Los resultados se presentan en la *figura 3*.

La asparagina no pudo detectarse en los caldos metabólicos de los

cultivos controles a las 24 h de incubación, mientras que en los medios conteniendo benlate dejó de detectarse a las 63 h.

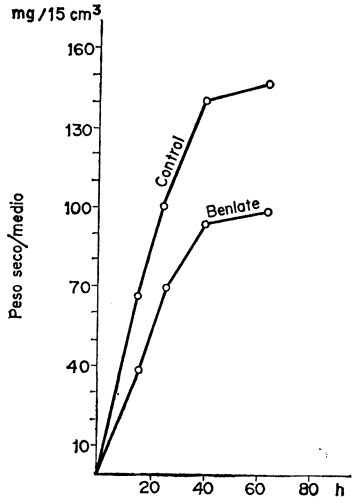


Figura 1. Efecto del benlate (1,3 mg/l producto activo) en el crecimiento de P. italicum

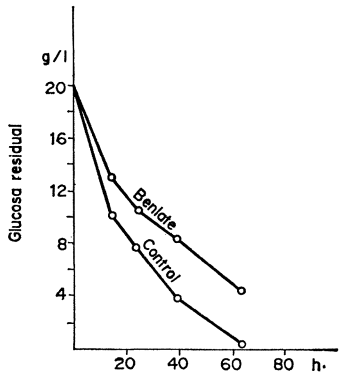


Figura 3. Efecto del benlate en la utilización de glucosa

Efecto del benlate en la composición del micelio

Los resultados de los análisis de proteína en el micelio desecado de cultivos controles y con benlate de diferentes tiempos de incubación se presentan en el *cuadro 1*. A las 15 h de incubación se aprecia que el benlate inhibe en un 50 % la síntesis de proteínas. Esta diferencia desaparece con el tiempo de incubación, por disminuir en el micelio sin tratar la proteína al tiempo que aumentan los carbohidratos.

En el contenido en nucleótidos y carbohidratos del micelio no se apreciaron diferencias significativas.

Estos resultados no explican las diferencias en el crecimiento de *Penicillium italicum* cuando se le cultiva con y sin benlate, por lo que consideramos de interés investigar el efecto del fungicida sobre la composición de la pared, ya que, como se muestra en la *figura 2*, las esporas tratadas aumentaron de tamaño sin formar micelio y, sin embargo, son fisiológicamente activas, ya que hay aumento de peso, así como consumo de las

Cuadro 1. Efecto del benlate y el tiempo de incubación en el contenido proteico del micelio de Penicillium italicum

	Horas de incubación			
	15	24	39	63
	Proteina, % (*)			
Control	29,30	19,36	15,84	11,44
Benlate (1,3 mg/l) (**)	14,96	11,65	10,65	11,53

(*) Micelio desecado. (**) Producto activo.

fuentes carbonada y nitrogenada del medio de cultivo, a lo largo del tiempo de incubación.

Efecto del benlate en la composición de las paredes

Los resultados de los análisis efectuados en las paredes celulares de micelio obtenido en medios con y sin benlate se presentan en el *cuadro 2*. Como en los análisis de micelio total, la única diferencia en la composición de las paredes se observa en la fracción proteica. Las paredes obtenidas de medios con benlate contienen un 4,8 % de proteínas, mientras que en las paredes controles contienen el 11,6 %. Esto representa una disminución del 58 % en el contenido de proteínas de la pared.

Cuadro 2. Efecto del benlate en la composición de las paredes celulares desecadas de P. italicum

Paredes celulares, fracciones	Benlate, mg/l (*)	
	0,0	1,3
	Porcentaje	
Carbohidratos (Antrona)	77,70	81,10
Glucosamina	5,00	5,60
Proteina total	11,60	4,80
Lípidos	2,60	2,00
Fósforo	0,98	0,63

(*) Producto activo.

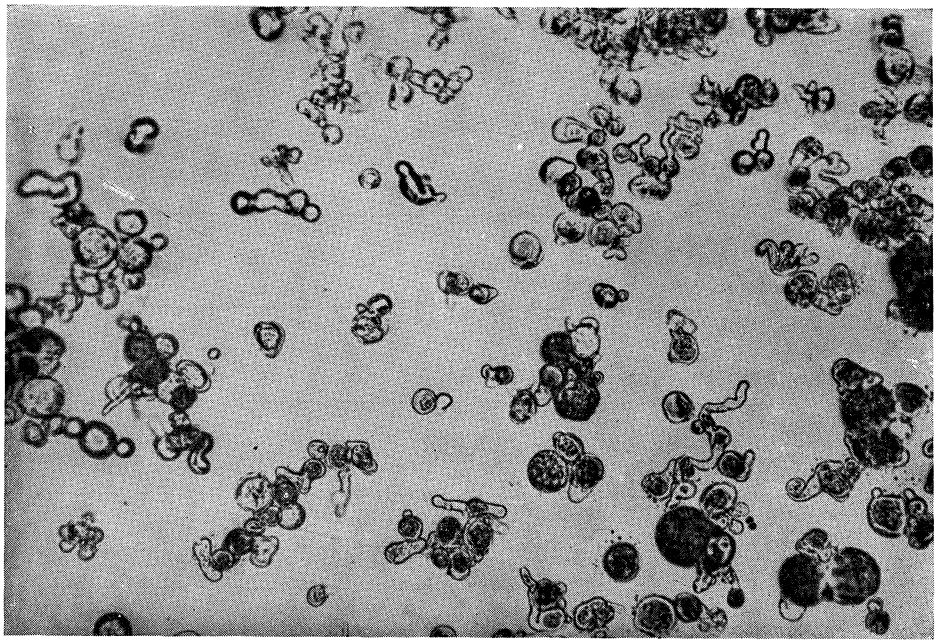


Figura 2. Conidios de P. italicum *incubados en presencia de 1,3 mg/l de benlate.* × *600*

Puede también apreciarse en el cuadro una ligera disminución en contenido de fósforo y lípidos de las paredes, como consecuencia del efecto del benlate.

El análisis cromatográfico de los hidrolizados de las paredes no reveló ninguna diferencia en la composición de hidratos de carbono. Cuando se hizo hidrólisis total, en los cromatogramas, apareció predominantemente glucosa y trazas de galactosa y manosa. En los hidrolizados parciales de paredes controles y de las obtenidas de micelio crecido en presencia de benlate, también se obtuvieron cromatogramas idénticos, encontrándose: glucosa, laminaro-triosa, galactosa, laminaro-biosa y manosa. Esto demuestra que el benlate no afecta a la composición de los hidratos de carbono de la pared.

Tampoco se observaron diferencias en los cromatogramas de aminoazúcares, apareciendo sólo una mancha, con las mismas características que la glucosamina.

DISCUSION

El benlate inhibe la esporulación y el crecimiento de *Penicillium italicum,* aunque esto último no sucede de manera inmediata y total, ya que el hongo en la presencia del fungicida no crece en forma filamentosa, pero las esporas aumentan considerablemente de tamaño, conservando una forma más o menos esférica, sin multiplicarse. En algunos hongos, como consecuencia de cambios en la composición del medio o ambientales, se ha descrito un crecimiento dimórfico, filamentoso o levaduriforme, habiéndose encontrado diferencias en la composición de polisacáridos y aminoazúcares, en las paredes celulares de estas dos formas (2, 6 y 9). El pentacloronitrobenceno reduce en un 28 a 39 % el contenido en hexosaminas de las paredes de *Neurospora crassa* (13). Nuestros resultados no revelaron diferencias entre los azúcares o aminoazúcares de las paredes de las formas filamentosas normales, o los de las paredes de las formas redondeadas obtenidas en presencia del benlate. En la fracción proteica se encontró una inhibición superior al 50 %. Esta fracción representa un 5 a 10 % de la pared y no tiene la rigidez de los hidratos de carbono, por lo que no consideramos sean las proteínas directamente las responsables del cambio de forma, podrían serlo indirectamente, afectando a la ordenación de las fibras de los polisacáridos. En el micelio total también se encontró una disminución considerable en el contenido de proteínas

de las células crecidas en presencia de benlate. El tiobendazol, otro fungicida de este grupo, también inhibe la síntesis de proteínas (16), y basándose en el retraso con que se manifiesta su efecto, Sisler (15) sugiere que estos fungicidas pueden inhibir la división celular. Esto explicaría el aumento de tamaño de las esporas de *P. italicum,* sin formar tubo germinativo.

En nuestro trabajo hemos encontrado que el benlate inhibe la síntesis de proteína en *Penicillium italicum,* micelio total y paredes, sin afectar a los azúcares, lípidos o nucleótidos, pero dada la complejidad de los procesos vitales puede tener otros efectos.

RESUMEN

El benlate, en concentraciones de 1,3 mg/l, producto activo, inhibe el crecimiento de *Penicillium italicum* en un 40 %. Los conidios al germinar no produjeron hifas normales, sino que aumentaron de tamaño, dando formas esféricas más o menos anormales. La síntesis de proteínas del micelio total fue inhibida en un 50 %, durante las primeras horas de incubación, y las proteínas totales de paredes aisladas, en un 58 %. Los restantes componentes del micelio o pared celular no fueron afectados significativamente por el fungicida.

SUMMARY

Effect of benlate on the physiology and mycelial composition of Penicillium italicum

Benlate at concentrations of 1.3 mg/l, active product, inhibits in a 40 % the growth of *Penicillium italicum.* Germinating conidia do not develop normal hyphae but they increase in size to give anormal spherical forms. The total protein synthesis is inhibited in a 50 %, during the first hours of incubation, and a 58 % the protein of the isolated cell walls. The rest of the mycelial components were not significatively affected by the fungicide.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLAM, A. I.; SINCLAIR, J. B., y SCHILLING, P. E. 1969. Phytopathology, 59, 1.659-62.
2. BARTNICKI-GARCÍA, S., y NICKERSON, N. J. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 58, 102-19.
3. BOAS, N. F. 1953. J. Biol. Chem., 204, 553-63.
4. BROWN, G. E. 1968. Plant. Dis. Rep., 52, 844-47.
5. CESSAC, M., y DODEL, J. B. 1969. Phytiat. Phytopharm., 18, 3-8.
6. CHATTAWAY, F. W., y HOLMES, M. R. 1968. J. Gen. Microbiol., 51, 367-76.
7. CHUNG, C. W., y NICKERSON, W. J. 1954. J. Biol. Chem., 208, 395-407.
8. DAINES, R. H., y SNEE, R. D. 1969. Phytopathology, 59, 792-94.
9. DOMER, J. E.; HAMILTON, S. G., y HARKIN, J. C. 1967. J. Bacteriol., 94, 466-74.
10. GHUYSEN, J. M.; TIPPER, D. J., y STROMINGER, J. L. 1966. Methods Enzymol., 8, 685-99.
11. HASTIC, A. C. 1970. Nature, 226, 771.
12. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, M. J.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J. 1951. J. Biol. Chem., 193, 265-75.
13. MACRIS, B., y GEORGOPOULOS, S. G. 1969. Phytopathology, 59, 879-80.
14. PARTRIDGE, S. M. 1948. Biochem. J., 42, 238-48.
15. SISLER, H. D. 1969. Annu. Rev. Phytopathol., 7, 311-30.
16. STARON, T.; ALLARD, C.; DARPOUX, H.; GRABOWSKI, H., y KOLLMAN, A. 1966. Phytiat. Phytopharm., 15, 129-33.
17. VAMBUTAS, V. K., y RACKER, E. 1965. J. Biol. Chem., 240, 2.660-67.

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

ESTUDIO SOBRE LA CROMOGENESIS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN PRESENCIA DE DISTINTAS MOLECULAS TETRACICLINICAS

por

M. ESPINOSA, R. LÓPEZ y J. M. LÓPEZ

INTRODUCCION

Es una creencia muy extendida el que todas las tetraciclinas son idénticas en cuanto a su mecanismo de acción, responsable de una inhibición de síntesis proteica a nivel ribosómico. Sin embargo, parecen existir peculiaridades moleculares que, en casos específicos, hacen recomendable el empleo de uno u otro de los derivados antibióticos.

Esta idea nos llevó a querer comprobar si las distintas modificaciones en la molécula base de la tetraciclina tenían significación para la síntesis de cromógenos en estirpes patógenas de *Pseudomonas aeruginosa* y, en caso positivo, conocer qué cambios se producían en las moléculas fenazínicas y fenoxazónicas características de estos cromógenos.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias

A lo largo de nuestro trabajo se han usado dos estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* de procedencia hospitalaria, aisladas de infecciones bronquiales (estirpes L-19 y L-29).

Medios de cultivo

Los pigmentos se obtuvieron a partir de cultivos de los microorganismos en medio líquido de Naves (3) en presencia o ausencia de antibióticos según hemos descrito anteriormente (2).

Antibióticos y desarrollo de la antibiótico-resistencia

Se utilizaron los siguientes agentes antibacterianos: tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina y doxiciclina. Las estirpes se hicieron resistentes a los antibióticos utilizando dos procedimientos: a) por exposición repetida frente a dosis crecientes subinhibidoras (4), y b) por exposición única a una dosis fuertemente inhibidora de los antibióticos, que nos permitiese aislar mutantes espontáneos (5). La concentración final alcanzada para cada una de las tetraciclinas fue de 100 μg/ml en ambos procedimientos.

Técnicas

Las diferentes fracciones cromógenas se aislaron por cromatografía en columnas de gel de sephadex G25F y sus productos de elución se registraron en un espectrofotometro de Beckman, DB-G, provisto de una microcubeta de flujo continuo (modelo 97.460) a 380 nm y recogidos mediante un colector de Beckman, de fracciones, automático. Las fracciones separadas se identificaron por espectrofotometría infrarroja (1).

RESULTADOS

En la *figura 1* se indica la diferente producción de pigmentos totales en estirpes sensibles y antibiótico-resistentes. Se observa tanto en la estirpe L-19 como en la L-29 un aumento de dicha producción en presencia de cualquiera de los antibióticos usados, con independencia del método seguido para alcanzar la antibiótico-resistencia.

Los distintos patrones de elución aparecen en las *figuras 2-3*, y en el *cuadro 1*, donde se pueden apreciar las variaciones en número y peso molecular relativo de los distintos metabolitos cromógenos aislados por cromatografía.

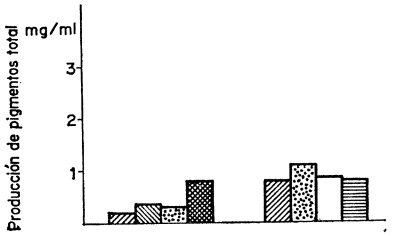


Figura 1

Producción total de pigmentos (mg/ml) en las estirpes L-19 y L-29 de Ps. aeruginosa *según las condiciones del ensayo.* ▨: *normal, no tratada;* ▧: *adaptado a la tetraciclina;* ▩: *mutante a la tetraciclina;* ▩ *adaptado a la doxiciclina;* □: *adaptado a la oxitetraciclina;* ▬: *adaptado a la clorotetraciclina*

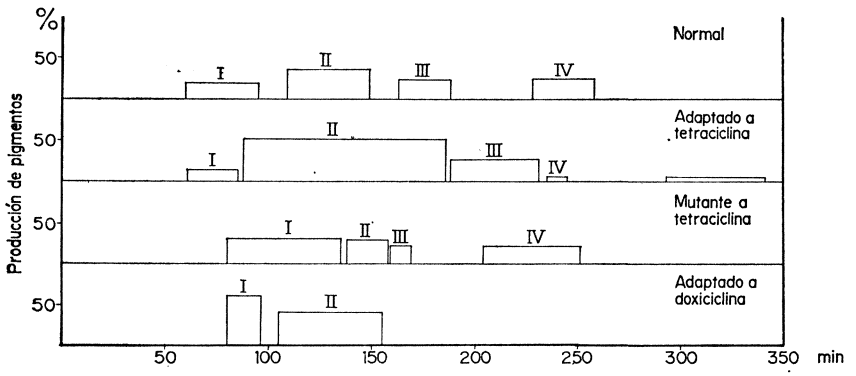


Figura 2. Patrones de elución de los pigmentos producidos por Ps. aeruginosa, estirpe L-19, según las condiciones del ensayo

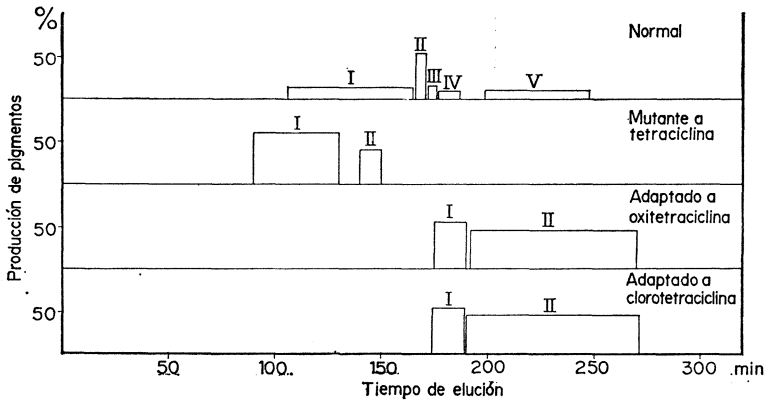


Figura 3. Patrones de elución de los pigmentos producidos por Ps. aeruginosa, *estirpe L-29, según las condiciones del ensayo*

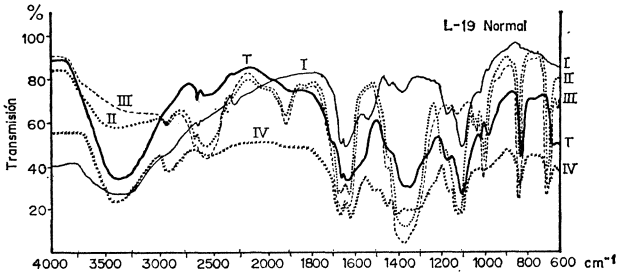


Figura 4

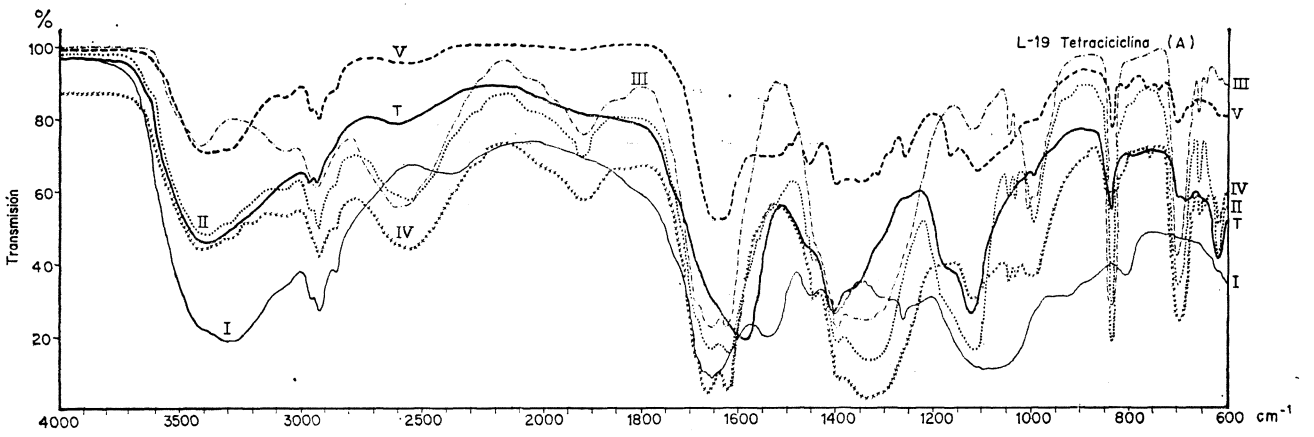


Figura 5

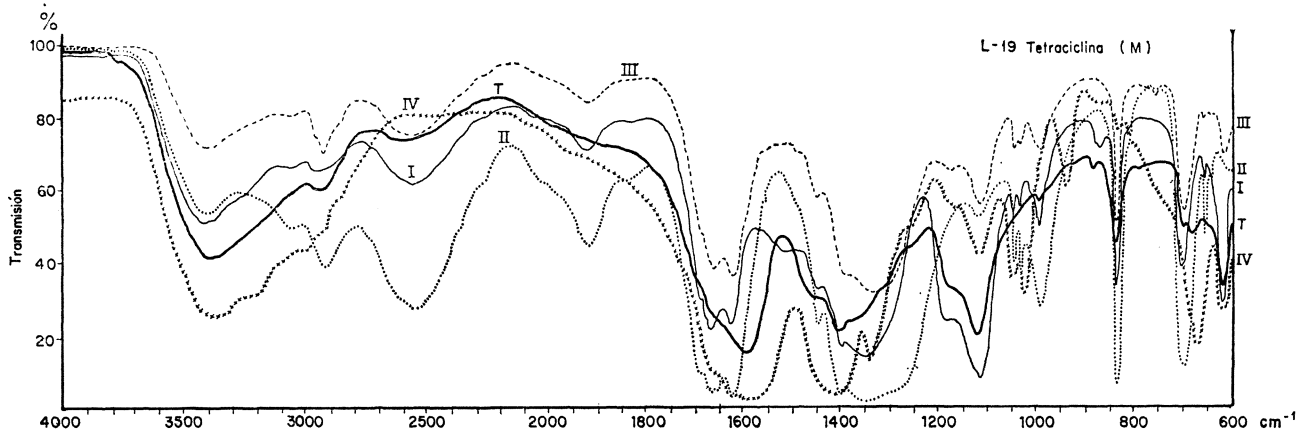


Figura 6

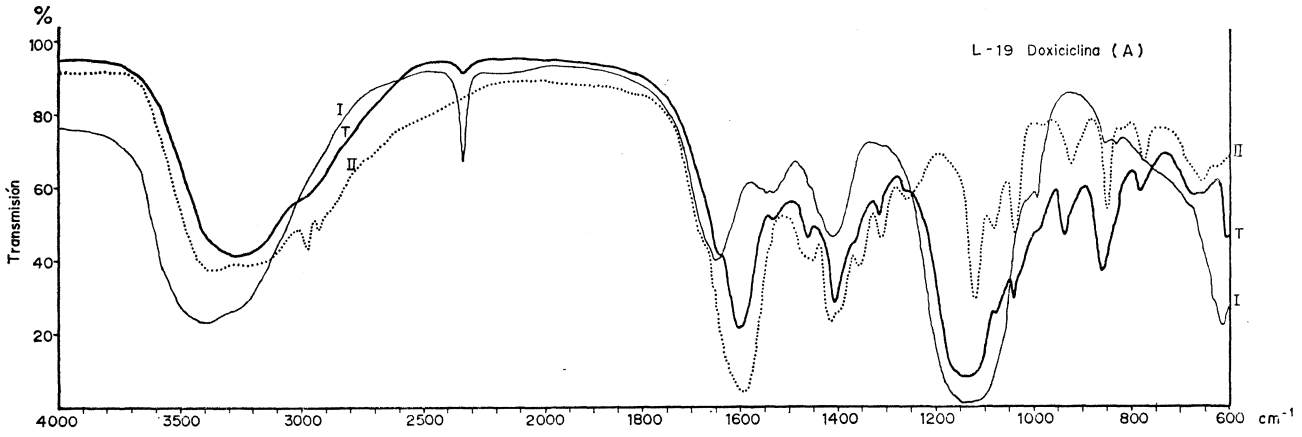


Figura 7

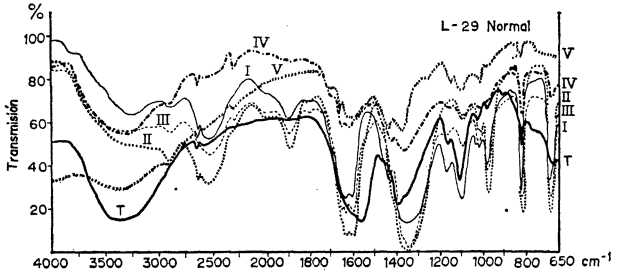


Figura 8

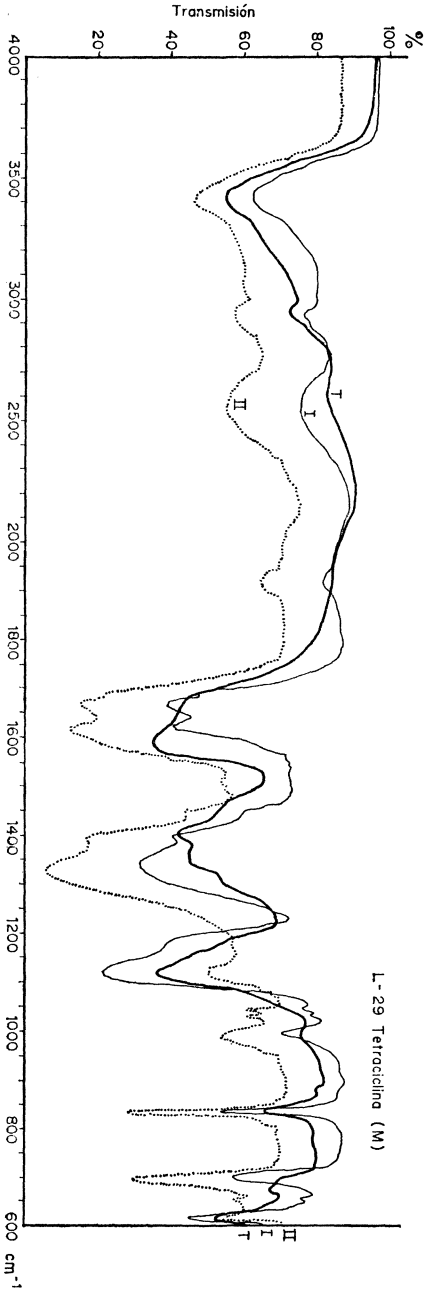

Transmisión
%
100
80
60
40
20
4000
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
cm⁻¹
I
II
L - 29 Terraciclina (M)

Figura 9

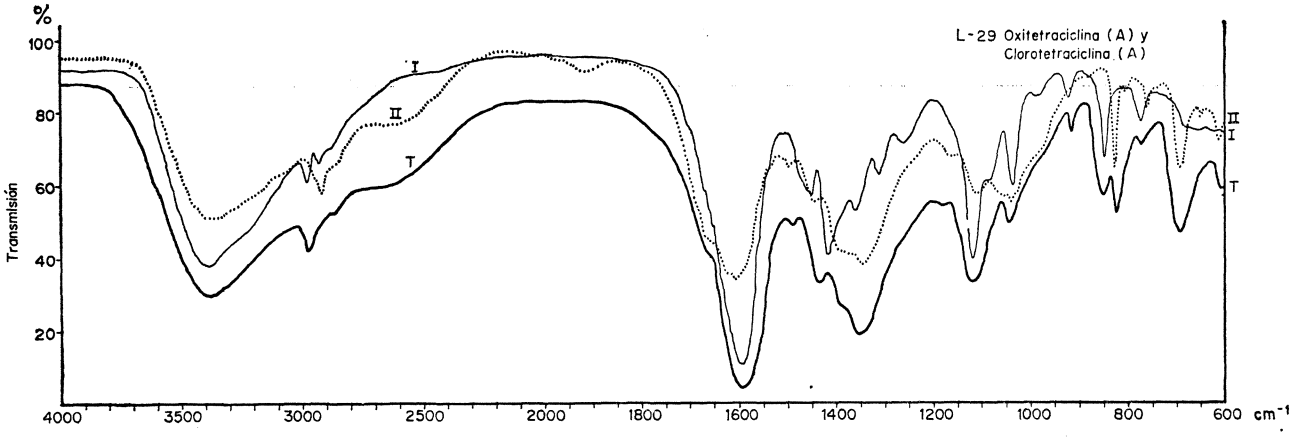


Figura 10

Figuras 4-10. Espectros IR de los pigmentos totales (T) y de las diferentes fracciones aisladas. (El orden señalado con números romanos se corresponde con los patrones de elución señalados en las figuras 2-3)

Los espectros IR registrados para las distintas fracciones cromógenas aisladas se muestran en las *figuras 4-10*. Un examen preliminar de estos espectros nos da una idea general sobre las bandas características que aparecen en las distintas fracciones cromógenas, como son las situadas a 1.110-1.120 y 830-840 cm^{-1}, correspondientes al núcleo molecular de los cromógenos.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El análisis de los resultados expuestos muestra que en la estirpe L-19 *(figura 2)* no sometida a tratamiento antibiótico, aparecen 4 fracciones identificadas previamente (1) como fenoxazónicas (I, II, III) y oxi-metil-fenazínicas (IV) *(figura 3)*. Cuando esta estirpe se adaptó a la tetraciclina, se observó la aparición de una nueva fracción (I) de color marrón-amarillento, que aún no hemos identificado. Las fracciones fenoxazónicas (II, III, IV) aparecen modificadas, ya que las bandas a 1.460 y 1.380 cm^{-1} presentes en las fracciones normales, están ligeramente desplazadas *(figura 4)*.

Los mutantes tetraciclín-resistentes de esta estirpe, sintetizaron 4 fracciones, dos de ellas (II, III) con unos espectros IR muy alterados, que hacen difícil su identificación. Nuevamente, la fracción fenoxazónica identificable (I) aparece ligeramente modificada, de un modo semejante a las anteriores; por su parte, la fracción fenazínica continúa siendo sensiblemente similar a las señaladas anteriormente *(figura 5)*.

La doxiciclina altera totalmente el cromotipo de la estirpe L-19, ya que por una parte elimina la fracción fenazínica y por otra, los dos únicos cromógenos aislados presentan unos espectros IR totalmente alterados *(figura 6)* que nos lleva a considerarlos como fracciones de nueva síntesis.

La estirpe L-29, no tratada con antibióticos, produce 5 fracciones *(figura 2R)* ya identificadas (1) como oxi-fenoxazonas (I, II, III), piocianina (V) y una fenoxazona no totalmente caracterizada IV *(figura 7)*.

De los mutantes resistentes a la tetraciclina sólo se aislaron 2 fracciones, la primera de las cuales se identificó como una fenoxazona modificada de una forma semejante a las fracciones I de la estirpe L-19 sometida al mismo tratamiento, y la segunda es un nuevo cromógeno de estructura química similar a las fracciones II y III de la L-19 tetraciclina-resistente *(figura 8)*.

La acción de la oxitetraciclina y clorotetraciclina sobre la síntesis de

Cuadro 1. Producción comparativa de los diferentes metabolitos cromó

Antibiótico	Estructura molecular de lo				
	Fenazinas			Fenoxazona	
	A	B	C	A	B
Ninguno	IV	Azul	Piocianina	I	Marrón
				II	Amarillo
				III	Marrón-rojizo
Tetraciclina (A)	V	Azul	Piocianina	II	Amarillo-verdoso
				III	Marrón
				IV	Rosa
Tetraciclina (M)	IV	Azul	Piocianina ligeramente modificada	I	Amarillo-verdoso
Doxiciclina (A)					
Ninguno	V	Azul	Piocianina con radicales diversos	I	Amarillo-verdoso
				II	Rosa
				III	Rosa-amarillento
				IV	Rosa
Tetraciclina (M)				I	Amarillo-verdoso
Oxitetraciclina (A)					
Clorotetraciclina (A)					

A = orden de aparición en la columna de sephadex. B = color de la fracción. C

ios de Ps. aeruginosa *en presencia o ausencia de antibióticos*

metabolitos cromógenos				Estirpe
	No identificados			
C	A	B	C	
-amino-3-oxi-				
-acetamido-3-oxi-				
-amino-3-oxi				
xi-fenoxazona modificada				
xi-fenoxazona modificada	I	Marrón-amarillento	Desconocida	
xi-fenoxazona modificada				L-19
xi-fenoxazona modificada	II	Marrón	Desconocida	
	III	Rosa	Desconocida	
	I	Amarillo	Desconocida	
	II	Amarillo claro	Desconocida	
xi-fenoxazona				
xi-fenoxazona				
xi-fenoxazona				
enoxazona no identificada				
Fenoxazona ligeramente modificada	II	Marrón-amarillento	Desconocida	L-29
	I	Marrón	Desconocida	
	II	Amarillo	Desconocida	
	I	Marrón	Desconocida	
	II	Amarillo	Desconocida	

= estructura química.

cromógenos fue idéntica, dando lugar a dos únicos cromógenos. La fracción I es muy semejante a la II aislada de la estirpe L-19 doxiciclín-resistente, como revela su espectro IR *(figura 9)*. Por su parte, la fracción II tiene una estructura molecular parecida a la fracción II de la misma estirpe tetraciclín-resistente.

En resumen, se puede señalar que la tetraciclina afecta ligeramente a la síntesis de fenazinas, mientras que lo hace de un modo más acentuado sobre la producción de fenoxazonas, como lo prueba: a) la desaparición de algunas de estas fracciones; b) las marcadas diferencias en sus espectros IR; c) el desplazamiento de algunas bandas, tales como la de 1.675 cm^{-1}, asignable a la vibración de valencia de grupo C = O amido y la situada a 1.380 cm^{-1}, que corresponde a la vibración de valencia y deformación simétrica de grupo —CH_3 de las acetamido-oxi-fenoxazonas; y d) la síntesis de fracciones nuevas, cuya identificación estamos llevando a cabo actualmente.

Los restantes derivados tetraciclínicos producen alteraciones aún más considerables en la biosíntesis de pigmentos, dando origen a unos espectros IR muy modificados, donde faltan algunas bandas muy características (2.950, 1.680, 1.420 y 990 cm^{-1}).

En todos los casos se pone de manifiesto una marcada alteración en el cromotipo de las estirpes tetraciclín-resistentes, con respecto a las sensibles, que depende del derivado tetraciclínico empleado y del tratamiento seguido.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos hacer patente nuestro reconocimiento a los Profs. A. Portolés y A. Hidalgo por su ayuda y consejos a lo largo de este trabajo. Asimismo, agradecemos a Pfizer, S. A. (España) la subvención parcial de esta investigación.

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia que pueden ejercer diversos derivados tetraciclínicos sobre la cromogénesis de estirpes patógenas de *Pseudomona aeruginosa.* A través de la separación cromatográfica sobre geles de sephadex y del estudio posterior, por espectroscopía IR, de las diversas fracciones obtenidas, se han encontrado alteracio-

nes cuali y cuantitativas de los diferentes metabolitos cromógenos sintetizados por estos mocroorganismos; ello demuestra que la síntesis de los mismos está influida, tanto por el tipo de tetraciclina usada —que puede afectar de diferente forma a los procesos metabólicos que conducen a la síntesis de tales cromógenos—, como por el procedimiento seguido para obtener la antibiótico-resistencia de los microorganismos.

SUMMARY

Study on the chromogenesis of Pseudomonas aeruginosa *in the presence of several tetracyclin-derivatives*

The present paper deals with the influence of severals tetracyclines on the chromogenesis of 2 pathogenic strains of *Pseudomonas aeruginosa.*

We have found variations in the number of fractions obtained from the antibiotic resistant strains by gel filtration on sephadex. In addition, the IR spectra of such fractions were dramatically changed, particularly those concerning to the phenoxazone molecules.

Our results suggest that the chromogenic metabolic pathways are influenced by both the tetracyclin derivatives that we have used and the procedure followed to get the antibiotic-resistance.

BIBLIOGRAFIA

1. ESPINOSA, M. 1969. Variabilidad de la cromogénesis en especies de *Pseudomonas.* Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid.
2. ESPINOSA, M.; PORTOLÉS, A., e HIDALGO, A. 1970. Chromogenesis variations in pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains concerning to the culture media. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg., Abt. 1, 125, 597-602.
3. NAVES, G. 1955. Contribution à l'étude de la pigmentation de *Pseudomonas fluorescens.* Thése, Faculté de Sciences, Université de Genève.
4. PÉREZ-UREÑA, M. T. 1966. La valoración de la antibiótico-resistencia de bacilos gram-negativos sometidos a interacciones antibacterianas de carácter sinérgico. Microbiol. Españ., 19, 299-319.
5. PORTOLÉS, A.; RAMOS, F., e HIDALGO, A. 1970. The action of antibiotics on carotenoid production by strains of *Sarcina lutea.* Z. Allg. Mikrobiol., 10, 501-7.

LABORATORIOS ALTER
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA

VALORACION DE POLIMIXINA CON *ESCHERICHIA COLI*

por

F. FERNÁNDEZ

INTRODUCCION

Las publicaciones oficiales (1 y 10-11) emplean la *Bordetella bronchiseptica* como organismo de ensayo para la valoración de polimixina por el método de difusión en agar. Otro germen que también se ha usado con el mismo fin ha sido la *Escherichia coli,* pero empleando técnicas por turbidez (2 y 12).

Nosotros, aprovechando que tenemos montado permanentemente en nuestro laboratorio, un procedimiento para valorar la vitamina B_{12} en placa con *Escherichia coli,* hemos probado a utilizar el mismo medio de ensayo para valorar la polimixina, pero empleando *E. coli* ATCC 10.536, que era el usado por otros autores en los ensayos por turbidez (2 y 12). El empleo de dicho germen tiene la ventaja de que su crecimiento sobre el medio reseñado no produce olor en absoluto; el olor desagradable sería un inconveniente si se utilizara un medio de tipo corriente.

La sensibilidad del método es menor que cuando se emplea la *Bordetella bronchiseptica,* pero resulta suficiente para las valoraciones rutinarias de polimixina que efectuamos en nuestro laboratorio.

En este trabajo presentamos el procedimiento llevado a cabo para obtener una curva patrón, junto con el análisis estadístico subsiguiente.

MATERIAL Y METODOS

El inóculo se prepara a partir de un cultivo sobre el medio A de la Farmacopea Británica ajustado a pH 7,0 (1). Después de incubar durante 18-24 h, a 32 °C, se arrastra el crecimiento con agua estéril y se diluye hasta obtener una transmisión del 25 %, en un spectronic 20, a 600 mμ. Esta suspensión es la que se emplea en la proporción del 0,4 % para la inoculación del medio de ensayo. La preparación de dicho medio puede verse en un trabajo de Harrison y colaboradores (9). Este medio se emplea en una sola capa y utilizamos placas grandes. El espesor de la capa de agar debe ser de 3-4 mm, calculando la cantidad de medio a emplear según la superficie de la placa. Los demás detalles técnicos en lo que se refiere a la confección de pocillos, etc., son análogos a los descritos en un trabajo publicado anteriormente (4).

El tampón utilizado para efectuar las diluciones fue de fosfatos 10 %, pH 6,0, habiéndose obtenido previamente una solución en agua de 10.000 μg/cm^3 como indica la Farmacopea de los Estados Unidos (11).

Para la curva patrón se emplearon 5 concentraciones en progresión geométrica, lo cual nos permite el uso de coeficientes polinomiales en el cálculo estadístico. En este caso, la relación entre las concentraciones fue de 1,6, siendo la más pequeña de 73,2 μg/cm^3, y la mayor, de 480 μg/cm^3.

El planteo utilizado para distribuir las distintas concentraciones en la placa fue en forma de cuadrado latino, con 5 lecturas para cada concentración.

La temperatura de incubación fue de 30 °C, durante un período de aproximadamente 18 h.

El crecimiento del germen en la placa fue perfectamente homogéneo y los halos de inhibición resultaron nítidos y de borde bien definido.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el *cuadro 1* pueden verse los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones.

Cuadro 1

Concentraciones, $\mu g/cm^3$	73,2	117,2	187,5	300	480
Logarismos de las concentraciones	1,8645	2,0690	2,2730	2,4741	2,6812
Coeficientes polinomiales	— 2	— 1	0	+ 1	+ 2
Resultados en milímetros	17,7	18,9	20,1	21,3	22,6
	17,9	19,2	20,0	21,2	22,4
	17,7	19,0	19,9	21,4	22,4
	17,7	19,0	20,0	21,3	22,7
	17,8	18,9	20,2	21,4	22,4
Totales	88,8	95,0	100,2	106,6	112,5
Medias	17,76	19,00	20,04	21,32	22,50

Como en otras ocasiones, vamos a emplear coeficientes polinomiales en vez de los logaritmos de las concentraciones.

Para el estudio estadístico de los resultados expuestos en el *cuadro 1*, nos servimos de las mismas fórmulas y procedimientos que en trabajos anteriores (3-8).

Cálculo de la línea de regresión

Debido a que empleamos coeficientes polinomiales, el coeficiente de regresión viene dado por la fórmula:

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

El valor calculado para b es de 1,180. Esto quiere decir que la ecuación para la línea de regresión será:

$$Z = \overline{Z} + 1{,}180\,X$$
$$Z = 20{,}124 + 1{,}180\,X$$

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

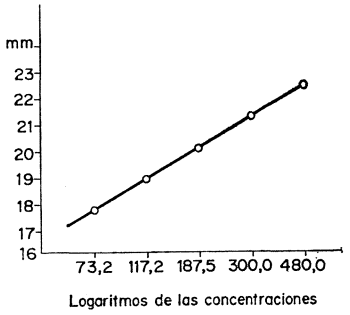


Figura 1

Análisis de la varianza

En el *cuadro 2* puede verse el análisis de varianza efectuado, teniendo en cuenta las fuentes de variación que se reseñan.

Cuadro 2

Fuente de variación	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Razón de la varianza (F)	
				Calcu-	P=0,95
Total	69,9256	24			
Entre concentraciones	69,6736	4	17,4148		
Regresión	69,6200	1	69,6200		4,35
Desviación de la linealidad	0,0536	3	0,0178	2,82	3,10
Error experimental	0,0126	20	0,0063		

Como puede verse, la regresión es altamente significativa, ya que el valor calculado para F es muy superior al valor tabulado. Por otro lado, no existe desviación significativa de la linealidad, ya que el valor calculado es menor que el valor tabulado.

Comentario final

Para las valoraciones rutinarias, utilizamos un ensayo del tipo 2 × 2, con las concentraciones de 100 y 400 $\mu g/cm^3$. En cada placa pueden incluirse varios problemas que se comparan simultáneamente con el mismo patrón. Para el cálculo de la potencia, prueba de paralelismo y obtención de los límites de error, seguimos las fórmulas e indicaciones de la Farmacopea Británica (1).

CONCLUSIONES

A la vista de lo anteriormente expuesto, puede valorarse la polimixina en placa con *Escherichia coli* ATCC 10.536, ya que:

1) El crecimiento del germen en las placas es perfectamente homogéneo.

2) Los halos de inhibición que se producen son nítidos, de borde bien definido y de tamaño apropiado.

3) La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas es lineal, dentro de límites convenientes.

RECONOCIMIENTO

Mi agradecimiento, en primer lugar, para la Dirección Técnica de Alter, S. A., por las facilidades dadas para la publicación de este trabajo. Agradezco también la colaboración entusiasta de la Srta. Marina López de Carrión, a cuyo cargo corrió la parte práctica de las experiencias realizadas.

RESUMEN

Se estudia la valoración microbiológica de polimixina con *Escherichia coli* ATCC 10.536, por el método de difusión en agar y mediante el empleo de pocillos. Las concentraciones utilizadas para la obtención de una curva patrón estaban comprendidas entre 73,2 $\mu g/cm^3$ y 480 $\mu g/cm^3$. Se produjeron halos de inhibición, nítidos, bien definidos y de tamaño apropiado. La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas fue lineal para las 5 concentraciones ensayadas. Se describe el estudio estadístico llevado a cabo que comprende el cálculo de la regresión y el análisis de varianza de los resultados obtenidos.

SUMMARY

Determination of polymyxin with Escherichia coli

The microbiological assay of polymyxin with *Escherichia coli* ATCC 10,536 is studied by the agar cup diffusion method. Clear, well defined inhibition zones of an appropiated size were obtained. The relationship between the logarithms of the concentrations and the responses was a linear one for the concentrations used. It is described the statistical analysis made, which includes the regression calculation and the variance analysis of the results obtained.

BIBLIOGRAFIA

1. British Pharmacopoeia. 1968. Biological assay of antibiotics, 1.313.
2. BOWMAN, F. W. 1957. Test organims for antibiotic microbial assays. Antibiot. Chemother., 7, 640.
3. FERNÁNDEZ, F. 1963. Valoración de formaldehído en placa de agar. Comunicaciones libres y a las ponencias de la II Convención Bienal de la Industria Farmacéutica Nacional, 140.
4. FERNÁNDEZ, F. 1964. Valoración de estreptomicina y derivados con *Bacillus licheniformis* Alter. Microbiol. Españ., 17, 209.
5. FERNÁNDEZ, F. 1966. Valoración de neomicina con *Bacillus licheniformis*. Microbiol. Españ., 19, 281.
6. FERNÁNDEZ, F. 1969. Valoración microbiológica de cloruro de benzalconio en placa de agar. Microbiol. Españ., 22, 169.
7. FERNÁNDEZ, F. 1970. Valoración de cloranfenicol con *Bacillus cereus*. Microbiol. Españ., 23, 107.
8. FERNÁNDEZ, F., y PIÑA, M. 1968. Valoración de ácido fusídico con *Bacillus licheniformis*. Microbiol. Españ., 21, 39.
9. HARRISON, E.; LEES, K. A., y WOOD, E. 1961. The assay of vitamin B_{12}. VI. Microbiological estimation with a mutant of *Escherichia coli* by the plate method. Analyst, 76, 696.
10. U. S. Food and Drug Administration. Compilation of regulations for certification of antibiotics drugs. 1962. Apartado 148, 1.
11. U. S. Pharmacopoeia. 1970. Biological tests and assays. Antibiotics microbiological assays, 857.
12. WINTERMERE, D. M.; EISENBERG, W. H., y KIRSHBAUM, A. 1957. Turbidimetric assay of tetracycline, chlortetracycline, chloramphenicol, neomycin and polymyxin using a single test organism. Antibiot. Chemother., 7, 190.

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

ANALISIS COMPARATIVO DE CLOROPLASTOS AISLADOS DE PLANTAS DE *BRASSICA CHINENSIS* SANAS E INFECTADAS CON EL VIRUS DEL MOSAICO AMARILLO DEL NABO

por

AMPARO VELA

INTRODUCCION

En los estudios citológicos realizados en plantas infectadas por el virus del Mosaico amarillo del nabo, se ha visto que el virus afecta preferentemente a los cloroplastos, ya que son los elementos celulares que resultan más alterados.

Rezende (8) pudo observar al microscopio óptico cambios estructurales en los cloroplastos de las regiones cloróticas de *Brassica chinensis*.

Rubio-Huertos (9-10) encontró y describió al microscopio óptico que los cuerpos de inclusión, formados en las hojas de *Brassica chinensis* infectadas por este virus, eran del tipo de cuerpos X, muy compactos, granulares y a veces vacuolados; solamente encontró estos cuerpos completamente desarrollados en los últimos estados de infección y consideró que estaban formados a partir de cloroplastos degenerados, describiendo su formación con todo detalle.

Chalcroft y Mattews (5), con material análogo, observaron al microscopio electrónico que, en las zonas cloroticas del huésped, los cloroplastos sufrían anormalidades muy acusadas, estando desintegrados completamente en las partes necrosadas.

Rubio-Huertos y colaboradores (11) observaron al microscopio electrónico la misma alteración gradual de los cloroplastos que Chalcroft y Mattews, y además, partículas de virus esféricos en disposición cristalina, tanto en el citoplasma como en las masas formadas por el citoplasma y los cloroplastos desintegrados.

Apoyándonos en estas conclusiones hemos considerado conveniente hacer un estudio químico comparativo en cloroplastos aislados de planta sana e infectada por este virus, esperando aclarar algún concepto referente a la relación entre el virus y los cloroplastos de la planta huésped.

MATERIAL Y METODOS

Hemos utilizado la estirpe Markham-Smith, del Mosaico amarillo del nabo (*).

Con esta estirpe inoculamos un lote de plantas de *Brassica chinensis* procedentes de semilla sanas que cultivamos en invernadero; mientras que otro lote de plantas sanas en idénticas condiciones de cultivo que las anteriores, ha sido utilizado para el estudio comparativo.

Obtención de los cloroplastos

Empleamos hojas de plantas sanas, y de las enfermas, solamente las que presentaban síntomas más acusados de infección, aproximadamente unos 30 días después de la inoculación. Después de lavadas y mantenidas en frigorífico durante 24 h, las trituramos añadiendo una solución isotónica con la célula formada por tampón tris 0,05 M y sacarosa 0,4 M, mezclados volumen a volumen. Después de filtrar a través de gasa se centrifugó el filtrado a 1.000 r/min durante 2-3 min, para eliminar las partes más gruesas. Posteriormente, centrifugamos, a 3.000 r/min durante 8 min, el líquido sobrenadante que contiene los cloroplastos en suspensión. El sedimento conteniendo los cloroplastos lo desecamos en estufa a 50 °C, hasta peso constante.

(*) La estirpe nos ha sido facilitada amablemente por el Dr. A. J. Gibbs, de la Rothamsted Experimental Station, de Harpenden, Herts (Inglaterra), a quien expresamos nuestro agradecimiento.

Análisis cromatográfico sobre papel

Empleamos los mismos métodos para la hidrólisis y determinación de los aminoácidos de la proteína en los cloroplastos procedentes de plantas enfermas y los de plantas sanas.

a) Precipitación de la proteína e hidrólisis posterior

Añadimos a los cloroplastos desecados cantidad suficiente de una disolución de ácido tricloroacético, para que la disolución final quede al 5 %. Al cabo de 12 h, a 4 °C, había precipitado la proteína, que a continuación separamos por centrifugación. Después de un lavado en serie con agua, alcohol, alcohol-éter y finalmente con éter, desecamos la proteína en estufa a 50 °C hasta peso constante.

Tomando 6,6 mg de esta proteína seca, la hidrolizamos en tubo cerrado con 6 ml de ClH 6N, calentado en estufa a 115 °C, durante 16 h. Evaporamos el líquido a sequedad en estufa a 60 °C y disolvemos el residuo en agua destilada, haciendo dos evaporaciones consecutivas para eliminar las trazas de ácido clorhídrico (el pH debe ser superior a 5, en otro caso hay que neutralizar con hidróxido amónico diluido y, finalmente, completar con agua destilada hasta 4 ml). Con esta solución hacemos el análisis cromatográfico.

b) Determinación cromatográfica de los aminoácidos de la proteína

Se hizo por cromatografía descendente, empleando papel whatman núm. 1.

1. *Determinación cualitativa.* Disolvente: butanol, 40; etanol, 10; ácido acético, 10, y agua, 20. Revelador: isatina al 0,2 % en acetona, secando en estufa saturada de humedad a 60 °C, durante 20 min (12).

2. *Determinación cuantitativa.* Disolvente: butanol, 40; etanol, 10; ácido acético, 10, y agua, 20. Revelador: solución de ninhidrina al 0,1 %, en isopropílico. Valoración: seguimos el método de Kay y colaboradores (6), midiendo la absorción de la luz a una longitud de onda de 575 mμ en un espectrofotómetro de Beckman, modelo B.

Determinación de nitrógeno

Empleamos el micrométodo de Kjeldahl (13).

Determinación de fósforo

La técnica seguida ha sido la de Briggs (4).

Determinación de clorofila

Nos hemos basado en la técnica de Arnon (1).

RESULTADOS

En las *figuras 1-2* pueden observarse los aminoácidos de la proteína hidrolizada de los cloroplastos de planta sana y enferma. Cualitativamente son los mismos para ambas y los aminoácidos identificados han sido los siguientes: lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, ácido glutámico, treonina, alanina, serina, glicocola, arginina, ácido aspártico, fenilalanina, histidina y tirosina. No obstante, en la determinación cuantitativa hemos podido comprobar comparativamente que, en general, hay un descenso en el contenido en aminoácidos de planta enferma, siendo más acusado en el caso del ácido glutámico-treonina. Excepción es la alanina, pues los valores encontrados en plantas enfermas son mayores que los observados en plantas sanas *(cuadro 1)*.

Cuadro 1

Aminoácidos	Cloroplastos de planta sana/proteina mg, %	Cloroplastos de planta enferma/proteina mg, %
Lisina	1,742	1,060
Leucina-isoleucina	4,030	2,484
Valina-metionina	4,712	2,424
Glutamico-treonina	5,848	0,393
Alanina	0,533	3,227
Serina-glicocola	3,833	3,363
Arginina	2,272	1,878
Aspártico	2,818	1,681
Fenilalanina	1,606	1,272
Histidina	2,015	1,606
Tirosina	1,000	0,727

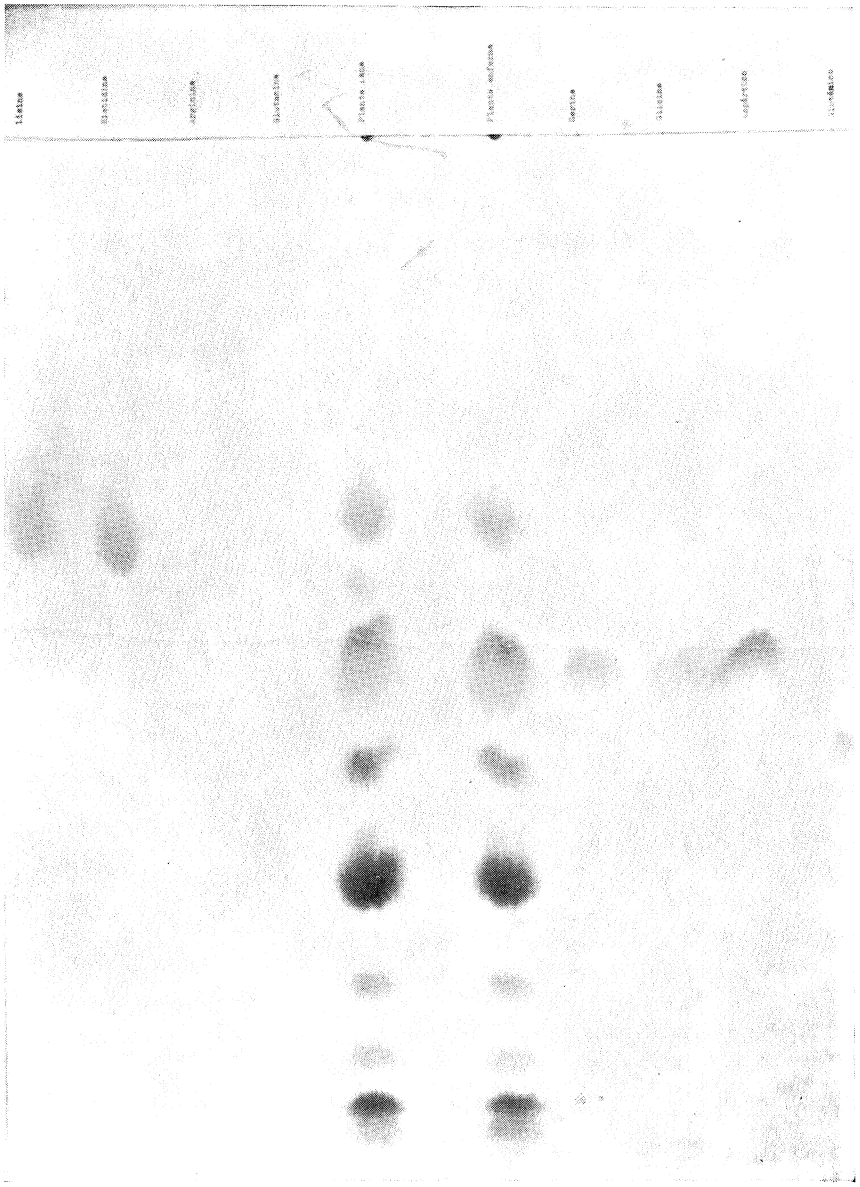


Figura 1. Cromatograma mostrando parte de los aminoácidos componentes de la proteína de los cloroplastos del tejido laminar de B. chinensis *sana e infectada por el Mosaico amarillo de la* Brassica

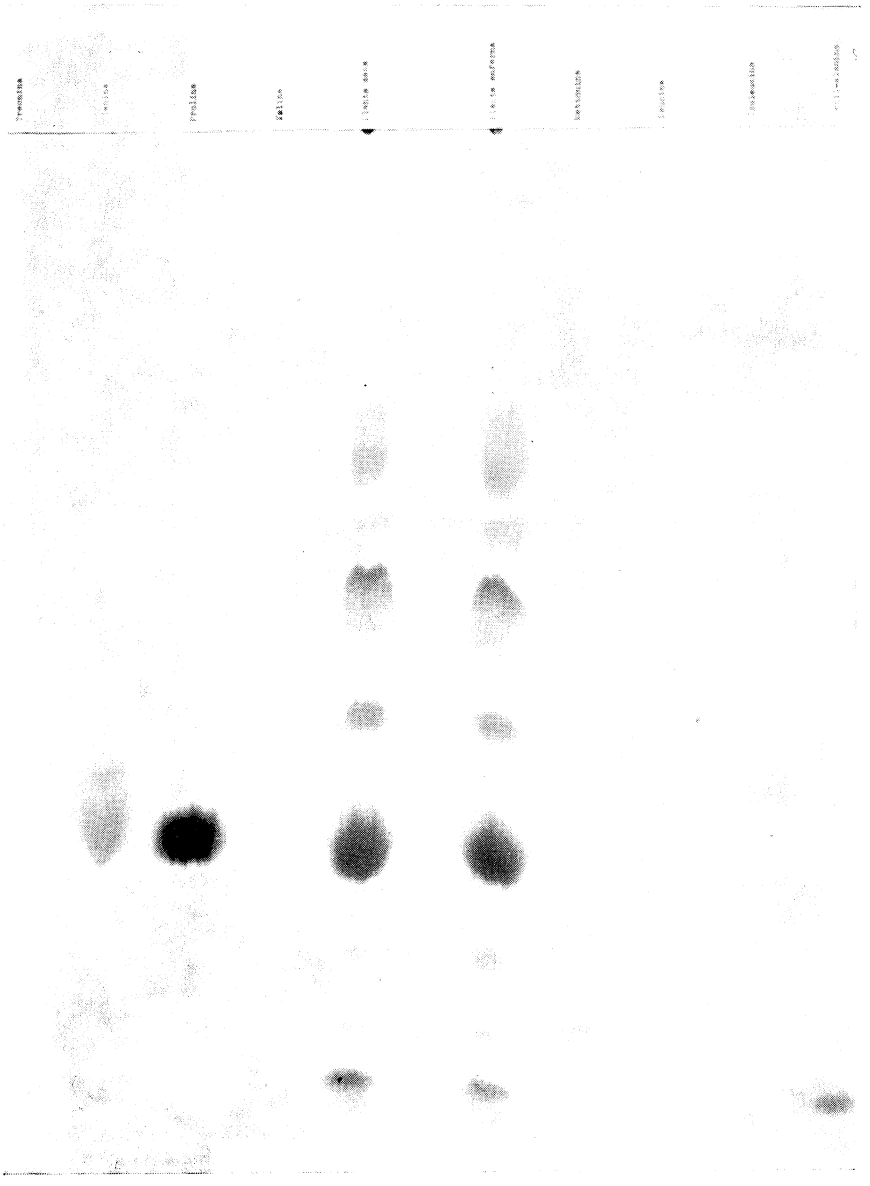


Figura 2. Cromatograma en el que se puede observar el resto de los aminoácidos identificados

El contenido de clorofila en planta sana fue de 7 mg % y en planta enferma 4,3 mg %; para el fósforo, de 0,533 mg % en planta sana, y de 0,566 mg % en planta enferma. En cuanto al nitrógeno total, en los cloroplastos de planta sana fue 6,24 mg %, y en planta enferma, 6,23 mg %. Estos valores encontrados están referidos a tanto por ciento de peso seco y quedan reflejados en el *cuadro 2*.

Cuadro 2

Material	P/cloroplastos desecados mg, %	N/cloroplastos desecados mg, %	Clorofila/ cloroplastos desecados mg, %
Cloroplastos de planta sana	0,533	6,24	7,0
Cloroplastos de planta enferma	0,566	6,23	4,3

DISCUSION

Encontramos que, fundamentalmente, no existen diferencias especiales desde el punto de vista cualitativo entre los aminoácidos de cloroplastos procedentes de hojas sanas y los de las infectadas por el virus. No obstante, en la determinación cuantitativa hemos podido comprobar cómo en plantas enfermas hay un descenso de todos los aminoácidos, salvo la alanina, que se encuentra en mayor cantidad que en planta sana.

Borges y Beato (3) observaron un incremento variable en el nitrógeno total en hojas infectadas por este virus en comparación con el de hojas sanas. Aunque nosotros no hemos observado diferencia alguna entre el nitrógeno total contenido en cloroplastos sanos y enfermos, no descartamos la posibilidad de que el aumento de alanina en los cloroplastos enfermos sea debido a ciertos cambios metabólicos producidos en el huésped por acción del virus y que sea una de las causas que contribuyen a la alteración estructural observada al microscopio electrónico.

Investigaciones realizadas por Matthews y colaboradores (7) sobre el contenido de fósforo en hojas de *Brassica chinensis* durante el período de multiplicación del virus aquí estudiado, han dado como resultado que

el peso del fósforo total y el etanol soluble permanecía totalmente constante. Tampoco hemos podido observar diferencia alguna entre cloroplastos sanos y enfermos, pues la diferencia observada en los resultados no es significativa.

Respecto al contenido en clorofila, por los valores finalmente obtenidos, hay una pérdida bastante manifiesta en los cloroplastos procedentes de planta enferma, debido a la clorosis observada en su sintomatología externa y producidos por la destrucción de los cloroplastos durante la infección.

Como Rubio-Huertos (9) observó al microscopio óptico que los cuerpos de inclusión de este virus eran formados a partir de los cloroplastos desintegrados y que a medida que estos cloroplastos eran más afectados por el virus, las masas resultantes se teñían con floxina, puede ocurrir que: 1.º) al no haber alteración respecto al contenido en nitrógeno y fósforo, pero sí un descenso en aminoácidos y un aumento de clorofila, el colorante quede interferido por la clorofila, puesto que la coloración por la floxina de los cloroplastos más o menos alterados coincide con la disminución de clorofila en los tejidos; 2.º) la alteración esté influida por el descenso de los aminoácidos; ó 3.º) la acción sea ejercida sobre otros elementos celulares que nosotros no hemos determinado, especialmente los fosfolípidos constituyentes de las membranas externas de los cloroplastos, que en las plantas enfermas presentan alteraciones morfológicas, consistentes en la aparición de vacuolas o vesículas a lo largo de la membrana seguida por la fragmentación de los cloroplastos y su destrucción.

RESUMEN

Se estudian comparativamente los cloroplastos aislados de plantas sanas de *Brassica chinensis* y de las infectadas por el Mosaico amarillo del nabo. Por análisis cromatográfico cualitativo no hemos observado diferencia alguna entre los aminoácidos proteicos contenidos en cloroplastos de plantas sanas y enfermas. Cuantitativamente existe un descenso de todos los aminoácidos en plantas enfermas, salvo la alanina, que se encuentra en mayor cantidad que en los cloroplastos de planta sana. No hemos observado diferencias apreciables respecto al contenido en nitrógeno y fósforo totales, pero sí ha sido bastante más elevado el valor obtenido de clorofila en los cloroplastos de plantas sanas.

SUMMARY

Comparative studies of isolated chloroplasts from healthy and turnip yellow mosaic virus infected Brassica chinensis

Isolated chloroplasts from healthy and turnip yellow mosaic virus infected *Brassica chinensis* plants had been analyzed for aminoacids, chlorophyll and N and P contents.

No qualitative differences in aminoacids have been found between chloroplasts from healthy and diseases plants, but a decrease in aminoacid contents has been found in chloroplasts from infected plants. On the contrary alanine was increased in chloroplasts from infected material.

Chlorophyl content was higher in chloroplasts from healthy plants. No differences were found in N and P contents.

BIBLIOGRAFIA

1. ARNON, D. I. 1949. Cupper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 1.
2. BLOCK, R. J. 1950. Estimation of aminoacids and amines on paper chromatograms. Anal. Chem., 22, 1.327.
3. BORGES, M. L. V., y BEATO, M. J. 1953. Determinacôes de azoto em *Brassica chinensis* L infectada com o virus do Mosaico amarelo do nabo. Broteria, 22, 149.
4. BRIGGS, A. P. 1922. A modification of the Bell-Doisy phosphate method. J. Biol. Chem., 53, 13.
5. CHALCROFT, J., y MATTHEWS, R. E. F. 1966. Cytological changes induced by turnip yellow mosaic virus in chinese cabbage leaves. Virology, 28, 555.
6. KAY, R.; HARRIS, J., y ENTENMAN, C. 1956. Quantification of the ninhidrin color reaction as applied to paper chromatography. Arch. Biochem. Biophys., 63, 14.
7. MATTHEWS, R. E. F.; BOLTON, E. T., y THOMPSON, H. R. 1963. Kinetics of labelling of turnip yellow mosaic virus with P^{32} and S^{35}. Virology, 19, 179.
8. REZENDE, M. C., y BORGES, M. L. V. 1952. L'action pathologique du virus de la mosaïque jaune du navet sur les chloroplasts de *Brassica chinensis*. Agron. Lusitana, 14, 259.

9. RUBIO-HUERTOS, M. 1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares, producidas por virus, en las plantas. Microbiol. Españ., 3, 207.
10. RUBIO-HUERTOS, M. 1956. Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. Phytopathology, 46, 553.
11. RUBIO-HUERTOS, M.; VELA, A., y LÓPEZ-ABELLA, D. 1967. Crystalline arrays of spherical particles in turnip yellow mosaic virus infected cells. Virology, 32, 438.
12. SMITH, J. 1953. Color reaction on paper chromatograms by a dipping technique. Nature, 171, 43.
13. TACHER, C. H. 1945. Manual de Análisis Orgánico Cualitativo y Cuantitativo, 257.

LABORATORIOS ALTER
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA

VALORACION DE ERITROMICINA CON *BACILLUS LICHENIFORMIS*

por

F. FERNÁNDEZ

INTRODUCCION

El germen más utilizado para la valoración microbiológica de la eritromicina es la *Sarcina lutea* (6-9). También se emplea el *Bacillus pumilus* (1) y el *B. subtilis* (5).

Desde hace años manejamos en nuestro laboratorio una raza de *Bacillus licheniformis* aislada e identificada por nosotros y que nos da un resultado excelente para valorar diversos antibióticos, habiendo sido esto objeto de varias publicaciones (2-4).

Al ensayar dicho organismo frente a la eritromicina, pudimos observar que daba lugar a magníficos halos de inhibición, con una sensibilidad suficiente como para que pudiera emplearse en la valoración de dicho antibiótico por el método de difusión en agar.

En este trabajo presentamos el procedimiento llevado a cabo para obtener una curva patrón, junto con el estudio estadístico subsiguiente.

MATERIAL Y METODOS

El inóculo se prepara a partir de una suspensión de esporas. Dicha suspensión puede obtenerse por el procedimiento que se indica en un trabajo anterior (2), y la cantidad que se añade al medio de ensayo se averigua la primera vez mediante tanteo y esto sirve de orientación para todas las veces que se usa la misma suspensión. El medio de ensayo es el medio A de la Farmacopea Británica (1), ajustado a pH 7,8 y se uti-

liza en una sola capa. El tampón empleado para efectuar las diluciones fue de fosfatos 0,1 M, pH 7,9-8,0 habiéndose obtenido previamente una solución en metanol de 10 $\mu g/cm^3$, como indica la Farmacopea de los Estados Unidos (9). El espesor de la capa de agar debe ser de 3-4 mm, calculando la cantidad de medio a emplear según la superficie de la placa. Los demás detalles técnicos en lo que se refiere al empleo de placas grandes, confección de pocillos, etc., son análogos a los descritos en un trabajo publicado anteriormente (2).

Para la curva patrón se emplearon 5 concentraciones diferentes, en progresión geométrica, lo cual nos permite el empleo de coeficientes polinomiales en el cálculo estadístico. En este caso, la relación entre las concentraciones fue de 1,6, siendo la más pequeña de 1,221 $\mu g/cm^3$ y la mayor de 8,0 $\mu g/cm^3$.

El planteo utilizado para distribuir dichas concentraciones fue en forma de cuadrado latino, con 5 lecturas para cada concentración.

La temperatura de incubación fue la de 32 °C, durante un período de, aproximadamente, 18 h.

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

RESULTADOS Y DISCUSION

En el *cuadro 1* pueden verse los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones.

Cuadro 1

Concentraciones, $\mu g/cm^3$	1,221	1,953	3,125	5,000	8,000
Logaritmos de las concentraciones	0,0867	0,2908	0,4949	0,6990	0,9031
Coeficientes polinomiales	— 2	— 1	0	+ 1	+ 2
Resultados en milímetros	19,0	20,4	22,6	24,8	26,2
	18,5	21,0	22,1	24,5	26,8
	18,0	20,4	22,7	24,1	26,8
	18,2	20,5	22,2	24,0	26,5
	18,1	20,4	22,2	24,5	26,6
Totales	91,8	102,7	111,8	121,9	132,8
Medias	18,36	20,54	22,36	24,38	26,56

Como en otras ocasiones, vamos a emplear coeficientes polinomiales en vez de los logaritmos de las concentraciones.

Para el estudio estadístico de los resultados expuestos en el *cuadro 1* nos servimos de las fórmulas y procedimientos que pueden verse en una publicación anterior (2).

Cálculo de la línea de regresión

Debido a que empleamos coeficientes polinomiales, el coeficiente de regresión viene dado por la fórmula

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

El valor calculado para b es de 2,024. Esto quiere decir que la ecuación para la línea de regresión será:

$$Z = \overline{Z} + 2{,}024X$$
$$Z = 22{,}44 + 2{,}024X$$

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

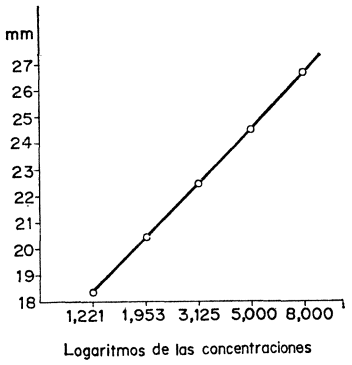


Figura 1

Análisis de la varianza

En el *cuadro 2* puede verse el análisis de varianza efectuado, teniendo en cuenta las fuentes de variación que se reseñan.

Cuadro 2

Fuentes de variación	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Razón de la varianza (F)	
				Calculada	P=0,95
Total	206,9000	24			
Entre concentraciones	205,0040	4	51,2504		
Regresión	204,8285	1	204,8285	2.160,63	4,35
Desviación de la linealidad	0,1755	3	0,0585	0,617	3,10
Error experimental	1,8960	20	0,0948		

Como puede observarse, la regresión es altamente significativa, ya que el valor calculado para F es muy superior al valor que se encuentra en las tablas. También se ve que no existe desviación significativa en la linealidad, ya que el valor calculado es menor que el tabulado. Como el valor de F para la desviación de la linealidad es de 0,617 y en las tablas para F no se encuentran valores menores a la unidad, tomamos el valor inverso que es 1,62 para el que corresponde un valor tabulado de 5,70. Esto quiere decir que aunque las variaciones encontradas para la linealidad son menores que las que podrían esperarse del error experimental, no lo son tanto que ello deba atribuirse a defecto en la técnica del ensayo.

Comentario final

Para las valoraciones rutinarias puede emplearse un ensayo de 2 × 2 con las concentraciones de 2 y 4 $\mu g/cm^3$. En cada placa pueden incluirse varios problemas, que se comparan simultáneamente con el mismo patrón. Para el cálculo de la potencia, prueba de paralelismo y obtención de los límites de error, seguimos las fórmulas en indicaciones de la Farmacopea Británica.

CONCLUSIONES

A la vista de lo anteriormente expuesto, puede valorarse la eritromicina con el *Bacillus licheniformis* Alter, ya que:

1) El crecimiento del germen en las placas es perfectamente homogéneo.

2) Los halos de inhibición que se producen son nítidos, de borde bien definido y de tamaño apropiado.

3) La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas es lineal dentro de límites convenientes.

RECONOCIMIENTO

Mi agradecimiento en primer lugar a la Dirección Técnica de Alter, S. A., por las facilidades dadas para la publicación de este trabajo. Agradezco también la colaboración entusiasta de la Srta. Marina López de Carrión, a cuyo cargo corrió la parte práctica de las experiencias realizadas.

RESUMEN

Se estudia la valoración microbiológica de eritromicina con *Bacillus licheniformis* Alter, por el método de difusión en agar y mediante el empleo de pocillos. Las concentraciones utilizadas para la obtención de una curva patrón, estaban comprendidas entre 1,221 $\mu g/cm^3$ y 8,0 $\mu g/cm^3$. Se produjeron halos de inhibición nítidos, bien definidos y de tamaño apropiado. La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas fue lineal para las 5 concentraciones ensayadas. Se describe el análisis estadístico llevado a cabo, que comprende el cálculo de la regresión y el análisis de varianza de los resultados obtenidos.

SUMMARY

Determination of erythromycin with Bacillus licheniformis

The microbiological assay of erythromycin with *Bacillus licheniformis* Alter, is studied by the agar cup diffusion method. Clear, well defined inhibition zones of an appropiated size were obtained. The relatioship between the logarithms of the concentrations and the responses was a linear one for the concentrations between 1,221 $\mu g/cm^3$ and 8,0 $\mu g/cm^3$. It is described the statistical analysis made, which includes the regression calculation and the variance analysis of the results obtained.

BIBLIOGRAFIA

1. British Pharmacopoeia. 1968. Biological assay of antibiotics, 1.313.
2. FERNÁNDEZ, F. 1964. Valoración de estreptomicina y derivados con *Bacillus licheniformis* Alter. Microbiol. Espań., 17, 209.
3. FERNÁNDEZ, F. 1966. Valoración de neomicina con *Bacillus licheniformis*. Microbiol. Espań., 19, 281.
4. FERNÁNDEZ, F., y PIÑA, M. 1968. Valoración de ácido fusídico con *Bacillus licheniformis*. Microbiol. Espań., 21, 39.
5. HIGGES, C. E.; PITTENGER, R. C., y MCQUIRE, J. M. 1953. Microbiologic assay procedures for ilotycin. Antibiot. Chemother., 3, 50.
6. KAVANAGH, F. 1963. Analytical Microbiology. Academic Press, Nueva York-Londres.
7. KIRSHBAUM, A.; BOWMAN, F. W., y FRIEDMAN, E. R. 1953. A cup plate method for determination of erythromycin in serum and other body fluids. Antibiot. Chemother., 3, 537.
8. U. S. Food and Drug Administration. Compilation of regulations for certification of antibiotic drugs. 1962. Apartado 148, 1.
9. U. S. Pharmacopoeia. 1970. Biological tests and assays. Antibiotics microbiological assays, 845.

BIBLIOGRAFIA

TECNICAS, ANALISIS Y CONTROLES EN MICROBIOLOGIA, por *E. Gastón de Iriarte.* 1971. Editorial Augusta, S. A., Barcelona. XVI + 576 páginas y numerosas ilustraciones.

En este manual se presentan, de manera clara y didáctica, todos aquellos métodos que con mayor frecuencia pueden ser utilizados en laboratorios que se ocupan de problemas microbiológicos, tanto a nivel de formación universitaria como de especialización industrial, sanitaria o ecológica.

La orientación dada en los distintos capítulos de la obra señala el propósito de documentar al lector, en cuanto al aspecto general de su utilización, acerca del material, medios de cultivo, técnicas de aislamiento e inoculación de los microorganismos para, seguidamente, dedicarse al estudio de las reacciones bioquímicas. Una buena parte del libro está dedicada a orientar en la práctica de diversas especializaciones microbiológicas, tanto de interés sanitario como industrial y agropecuario; se incluyen técnicas aplicables al control del aire, aguas de bebida y residuales, alimentos, productos biológicos, etc., y también al de estudios microbiológicos en agua marina y del suelo. Asimismo, el libro se completa, en cuanto a su aplicación sanitaria, con los capítulos dedicados a determinaciones hematológicas, análisis clínicos, inmunoterapia y técnicas en virología.

Consideramos que este libro, "Técnicas, análisis y controles en Microbiología", es un fiel reflejo del perfecto conocimiento que el Prof. Gastón de Iriarte posee de los problemas microbiológicos, y estamos seguros de que, por su fácil manejo, se convertirá en una habitual obra de consulta para aquellos interesados en practicar la Microbiología.

A. PORTOLÉS

VIRUSHEPATITIS. AKTUELLE PROBLEME ZU ÄTIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE, SCREENING, KLINIK UND NACHSORGE. Director: *C. Wagenknecht.* 1970. Berlin: Volk und Gesundheit. 436 páginas y 81 figuras.

Recoge los resultados del Primer Simposio de la Comisión de Trabajo e Investigación sobre hepatitis vírica, celebrado en Karl-Marx-Stadt, durante los días 5-6 de febrero de 1970, bajo la dirección científica del Dr. C. Wagenknecht.

El texto destaca, en su Introducción, la importancia de la hepatitis vírica en la mayor parte de los países europeos, que alcanza una morbilidad, sólo en las formas clínicas manifiestas, de 20-30/10.000 habitantes en la República Democrática Alemana.

El Simposio trató los problemas de esta afección en cuatro temas generales: Etiología, Modernos Métodos Epidemiológicos, Cursos Clínicos de las hepatitis anictéricas y Epidemiología. Cada tema va seguido de una discusión y se hace un resumen general del tema sobre la etiología, en el que se señala el problema actual sobre el denominado antígeno-SH-Australia, que ofrece excelentes posibilidades para mejorar en forma decisiva el control de la hepatitis sérica. En los métodos epidemiológicos se describen, con pruebas enzimáticas, las cadenas de infección anictéricas y sus interrupciones. La investigación para caracterizar los estadios del curso de la hepatitis se hace por medio de la correlación de parámetros esenciales. En la epidemiología, describe el desarrollo de la morbilidad en la República Democrática de Alemania en comparación con otros países.

Las discusiones de los treinta y cuatro trabajos que componen el texto y la presencia de investigadores y clínicos de diferentes países permitieron un intercambio de ideas y experiencias, a nivel internacional, que prestan notable interés al Simposio y a la publicación de referencia.

M. RODRÍGUEZ-REBOLLO

Depósito legal: M. 702 - 1968.

Artes Gráf. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid