
VOLUMEN 25. 1972

ABRIL - JUNIO. NUMERO 2

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, Prof. Agustín Pumarola, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó y Dr. Gonzalo Sierra.

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 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 |
|--|--------|
| Inhibición de la síntesis del virus polio por el indol-3-acético, a nivel celular, por <i>A. García Gancedo, Sacramento Rico y Pilar Vilas</i> | 69 |
| La fermentación del pimiento empleado en el relleno de aceitunas verdes, por <i>F. González-Cancho, M. I. Mínguez-Mosquera y M. J. Fernández-Díez</i> | 81 |
| Microscopía electrónica de los lipopolisacáridos de la <i>Erwinia carotovora</i> y de las formas normal y L del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , por <i>M. Santaolalla y M.^a Dolores Esplá</i> | 91 |
| Estudios sobre fijación del nitrógeno por <i>Azotobacter chroococcum</i> , por <i>A. H. El-Refai, M. A. El-Sayed y T. A. Mohamed</i> . | 105 |
| Análisis genético del equilibrio entre individuos segregadores y no segregadores de glutamato en las poblaciones de <i>C. intermedium C₃</i> , por <i>J. Guinea, S. Hernández y R. Parés</i> | 117 |
| Características sintomatológicas, morfológicas y ultraestructurales de una raza del virus Mosaico de la alfalfa encontrada en España, por <i>J. R. Díaz-Ruiz y R. Moreno</i> | 125 |
| Cursos de Virología y de Microbiología de los Alimentos | 141 |
| Próximos simposios | 141 |
| IV Congreso Nacional de Microbiología | 142 |
| Advertencia | 142 |
| Bibliografía, por <i>L. Vilas</i> | 143 |

CONTENTS

| | Page |
|--|------|
| Inhibition of polio virus synthesis by indole-3-acetic acid, by <i>A. García-Gancedo, Sacramento Rico and Pilar Vilas</i> | 69 |
| Fermentation of red pepper used for stuffing green olives, by <i>F. González-Cancho, M. I. Mínguez-Mosquera and M. J. Fernández-Díez</i> | 81 |
| Electron microscopy of lipopolysaccharides from <i>Erwinia carotovora</i> and the bacillary and L forms of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , by <i>M. Santaolalla and M.^a Dolores Esplá</i> | 91 |
| Studies on nitrogen fixation of <i>Azotobacter chroococcum</i> , by <i>A. H. El-Refai, M. A. El-Sayed and T. A. Mohamed</i> | 105 |
| Equilibrium state between segregators and non segregators cells in the <i>C. intermedium C₃</i> populations, by <i>J. Guinea, S. Hernández and R. Parés</i> | 117 |
| Some characteristics of alfalfa mosaic virus (AMV) Spanish strain, by <i>J. R. Díaz-Ruiz and R. Moreno</i> | 125 |
| Courses on Virology and Food Microbiology | 141 |
| Next symposia | 141 |
| IV National Congress of Microbiology | 142 |
| Notice | 142 |
| Bibliography, by <i>L. Vilas</i> | 143 |

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

INHIBICION DE LA SINTESIS DEL VIRUS POLIO, POR EL INDOL-3-ACETICO, A NIVEL CELULAR

por

A. GARCIA-GANCEDO, SACRAMENTO RICO y PILAR VILAS

INTRODUCCION

El indol-3-acético (IA) es una fitohormona o auxina que se sintetiza en ciertos tejidos vegetales, principalmente meristemos, y que regula diferentes actividades biológicas de las plantas. Existe una extensa bibliografía que demuestra que las hormonas en vegetales, insectos y mamíferos, inducen sus efectos a través del control del metabolismo de los ácidos nucleicos. Parece ser que activan determinados centros genéticos dirigiendo la producción de ARN y la síntesis de las enzimas.

Limaset y Cormet (10) achacan a la alta concentración de auxina existente en los meristemos de las plantas, la rara presencia del virus del mosaico en este tejido cuando la planta se halla infectada. Según Silberger y Skoog (15), esta sustancia es capaz de provocar una disminución en la cantidad de ácidos nucleicos y para Louis (11) el IA reduce fuertemente el número de mitosis celulares y así todo ello podría repercutir negativamente en la multiplicación de las partículas víricas infectivas.

Todo esto, unido a otros datos y consideraciones, indica que el IA ejerce una actividad biológica indudable y por ello, directa o indirectamente puede actuar sobre la síntesis vírica.

MATERIALES Y METODOS

Virus

Polio tipo 1 (Mahoney), polio tipo 3 (Saukett); mantenidos en este Departamento a través de pases en células HeLa. Herpes simplex, cepa LF aislada por el Dr. E. Gallardo, que ha sufrido 17 pases en cerebro de conejo y mantenida posteriormente en pases de células HeLa. Vacunal procedente de linfa vacunal de ternera, adaptado a células HeLa.

Sustancia

El IA (E. Merck. Ag. Darmstad), se utiliza disuelto en medio de mantenimiento, ajustado a pH 7,2 con bicarbonato sódico estéril al 2,8 %.

Medios de cultivo

El medio de mantenimiento empleado en todos los experimentos está formado por 0,1 % de extracto de levadura, 0,5 % de hidrolizado de lactoalbúmina, solución de Hanks a la que se le adiciona 5 % de suero de ternera. El medio de multiplicación celular tiene los mismos componentes, pero el suero de ternera va incorporado en la proporción de 10 %. Todos los medios llevan 100 UI/cm³ de penicilina G, 100 µg/cm³ de sulfato de estreptomina y 20 UI/cm³ de nistatina. Ambos medios se han ajustado a pH 7,2 con bicarbonato sódico estéril al 2,8 %.

Métodos generales de cultivo y titulación del virus

Células HeLa en monocapa, cultivadas en tubos de ensayo, se lavan dos veces con solución tamponada de Hanks, con el fin de eliminar totalmente el suero del medio de cultivo que podría interferir con la adsorción del virus. Se infectan las células con el virus resuspendido en caldo común y manteniéndoles en contacto durante el período de adsorción. Pasado este período, se retira el virus no adsorbido y se lava nuevamente la monocapa celular. Se agrega 1 cm³ de medio de mantenimiento a cada tubo y se colocan en estufa a 37 °C. Las lecturas se realizan cada 24 h, observándose los efectos citopáticos (ECP).

Para los experimentos de titulación del virus, se recoge el virus intra-

celular y el extracelular. Rompiéndose las células infectadas mediante congelaciones y descongelaciones sucesivas (3 veces) se libera el virus intracelular. La totalidad del virus se conserva a 4 °C hasta el momento de su titulación, que se realiza lo antes posible. El título se calcula por el método de Reed y Muench (14) y se expresa en CCDI/50 (cultivo celular dosis infectiva 50 %). Debe tenerse en cuenta que se ponen en contacto 0,2 cm³ de las suspensiones de virus con las células de cada tubo de cultivo, con el fin de que toda la monocapa celular quede cubierta. Por tanto, el título se refiere a 0,2 cm³ de suspensión de virus/tubo. En los experimentos realizados con los virus herpes y vacunal, la titulación se realiza en membrana corio-alantoidea (MCA) de embrión de pollo, inoculando sobre esta membrana en grupos de 5 embriones de 12 días de edad, 0,2 cm³ de la dilución a titular; a las 48 h se extraen las membranas y se hace la lectura del número de lesiones específicas producidas por el virus, calculándose el título.

RESULTADOS

Determinación previa de la posible actividad antivírica del IA

Se realizaron experimentos que consistían en hacer dos titulaciones, paralelas y simultáneas, de virus polio 1 sobre células HeLa, incorporando al medio de cultivo celular de una serie la sustancia a la dosis adecuada no tóxica para las células (500 µg/cm³ y tubo) y dejando la otra serie con el medio normal de mantenimiento. A esta dosis las células no presentan ECP inespecíficos, ni anomalías estructurales, y además soportan la multiplicación normal de los virus herpes simplex y vacunal como se muestra más adelante, lo que indica que el IA no ha producido alteraciones serias en los cultivos. Si existen diferencias significativas en el título de virus entre las dos series, serán debidas a la acción de la sustancia. En el *cuadro 1* se exponen los resultados obtenidos y muestran una diferencia, claramente significativa, de 4 logaritmos en las diluciones a las que aparecen ECP como resultado del tratamiento de las células después de la infección.

Cuadro 1. Inhibición de ECP inducidos por el virus polio en células HeLa, mediante tratamiento posterior con IA de las células infectadas

| Virus polio 1 | Diluciones de virus | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁹ |
| Células infectadas y tratadas | 4 | 2 | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Células infectadas y sin tratar | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 |

4 = 100 % de células con ECP; 3 = 75 %; 2 = 50 %; 1 = 25 %; ± = escasos efectos; 0 = sin ECP. Lectura a los 5 días de inoculación. Dosis de IA constante: 500 µg/cm³ y tubo.

Con el fin de conocer la posible acción de la sustancia, previa a la infección, que se llevaría a cabo fundamentalmente sobre los receptores celulares específicos, en otro experimento, se puso en contacto la sustancia, diluida en medio de mantenimiento, con las células HeLa en cultivo, eliminándose aquélla después de media hora, mediante lavado; realizándose después la infección de los cultivos de la forma descrita anteriormente. Una serie paralela de tubos con cultivo de células se somete a las mismas manipulaciones, pero sustituyendo la dilución de la sustancia por el medio de mantenimiento. En el *cuadro 2* se presentan los resultados obtenidos, no encontrándose diferencias significativas entre la aparición de los ECP de las dos series, tanto en la tratada como en la no tratada.

Cuadro 2. Tratamiento previo a la infección de las células HeLa mediante IA

| Polio 1 | Diluciones del virus | | |
|--------------------|----------------------|------------------|------------------|
| | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ |
| Células tratadas | 3 | 1 | ± |
| Células sin tratar | 4 | 1 | ± |

Dosis de IA constante: 500 µg/cm³ y tubo. Lectura de los ECP a las 48 h.

Determinación de la posible actividad viricida del IA directamente sobre el virus polio 1

Es importante determinar si existe acción viricida directa sobre el virus al medio (al mezclarse a éste la sustancia), al ser liberado aquél por las células, lo cual se reflejaría en una disminución del título final del virus obtenido, que podría achacarse injustificadamente a una acción virostática en los experimentos de este tipo. El experimento correspondiente se llevó a cabo mezclando una suspensión de virus con la sustancia diluida en medio de mantenimiento y simultáneamente la misma suspensión de virus con medio de mantenimiento sin sustancia, y se colocó a 4 °C con agitación frecuente. A diferentes períodos de tiempo de contacto se toman muestras de ambas mezclas y se titulan sobre células HeLa, con el fin de observar la disminución del virus si lo hubiese, en la mezcla virus-IA con respecto a la mezcla virus-medio de mantenimiento.

Los resultados obtenidos, que se exponen en el *cuadro 3*, indican que no se produce efecto viricida inducido por el IA, ya que no se observan diferencias significativas entre ambas series de titulaciones, a los mismos intervalos de tiempo de contacto.

Cuadro 3. Ensayo para determinar si hay inactivación del virus a 4 °C por contacto directo con el IA

| | Horas de contacto | | | | | |
|--------------|-------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 24 |
| Polio 1 + IA | $10^{-6,2}$ | 10^{-5} | $10^{-4,7}$ | $10^{-4,5}$ | $10^{-4,7}$ | 10^{-5} |
| Polio 1 + MM | 10^{-6} | 10^{-5} | $10^{-4,7}$ | 10^{-5} | 10^{-5} | $10^{-4,5}$ |

MM = medio de mantenimiento. Dosis de IA: 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Título del virus en CCDI 50/0,2 cm^3 en células HeLa.

Determinación del rendimiento en virus polio 1 de las células infectadas y tratadas comparado con el rendimiento de las células infectadas y no tratadas

Para ello, dos series de cultivos de células HeLa se infectaron con la misma dosis de virus y según la forma ya descrita, se añadió después a una serie medio con IA y a la otra serie medio de mantenimiento normal.

Se tomaron grupos de 4 tubos de cultivo de ambas series al final del período de adsorción del virus y en las 24 y 48 h posteriores, rompiéndose las células mediante congelaciones y descongelaciones sucesivas, con el fin de obtener el virus intracelular y el extracelular y titulándose posteriormente en células HeLa. Los resultados expuestos en el *cuadro 4* indican una diferencia en el rendimiento en virus de alrededor de 5 logaritmos a las 24 y 48 h entre las células infectadas sin tratar y las infectadas y tratadas, lo que muestra una clara acción inhibidora del IA.

Cuadro 4. Acción del IA sobre la síntesis del virus polio 1 en células HeLa

| Virus polio 1 | Períodos de síntesis, horas | | |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| | 0 | 24 | 48 |
| Células infectadas y tratadas | $10^{-0.5}$ | $10^{-3.5}$ | $10^{-4.75}$ |
| Células infectadas sin tratar | 10^{-1} | $10^{-9.25}$ | 10^{-9} |

Título del virus en CCDI 50/0,2 cm³ en células HeLa. Dosis de virus y sustancia constantes; dosis de IA: 500 µg/cm³ y tubo. Rendimiento en virus a las 24 h y 48 h de infección.

Influencia del período de tiempo entre inoculación del virus y tratamiento con IA sobre la síntesis del virus polio 1

Para determinar la relación que pudiera existir entre el intervalo de tiempo transcurrido desde el final de la adsorción del virus hasta el momento del tratamiento y la respuesta de inhibición, se infectaron células HeLa con el virus, se eliminó el virus no adsorbido tras el período de adsorción, se añadió a los cultivos medio normal de mantenimiento, eliminándose éste y añadiendo finalmente medio con la sustancia, incorporada a las horas que se indican en el *cuadro 5*, después de la infección. A las 48 h de la infección, se obtiene el virus intracelular y el extracelular, titulándose. Se observa que a medida que el intervalo entre infección y tratamiento es más amplio, la respuesta de inhibición de la síntesis de virus es menor, debido a que ha habido más tiempo para que hubiera síntesis de virus. Hasta las 6 h de tratamiento, la inhibición es claramente significativa.

Cuadro 5. Influencia del período de tiempo entre inoculación y tratamiento sobre la síntesis del virus polio 1 en células HeLa

| Intervalo, horas | | | | Control sin tratar |
|------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|
| 1 | 2 | 4 | 6 | |
| $10^{-2,7}$ | $10^{-3,5}$ | $10^{-3,5}$ | $10^{-4,2}$ | $10^{-7,5}$ |

Rendimiento en virus a las 48 h de la inoculación, expresado en CCDI 50/0,2 cm³. Dosis de IA: 500 µg/cm³ y tubo.

Relación entre dosis de IA y el grado de inhibición de la síntesis del virus polio 1

Por otra parte, se ha comprobado que existe relación directa entre la dosis de sustancia y respuesta de inhibición de la síntesis del virus, habiéndose obtenido este resultado inoculando una serie de cultivos de células HeLa con la misma dosis de virus y realizando posteriormente el tratamiento con la sustancia incorporada al medio de mantenimiento a dosis decrecientes por grupos de tubos de cultivo de células HeLa. A las 24 h se obtiene el virus intracelular y el extracelular, determinándose, mediante titulación, el rendimiento en virus de cada grupo. Los resultados se exponen en el cuadro 6. Dosis inferiores a 500 µg/cm³ y superiores a 100 µg/cm³ resultan activas.

Cuadro 6. Relación entre dosis de IA y el grado de inhibición de la síntesis del virus polio 1 en células HeLa

| Dosis de IA, µg/cm ³ y tubo | | | | | Control de células infectadas sin tratar |
|--|-------------|-------------|-------------|-----------|--|
| 500 | 330 | 200 | 160 | 100 | |
| $10^{-5,5}$ | $10^{-6,5}$ | $10^{-6,5}$ | $10^{-7,5}$ | 10^{-9} | 10^{-9} |

Dosis de virus constante. Rendimiento en virus a las 24 h expresado en CCDI 50/0,2 cm³.

Inhibición de la síntesis del virus polio 3 en células HeLa por tratamiento posterior con IA

Con el fin de determinar la especificidad de acción de la sustancia, se ha ensayado ésta sobre el virus polio 3. Por una parte, se han inoculado dos series de cultivos de células HeLa con diluciones decimales del virus, incorporando después a una serie el medio de mantenimiento con la sustancia incorporada y a la otra serie el medio de mantenimiento normal. Después de 96 h, se obtiene el virus intracelular y el extracelular de cada grupo de tubos de cultivo correspondientes a cada dilución de virus y se titula. Los resultados obtenidos, que se presentan en el *cuadro 7*, indican una diferencia significativa entre ambas series; lo que demuestra que también el virus polio 3 resulta inhibido en su síntesis por el IA.

Cuadro 7. Inhibición de la síntesis del virus polio 3 en células HeLa por tratamiento posterior con IA

| Virus polio 3 | Diluciones del virus | | | | |
|-------------------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} |
| Células infectadas y tratadas | $10^{-2,5}$ | $10^{-3,5}$ | $10^{-1,2}$ | 0 | 0 |
| Células infectadas sin tratar | $10^{-5,5}$ | $10^{-3,5}$ | 10^{-3} | $10^{-2,7}$ | 0 |

Dosis de IA constante: $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ y tubo. Rendimiento en virus a las 96 h expresado en CCDI $50/0,2 \text{ cm}^3$.

Relación entre dosis de IA y el grado de inhibición de la síntesis del virus polio 3 en células HeLa

Con procedimiento semejante al utilizado para el virus polio 1, ya descrito anteriormente, se obtienen los resultados del *cuadro 8*, que indican un comportamiento semejante de las células infectadas frente al virus polio 1.

Cuadro 8. Relación entre dosis de IA y el grado de inhibición de la síntesis del virus polio 3 en células HeLa

| Dosis de IA $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ y tubo | | | | | Control de células infectadas sin tratar |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|--|
| 500 | 330 | 200 | 160 | 100 | |
| $10^{-2,2}$ | $10^{-2,7}$ | $10^{-3,5}$ | $10^{-3,7}$ | $10^{-4,5}$ | 10^{-5} |

Dosis de virus constante. Rendimiento en virus a las 48 h, expresado en CCDI 50/0,2 cm^2 .

Acción del IA sobre la síntesis del virus herpes simplex en células HeLa

En relación con la determinación de la especificidad de acción de la sustancia, se ha ensayado su posible actividad sobre células HeLa infectadas con virus herpes simplex. Dos series de cultivos de células HeLa se han inoculado con diluciones decimales de virus. Después del período de adsorción y del lavado, a una serie se le añade medio de mantenimiento con la sustancia incorporada y a la otra serie medio de mantenimiento normal. A las 72 h de la infección, se obtiene el virus intracelular y el extracelular, titulándose en MCA (membrana corio-alantoidea) de embrión de pollo. Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 9. No se observan diferencias significativas entre los títulos obtenidos en la serie control y los de la tratada.

Cuadro 9. Acción del IA sobre la síntesis del virus herpes simplex en células HeLa

| Virus herpes simplex | Diluciones del virus | | | | |
|---------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} |
| Células infectadas y tratadas | 4×10^6 | $5,1 \times 10^5$ | $6,8 \times 10^4$ | $3,5 \times 10^4$ | $3,7 \times 10^3$ |
| Células infectadas y sin tratar | $3,4 \times 10^6$ | $8,7 \times 10^5$ | $4,2 \times 10^4$ | $3,8 \times 10^4$ | $1,8 \times 10^3$ |

Tratamiento posterior a la infección. Dosis de IA constante: $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ y tubo. Rendimiento en virus a las 72 h de la infección, expresado en UFP/ cm^3 en embrión de pollo.

Acción del IA sobre la síntesis del virus vacunal en células HeLa

Siguiendo el mismo método utilizado para el virus herpes simplex, se obtienen unos resultados que son semejantes a los obtenidos con aquel virus y que están expresados en el *cuadro 10*.

Cuadro 10. Acción del IA sobre la síntesis del virus vacunal en células HeLa

| Virus vacunal | Diluciones del virus | | | | |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ |
| Células infectadas y tratadas | 1,5 × 10 ⁷ | 1,3 × 10 ⁶ | 3,3 × 10 ⁵ | 9,3 × 10 ⁴ | 3,2 × 10 ⁴ |
| Células infectadas y sin tratar | 1,1 × 10 ⁷ | 8,5 × 10 ⁶ | 9,3 × 10 ⁵ | 7,3 × 10 ⁴ | 2,2 × 10 ⁴ |

Tratamiento posterior a la infección. Dosis de IA constante: 500 µg/cm³ y tubo. Rendimiento en virus a las 72 h de la infección, expresado en UFP/cm³ en embrión de pollo.

DISCUSION

De los resultados obtenidos en este trabajo puede deducirse que el IA ejerce una acción virostática específica sobre la síntesis intracelular del virus poliomielítico, ya que ni ejerce acción viricida, ni acción previa e irreversible sobre los receptores celulares específicos.

Aunque es muy escaso el número de virus ensayados hasta ahora, parece existir una especificidad anti-ARN vírico, ya que los dos virus ADN estudiados en este trabajo no se ven afectados aparentemente en su mecanismo de síntesis en células HeLa.

En otro trabajo intentaremos determinar el mecanismo de acción del IA, pero puede sacarse cierta orientación sobre dicho mecanismo, considerando que dicha sustancia ejerce un cierto número de actividades sobre diversos sistemas biológicos. El IA y la enzima que convierte el triptófano en IA, se encuentran en muchos animales, aunque no en todos sus órganos, siendo relativamente ricos en la enzima el riñón, hígado y testículos (8). Dicha sustancia induce en los tejidos animales algunos efectos sobre la

respiración y sobre la actividad de la carboxilasa (2-4 y 6), y utilizando células de carcinoma ascítico de Erlich, resulta que el aumento de la concentración en IA hace disminuir progresivamente el consumo de oxígeno y provoca una pérdida progresiva de agua celular, entre otros efectos. Gordon (8) encuentra que el IA inyectado en ratones estimula la producción de anticuerpos, e indica la posibilidad de que actúe, tanto en vegetales como en animales, sobre la génesis del ácido nucleico. Según Bendaña y colaboradores (1) el IA se acopla *per se* con el ARN soluble. Por otra parte, según Winter y Thimann (16), el IA acoplado al ARN posiblemente actuará regulando procesos de biosíntesis, y prueba de ello es que se han encontrado complejos IA-proteína.

De todo lo expuesto se deduce que la actividad biológica sobre las células y tejidos animales puede tener diversas manifestaciones y probablemente pueda actuar el IA sobre diversos mecanismos biológicos. En este caso, sólo actúa sobre virus ARN, por tanto, su acción está ligada a algún factor específico de la síntesis de virus ARN. No obstante, deberán ensayarse más virus, tanto ADN como ARN.

Probablemente la acción de la sustancia se verifica en el citoplasma celular, ya que según ciertos autores (7 y 9) en experimentos de fraccionamiento de células infectadas por virus poliomiélico, el ciclo de replicación se realiza en el citoplasma celular, cosa que se corrobora al obtenerse la síntesis de antígeno y ARN poliomiélicos en fragmentos de células sin núcleos (5 y 12). Mientras en células normales los poliribosomas celulares están libres en extractos citoplasmáticos, los ribosomas de células infectadas por poliovirus están asociados a vesículas citoplasmáticas con paredes de lipoproteínas, las cuales parecen ser los centros de síntesis y acoplamiento de los compuestos del poliovirus (10).

RESUMEN

El indol-3-acético ejerce una acción virostática significativa a nivel celular sobre el virus polio (ARN) y no sobre los virus herpes simplex y vacunal (ADN). Existe correlación entre dosis de sustancia y respuesta de inhibición de la síntesis de virus polio, como asimismo entre el intervalo de tiempo transcurrido entre la infección de células y el tratamiento de éstas, con respecto a la respuesta de inhibición de la síntesis de virus polio. El compuesto no ejerce acción viricida a la dosis virostática activa.

SUMMARY

Inhibition of polio virus synthesis by indole-3-acetic acid

Indole-3-acetic acid has a significant virustatic effect at cellular level on polio virus (RNA) and has not it on herpes simplex and vaccinia viruses (DNA).

There is a direct relation between dose of substance and inhibition response of polio virus synthesis, as well as between both the interval from cell infection to cell treatment and the inhibition response of polio virus synthesis.

The compound has no viricide effect at the active virustatic dose.

BIBLIOGRAFIA

1. BENDAÑA, F. E.; GALSTON, A. W.; KAUR-SAWHNEY, R., y PENNY, P. J. 1965. *Plant Physiol.*, 6, 977.
2. BERNARD, B. de. 1951. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 27, 803.
3. BERNARD, B. de. 1952. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 28, 81.
4. BERNARD, B. de. 1954. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 30, 457.
5. CROCKER, T.; PFENDT, E., y SPENDLOVE, R. 1964. *Science*, 145, 401.
6. CHRISTENSEN, H. N.; RIGGS, T. R., y COYNE, B. A. 1954. *J. Biol. Chem.*, 209, 413.
7. DARNELL (Jr.), J. E. 1962. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 27, 149.
8. GORDON, S. A., y BUSS, E. 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 136.
9. HOLLAND, J. J., y BASSETT, D. W. 1964. *Virology*, 23, 164.
10. LIMASSET, Y., y CORMET, P. 1949. *C. R. Acad. Sci.*, 223, 1971.
11. LOUIS, R. 1955. *Zellforsch.*, 41, 385.
12. MARCUS, P. I., y FREIMAN, M. E. 1966. *Methods Cell Physiol.*, 2, 93.
13. PENMAN, S.; BECKER, Y., y DARNELL, J. E. 1964. *J. Mol. Biol.*, 8, 541.
14. REED, L. J., y MUENCH, H. 1938. *Ann. J. Hyg.*, 27, 493.
15. SILBERGER, J., y SKOOG, F. 1953. *Science*, 118, 443.
16. WINTER, A., y THIMANN, K. V. 1966. *Plant Physiol.*, 41, 335.

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

LA FERMENTACION DEL PIMIENTO EMPLEADO EN EL RELLENO DE ACEITUNAS VERDES (*)

por

F. GONZÁLEZ - CANCHO, M. I. MINGUEZ - MOSQUERA
y M. J. FERNÁNDEZ - DÍEZ

INTRODUCCION

Tomando como base los ensayos prácticos realizados por Aliguiskis (1-2), se inició, en 1968, un plan de investigación sobre la elaboración del pimiento empleado en el relleno de aceitunas verdes, estilo español, al objeto de conseguir que su aprovechamiento sea más rentable, y que presente en el mercado un grado de calidad elevado y uniforme, lo cual no ocurre frecuentemente con el actual sistema de fabricación en España, constituido por dos fases fundamentales: pelado por tostación, a la llama directa de fuel-oil, y conservación, en salmuera saturada.

El sistema en estudio consta igualmente de dos fases: pelado y conservación en salmuera, hasta el momento de su empleo. La primera puede realizarse, bien por tostación, como es tradicional en la industria de aderezo, bien por tratamiento alcalino con una solución de hidróxido sódico, con lo cual, según las experiencias realizadas, puede conseguirse un rendimiento mayor.

Es, sin embargo, en la segunda fase de la fabricación, en la que se

(*) Comunicación presentada al III Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona, junio de 1971. Parte de los resultados corresponden a la tesis doctoral de uno de los autores (M. I. M. M.).

pretende introducir una modificación realmente importante, sustituyendo la simple conservación en salmuera saturada por una fermentación en salmuera de menor graduación (12-13 % de ClNa) acidulada con ácido láctico, hasta un valor de pH de aproximadamente 3,4 unidades. Con ello, por los resultados obtenidos en las tres campañas en que vienen realizándose estos ensayos, puede asegurarse una buena textura del fruto, mantenida durante largo tiempo, y una desaparición rápida de la materia fermentable. Ambas características unidas pueden permitir, bien comercializar rápidamente el producto, si la demanda así lo exige, bien mantenerlo almacenado en perfectas condiciones durante largo tiempo, si ello fuera necesario.

Las investigaciones realizadas hasta la fecha (3-5 y 8) han demostrado que los microorganismos responsables de la fermentación en salmuera acidulada son las levaduras. Se comprende, por lo tanto, la necesidad de realizar un estudio sistemático detallado de dichos gérmenes, aislados durante las campañas 1968-69 y 1969-70, al objeto de conseguir una fermentación dirigida en condiciones óptimas.

En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos hasta la fecha en dicho estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

Los ensayos realizados simultáneamente en el laboratorio y a escala semi-industrial en las instalaciones de la Cooperativa Agrícola "Virgen de Belén", del término de Pilas (Sevilla), se pueden dividir en tres grupos que llevan la nomenclatura siguiente:

CA. Pelado químico y conservación en salmuera de baja graduación;

HA. Pelado al horno y conservación en salmuera de baja graduación;

HS. Pelado al horno y conservación en salmuera saturada.

El pelado químico en el grupo CA se realiza por inmersión del pimiento en solución del 12 % de hidróxido sódico. Las temperaturas del baño oscilan entre 63° y 68 °C, y los tiempos de inmersión entre 2,5 y 4 min, eligiéndose estos valores de acuerdo con resultados obtenidos anteriormente. Finalizado el período de pelado, los pimientos se introducen durante corto tiempo en agua acidulada al 1 % con ácido láctico y se lavan posteriormente con agua, eliminando cascabullos y semillas.

A continuación, los pimientos así tratados se conservan en el labora-

torio en salmuera del 12-13 % de ClNa, acidulada con 1 % de ácido láctico, en fermentadores de cloruro de polivinilo con capacidad para unos 4 kg de fruto, diseñados y contruidos en el Instituto de la Grasa, con dispositivos adecuados para el requerido de salmuera y toma de muestras, y disco interior perforado del mismo material, para evitar la flotación del pimiento y formación de velo de levaduras en su superficie.

En los otros dos grupos, HA y HS, el pelado se hace por tostación a llama directa de fuel-oil, y conservación en la salmuera diluida ya indicada, o saturada, respectivamente.

En la industria se utilizan bidones metálicos de 200 l de capacidad, a los que se adapta un disco interior de cloruro de polivinilo perforado, para evitar el desarrollo de levaduras superficiales.

La toma de muestras de las salmueras correspondientes se hace, en el laboratorio, asépticamente y con la necesaria periodicidad para conocer la marcha de la fermentación lo más exactamente posible, mientras que en la industria, la frecuencia empleada, aunque menor, nos ha permitido seguir fácilmente el control de dicha fermentación.

Para el reconocimiento de los microorganismos responsables de la típica fermentación y posibles productos de alteraciones se han empleado los siguientes medios de cultivo selectivos, considerados en principio como más idóneos: agar-eosina-azul de metileno de Levine, agar-infusión de levadura-glucosa, agar-extracto de malta y jugo de hígado-triptona-glucosa.

Las siembras en los medios de cultivo indicados se hacen por extensión y agotamiento y por dilución para recuento de gérmenes, excepto en el jugo de hígado-triptona-glucosa, para clostridios, que se utiliza la técnica descrita en una publicación anterior (6). Para el desarrollo de lactobacilos se utiliza el agar-infusión de levadura-glucosa, con unas gotas de anetol, que inhibe el desarrollo de levaduras. La incubación se hace a las temperaturas de 25°, 30° y 37 °C, de acuerdo con las necesidades óptimas de desarrollo de los diferentes microorganismos.

El aislamiento de los gérmenes desarrollados para el estudio taxonómico se hace en los mismos medios de cultivo, dando los pases necesarios para la completa purificación de los cultivos.

Dicho estudio taxonómico se realiza según las normas que se indican en el Manual de Lodder (7).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las experiencias se han realizado durante tres campañas consecutivas, 1968-69, 1969-70 y 1970-71.

El análisis microbiológico cuantitativo de las numerosas tomas de muestras de las salmueras de ocho fermentadores instalados en el laboratorio, indica, como puede observarse en los *cuadros 1-5*, correspondientes a cinco de ellos, lo siguiente:

1. En los fermentadores CA estudiados, únicamente se observa desarrollo de levaduras. El máximo crecimiento de dichos microorganismos se presenta alrededor de los 5-7 días de fermentación. El aumento de las mismas a partir de los 40 días de conservación, se debe a la formación de velos superficiales.

2. En la mayoría de los fermentadores HA, juntamente con el desarrollo de levaduras ya indicado en los CA, se observa un crecimiento de lactobacilos. Debido a la existencia de estos últimos gérmenes, en el *cuadro 3*, el número de microorganismos es significativamente más elevado, y en el *cuadro 4* no se especifican resultados cuantitativos. En cambio, en el *cuadro 5* únicamente se observa desarrollo de levaduras.

El máximo desarrollo de la población microbiana se produce entre los

Cuadro 1. Desarrollo microbiano. Fermentador de laboratorio CA1

| Días de fermentación | Levaduras/ml | Bacilos gram-negativos (<i>coli-aerógenes</i>)/ml | Lactobacilos |
|----------------------|--------------|---|--------------|
| 1 | 1.500 | 90 | — |
| 2 | 2.700 | 60 | — |
| 3 | 4.000 | — | — |
| 4 | 24.000 | — | — |
| 5 | 140.000 | — | — |
| 6 | 1.800.000 | — | — |
| 7 | 1.000.000 | — | — |
| 8 | 530.000 | — | — |
| 10 | 369.500 | — | — |
| 14 | 70.000 | — | — |
| 20 | 25.750 | — | — |
| 34 | 166.000 | — | — |

Cuadro 2. Desarrollo microbiano. Fermentador de laboratorio CA2

| Días de fermentación | Levaduras/ml | Bacilos gram-negativos (<i>coli-aerógenes</i>) | Lactobacilos |
|----------------------|--------------|--|--------------|
| 3 h | 88.750 | — | — |
| 1 | 54.250 | — | — |
| 2 | 285.500 | — | — |
| 3 | 350.000 | — | — |
| 5 | 800.000 | — | — |
| 6 | 186.000 (*) | — | — |
| 8 | 227.000 | — | — |
| 9 | 148.000 | — | — |
| 10 | 109.000 | — | — |
| 13 | 60.000 | — | — |
| 16 | 7.900 | — | — |
| 24 | 500 | — | — |
| 68 | 120.000 | — | — |
| 100 | 120.000 | — | — |

(*) Resultado anómalo.

Cuadro 3. Desarrollo microbiano. Fermentador de laboratorio HAI

| Días de fermentación | Levaduras + lactobacilos/ml | Bacilos gram-negativos (<i>coli-aerógenes</i>) |
|----------------------|-----------------------------|--|
| 2 | 725.000 | — |
| 3 | 1.790.000 | — |
| 5 | 4.350.000 | — |
| 6 | 4.850.000 | — |
| 7 | 2.600.000 | — |
| 8 | 225.000 (*) | — |
| 10 | 200.000 | — |
| 15 | 268.500 | — |
| 19 | 300.000 | — |
| 25 | 41.300 | — |
| 38 | 260.000 | — |

(*) Resultado anómalo.

Cuadro 4. Desarrollo microbiano. Fermentador de laboratorio HA2

| Días de fermentación | Levaduras | Bacilos gram-negativos (<i>coli-aerógenes</i>) | Lactobacilos |
|----------------------|-----------|--|--------------|
| 3 h | ++ | + | — |
| 1 | +++ | + | + |
| 2 | +++ | + | +++ |
| 3 | +++ | + | +++ |
| 5 | +++ | — | +++ |
| 6 | +++ | — | +++ |
| 8 | +++ | — | +++ |
| 9 | ++ | — | +++ |
| 10 | ++ | — | +++ |
| 13 | + | — | +++ |
| 16 | + | — | +++ |
| 24 | + | — | +++ |
| 68 | ++ | — | +++ |
| 100 | +++ | — | + |

+++ = Desarrollo abundante, ++ = d. regular, + = d. escaso. — = sin desarrollo.

Cuadro 5. Desarrollo microbiano. Fermentador de laboratorio HA4

| Días de fermentación | Levaduras/ml | Bacilos gram-negativos (<i>coli-aerógenes</i>) | Lactobacilos |
|----------------------|--------------|--|--------------|
| 1 | 10.000 | — | — |
| 2 | 188.000 | — | — |
| 3 | 175.000 | — | — |
| 4 | 81.000 (*) | — | — |
| 6 | 92.000 (*) | — | — |
| 7 | 123.000 (*) | — | — |
| 8 | 950.000 | — | — |
| 10 | 235.000 | — | — |
| 15 | 48.000 | — | — |
| 24 | 22.000 | — | — |
| 41 | 440.000 | — | — |
| 70 | 118.000 | — | — |

(*) Resultados anómalos.

5 y 8 días del proceso fermentativo. Análogamente a lo indicado en los fermentadores CA se produce un aumento en el número de levaduras como consecuencia de la formación de velos superficiales de las mismas, a partir de los 40 días.

3. Prácticamente no existe desarrollo en ninguno de los fermentadores de bacterias gram-negativas de tipo *coli-aerogenes*, debido a que el valor del pH se mantiene alrededor de 3-4 unidades, suficientemente bajo para impedir su crecimiento.

4. En los fermentadores HS con salmuera saturada, no se observa desarrollo microbiano, lo que indica que se trata simplemente de una conservación.

El análisis microbiológico de los bidones instalados en la industria indica su paralelismo con lo observado en los fermentadores de laboratorio.

En el *cuadro 6* se presentan las distintas especies aisladas, especificando el porcentaje de cada una de ellas y el porcentaje de frecuencia por muestras analizadas. Asimismo, se indica el intervalo de permanencia y máximo desarrollo en días, de cada una de ellas, y la procedencia de la muestra.

De su observación se deduce lo siguiente:

1) Las especies más representativas, tanto por el número de cepas encontradas como por la frecuencia en que aparecen en las distintas muestras analizadas, son: *Hansenula subpelliculosa*, *Saccharomyces lactis*, *Hl. anomala*, *S. rouxii*, *Hanseniaspora valbyensis* y *S. cerevisiae*, entre las esporígenas, y *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata* y *Torulopsis famata*, entre las no esporígenas.

2) Por lo que respecta a la sucesión de las distintas especies en el proceso fermentativo, se puede indicar:

a) *Hansenula subpelliculosa*, permanece durante todo el transcurso de la elaboración, alcanzando su máximo crecimiento alrededor de los 2 días de colocación del pimiento en salmuera.

b) Las levaduras apiculadas (*Kloeckera* y *Hanseniaspora*), se encuentran presentes durante los 10 primeros días del proceso fermentativo, coincidiendo su máximo desarrollo con el de la población de levaduras, aproximadamente a los 5 días.

Cuadro 6

| Diagnóstico | Cepas aisladas sobre un total de 221 | Porcentaje del total | Número de muestras en que se encuentra sobre un total de 59 | Porcentaje de frecuencia | Intervalo de permanencia en días (*) | Procedencia de la muestra | |
|-------------------|--------------------------------------|----------------------|---|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------|
| Espórigenas | <i>Hanseniaspora valbyensis</i> | 8 | 4 | 3 | 5 | 1-5 (5.º) | CA — HA |
| | <i>Hansenula anomala</i> | 15 | 7 | 7 | 12 | 2-16 (3.º) | CA — HA |
| | <i>Hl. subpelliculosa</i> | 72 | 33 | 20 | 34 | 3 h-100 (2.º) | CA — HA |
| | <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | 3 | 1 | 1 | 2 | 6 | CA |
| | <i>S. cerevisiae</i> | 5 | 3 | 3 | 5 | 8, 100 (**) | CA — HA |
| | <i>S. chevalieri</i> | 2 | 1 | 1 | 2 | 16 | CA |
| | <i>S. lactis</i> | 23 | 13 | 13 | 22 | 3 h-15 (8.º) | CA — HA |
| | <i>S. rosei</i> | 1 | 1 | 1 | 2 | 5 | HA |
| | <i>S. rouxii</i> | 7 | 4 | 4 | 7 | 24, 100 (**) | HS |
| | <i>S. steineri</i> | 2 | 2 | 2 | 3 | 2, 180 (**) | HA |
| <i>S. veronae</i> | 3 | 1 | 1 | 2 | 3 | CA | |
| No esporígenas | <i>Candida brumptii</i> | 1 | 0 | 1 | 2 | 5 | CA |
| | <i>C. krusei</i> | 24 | 11 | 18 | 31 | 9-180 (16.º) | CA — HA |
| | <i>C. tropicalis</i> | 2 | 1 | 2 | 3 | 6 | CA |
| | <i>Cryptococcus luteolus</i> | 4 | 2 | 1 | 2 | 68 | CA |
| | <i>Kloeckera apiculata</i> | 33 | 15 | 16 | 27 | 2-10 (5.º) | CA — HA |
| | <i>Torulopsis famata</i> | 16 | 7 | 8 | 14 | 24-180 (100.º) | CA — HA |

(*) Únicamente aisladas en los días indicados, (**) El número entre paréntesis indica el día de máximo desarrollo.

c) *Saccharomyces lactis*, se encuentra en las salmueras de los 15 primeros días de la fermentación y alcanza su máximo desarrollo a los 8 días de dicho proceso. La desaparición de este género, así como la de levaduras apiculadas, coincide con la de azúcares en la salmuera.

d) La presencia de *Candida krusei* puede originar la formación de velos superficiales, a partir de los 16 días de fermentación.

e) Levaduras de tipo oxidante, *Torulopsis famata*, dominan alrededor de los 3 meses del proceso fermentativo.

3) *Saccharomyces rouxii*, se aísla exclusivamente en muestras de salmueras saturadas, lo que puede indicar su resistencia a la sal.

Falta por indicar que, con algunos de los microorganismos aislados e identificados, se han realizado en la pasada campaña, a escala de laboratorio, los primeros ensayos de fermentación dirigida, mediante inoculación de muestras de pimientos en salmuera, previamente esterilizadas y sin esterilizar, con cultivos puros de los citados gérmenes.

El diferente comportamiento observado y las excelentes características físico-químicas y organolépticas de algunas de las muestras de esta experiencia, aún en desarrollo, hacen prever que, en un futuro bastante próximo, se alcancen resultados muy satisfactorios que permitan una modificación efectiva y rentable de esta importante industria nacional.

AGRADECIMIENTO

A los Sres. Pérez-Paz y Márquez-González, Gerente y Director Técnico, respectivamente, de las empresas Cooperativa Agrícola "Virgen de Belén" y Medina Garvey, S. A., de Pilas, por su colaboración. Al Plan de Formación del Personal Investigador, por la beca concedida a uno de los autores (M. I. M. M.).

Finalmente, a las señoras D.^a María J. Revillas de Montes y D.^a Mercedes Bodineau de Ruiz, por su eficaz ayuda.

RESUMEN

Para la elaboración del pimiento empleado en el relleno de aceitunas verdes se ha introducido una modificación que consiste en sustituir la simple conservación tradicional en salmuera saturada, por una fermentación en salmuera de menor graduación (12-13 %), acidulada con ácido láctico, hasta un valor de pH de aproximadamente 3-4 unidades.

Las investigaciones realizadas han demostrado que los microorganismos responsables de dicha fermentación son las levaduras.

Se exponen los resultados de un estudio sistemático detallado de dichos gérmenes, aislados durante dos campañas, al objeto de conseguir una fermentación dirigida en condiciones óptimas.

SUMMARY

Fermentation of red pepper used for stuffing green olives

Red pepper for stuffing green olives was processed according to a new method, changing the traditional way of storing fruits into a saturated brine, by a fermentation into a lower concentration brine (12-12 %), acidified with lactic acid up to a pH value of 3-4 units.

Undertaken research shows that yeasts are the microorganisms responsible for that fermentation.

Results of a detailed taxonomic study germe, isolated from the fermentation brines during two seasons, are exposed on this paper. The main purpose of this research is to select the microorganisms which may produce fermentation under the best conditions.

BIBLIOGRAFIA

1. ALIGUISAKIS, E. 1959. *Xhmika y Xponika*, 24B, 3-5.
2. FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J. 1969. *Grasas Aceites*, 20, 12-24.
3. FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J.; FERNÁNDEZ-VILLASANTE, J., y GONZÁLEZ-PELLISSÓ, F. 1968. *Grasas Aceites*, 19, 16-18.
4. FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CANCHO, F.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; MÁRQUEZ-GONZÁLEZ, J., y PÉREZ-PAZ, C. M. 1969. *Grasas Aceites*, 20, 119-25.
5. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; GONZÁLEZ-CANCHO, F.; PÉREZ-PAZ, C. M.; MÁRQUEZ-GONZÁLEZ, J., y FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J. 1970. La fermentación dirigida del pimiento, y su elaboración en recipientes de gran capacidad. Comunicación presentada a la VI Asamblea de Miembros del Instituto de la Grasa y sus Derivados. Sevilla.
6. GONZÁLEZ-CANCHO, F., y FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J. 1968. *Microbiol. Españ.*, 21, 129-41.
7. LODDER, J., y KREJER-VAN-RIJ, N. J. W. 1952. *The Yeast. A taxonomic study.* North Holland Publishing Company, Amsterdam.
8. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; GONZÁLEZ-CANCHO, F.; PÉREZ-PAZ, C. M.; MÁRQUEZ-GONZÁLEZ, J., y FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J. 1970. *Grasas Aceites*, 21, 342-48.

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

ELECTRON MICROSCOPY
OF LIPOPOLYSACCHARIDES FROM *ERWINIA*
CAROTOVORA AND THE BACILLARY AND L
FORMS OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

by

M. SANTAOLALLA and M.^a DOLORES ESPLÁ

INTRODUCTION

Lipopolysaccharides (LPS) of Gram negative microorganisms are macromolecular complexes which have been studied extensively in recent years, especially with regard to their chemical composition and biological properties, and with regard to their morphology and ultrastructure by electron microscopy in a restricted number of species, most of which were animal and human pathogens and members of the Enterobacteriaceae. Thus, Schramm et al. (11) reported that the morphology in shadowed specimens of LPS from *Escherichia coli* as seen through the electron microscope has the appearance of droplets at pH 7 or long ribbons at pH 10. Rothfield et al. (7) reported that, when examined by negative-staining techniques, LPS from several strains of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* showed a relatively homogeneous population of hollow spherical structures. Shands et al. (12) showed that the electron micrographs of positively-stained LPS from *S. typhimurium* appeared as a ribbon which was primarily linear with frequent branching. Occasionally it formed a triple layered structure which consisted of two dense outer lines enclosing a less dense center. Lopes and

Inniss (4-5) reported that the electron microscopic appearance of LPS, isolated from an avian strain of *E. coli* 018, in positively stained preparation showed ribbon-like structures with frequent branching, and when negative staining was employed, the LPS appeared as a branching ribbon with one central and two lateral zones divided by two relatively dense parallel lines running the complete length of the ribbon.

In the present work we studied the fine structure of lipopolysaccharides isolated from two Gram negative microorganisms which are plant pathogens: *Erwinia carotovora* and *Agrobacterium tumefaciens*, and the L form of the later which is also pathogenic, inducing tumor formation in plants as does the parental strain.

MATERIAL AND METHODS

a) Microorganisms

A strain of *Erwinia carotovora*, b. 312 E. Ellmers 904 (1952) from Denmark and *Agrobacterium tumefaciens* strain n° 13 from our Institute were used; L formas of *A. tumefaciens* were obtained by induction with glycine by Rubio-Huertos and Beltrá (8); the chemical composition of the cell wall from normal and the L form of *A. tumefaciens* were different (10); both strains were grown in common broth using flasks of 6 l with agitation during 48 h at 25 °C.; the cells were harvested by centrifugation and washed twice with distilled sterile water and lyophilized.

b) Preparation of cell walls

Lyophilized microorganisms were suspended in a small volume of water, the cell suspension was mixed with an equal volume of Ballotini beads n° 12 and disintegrated in a Braun disintegrator principally following the methods of Cummins and Harris (1) and of Salton and Horne (9) as described in a previous work by Santaolalla (10).

c) Extraction of lipopolysaccharides

LPS were extracted from cells and cell walls with phenol-water by the method of Westphal and Jann (13). The first purification was made by suspension in water to give a 3 % suspension which is centrifuged for 6-8 h at 80,000 g; the sediment was suspended in water, and the suspension

was recentrifuged 2-3 times at 105,000 g for 3 h each. The total elimination of nucleic acid was done using ribonuclease in 0.1M NaCl and 0.01M Na₃PO₄, pH 7 buffer as described by Leive et al. (3). The purity of the samples was checked by ultraviolet light absorption spectra, using a Unicam spectrophotometer, model U.S. 500.

The final non dialyzable product was lyophilized.

d) Isolation of lipid A

The LPS was treated with 1 % acetic acid at 100 °C for 2 h. Lipid A, released as a water insoluble precipitate, was removed by centrifugation and washed free of acid with water.

e) Electron microscopy

The LPS was suspended in distilled water at a concentration of about 1 mg/ml and negatively stained using 2 % phosphotungstic acid, with the standard procedure; and positively stained with a drop of 2 % uranyl acetate following the method described by Shands et al. (12).

Staining of LPS with potassium permanganate was carried out placing a drop of LPS suspension as above on a carbon coated grid, letting it to dry, and placing the grid with the dried LPS over a drop of 2 % KMnO₄ in water placed on a wax surface for 15 min followed by gentle washing with water.

The material was examined with a Siemens Elmiskop I electron microscope. The pictures were taken at a plate magnification of 40,000 or 80,000.

RESULTS

Negative and positive staining of the cell wall preparations were made to control the purity of the preparations (*figures 1-2*).

When the phenol-water method was used a preparation was obtained which contained not only the LPS but a great deal of nucleic acids, as indicated by U.V. absorption curves (*figure 3*) (crude preparation). Further centrifugation and treatment with ribonuclease gave a purified LPS (*figure 3*).

Purified LPS from *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens* and

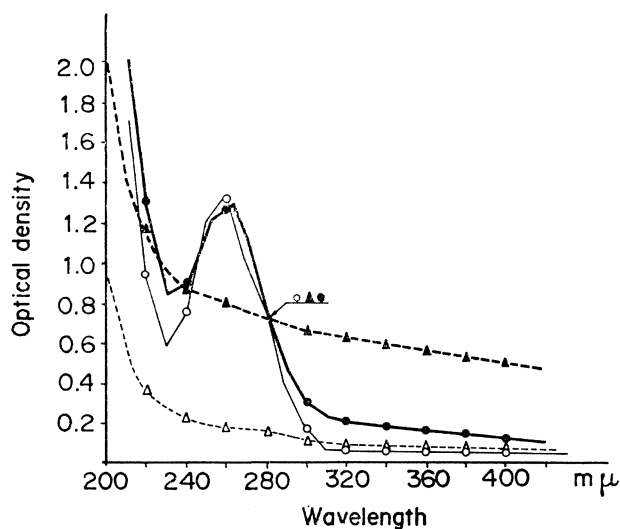


Figure 3. Ultraviolet absorption spectra from crude and purified LPS; ○—○ crude LPS from *E. carotovora*; ●—● crude LPS from *A. tumefaciens*; △—△ purified LPS from *E. carotovora*; ▲—▲ purified LPS from *A. tumefaciens*

its L form obtained as above in aqueous suspension when examined under the electron microscope by negative staining techniques appeared as oval bodies (figures 4 and 9-10), and occasionally as spheroids (figure 4), several bodies were formed by concentric rings (figure 5).

Figure 4 shows negatively stained purified LPS from *Erwinia carotovora* with hollow spheres of variable diameter; several strings structures could also be seen. The ribbon-like appearance with trilaminar structure is infrequent in these preparations.

Figure 5 shows another negatively stained purified LPS from *Erwinia carotovora* which appear as spheroid surrounded by two, three or more concentric ribbons.

Electron microscopy of a similar preparation of LPS from *Erwinia carotovora* using positive staining showed a flat ribbon tending to form imperfect rings of different sizes; the ribbon had a trilaminar structure and its width varies from 80 to 100 Å (figure 6).

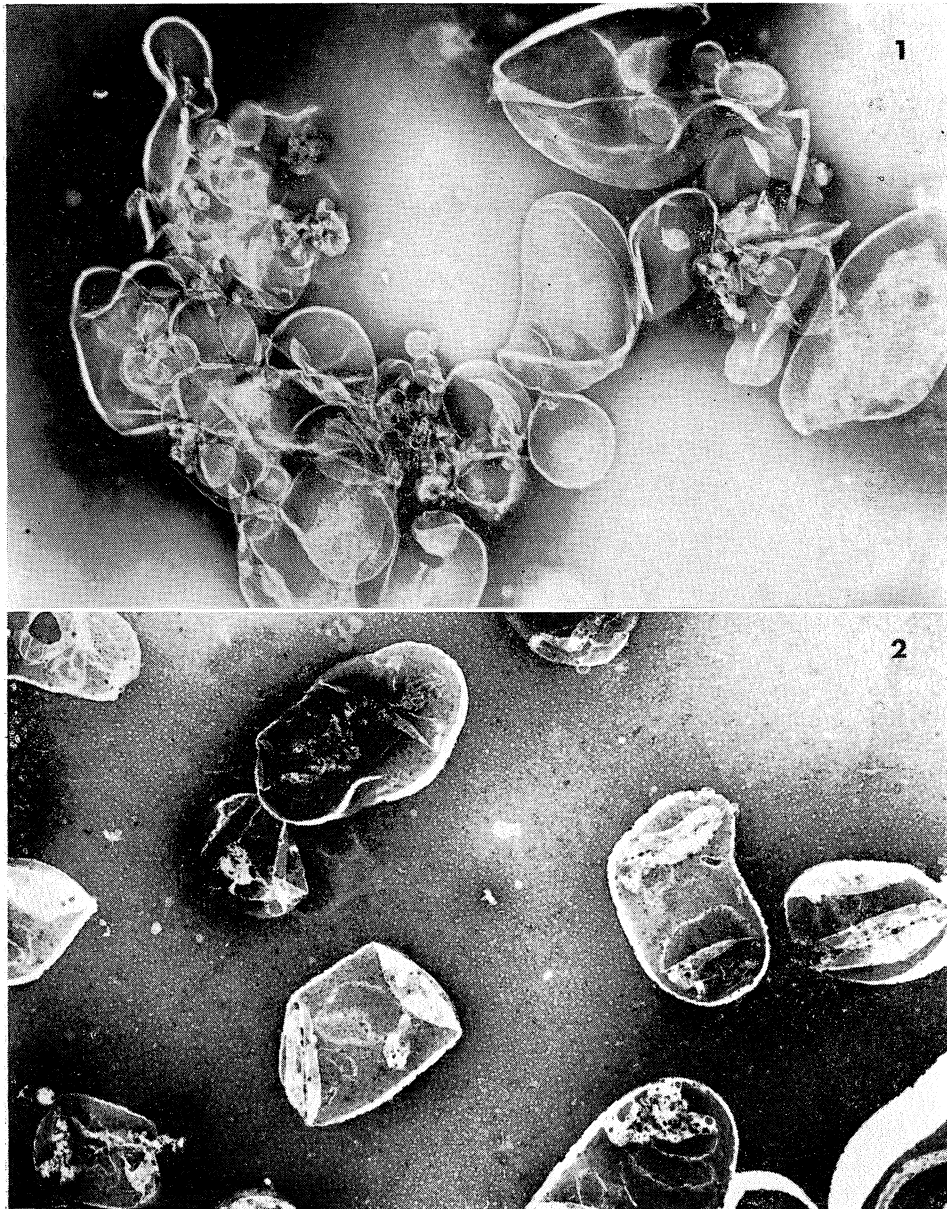
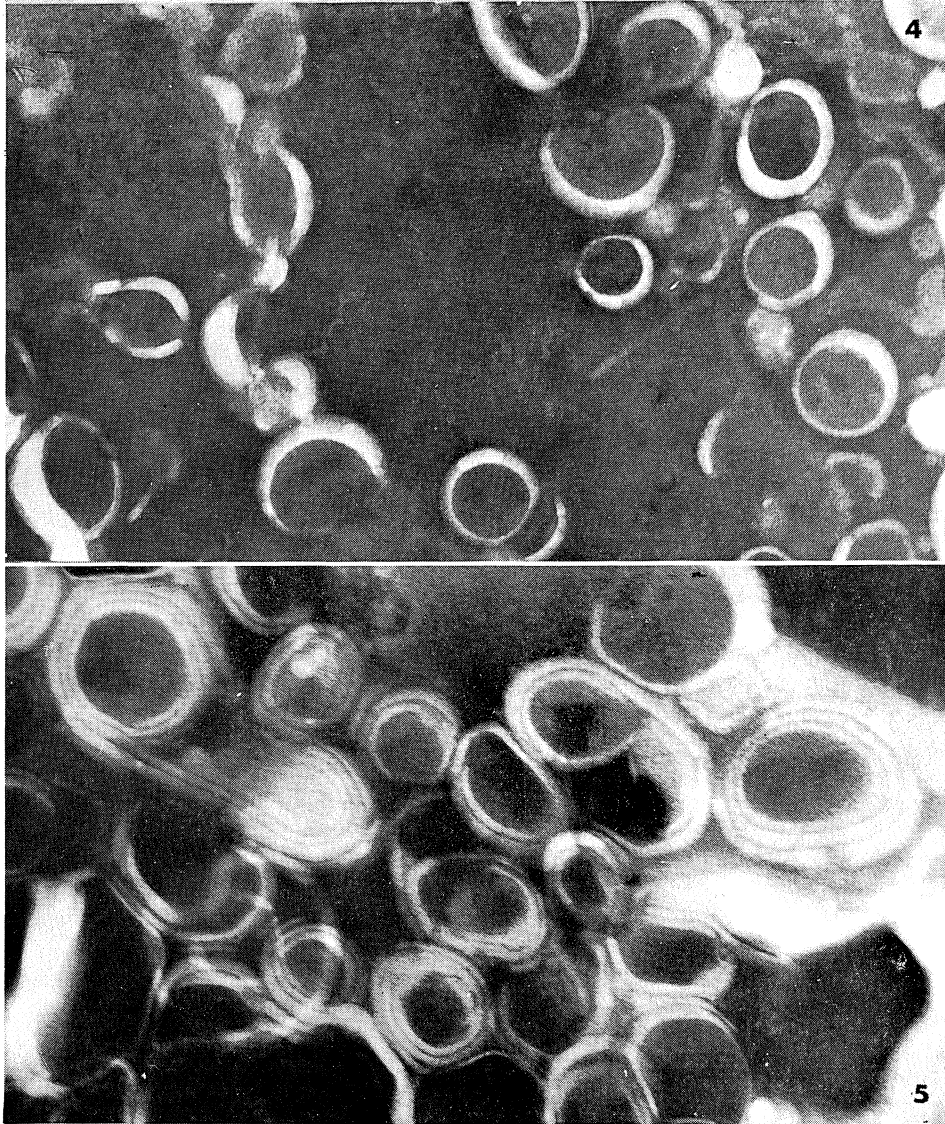


Figure 1. Cell walls from Erwinia carotovora, negative staining. $\times 41,000$. Figure 2. Cell walls from Agrobacterium tumefaciens, negative staining. $\times 19,200$



Figures 4-5. Negatively stained purified LPS from E. carotovora, $\times 171,400$

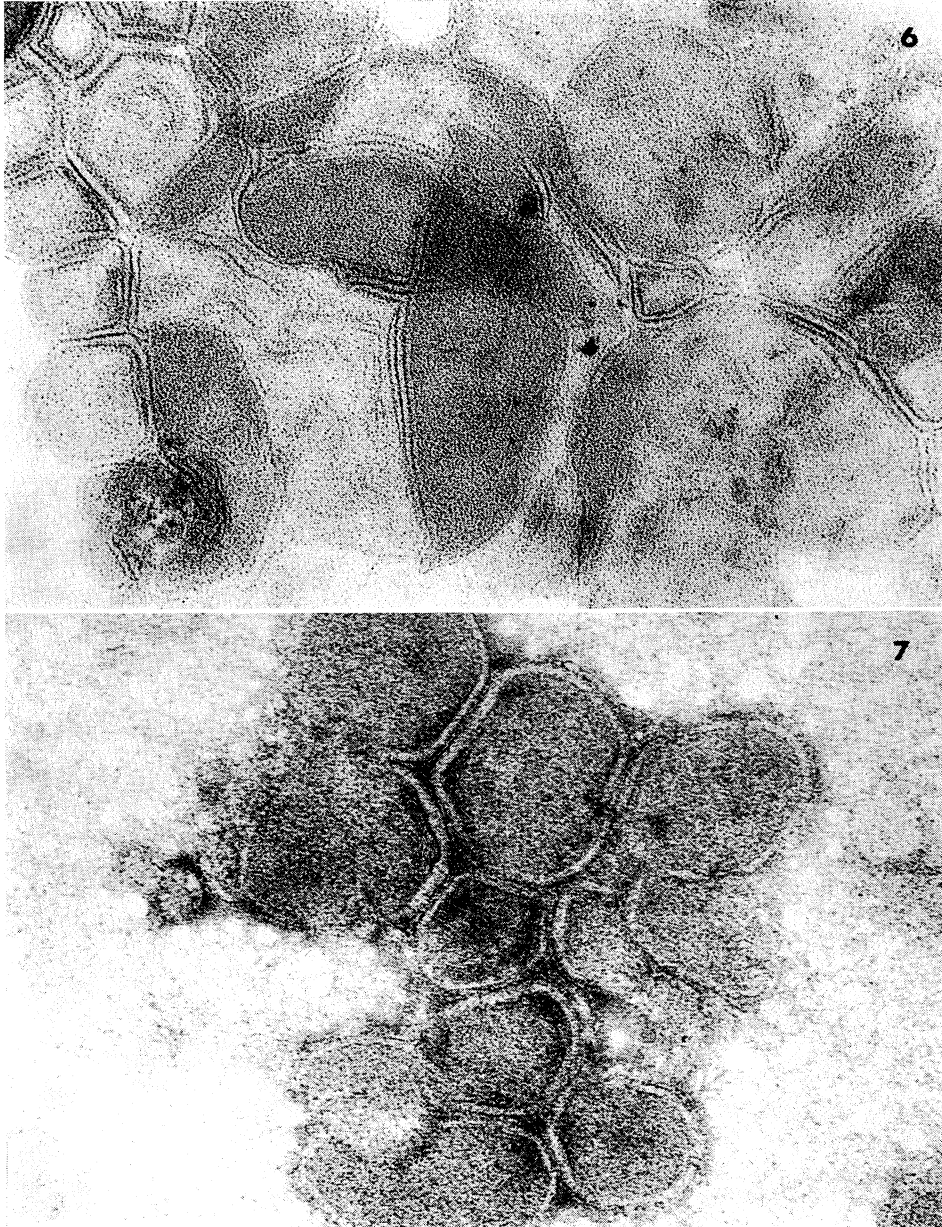


Figure 6. Purified LPS from cell wall of *E. carotovora*; positive staining. $\times 142,800$. Figure 7. Purified LPS from *A. tumefaciens*, disc-like structure separated by a thin membrane; positive staining. $\times 207,100$

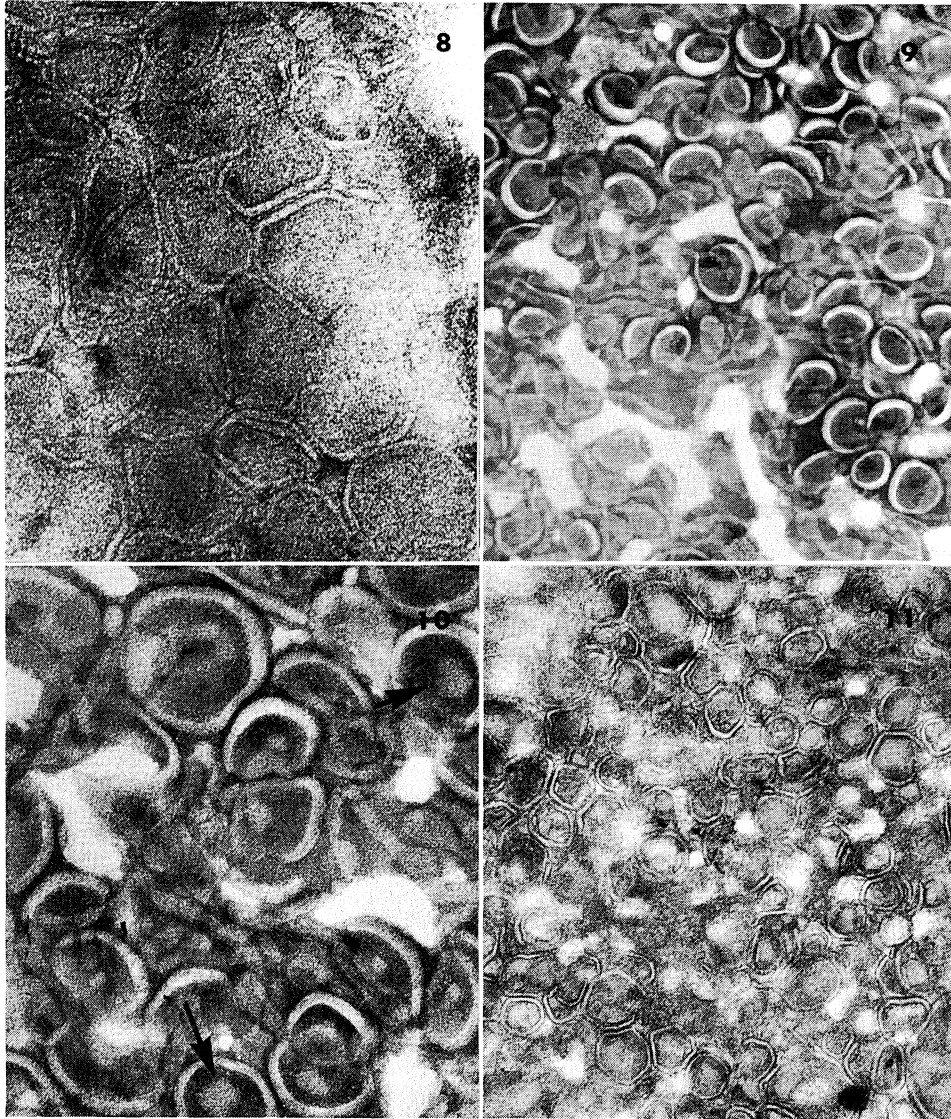
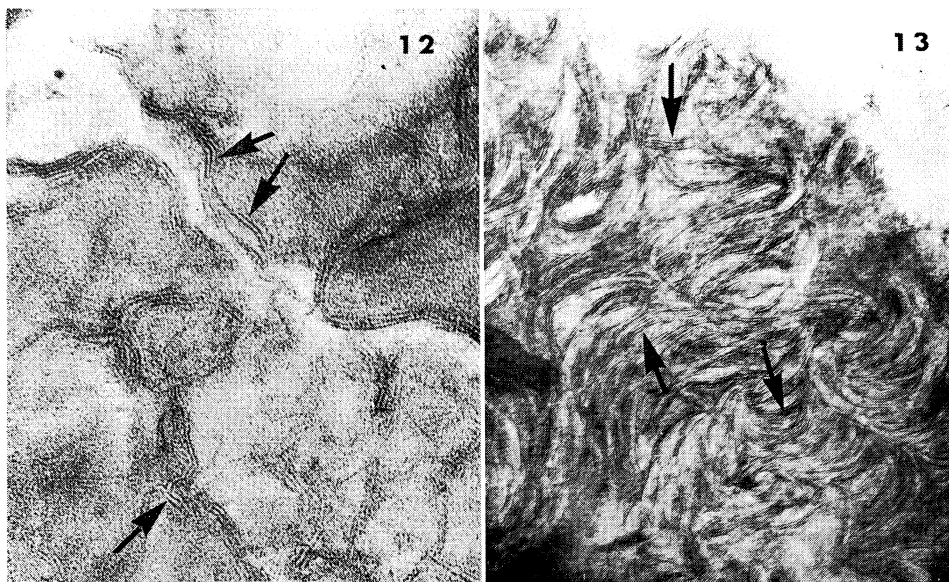


Figure 8. Purified LPS from whole cells of *A. tumefaciens*; positive staining. $\times 166,400$. Figure 9. Purified LPS from L forms of *A. tumefaciens*; negative staining. $\times 83,200$. Figure 10. Purified LPS from L forms of *A. tumefaciens*; negative staining. Arrows indicate the inner spheroid bodies. $\times 166,400$. Figure 11. Positive staining of purified LPS of L forms from *A. tumefaciens*. $\times 83,200$



Figures 12-13, positive staining of purified LPS from A. tumefaciens. Arrows indicate the trilaminar structures. 12) $\times 69,300$ 13) $\times 93,600$

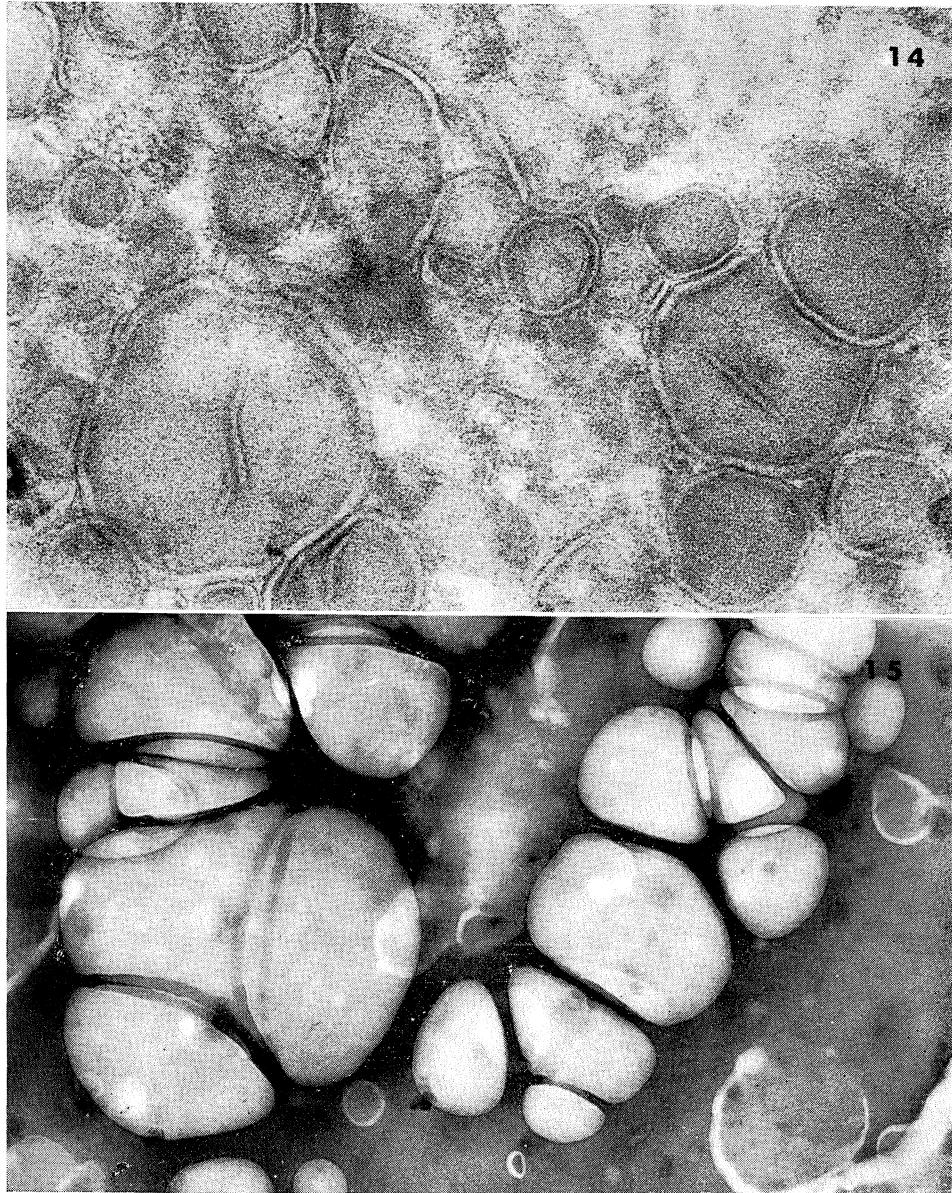


Figure 14. Positive staining of purified LPS of L forms from A. tumefaciens. $\times 171,400$.
Figure 15. Negative staining of lipid A of the LPS from E. carotovora. $\times 82,100$

Electron micrographs of purified LPS from *Agrobacterium tumefaciens* in aqueous solution by positive staining techniques are shown in figures 7-8. Both, figure 7 of purified LPS from the whole cell of *A. tumefaciens* and figure 8 from the cell wall, show a better definition of the thin membrane between the circular ribbons which enclose granular material. The ribbons are about 75 Å wide.

Different magnifications of electron micrographs of purified LPS from L forms of *Agrobacterium tumefaciens* in aqueous solution by negative staining techniques are shown in figures 9-10; in both oval bodies or string structures appear. In figure 10, made under higher magnification, typical LPS structures of general spherical shape are visible, as well as several spherical shapes with inner spheroid bodies (arrows).

Figures 11, and 14 correspond to a positive staining of purified LPS of L form from *Agrobacterium tumefaciens* made at different magnification. Both electron micrographs show with better definition the circular ribbons and their structures forming flat discs. In figures 12-13 the trilaminar structure was observable (arrows).

Figure 15 corresponds to a negative staining of lipid A extracted by mild hydrolysis of LPS from *Erwinia carotovora*. The appearance is that of a population of spheroids of different sizes coupled together or alone. Lipid A from *Agrobacterium tumefaciens* and its L form showed the same structures.

Preparations of purified and unpurified LPS from *Erwinia carotovora* and *Agrobacterium tumefaciens* and its L forms were stained with KMnO_4 but no structures could be observed.

DISCUSSION

The illustrations show that purified LPS from strains of both *Erwinia carotovora*, and the bacillar and L form of *Agrobacterium tumefaciens* extracted by the phenol-water procedure (12) and purified by ribonuclease method (2) have similar structures regardless of whether positive or negative staining methods were used. The results obtained are in accordance with those described by other authors principally with LPS from different *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* sp.; thus there seems to be a structural similarity between LPS from animal and plant pathogen microorganisms.

The structural details obtained by the negative and positive staining methods are not fundamentally different. The ribbons with a trilaminar structure described by Shands et al. (12) in LPS isolated from different *Salmonella typhimurium* spp. by positive staining in which a triple-layered structure appears which consists of two dense outer lines enclosing a less dense center is clearly seen in the electron micrographs obtained by the positively stained LPS of the present report (see figures 12-13). Lopes and Inniss (4) have shown that positively stained LPS isolated from *Escherichia coli* by phenol-water extraction, purified by centrifugation and dissolved in 0,1 M tris (hydroxymethyl) aminomethane (tris) buffer (pH 8.0) has a trilaminar ribbon-like structure, which is more marked in some regions than in others.

The lipid A portion differed markedly in appearance from intact LPS, when observed by negative staining methods appearing as a population of smaller smooth, spheroids. Rothfield and Horne (6) showed a lipid A prepared from LPS *Salmonella typhimurium* of a cobweb appearance made up of many individual leaflets.

We do not know of any work about LPS morphological structure of L forms from bacteria, however in our work we have found a similar appearance of their LPS structures to that of normal forms of bacteria.

SUMMARY

The morphology of lipopolysaccharides isolated from *Erwinia carotovora* and the bacillary and L forms of *Agrobacterium tumefaciens* by the phenol-water method were studied by electron microscopy using negative, positive and K MnO₄ staining methods. The LPS from *E. carotovora* and the bacillary and L forms of *A. tumefaciens* have a spheroid or disk-like appearance as stained by negative and positive methods, showing in some places a trilaminar structure in accordance with the results found by different workers for LPS from *Salmonella* and *E. coli* strains. K MnO₄ staining did not reveal such morphology. It seems that pH and some other factors yet unknown influence the distribution patterns of the sample, causing the appearance in some preparations of spheroids and ribbons together.

Electron microscopy of the positively stained lipid A from *Agrobacterium tumefaciens* differed markedly in appearance from intact LPS,

presenting a similar appearance such to the one noted by Rothfield and Horne (6) in *Salmonella tiphymurium*.

RESUMEN

Microscopía electrónica de los lipopolisacáridos de la Erwinia carotovora y de las formas normal y L del Agrobacterium tumefaciens

Estudiamos la estructura sub-microscópica de los lipopolisacáridos aislados de la *Erwinia carotovora* y *Agrobacterium tumefaciens* formas normal y L, extraídos por el método de fenol-agua, y usando los métodos de tinción negativa, positiva y MnO_4K . Ambos lipopolisacáridos aparecen en forma de esferoides o cintas planas que tienden a formar anillos más o menos imperfectos, mostrando en algunas zonas una estructura trilaminar que concuerda con la encontrada por diferentes investigadores en los lipopolisacáridos de los géneros *Salmonella* y *Escherichia coli*. La tinción con MnO_4K no revela ninguna estructura. Se observa la influencia del pH y algunos otros factores todavía desconocidos que influyen en la apariencia no idéntica, al ser observados bajo tinción negativa o positiva.

La estructura sub-microscópica del lípido A del *Agrobacterium tumefaciens*, observado en forma de tinción positiva, difiere marcadamente de aquella del lipopolisacárido intacto y presenta una estructura similar a la observada por Rothfield y Horne (6) en el lípido A de *Salmonella tiphymurium*.

BIBLIOGRAFIA

1. CUMMINS, C. S., and HARRIS, H. 1958. Studies on the cell wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. J. Gen. Microbiol, 18, 173-89.
2. BRENNER, S., and HORNE, R. W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys Acta, 34, 103-110.
3. LEIVE, M. L.; SHOWLIN, W. K., and MERGENHAGEN, S. E. 1968. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharide released from *E. coli* by ethylenediamine tetracetate. J. Biol. Chem., 243, 6,384-91.
4. LOPES, J., and INNISS, W. E. 1969. Electron microscopy of effect of polymyxin on *E. coli* lipopolysaccharide. J. Bacteriol., 100, 1,128-30.
5. LOPES, J., and INNISS, W. E. 1970. Electron microscopy study of lipopolysaccharide from an avian strain of *E. coli* 018. J. Bacteriol., 103, 238-43.

6. ROTHFIELD, L., and 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.
7. ROTHFIELD, L.; TAKESHITA, M.; PEARLMAN, M., and HORNE, R. W. 1966. Role of phospholipids in the enzymatic synthesis of the bacterial cell envelope. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 25, 1,495-502.
8. RUBIO-HUERTOS, M., and BELTRÁ, R. 1962. Fixed pathogenic L forms of *A. tumefaciens*. *Nature*, 195, 4,836.
9. SALTON, M. R. J., and HORNE, R. W. 1951. Studies of the bacterial cell walls. II. Methods of preparation and some properties of cell wall. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 177-97.
10. SANTAOLALLA, M. 1963. Obtención y análisis químico de paredes celulares del *A. tumefaciens* y de sus formas L fijas. *Microbiol. Españ.*, 16, 25-39.
11. SCHRAMM, J.; WESTPHAL, O., and LUDERITZ, O. 1952. Über bakterielle Reizstoffe. III. Mitt.: Physikalisch-Chemisches Verhalten eines hochereinigten Colipyrrogens. *Z. Naturforsch.*, 76, 594-98.
12. SHANDS (Jr.), J. W.; GRAHAM, J. A., and NATH, K. 1967. The morphologic structure of isolated bacterial lipopolysaccharide. *J. Mol. Biol.*, 25, 15-21.
13. WESTPHAL, O., and JANN, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. *Methods Carbohydr. Chem.*, 5, 83-91.

NATIONAL RESEARCH CENTRE. CAIRO (EGYPT)
MICROBIOLOGICAL CHEMISTRY RESEARCH LABORATORY

STUDIES ON NITROGEN FIXATION OF *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM*

by

A. H. EL - REFAL, M. A. EL - SAYED and T. A. MOHAMED

INTRODUCCION

Most of the numerous publications dealing with the nitrogen fixation by bacteria agreed that the nitrogen fixation by a given microorganism would entirely depend on the different environmental conditions under which the organism was cultivated. The *Azotobacter*, as a whole, show a great versability in utilization of organic compounds as sources of energy. These sources included higher and lower aliphatic alcohols, salts of fatty acids, tricarboxylic acid cycle intermediates and the different sugars (17 and 20).

Nitrogen fixation was greatly affected by the presence of certain minerals. Krzemieniewska (19) in his quantitative study of the general mineral requirements of *Azotobacter chroococcum* found that phosphorous was required in the largest amount compared to the other minerals. Zhivku (33) observed that soluble mineral phosphates, molybdenum and boron increased nitrogen fixation. The essentiality of molybdenum was previously reported by Bortels (4-5), Bershova (2-3) and Ranter (28). Moshkovskii et al. (24) noted that iron participated directly in nitrogen fixation by reducing nitrogen, while being oxidized itself to the trivalent state.

In a previous communication, the authors (11) showed that a strain of *Azotobacter chroococcum* isolated from local habitats was found to

be the best nitrogen fixer among twenty different other strains. The experiments reported here were carried out to investigate the influence of certain factors on growth and nitrogen fixation in this local organism. The results obtained lead to the formulation of the optimum conditions for nitrogen fixation process in the experimental organism.

MATERIALS AND METHODS

Experimental organism

The cultures used in this work were inoculated with descendants from a single slant of a locally isolated, pure culture of *Azotobacter chroococcum*.

Experimental cultures

The experimental cultures were made in 250 ml Erlenmeyer flasks, each containing 100 ml of the medium formulated by Montasir et al. (25). This medium which was considered as the basal medium has the following composition (g/l; w/v): mannitol, 20.0; KH_2PO_4 , 1.0; NaCl, 0.5; CaCO_3 , 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; FeSO_4 , 0.05, sodium molybdate, 0.005. The initial pH of the medium in each experimental modification was adjusted to pH 7.0. The flasks were sterilized at one atmosphere for 20 min and inoculated with standard inoculum. Incubation was carried out at 30 °C for 7 days under stagnant culture conditions.

Dry weight determination

At the end of the incubation period, the cultures were treated with diluted HCl to remove the precipitated CaCO_3 . Samples of the cultures were diluted and the optical densities determined colourimetrically were compared with a previously prepared standard curve (30).

Determination of total nitrogen

The total nitrogen contents of the cultures were estimated by micro-kjeldahl method (16 and 22).

Determination of glucose

This was determined according to the modified Luffi-Schoorl method (31).

RESULTS AND DISCUSSION

1. *Effect of culture age*

The results of the daily determination of consumed glucose, dry weight and nitrogen yields were given in *table 1*. The lag phase of growth seemed

Table 1. The consumed sugar (C. S.), dry weight (D. wt.) and total nitrogen (T. N.) (mg/100 ml culture medium) of the experimental organism at different incubation periods

| Time (days) | C. S. (*) (mg) | D. wt. (mg) | T. N. (mg) |
|-------------|----------------|-------------|------------|
| 0 | none | none | none |
| 1 | 566 | 72 | 5.6 |
| 2 | 1,052 | 174 | 9.5 |
| 3 | 1,454 | 361 | 19.0 |
| 4 | 1,775 | 452 | 28.5 |
| 5 | 1,838 | 519 | 37.5 |
| 6 | 1,936 | 601 | 45.2 |
| 7 | 1,925 | 720 | 48.2 |
| 8 | 1,925 | 720 | 46.5 |
| 9 | 1,925 | 678 | 44.0 |
| 10 | 1,925 | 675 | 44.0 |

(*) Initial sugar concentration = 1,925 mg/100 ml culture medium.

to occur during the first 24 h of incubation. Rabotnova et al. (27) also recorded that *Azotobacter agilis* had a lag phase up to 18 h. The period lasted between 1-7 days, represented the growth phase. Maximal yields of dry weight and total nitrogen were recorded after 7 days of incubation. Thereafter, a decline phase of growth took place.

2. Utilization of carbon sources

Different experimental modifications in which mannitol-used in the basal medium-was replaced by carbon equivalent concentrations of the tested compounds (table 2). The experimental organism showed maximum

Table 2. The dry weight (D. wt.) and total nitrogen (T. N.) (mg/100 ml culture medium), of the experimental organism grown on different sources of carbon

| Carbon sources | D. wt. (mg) | T. N. (mg) |
|-------------------------|-------------|------------|
| Glucose | 644 | 50.4 |
| Mannitol | 632 | 46.8 |
| Sucrose | 492 | 40.4 |
| Benzoate | none | none |
| Oleate | none | none |
| Glycerol | none | none |
| Acetate | none | none |
| Pyruvate | none | none |
| α -ketoglutarate | none | none |
| Fumarate | none | none |
| Malate | none | none |
| Succinate | 114 | 12.6 |

yields with glucose. The superiority of glucose as a carbon source for *Azotobacter spp.* was also recorded (17 and 25). The experimental organism failed to utilize benzoate, oleate, acetate, pyruvate, α -ketoglutarate, fumarate, malate or glycerol as carbon source.

In the subsequent experiments, glucose was used as carbon source instead of mannitol usually used in the original basal medium. The glucose containing medium was referred to as "modified basal medium".

3. Effect of some organic supplements

The role of pyruvate, α -ketoglutarate and acetate in the mechanism of nitrogen fixation was evaluated (7-8). The effect of these compounds,

together with other related intermediates, on growth and nitrogen fixation in the experimental organism was studied. These compounds were added in presence and absence of glucose. In presence of glucose (10 g/l), these supplements were charged at carbon concentration equivalent to 1 % glucose either at the beginning of incubation or after 4 days of incubation. It was found more convenient to add the individual supplements to the medium at that stage of growth as about 92 % of the concentration of glucose was consumed (*table 1*). The results obtained with these experimental treatments were compared with control treatment in which 2 % glucose without the addition of organic compounds was used as sole carbon source (*table 3*). The addition of the tested supplements, except pyruvate,

Table 3. The dry weight (D. wt.) and total nitrogen content (T. N.) (mg/100 ml culture medium) of the experimental organism as affected by the addition of different organic supplements to the modified basal medium containing 1 g glucose % (w/v)

| Treatments | Time of addition | | | |
|-------------------------|------------------|---------------|----------------|---------------|
| | After 4 days | | At zero time | |
| | D. wt. (mg) | T. N. (mg) | D. wt. (mg) | T. N. (mg) |
| Control (*) | 680 | 47.6 | 680 | 47.6 |
| Acetate | 806 | 44.8 | 383 | 19.6 |
| Pyruvate | 490 | 44.8 | 392 | 20.4 |
| α -ketoglutarate | 962 | 47.6 | 450 | 19.6 |
| Succinate | 753 | 46.2 | 661 | 45.4 |
| Fumarate | 956 | 47.6 | 376 | 21.4 |
| Malate | 758 | 48.6 | 396 | 19.8 |

(*) Control = modified basal medium containing 2 g % glucose.

to glucose containing medium markedly increased the bacterial growth. The stimulation of growth, however, did not take place when these supplements were added after 4 days of incubation. i.e. when the glucose present in the medium was nearly consumed. These results together with the failure of the organism to utilize these compounds as sole sources of carbon (*table 1*) suggested that these compounds might require a "sparker"

in order to be utilized, perhaps due to the active transport of these compounds in the presence of glucose (the sparker) as suggested by Gale (13) and El-Sayed (10). On the other hand, succinate improved the growth as well as nitrogen fixation when added after 4 days of incubation. In addition, succinate supported considerable growth (114 mg/culture) and nitrogen yield (12.6 mg/culture) when used as sole carbon source (table 2). This might be due to the fact that succinate did not need a "sparker" to be utilized (29).

4. Effect of phosphate level

As it is proved that phosphate, as adenosine triphosphate, is of great importance in nitrogen fixation process (7), it was decided to study the response of the local organism to phosphate level. The data presented in table 4 proved that the phosphate ions were indispensable for the organism,

Table 4. The consumed sugar (C. S.), dry weight (D. wt.) and total nitrogen content (T. N.) (mg/100 ml culture medium) of the experimental organism as affected by the addition of various concentrations of potassium dihydrogen phosphate

| KH ₂ PO ₄ concentrations (g %) | C. S. (*) (mg) | D. wt. (mg) | T. N. (mg) |
|--|----------------|-------------|------------|
| 0.00 | none | none | none |
| 0.01 | 1,205 | 502 | 30.5 |
| 0.03 | 1,711 | 641 | 41.8 |
| 0.05 | 1,852 | 653 | 43.2 |
| 0.08 | 2,000 | 705 | 45.7 |
| 0.10 | 2,000 | 701 | |
| 0.20 | 1,205 | 605 | 40.5 |
| 0.30 | 805 | 563 | 38.0 |
| 0.40 | 703 | 462 | 25.0 |
| 0.50 | 606 | 456 | 17.0 |

as no growth was detected when cultivated on medium containing no added phosphate. The addition of phosphate was accompanied by enhancing the

growth as well as the capacity for nitrogen fixation. Optimal phosphate level appeared to lie at 0.08-0.1 g % (w/v) KH_2PO_4 . Similar findings were also recorded by Jensen (17), Krzemieniewska (19) and Overbeck (26).

5. Effect of trace elements

The glass wares used in this experiment were treated according to Esposito and Wilson (12). Analytical reagent grade chemicals were used for the preparation of the modified basal medium. This medium lacking iron and molybdenum was used as the control treatment. To aliquots of this medium, the tested trace elements (100 ppm) were added in different experimental treatments.

From the results in *table 5*, it could be concluded that neither of the individual trace elements appeared to affect the cell mass yield and nitrogen

Table 5. The consumed sugar (C. S.), Dry weight (D. wt.) and total nitrogen content (T. N.) (mg/100 ml culture medium) of the experimental organism as affected by different trace elements

| Treatments | C. S. (*) (mg) | D. wt. (mg) | T. N. (mg) |
|-------------------|-------------------|----------------|---------------|
| Control (**) | 983 | 225 | 15.4 |
| Molybdenum + iron | 1,984 | 675 | 47.4 |
| Molybdenum | 805 | 203 | 17.1 |
| Iron | 915 | 302 | 22.9 |
| Cobalt | 805 | 198 | 11.2 |
| Zinc | 803 | 304 | 15.1 |
| Boron | 895 | 250 | 23.5 |
| Copper | 825 | 275 | 16.8 |
| Tungsten | 504 | 252 | 23.2 |
| Strontium | 805 | 298 | 22.4 |
| Mixture | 552 | 125 | 8.4 |

(*) Initial sugar concentration = 1,984 mg/100 ml culture medium. (**) Medium containing no trace elements.

fixation. However, best results were recorded with iron-molybdenum mixture. The role of molybdenum in nitrogen fixation was studied by Magee

and Burris (21). They indicated that molybdenum is present as molybdo-protein in living cells of nitrogen fixating bacteria. Keeler et al. (18) stated that the uptake of molybdenum by intact cells of bacteria is greatly influenced by aeration and by the amount of ferrous ions in the medium. In addition, iron as non-heme iron is the most important component of the ferredoxin which play an important role in nitrogen fixation (7-8 and 23). Bulen et al. (6) stated that nitrogenase is an ironmolybdenum containing enzyme, with iron at the binding site for nitrogen. The presence of molybdenum and non-heme iron protein in the cell components of *Azotobacter spp.* was recently proved (14 and 15).

6. Effect of soil extract

Different volumes of soil extract, prepared after El-Refai (9) were added to the modified basal medium under different experimental conditions (table 6). The addition of th esoil extract to the medium containing

Table 6. The consumed sugar (C. S.), dry weight (D. wt.) and total nitrogen content (T. N.) (mg/100 ml culture medium) of the experimental organism as affected by soil extract added in presence and absence of trace elements (Mo + Fe)

| Soil extract concentration (ml %, v/v) | In presence of trace elements | | | In absence of trace elements | | |
|--|-------------------------------|-------------|------------|------------------------------|-------------|------------|
| | C. S. (*) (mg) | D. wt. (mg) | T. N. (mg) | C. S. (*) (mg) | D. wt. (mg) | T. N. (mg) |
| Control (**) | 2,000 | 622 | 49.2 | 656 | 231 | 14.0 |
| 1 | 1,835 | 561 | 42.1 | 975 | 343 | 19.6 |
| 5 | 1,575 | 498 | 36.3 | 1,395 | 412 | 23.8 |
| 10 | 1,506 | 452 | 29.4 | 1,402 | 482 | 29.4 |
| 15 | 1,308 | 403 | 25.2 | 1,404 | 504 | 29.4 |

(*) Initial sugar concentration = 2,000 mg/100 ml culture medium. (**) Modified basal medium containing no soil extract.

N. B. The partial chemical analysis of the soil extract used revealed the following: total soluble salts = 0.056 g %; total Kjeldahl nitrogen = 0.005 g %; nitrates = 0.023 g %; ammonia = undetectable; vitamins = undetectable.

no trace elements greatly enhanced the growth and the nitrogen fixation. On the contrary, the addition of this extract to the medium containing trace elements caused a marked inhibition of the bacterial yields. This might indicate that the effect of soil extract was due to its content of inorganic constituents. This finding is analogous to that of El-Refai (9), who attributed the effect of soil extract to its organic and inorganic constituents which might take part in the different metabolic activities of the bacterial cells. The retardation of growth of the organism when soil extract was added to the medium containing Mo + Fe might be due to the sensitivity of the organism to higher concentrations of elements, especially when knowing that the salt content of the used soil extract was 56 mg % (w/v). Such explanation is quite logic as the requirements of *Azotobacter* for trace elements are in micrograms (1, 5, 19-20 and 32).

SUMMARY

The growth and the nitrogen fixation in a locally isolated strain of *Azotobacter chroococcum* were influenced by the age of the culture and the composition of the medium. Glucose was found to be superior carbon source. However, better results were obtained with the addition of certain organic supplements to glucose-containing medium. Phosphate proved to be indispensable for both growth and nitrogen fixation. Similarly, the addition of molybdenum and iron or soil extract to the culture medium stimulated the activities of the organism.

RESUMEN

Estudios sobre fijación del nitrógeno por Azotobacter chroococcum

Se ha encontrado que la edad del cultivo y la composición del medio influyen en el crecimiento y la fijación del nitrógeno, en una estirpe de *Azotobacter chroococcum* y asimismo, que la glucosa es la fuente de carbono más adecuada. Sin embargo, se han obtenido mejores resultados añadiendo ciertos suplementos orgánicos al medio glucosado. El fosfato ha demostrado ser indispensable, tanto para el crecimiento como para la fijación del nitrógeno. La adición de molibdeno y hierro o extracto de suelo al medio de cultivo estimula la actividad del microorganismo.

BIBLIOGRAPHY

1. ANDERSON, G. R., and JORDAN, J. V. 1961. Boron: a nonessential growth factor for *Azotobacter chroococcum*. Soil Sci., 92, 113-16.
2. BERSHOVA, O. I. 1956. The action of microelements on the soil bacteria. I. The utilization of molybdenum by *Azotobacter*. Mikrobiol. Zh. Akad. Nauk Ukr. SSR, 18, 5-12.
3. BERSHOVA, O. I. 1958. Utilization of molybdenum by nitrogen fixing bacterial cultures. Tr. Inst. Mikrobiol., Akad. Nauk Latv. SSR, 7, 115-20.
4. BORTELS, H. 1930. Molybden als Katalysator bei der Biologischen Stickstoffbindung. Arch. Mikrobiol., 1, 333-42.
5. BORTELS, H. 1936. Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Molybden, Vanadium, Wolfram und anderen Erdaschenstoffen für stickstoffbindende und andere Mikroorganismen, Zentralbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. II, 95, 193-218.
6. BULEN, W. A.; BURNS, R. C., and LE COMTE, J. R. 1965. Nitrogen fixation. Hydrosulfite as electron donor with cell free preparation of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 53, 532-39.
7. BURRIS, R. H. 1966. Biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Plant Physiol., 17, 155-84.
8. CARNAHAN, J. E., and CASTLE, J. E. 1963. Nitrogen fixation. Annu. Rev. Plant Physiol., 14, 125-36.
9. EL-REFAI, A. H. 1961. Physiological and biochemical studies on nitrogen fixation by blue green algae. M.Sc. Thesis, Faculty of Science, Ain-Shams University, Cairo.
10. EL-SAYED, M. A. 1968. Studies on the acetic acid bacteria. Ph.D. Thesis, Faculty of Science, Ain-Shams University, Cairo.
11. EL-SAYED, M. A.; EL-REFAI, A. H., and MOHAMED, T. A. 1971. Nitrogen fixation by some cultures of *Azotobacter*. Pak. J. Biochem. 2nd issue.
12. ESPOSITO, R. G., and WILSON, P. W. 1956. Trace metals requirement of *Azotobacter*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 93, 564-67.
13. GALE, E. F. 1947. The assimilation of amino acids by bacteria. I. The passage of certain amino acids across the cell wall and their concentration in the environment of *Streptococcus faecalis*. J. Gen. Microbiol., 1, 53-76.
14. GANELIN, V. L.; L'VOV, N. P.; KRISTEINE, B.; LYUBIMOV, V. I., and KRETOVICH, V. L. 1969. Iron and molybdenum-containing components of the nitrogen-fixing system of *Azotobacter vinelandii*. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 185, 1,169-71.
15. GVOZDEV, R. I.; YAKOVLEV, V. A.; LINDE, V. R.; VOROB'EV, L. V., and ALFIMOVA, E. Ya. 1969. *Azotobacter* cell components containing molybdenum and non-heme iron. Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol., 2, 215-21.
16. JACOBS, M. B. 1958. The Chemical Analysis of Food and Food Products, 34. D. Van Nostrand Co., Inc. New York.

17. JENSEN, H. L. 1954. The Azotobacteriaceae. *Bacteriol. Rev.*, 18, 195-213.
18. KEELER, R. F.; BULEN, W. A., and VARNER, J. E. 1956. Distribution of molybdenum⁹⁹ in cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 72, 394-96.
19. KRZEMIENIEWSKA, H. 1910. Der Einfluss der Mineralbestandteile der Nahrlosung auf die Entwicklung des *Azotobacters*. *Bull. Int. Acad. Pol. Sci. Lett., Cl. Sci., Math. Natur. Ser. B*, 376-413.
20. KURDINA, R. M. 1968. Effect of cobalt on the growth and nitrogen fixation of *Azotobacter chroococcum* 53. *Tr. Inst. Mikrobiol. Virusol., Akad. Nauk. Kaz. SSR.*, 11, 84-86.
21. MAGEE, W. E., and BURRIS, R. H. 1956. Oxidative activity and nitrogen fixation in cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 71, 635-43.
22. MARKHAM, R. 1942. A steam distillation apparatus suitable for micro-Kjeldahl analysis. *Biochem. J.*, 36, 790-91.
23. MARTENSON, L. E. 1963. Nitrogen fixation: Role of ferredoxin in anaerobic metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.*, 17, 115-38.
24. MOSHKOVSKII, Y. S.; IVANOV, I. O.; STUKAN, R. A.; MATHANOV, G. I.; MARDANYAN, S. S.; BELOV, Y., and GOL'DANSKII, V. I. 1967. Application of the Moessbauer effect in studying the role of iron in biological nitrogen fixation. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 174, 215-17.
25. MONTASIR, A. H.; MOSTAFA, M. A., and ELWAN, S. H. 1959. Desert rhizospheric microflora as a biotic factor in the development of *Farsetia aegyptiaca* Turra Farset. V. Nitrogen fixation and decomposition process by *Farsetia* rhizospheric microorganisms. *Ain-Shams Sci. Bull.*, 4, 27-49.
26. OVERBECK, J. 1967. Biochemical-ecological studies of the phosphate metabolism of *Azotobacter chroococcum*. *Helgolander Wiss. Meeresunters.*, 15, 202-9.
27. RABOTNOVA, I. L.; ZAITSEVA, G. N., and MINEEVA, A. 1959. Lag phase in microorganisms. III. Changes in *Azotobacter* cells grown on molecular and on ammonia nitrogen. *Mikrobiologiya*, 28, 683-89.
28. RANTER, E. I. 1964. Molybdenum and the problem of biological nitrogen fixation. *Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Biol.*, 29, 223-43.
29. REPASKE, R., and WILSON, P. W. 1953. Oxidation of intermediates of the tricarboxylic acid cycle of *Azotobacter agile*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 39, 225-32.
30. SAYED-AHMED, M. M. 1969. The biosynthesis of amino acids by microorganisms, M.Sc. Thesis, Faculty of Science, Cairo University.
31. SCHOORL, V. 1929. Physical and chemical methods of analysis, by C. A. Browne and F. W. Zerban, 3 ed.
32. VOETS, J. P. 1957. The influence of iron on the nitrogen fixation and dextrose metabolism by *Azotobacter*. *Meded. Landbouwhoges. Opzoekingssta. Staat Gent.*, 22, 291-303.
33. ZHIVKU, V. R. 1967. Nutrient sources of *Azotobacter*. *Pochvozn. Agrokhim.*, 2, 55-60.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ANALISIS GENETICO DEL EQUILIBRIO
ENTRE INDIVIDUOS SEGREGADORES
Y NO SEGREGADORES DE GLUTAMATO
EN LAS POBLACIONES DE *C. INTERMEDIUM* C₃

por

J. GUINEA, S. HERNÁNDEZ y R. PARÉS

INTRODUCCION

Con anterioridad se ha descrito la acumulación de aminoácidos durante el crecimiento de la cepa C₃ de *Citrobacter intermedium* en un medio mineral con glucosa (2-3). Posteriormente se ha descrito un método de análisis colonial para la segregación de glutamato y alanina que revela que las poblaciones de los cultivos en fase logarítmica de esta bacteria están constituidas por individuos sg⁺ segregadores y sg⁻ no segregadores (7 y 9). Los subcultivos obtenidos a partir de colonias de tipo C, poblaciones que no acumulan aminoácidos a su alrededor, se hacen rápidamente idénticas a las de la población de partida.

El análisis genético de este fenómeno fue iniciado por Guinea hace unos años, llegándose a poner de manifiesto que los elementos no segregadores dan a su descendencia formas segregadoras con una alta probabilidad, la cual tiene la misma cinética que la aparición de mutantes (6). La frecuencia del cambio es mucho más alta que la que puede esperarse de un fenómeno mutacional.

La determinación de la velocidad del cambio sg⁻→sg⁺ por los méto-

dos aplicados a las mutaciones bacterianas ofrece una serie de dificultades que han sido discutidas ampliamente en otros trabajos (6 y 8).

MATERIAL Y METODOS

Las características de las cepas bacterianas, medios de cultivo y método de análisis colonial se han descrito en publicaciones precedentes (2-3 y 6). Sustancialmente, con el método del análisis colonial se demostró la existencia de elementos segregadores y no segregadores de ácido glutámico dentro de las poblaciones de *Citrobacter intermedium* C₃, así como una interconversión entre los mismos sujeta a un equilibrio definido para las condiciones de trabajo descritas. Las colonias denominadas A están constituidas por individuos segregadores de glutamato, acontecimiento demostrable al revelarse con *Leuconostoc mesenteroides* P-60 glutámico-dependiente. Junto a las colonias de tipo C, no acumuladoras de aminoácidos, se incluye otro tipo, el B, constituido por colonias rodeadas de un escaso desarrollo en *Leuconostoc mesenteroides* P-60.

Una célula sg^+ tiene una definida probabilidad de aparecer en un cultivo de células sg^- que depende de la magnitud de la población y del número de generaciones. La probabilidad de que una célula sg^- dé una colonia A es $P = \frac{NA}{N}$, fracción que indica el número de colonias A sobre

un total N, procedentes de una suspensión de una colonia C. La pequeña proporción de células sg^+ en la colonia C puede considerarse despreciable.

Las frecuencias F'_1 y F'_2 de colonias A en cultivos procedentes de muestras de una colonia C, con tiempos de incubación t_1 y t_2 , dan una velocidad aparente de la variación $sg^- \rightarrow sg^+$ por células y generación (1 y 4).

$$a' = \frac{F'_2 - F'_1}{n_2 - n_1} \quad [I]$$

Desarrollando F'_2 y F'_1 se obtiene que

$$a' = a + \frac{N_1 \Delta' - N_2 \Delta}{N_1 N_2 (n_2 - n_1)} \quad [II]$$

siendo a el valor real de la variación $sg^- \rightarrow sg^+$, a' el valor aparente, N_1 y N_2 , respectivamente, la población/ml después de los tiempos t_1 y t_2 en el que han transcurrido n_1 y n_2 generaciones. Pueden regularse los inóculos de estos cultivos para que N_1 sea aproximadamente igual a N_2 . Si además se tiene en cuenta en [II] que $\Delta' = P(N - X_2)$ y $\Delta = P(N - X_1)$, siendo $x = aNn$ se obtiene que

$$a = \frac{a'}{1 - P} \quad \text{[III]}$$

Si a es muy grande, el cambio recíproco $sg^+ \rightarrow sg^-$ condiciona un equilibrio en la población que en un tiempo t_3 suficientemente grande será $F'_3 - F'_2 = 0$, lo cual permite estimar la velocidad de la variación retrógrada b . En efecto, en el equilibrio de la población

$$\frac{X}{N} = \frac{\frac{Na}{N} - P}{1 - P} \quad \text{[IV]}$$

Con el valor dado [IV] y a se puede determinar el número de generaciones necesario para alcanzar el equilibrio y con ello b . Una colonia *C* se suspende en 10 ml de Ringer 1/4. Se preparan las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} . Extendiendo volúmenes de 0,1 ml sobre placas de la dilución 10^{-4} se obtiene un número de colonias que oscila de 10 a 35, las cuales se revelan con *Leuconostoc mesenteroides* P-60. Con esta serie se determina P . Se inoculan tubos de 10 ml en la dilución 10^{-2} y se incuban a 20 °C. Se determinan N y Na como en el caso anterior, saliendo igual número promedio de colonias por placa (serie 1). Se lleva a cabo una operación análoga con inóculos de 1 ml de la dilución 10^{-6} y de 1 y 2 ml de la dilución 10^{-8} . Se incuban 12 h, a 30 °C, repitiéndose la extensión en placas y el revelado. Se toman placas cuyo número de colonias oscila entre 10 y 35 (serie 2).

Se determina el número de generaciones n_1 y n_2 correspondientes a cada serie, aplicando la ley del crecimiento logarítmico. El número inicial de

células/ml en cada caso se determina a partir de los valores encontrados en la serie de placas que ha servido para determinar P. Los inóculos que se toman de la dilución 10^{-8} contienen un número promedio de células por unidad de volumen que se determina independientemente, aplicando el método del número más probable (5).

Con los datos obtenidos se calcula a aplicando las fórmulas I y III. La serie 2 tiene el mismo número de individuos que la serie 1, con 9 h más de incubación. A 24 y 33 h, partiendo de diluciones apropiadas, se extienden 0,1 ml sobre placas y se revela con *Leuconostoc mesenteroides* P-60, obteniéndose valores idénticos de Na. Con estos valores y aplicando la fórmula IV puede determinarse la fracción X de células sg^{-} en la población en equilibrio. Entonces la velocidad del cambio recíproco $sg^{+} \rightarrow sg^{-}$ viene dada por

$$b = a \frac{X}{N - X}$$

RESULTADOS

En el *cuadro 1* se consignan los resultados obtenidos en 3 experiencias independientes con distintos valores de P obtenidos variando intencionadamente el tiempo de revelado.

En el *cuadro 2* se resumen los resultados obtenidos en una experiencia análoga, en la que la segunda y tercera serie corresponden a incubaciones de 24 y 33 h. El análisis colonial se ha practicado a partir de 0,1 ml de diluciones 1/100. Las frecuencias de colonias A, correspondientes a la 2.^a y 3.^a no difieren entre sí significativamente, de acuerdo con el valor de la t de Student, que arroja una probabilidad del 90 % de que no sean iguales.

Aplicando la fórmula IV, resulta una fracción de sg^{+} en la población en equilibrio de 0,4. De acuerdo con la fórmula V, b sería $2,37 \cdot 10^{-2}$.

RESUMEN

En este trabajo se da a conocer un nuevo método de determinación de velocidad de aparición de elementos segregadores (sg^{+}) a partir de los no segregadores (sg^{-}), con el que puede llevarse a cabo un análisis más pre-

a'

Cuadro 1. Velocidad del cambio $sg^- \rightarrow sg^+$ según $a = \frac{a'}{1 - P}$. Resultados obtenidos en tres experiencias independientes con distintos valores de P obtenidos variando el tiempo de revelado

| Prueba | N_0 | N_A | P | N_1 | $(N_1)^3$ | $(N_A)^3$ | F_1 | n_1 | N_2 | $(N_2)^{12}$ | $(N_A)^{12}$ | F_2 | n_2 | a' | a |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------|-------|-----------|-----------|-------|-------|-------|--------------|--------------|-------|-------|-------|---------------------|
| 1. ^a | $2,2 \cdot 10^6$ | $1,2 \cdot 10^6$ | 0,55 | 219 | 340 | 175 | 0,51 | 0,6 | 0,3 | 198 | 116 | 0,58 | 8,1 | 0,017 | $3,8 \cdot 10^{-2}$ |
| | | | | | | | | | 0,6 | 200 | 96 | 0,475 | 8,7 | | |
| | | | | | | | | | 30 | 272 | 215 | 0,8 | 3,2 | | |
| | | | | | | | | | | | | 0,615 | 6,7 | | |
| 2. ^a | $2 \cdot 10^6$ | $5,5 \cdot 10^5$ | 0,275 | 200 | 220 | 100 | 0,45 | 0,2 | 0,08 | 283 | 180 | 0,64 | 4,8 | 0,02 | $3 \cdot 10^{-2}$ |
| | | | | | | | | | 2 | 407,5 | 312,5 | 0,77 | 7,7 | | |
| | | | | | | | | | 1 | 216 | 92 | 0,43 | 7,7 | | |
| | | | | | | | | | | | | 0,61 | 6,7 | | |
| 3. ^a | $1,32 \cdot 10^6$ | $2,95 \cdot 10^5$ | 0,223 | 132 | 148 | 33 | 0,225 | 0,25 | 1,36 | 138 | 80 | 0,58 | 10 | 0,02 | $4,1 \cdot 10^{-2}$ |
| | | | | | | | | | 0,78 | 88 | 44 | 0,50 | 10,3 | | |
| | | | | | | | | | | | | 0,54 | 10,1 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

ciso del equilibrio entre unos y otros, en las poblaciones de los cultivos de *Citrobacter intermedium* C₃.

Cuadro 2. Ensayo comparativo entre las frecuencias de colonias A de las series 2.^a y 3.^a de la prueba de equilibrio entre $sg^- \rightarrow sg^+$

| Serie | Número total de colonias | Colonias B+C | P (% B+C) | M - P | (M - P) ² |
|-----------------|--------------------------|--------------|-----------|-------|----------------------|
| 2. ^a | 112 | 47 | 653,4 | 86,9 | 12.623,76 |
| 3. ^a | 115 | 37 | 344,4 | 112,3 | 1.559,90 |
| | M=46,7 | t= 0,263 | | | |
| | M'=43 | n=20 | | | |

SUMMARY

Equilibrium state between segregators and non segregators cells in the C. intermedium C₃ populations

This work shows a new method for the determination of the speed apparition of segregators elements (sg^+) from the nonsegregators (sg^-). An analysis more accurate of the equilibrium among them, may be carried out with this work, in the populations of cultures of *Citrobacter intermedium* C₃.

BIBLIOGRAFIA

1. BRAUN, W. 1965. Bacterial Genetics. W. B. Saunders Company, Filadelfia-Londres.
2. CLOTET, R.; GUINEA, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1968. Segregación de aminoácidos por una cepa de *C. intermedium*. Microbiol. Españ., 21, 155.
3. CLOTET, R.; GUINEA, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1968. Producción de alanina por fermentación con *C. intermedium* C₃. Rev. Españ. Fisiol., 25, 41.
4. CLOWES, R., y MOODY, C. 1966. Genetics, 53, 717.
5. EISENHART, C., y WILSON, P. W. 1943. Statistical methods and control in bacteriology. Bacteriol. Rev., 7, 57.

6. GUINEA, J. 1966. Estudio sobre la segregación de aminoácidos por *C. intermedium* C₃ y su condicionamiento genético. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona.
7. GUINEA, J. 1970. Análisis colonial de la producción de ácido glutámico por *Citrobacter intermedium* C₃. Microbiol. Españ., 23, 13.
8. HERNÁNDEZ, S. 1968. Segregación de glutamato en *C. intermedium* como propiedad determinada por la presencia de un factor episómico. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona.
9. HERNÁNDEZ, S. 1970. Heterogeneidad colonial de *Citrobacter intermedium* C₃ en relación con la segregación de alanina. Microbiol. Españ., 23, 139.

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

CARACTERISTICAS SINTOMATOLOGICAS,
MORFOLOGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES
DE UNA RAZA DEL VIRUS MOSAICO
DE LA ALFALFA ENCONTRADA EN ESPAÑA

por

J. R. DÍAZ-RUIZ y R. MORENO

INTRODUCCION

El virus Mosaico de la alfalfa es el único virus multiparticulado conocido, que presenta más de dos partículas o componentes con diferentes tamaños y formas que van desde bacilares con bordes redondeados a esféricas o casi esféricas. Este hecho hace que sea fácilmente identificable al microscopio electrónico por los métodos de tinción.

Desde 1931, se conocen gran número de razas de este virus, que se han diferenciado por la producción de síntomas en distintas plantas de ensayo. Generalmente, el tipo común y la mayoría de las razas descritas, producen sólo lesiones locales en judía, aunque existen algunas variantes que dan también síntomas generalizados (15-19).

Esta variabilidad en la producción de síntomas, probablemente, es debida a diferencias en la proporción de sus componentes, ya que se ha visto que la frecuencia de cada componente no sólo varía con las distintas razas, sino que, para una misma raza, no permanece constante en el curso de la infección.

Recientemente, Hull y colaboradores (8) estudian la ultraestructura de plantas de *Nicotiana tabacum* var. white burley, infectadas con 24 razas de este virus, y hacen cuatro grupos, de acuerdo con los tipos de formaciones encontradas.

En este trabajo se describen algunas características sintomatológicas, citológicas, morfológicas y ultraestructurales de una raza del virus Mosaico de la alfalfa, encontrada en España, que difieren en parte de las conocidas para otras razas.

MATERIAL Y METODOS

Fuente del virus

El virus Mosaico de la alfalfa ha sido encontrado en los alrededores de Madrid infectando, con síntomas de mosaico y amarilleamiento (*figura 1*), la mayoría de las plantas de alfalfa de un cultivo.

Se han inoculado, con savia de algunas de estas plantas tomadas como muestras, diferentes plantas de ensayo, empleando carborundo (37μ) como abrasivo.

Citología

Se han realizado exámenes citológicos de las muestras (alfalfa) y de diferentes plantas de ensayo que presentaban síntomas, por el método de tinción con floxina (10-11).

Purificación

El virus ha sido purificado por el método del butanol-cloroformo (13), a partir de muestras de alfalfa recogidas en el cultivo y a partir de plantas de tabaco y judía inoculadas con estas muestras.

Las tinciones negativas del virus purificado se han hecho por el método de Brenner y Horne (3), utilizando ácido fosfotúngstico a $\text{pH} = 7$ y fijando las partículas previamente con una solución de formaldehído al 2 % (6).

Serología

Los ensayos serológicos han sido realizados por el método de doble difusión en gel de agar (4), utilizando como antígenos preparaciones purifi-

cadadas del virus que han sido probadas frente a antisueros de los virus Mosaico de la alfalfa y Mosaico del pepino, cedidos amablemente por el Dr. Peña Iglesias. Como antígeno testigo se ha empleado la raza 425 del virus Mosaico de la alfalfa y como control, savia clarificada de planta sana.

Los resultados han sido obtenidos a los 3 días de incubación a temperatura ambiente.

Ultraestructura

Se han examinado gran número de secciones ultrafinas de tejido de la muestra y de algunas plantas de ensayo que presentaban síntomas, que han sido preparadas como sigue: 1) fijación en 5 % de glutaraldehído en tampón palade a 4 °C, durante 45 min; y en 2 % de tetraóxido de osmio en tampón palade, a 4 °C, durante 2 h; 2) deshidratación en una serie de acetonas de distinta concentración, saturada la de 70 % con acetato de uranilo para conseguir contraste; 3) inclusión en mezclas de aralditas (durcupán).

Las secciones han sido obtenidas con un ultramicrotomo LKB y cuchillas de vidrio, estiradas con cloroformo, montadas sobre rejillas con una película de formvar, teñidas con citrato de plomo (9) y observadas con un microscopio Siemens Elmiskop I del Servicio de Microscopía Electrónica del CIB (CSIC).

RESULTADOS

Sintomatología

De las plantas de ensayo inoculadas, dieron síntomas de infección las siguientes: quenopodiáceas: *Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa*; papilionáceas: *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vicia faba* y *Vigna sinensis*; solanáceas: *Nicotiana tabacum* var. white burley, *N. clevelandii*, *Petunia hybrida*, *Solanum lycopersicum*.

No presentaron síntomas, las siguientes: cucurbitáceas: *Cucumis sativus*, y *C. melo*; papilionáceas: *Lathyrus odoratus*, *Medicago sativa*, *Trifolium repens*, *Tr. pratense*, *Tr. incarnatum*; solanáceas: *Capsicum frutescens*; umbelíferas: *Apium graveolens*.

Los síntomas más característicos han sido: *Chenopodium amarantico-*

lor: lesiones locales necróticas y síntomas generalizados consistentes en moteado, clareado de nerviaciones (*figura 3*) y deformación de hojas; *Phaseolus vulgaris*: lesiones locales necróticas estrelladas y ramificadas siguiendo las nerviaciones, en hojas cotiledónicas, síntomas generalizados con mosaico y deformación de hojas (*figura 2*); *Nicotiana tabacum* y *N. clevelandii*: mosaico con deformación de hojas y retardo en el crecimiento (*figura 4*); *Solanum lycopersicum*: síntomas generalizados consistentes en lesiones necróticas, mosaico, deformación de hojas (ahilamiento) y reducción en el crecimiento.

Citología

De todas las plantas examinadas, sólo las de alfalfa (muestra) presentan unas inclusiones cristalinas en sus células de epidermis que son prismas hexagonales perfectos (*figuras 5-6*).

Purificación

El virus purificado en fosfato tampón 0,01M, pH=7, presenta espectro de absorción al ultravioleta, semejante al de otras razas, con valores de $E_{260}/E_{280} = 1,5$.

En las preparaciones purificadas a partir de alfalfa y coloreadas por la técnica de tinción negativa descrita, se puede ver el virus completo (todos sus componentes) en una proporción determinada (*figura 8*); pero cuando las purificaciones se han realizado a partir de tabaco o judía inoculados con alfalfa, la proporción de componentes varía, observándose un incremento en la cantidad de partículas esféricas cuando se trata de tabaco (*figura 9*) y partículas esféricas solamente cuando se trata de judía (*figura 10*).

Estas formas esféricas han sido transmitidas de judía a judía y a tabaco, recuperándolas de la infección producida. Además, inoculadas en diferentes plantas de ensayo producen síntomas semejantes a los obtenidos con el virus completo y de la misma forma que éste, no infectan por inoculación mecánica plantas de alfalfa.

Serología

Una línea de precipitación (*figura 7*) ha sido observada frente al antisuero del virus Mosaico de la alfalfa, con cada uno de los antígenos del

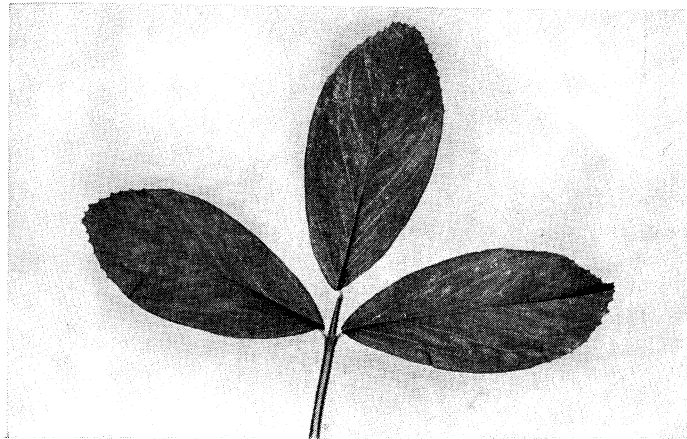


Figura 1. Hojas de alfalfa (muestra) con mosaico

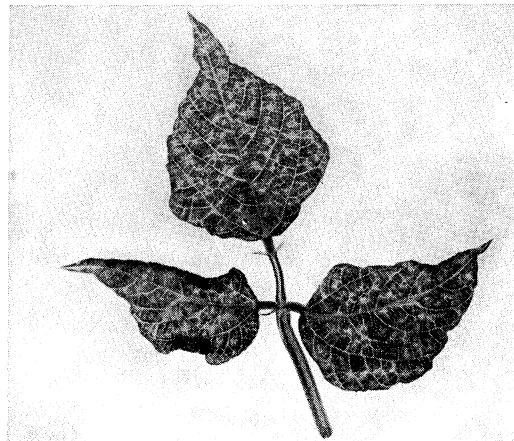


Figura 2. Síntomas generalizados con mosaico y deformación de hojas en judía

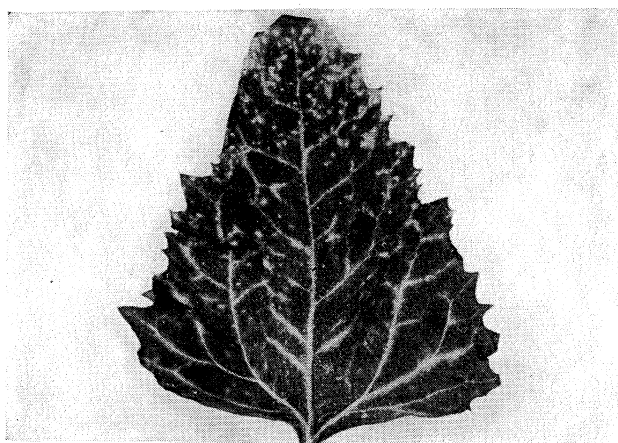


Figura 3. Síntomas generalizados con moteado y clareado de venas en Chenopodium amaranticolor

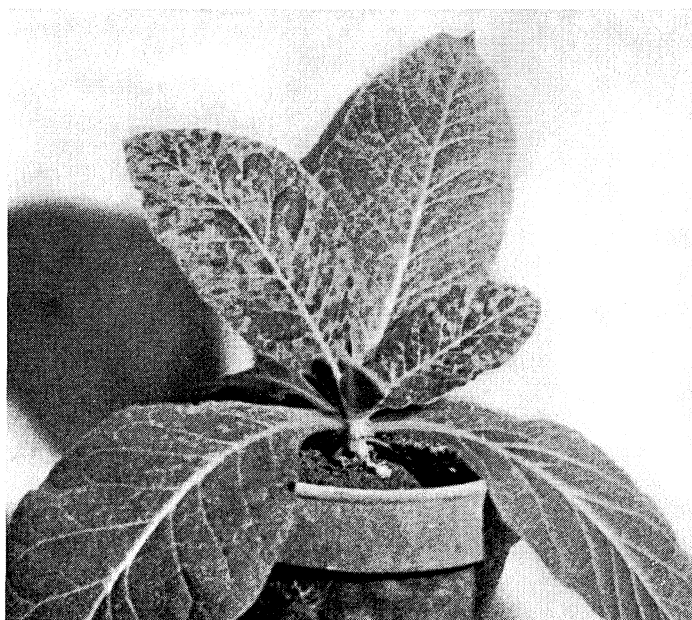


Figura 4. Planta de Nicotiana tabacum var. white burley con mosaico

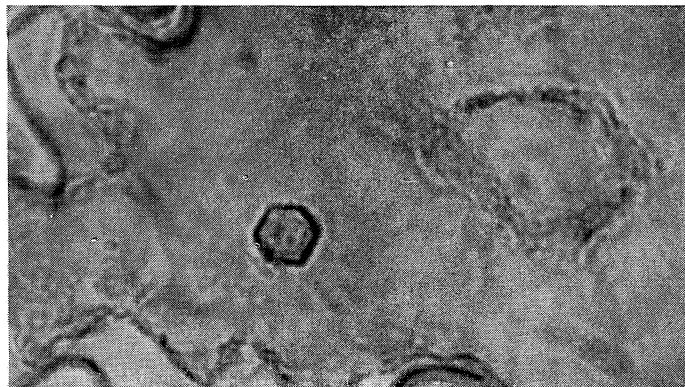


Figura 5. Inclusión cristalina hexagonal en célula de epidermis de alfalfa (muestra)

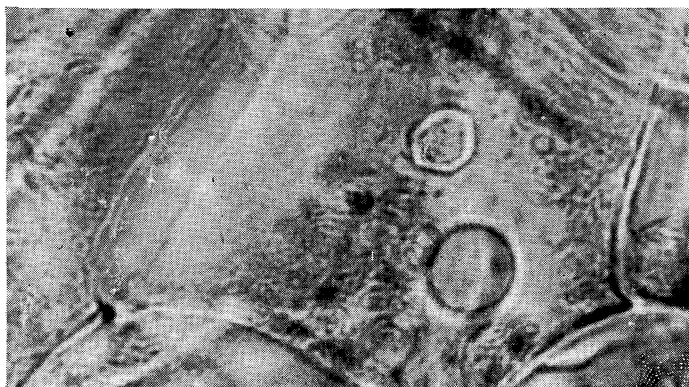


Figura 6. Otra inclusión cristalina semejante a la anterior

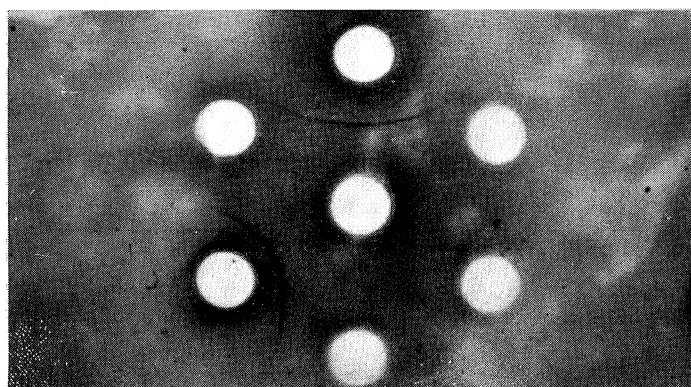


Figura 7. Zonas de precipitación observadas con el virus ensayado (arriba) y con el virus testigo (izquierda), frente al antisuero del virus Mosaico de la alfalfa (centro)

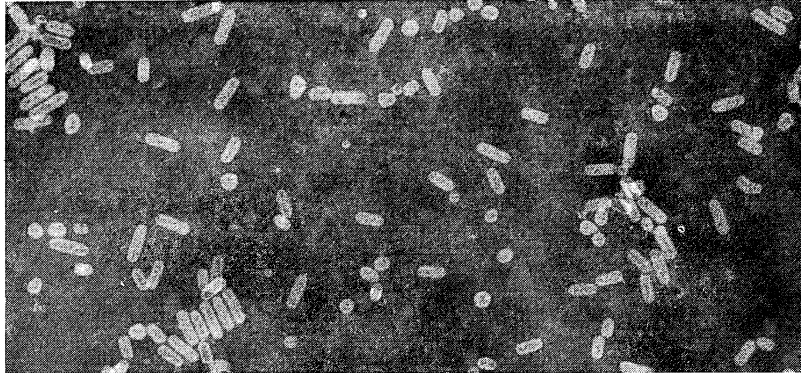


Figura 8. Tinción negativa del virus Mosaico de la alfalfa purificado a partir de alfalfa. $\times 91.800$

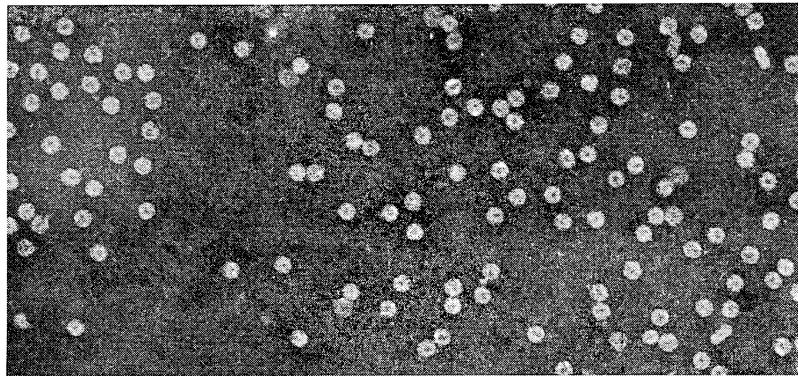


Figura 9. Tinción negativa del virus Mosaico de la alfalfa purificado a partir de tabaco. $\times 92.000$

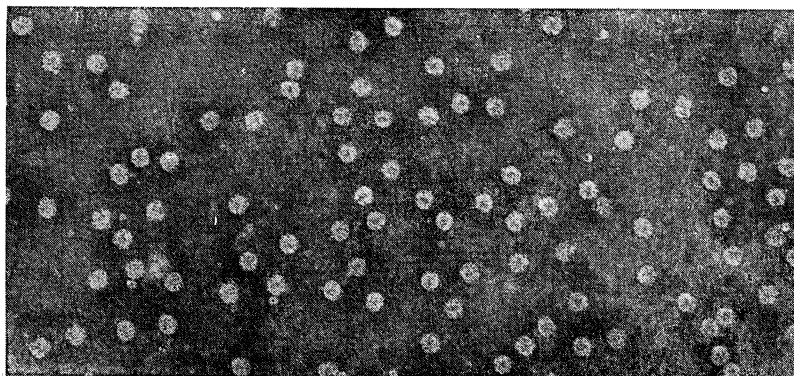


Figura 10. Tinción negativa del virus Mosaico de la alfalfa purificado a partir de judía. $\times 92.000$

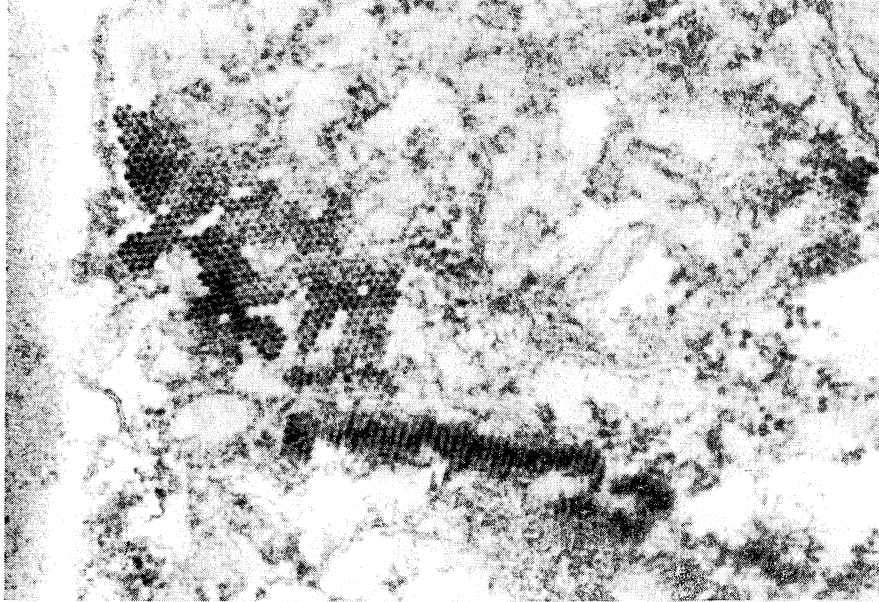


Figura 11. Agregados de partículas bacilares cortadas longitudinal y transversalmente. × 88.000

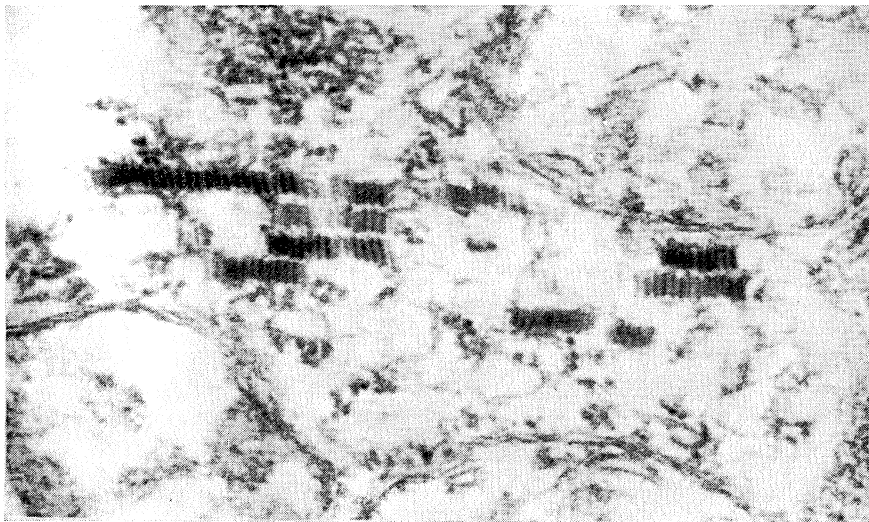


Figura 12. Corte longitudinal de partículas bacilares dispuestas en empalizada. × 88.000

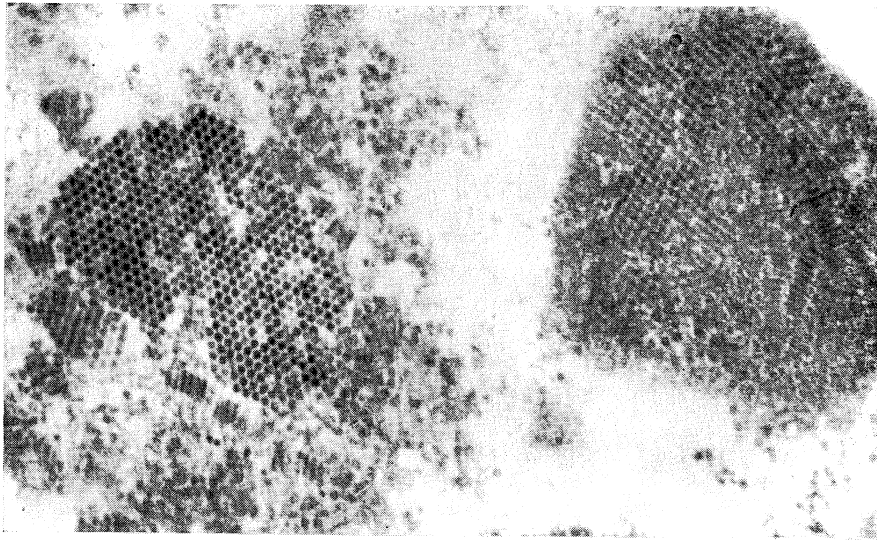


Figura 13. Agregados cristalinos de partículas bacilares. $\times 80.000$

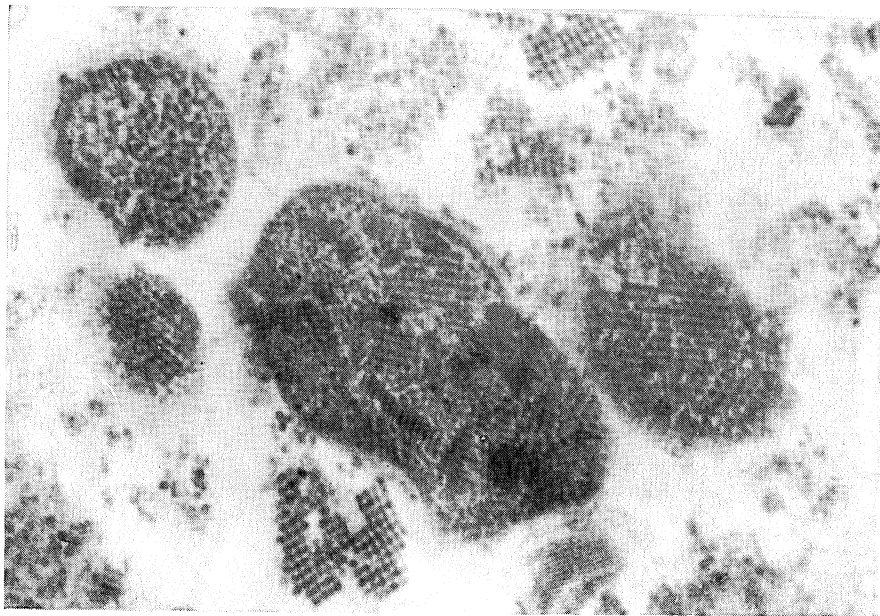


Figura 14. Agregados semejantes a los anteriores. $\times 80.000$

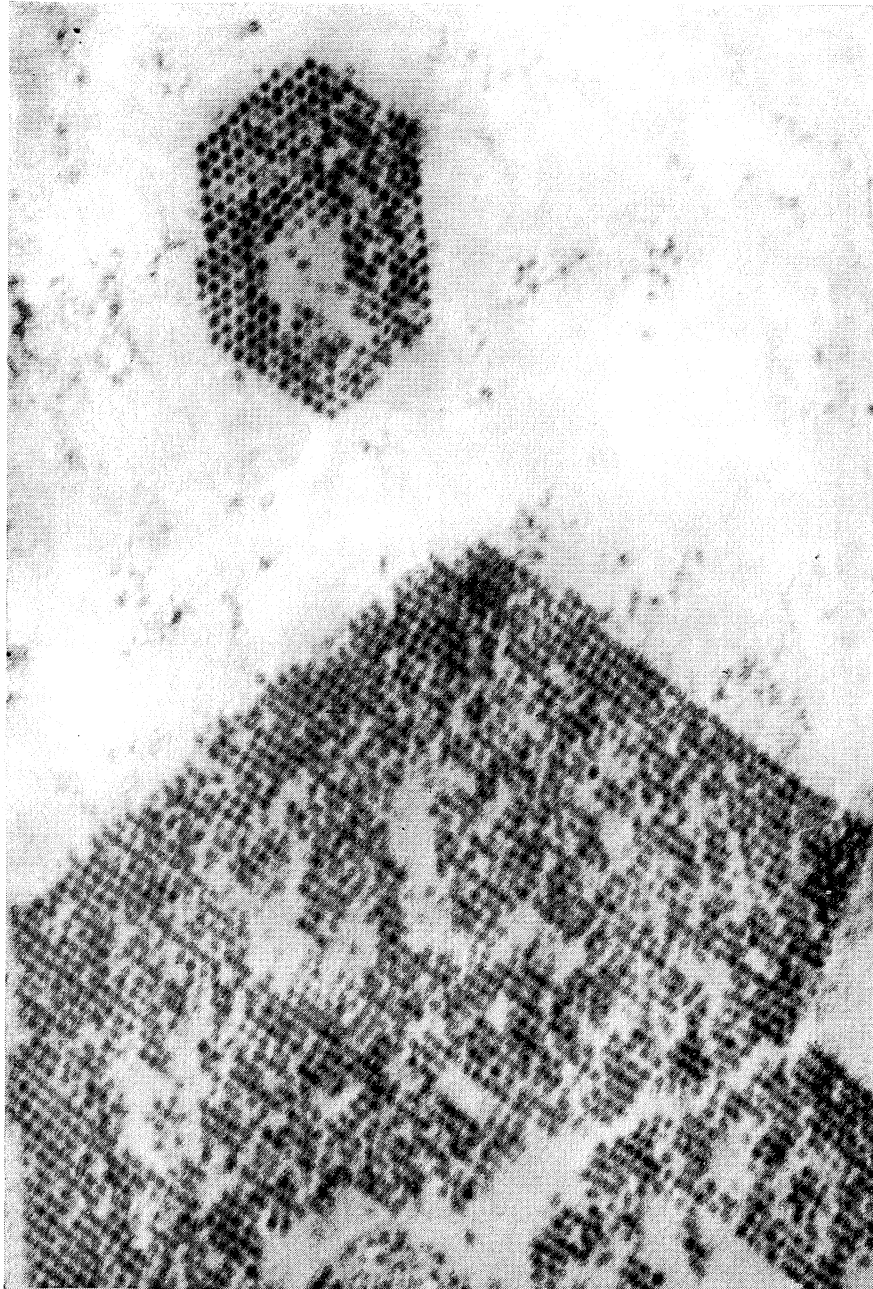


Figura 15. Agregados cristalinos de partículas esféricas. $\times 100.000$

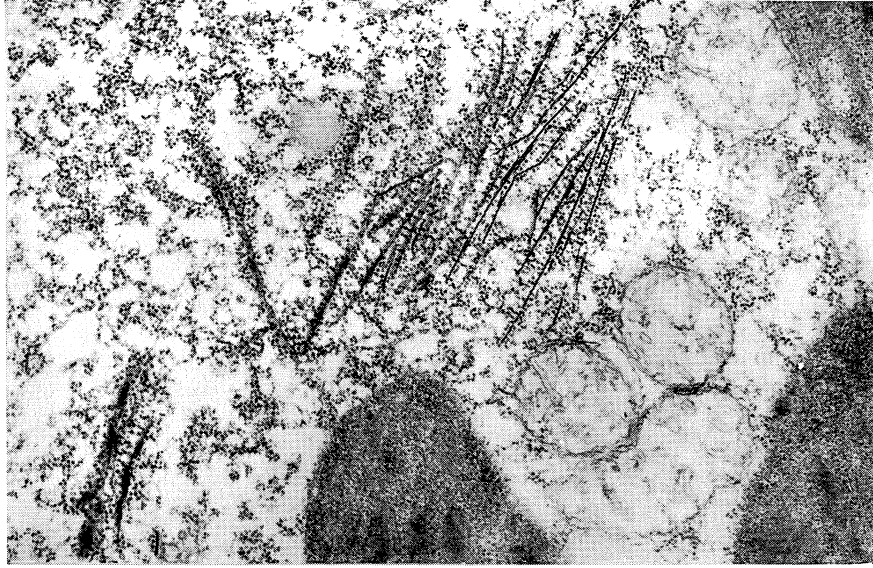


Figura 16. Bandas rígidas localizadas en el citoplasma. $\times 28.700$

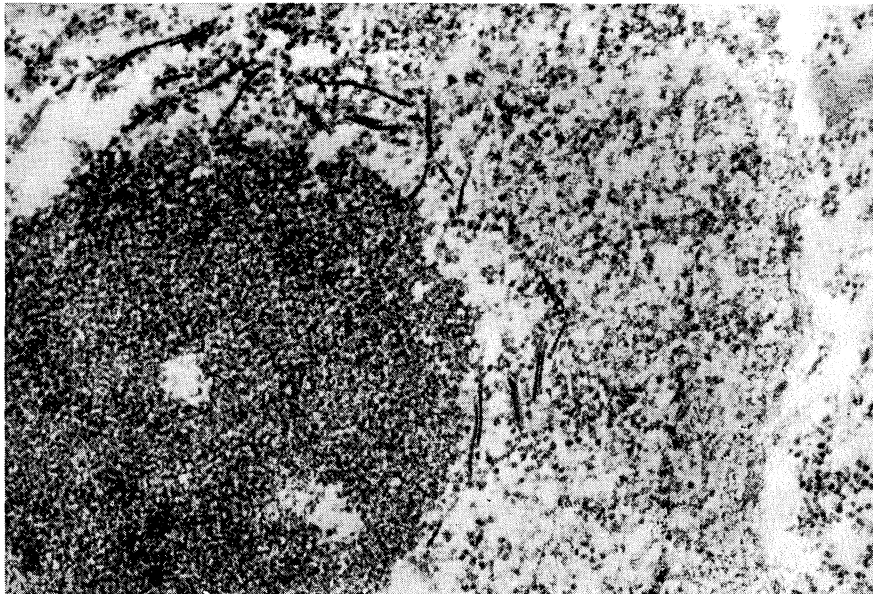


Figura 17. Formaciones tubulares en la periferia del nucleolo. $\times 60.000$

virus ensayado y de la raza 425 del virus testigo, pero no con el extracto de savia sana.

En ningún caso ha habido precipitación frente al antisuero del Mosaico del pepino.

Ultraestructura

En secciones ultrafinas de plantas de alfalfa (muestra), se han visto las siguientes formaciones: agregados de partículas bacilares, unidas lado a lado y dispuestas en empalizada (*figuras 11-12*); agregados cristalinos de partículas bacilares (*figuras 13-14*); agregados cristalinos de partículas esféricas (*figura 15*), que por su forma hexagonal y tamaño se corresponden con las inclusiones observadas al microscopio óptico (*figuras 5-6*); formaciones constituidas por bandas rígidas y densas a los electrones encontradas en el citoplasma (*figura 16*); formaciones tubulares localizadas en el nucleoplasma junto al nucleolo (*figura 17*)

En secciones ultrafinas de plantas de judía, tomate y soja se han visto todas las formaciones anteriores menos los agregados de partículas bacilares.

DISCUSION

La raza que hemos estudiado presenta en algunas de las plantas de ensayo inoculadas una sintomatología semejante a la raza descrita por Zaumeyer (18) y llamada Mosaico amarillo de la alfalfa. Sin embargo, los síntomas que produce en otras plantas de ensayo son distintos de los descritos para las razas más conocidas de este virus.

Por otro lado, las inclusiones cristalinas encontradas en las células de epidermis de alfalfa difieren por su forma, perfectamente regular, de las observadas por Desjardins (5).

Otra característica de esta raza es la gran variabilidad que presenta en cuanto a proporción de componentes, en las diferentes plantas y en distintas épocas. Así, en la infección sistemática que se produce en tabaco o judía inoculados con alfalfa (muestra), hemos encontrado un incremento en la cantidad de partículas esféricas en el primer caso, y sólo formas esféricas cuando se trata de judía. Estas formas esféricas han sido transmitidas de judía a judía y a tabaco, recuperándolas de la infección producida.

El estudio de la ultraestructura nos ha permitido observar de forma

constante y en diferentes plantas inoculadas (alfalfa, judía, tomate, soja), estructuras no descritas anteriormente para este virus, como son los agregados cristalinos de partículas bacilares y esféricas (*figuras 13-15*) y las formaciones rígidas encontradas en el citoplasma (*figura 16*). Bandas rígidas semejantes a éstas fueron descritas por Rubio-Huertos y Moreno (12) para un virus de la alfalfa no identificado. Otras formaciones que han sido vistas en el nucleoplasma (*figura 17*) son parecidas a las observadas por Hull y colaboradores (7). Sin embargo, los agregados típicos de partículas bacilares en empalizada, sólo los hemos encontrado en plantas de alfalfa.

De todas estas consideraciones y teniendo en cuenta que la unidad infecciosa del virus Mosaico de la alfalfa posiblemente está formada por 3 unidades de ARN, las cuales se replican independientemente (14), parece verosímil que, al menos en esta raza estudiada, las formas esféricas de este virus puedan producir la enfermedad por sí solas. De otra forma, habría que pensar en que se trata de algún otro virus esférico asociado con el Mosaico de la alfalfa.

Dado que el virus Mosaico del pepino posee características en común con el Mosaico de la alfalfa, como sintomatología (1-2), transmisión por vectores (6), estructura (6), necesidad de ser fijado con formaldehído para que no se destruya con ácido fosfotúngstico, y puesto que su forma y tamaño coinciden con los de las partículas esféricas aisladas por nosotros, pudiera tratarse quizá de este virus. Sin embargo, han fallado todas las inoculaciones que hemos hecho sobre diferentes cucurbitáceas y no hemos encontrado ninguna reacción serológica entre ambos.

En trabajos actualmente en curso, tratamos de dilucidar si estas formas esféricas son efectivamente un componente del virus Mosaico de la alfalfa capaces de producir infección por sí mismas, o si, por el contrario, se trata de un nuevo virus cuyas características hasta ahora conocidas se parecen en parte o son intermedias a las de los virus Mosaico de la alfalfa y Mosaico del pepino.

RESUMEN

Una raza del virus Mosaico de la alfalfa, encontrada en España, presenta características diferentes de las conocidas para otras razas, como son los síntomas producidos en algunas plantas de ensayo, unas inclusiones

cristalinas hexagonales observadas al microscopio de luz y algunas formaciones cristalinas y bandas rígidas encontradas en secciones ultrafinas de las plantas infectadas.

Además, esta raza presenta una gran variabilidad en la proporción de sus componentes, llegando a observarse y transmitirse sólo por formas esféricas.

En el trabajo se describe y discute el posible significado de estos hallazgos.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. Peña Iglesias, del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, las facilidades y ayudas prestadas en la realización de las pruebas serológicas.

SUMMARY

Some characteristics of alfalfa mosaic virus (AMV) Spanish strain

An strain of AMV, found in Spain, presents hexagonal crystalline inclusion bodies and inoculated to *Phaseolus vulgaris* induced very strong symptoms; the virus particles recovered from it by purification, showed only one spherical component. These particles need formaline to be observed at the electron microscope as the multiparticulate AMV .

Ultrathin sections of infected (tobacco, bean, soybean, etc.) plants, showed crystalline arrays of virions and other structures which are described.

Serology of the original particles was positive against AMV antiserum, and negative against cucumber mosaic virus antiserum.

BIBLIOGRAFIA

1. BHARGAVA, K. S. 1951. Some properties of four strains of cucumber mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.*, 38, 377.
2. BOS, L., y JASPARS, E. M. J. 1971. Alfalfa mosaic virus. Commonwealth Mycological Institute, Description of Plant Viruses.
3. BRENNER, S., y HORNE, R. W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 103.

4. Committee on Plant Virology. 1961. Serological Test for the Identification of Plant Viruses. American Phytopathological Society.
5. DESJARDINS, P. R. 1966. Inclusion bodies in *Nicotiana tabacum* produced by two strains of alfalfa mosaic virus. *Phytopathology*, 56, 875.
6. HULL, R. 1969. Alfalfa mosaic virus. *Advan. Virus Res.*, 15, 365.
7. HULL, R.; HILLS, G. J., y PLASKITT, A. 1969. Electron microscopy on *in vivo* aggregation forms of a strain of alfalfa mosaic virus. *J. Ultrastruct. Res.*, 26, 465.
8. HULL, R.; HILLS, G. J., y PLASKITT, A. 1970. The *in vivo* behaviour of twenty-four strains of alfalfa mosaic virus. *Virology*, 42, 753-72.
9. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque, stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208.
10. RUBIO-HUERTOS, M. 1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas. *Microbiol. Españ.*, 3, 207.
11. RUBIO-HUERTOS, M. 1956. Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. *Phytopathology*, 46, 553-56.
12. RUBIO-HUERTOS, M., y MORENO, R. 1968. Estudio de un virus de la alfalfa y ultraestructura de las hojas infectadas. *Microbiol. Españ.*, 21, 13.
13. STEERE, R. L., 1959. The purification of plant viruses. *Advan. Virus Res.*, 6, 1.
14. VAN VLOTEN-DOTING, L.; KRUSEMAN, J., y JASPARS, E. M. S. 1968. The biological function and natural dependence of bottom component and top component of alfalfa mosaic virus. *Virology*, 34, 728.
15. VERHOYEN, M. 1966. Découverte en Belgique d'une variante du virus de la mosaïque de la lucerne (alfalfa mosaic virus), systemique chez le haricot. *Parasitica*, 22, 1.
16. ZAUMEYER, W. J. 1952. Another strain of alfalfa mosaic virus systemically infections to beans. *Phytopathology*, 42, 344.
17. ZAUMEYER, W. J. 1953. Alfalfa yellow mosaic virus systemically infections to beans. *Phytopathology*, 43, 38.
18. ZAUMEYER, W. J. 1963. Two new strains of alfalfa mosaic virus systemically infections to beans. *Phytopathology*, 53, 444.
19. ZAUMEYER, W. J., y PATINO, G. 1960. Vein necrosis another systemically infections strains of alfalfa mosaic virus in beans. *Phytopathology*, 50, 226.

CURSOS DE VIROLOGIA Y DE MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Organizado por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense, y el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología (Catedrático-Director: Prof. Lorenzo Vilas), se ha desarrollado en los laboratorios de la Cátedra, del 21 de febrero al 17 de marzo, un Curso práctico de Técnicas fundamentales en Virología. Los profesores, todos pertenecientes al Instituto, han sido los Dres. Angel García Gancedo (Director técnico), M.^a Luisa Alonso, Carmen Gil, Emilio Ronda, Pilar Vilas, Concepción Ronda y Sacramento Rico; personal ayudante: Srtas. Pilar Sanz, Carmen Granados y M.^a Luisa Rodríguez.

Del 3 al 27 de abril, organizado también por las entidades citadas y con igual Dirección, ha tenido lugar, en la misma Cátedra, un Curso teórico-práctico sobre Microbiología de los Alimentos, a cargo de los profesores Dres. Cándida González (Director técnico), Carmen Gil, Fernando Pérez Flórez, Carlos Ramírez, Gustavo del Real y Manuel Rodríguez Rebollo.

PROXIMOS SIMPOSIOS

El III Simposio Internacional sobre Protoplastos de Levaduras se celebrará en Salamanca, del 2 al 5 del próximo mes de octubre. El Presidente del Comité Organizador es el Prof. Julio R. Villanueva, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca.

Durante los días 13 y 14 del mismo mes de octubre tendrá lugar en Madrid el I Simposio sobre Microbiología de Infecciones Bacterianas, corriendo la organización a cargo de la Sociedad Española de Microbiología. Del 11 al 14 de diciembre está prevista la celebración en la Universidad de La Laguna (Tenerife) del III Simposio sobre Aplicacio-

CURSOS DE VIROLOGIA Y DE MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Organizado por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense, y el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología (Catedrático-Director: Prof. Lorenzo Vilas), se ha desarrollado en los laboratorios de la Cátedra, del 21 de febrero al 17 de marzo, un Curso práctico de Técnicas fundamentales en Virología. Los profesores, todos pertenecientes al Instituto, han sido los Dres. Angel García Gancedo (Director técnico), M.^a Luisa Alonso, Carmen Gil, Emilio Ronda, Pilar Vilas, Concepción Ronda y Sacramento Rico; personal ayudante: Srtas. Pilar Sanz, Carmen Granados y M.^a Luisa Rodríguez.

Del 3 al 27 de abril, organizado también por las entidades citadas y con igual Dirección, ha tenido lugar, en la misma Cátedra, un Curso teórico-práctico sobre Microbiología de los Alimentos, a cargo de los profesores Dres. Cándida González (Director técnico), Carmen Gil, Fernando Pérez Flórez, Carlos Ramírez, Gustavo del Real y Manuel Rodríguez Rebollo.

PROXIMOS SIMPOSIOS

El III Simposio Internacional sobre Protoplastos de Levaduras se celebrará en Salamanca, del 2 al 5 del próximo mes de octubre. El Presidente del Comité Organizador es el Prof. Julio R. Villanueva, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca.

Durante los días 13 y 14 del mismo mes de octubre tendrá lugar en Madrid el I Simposio sobre Microbiología de Infecciones Bacterianas, corriendo la organización a cargo de la Sociedad Española de Microbiología. Del 11 al 14 de diciembre está prevista la celebración en la Universidad de La Laguna (Tenerife) del III Simposio sobre Aplicacio-

nes de la Espectroscopía Molecular en Biología Microbiana, organizado por la Universidad de La Laguna, Comité Español de Espectroscopía (SEDO) y la SEM. La correspondencia relativa a ambos simposios debe dirigirse al Dr. Antonio Portolés, Sociedad Española de Microbiología, Joaquín Costa, 32, Madrid-6.

IV CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Este Congreso, organizado por la SEM, tendrá lugar del 1 al 3 de octubre de 1973 en la Facultad de Ciencias (Sección Biológicas), de la Universidad de Granada.

Correspondencia: Secretaría del IV Congreso Nacional de Microbiología, Estación Experimental del Zaidín, Profesor Albareda, 1, Granada.

ADVERTENCIA

Examinada la queja recibida respecto a un trabajo publicado en el volumen 24 de esta Revista, el Consejo Rector de la misma ha acordado reiterar su criterio de no admitir trabajos que no sean originales e inéditos.

nes de la Espectroscopía Molecular en Biología Microbiana, organizado por la Universidad de La Laguna, Comité Español de Espectroscopía (SEDO) y la SEM. La correspondencia relativa a ambos simposios debe dirigirse al Dr. Antonio Portolés, Sociedad Española de Microbiología, Joaquín Costa, 32, Madrid-6.

IV CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Este Congreso, organizado por la SEM, tendrá lugar del 1 al 3 de octubre de 1973 en la Facultad de Ciencias (Sección Biológicas), de la Universidad de Granada.

Correspondencia: Secretaría del IV Congreso Nacional de Microbiología, Estación Experimental del Zaidín, Profesor Albareda, 1, Granada.

ADVERTENCIA

Examinada la queja recibida respecto a un trabajo publicado en el volumen 24 de esta Revista, el Consejo Rector de la misma ha acordado reiterar su criterio de no admitir trabajos que no sean originales e inéditos.

nes de la Espectroscopía Molecular en Biología Microbiana, organizado por la Universidad de La Laguna, Comité Español de Espectroscopía (SEDO) y la SEM. La correspondencia relativa a ambos simposios debe dirigirse al Dr. Antonio Portolés, Sociedad Española de Microbiología, Joaquín Costa, 32, Madrid-6.

IV CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Este Congreso, organizado por la SEM, tendrá lugar del 1 al 3 de octubre de 1973 en la Facultad de Ciencias (Sección Biológicas), de la Universidad de Granada.

Correspondencia: Secretaría del IV Congreso Nacional de Microbiología, Estación Experimental del Zaidín, Profesor Albareda, 1, Granada.

ADVERTENCIA

Examinada la queja recibida respecto a un trabajo publicado en el volumen 24 de esta Revista, el Consejo Rector de la misma ha acordado reiterar su criterio de no admitir trabajos que no sean originales e inéditos.

BIBLIOGRAFIA

BACTERIOCINE UND BACTERIOCINÄHNLICHE SUBSTANZEN,
por *Henning Brandis* y *Jan Smarda*. 1971. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 408 páginas y 85 figuras.

Este libro constituye el tomo once de la colección que publica la Editorial Gustavo Fischer bajo el nombre general de "Enfermedades Infecciosas y sus Agentes". Sobre el propósito del libro nos dicen sus autores en un prólogo breve, sincero y objetivo, lo siguiente: "No existía una monografía completa sobre las bacteriocinas, aunque las numerosas publicaciones aparecidas sobre el tema en las revistas científicas aconsejaban su redacción. Hemos ampliado en nuestro libro el concepto de bacteriocina, aplicándolo a otras sustancias parecidas, porque se reserva a las investigaciones futuras la tarea de definir y delimitar las sustancias antibióticas que hoy se conocen como bacteriocinas o análogas a éstas. La investigación de las bacteriocinas se encuentra actualmente en fase de gran actividad, por lo que es inevitable que muchas preguntas queden todavía sin respuesta y que muchos resultados experimentales tengan que ser rápidamente revisados o superados. La misión de nuestra monografía es facilitar la introducción en la esfera de investigación de las bacteriocinas y la de informar sobre el estado actual de muchos problemas especiales con ellas relacionados. Esperamos que nuestro trabajo impulse el escaso conocimiento que hoy tenemos sobre la naturaleza de las bacteriocinas y sobre su mecanismo de acción". El libro, pues, está constituido por la exposición ordenada y completa de lo que hoy se sabe sobre estas materias, acompañada de la literatura correspondiente. Es un punto de partida obligado para todo el que trabaje en este campo o para el que quiera informarse del estado de la cuestión.

El índice nos señala 199 páginas para el estudio de las colicinas y el resto del espacio dedicado a los procedimientos de tipificación con bacteriocinas y a la descripción de las bacteriocinas y otras sustancias análogas a éstas (piocinas, bacteriocinas de pasteurellas, vibriocina, megacinas, monocinas, bacteriocinas de diftéricos, estafilococos, estreptococos, neumococos, clostridios, rizobiaceas, acromobacteriaceas, bacteroides, pertussis, neisserias, lactobacilos y micobacterias).

Obra completa y recomendable.

L. VILAS

Depósito legal: M. 702 - 1968.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15. Madrid