

16 H

VOLUMEN 25. 1972

JULIO - SEPTIEMBRE. NUMERO 3

Microbiología Española

Revista

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



50

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 × 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.

I N D I C E

	Página
Actividad antivírica de una sustancia de nueva síntesis sobre el virus vacunal, por <i>Sacramento Rico</i> y <i>A. García-Gancedo</i> ...	145
Acción <i>in vivo</i> del DIBATOD sobre lesiones dérmicas producidas por el virus vacunal, por <i>Sacramento Rico</i> y <i>A. García-Gancedo</i>	165
Nuevos métodos para el estudio ecológico de microorganismos en aguas eutróficas, por <i>F. Emiliani</i>	175
Estructura y composición del lipopolisacárido de la forma L fija del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , por <i>M. Santaolalla</i>	179
Levaduras y su significancia en la fermentación láctica de aceitunas verdes, por <i>M. Castañón</i> y <i>B. Iñigo</i>	195
Curso de Microbiología Básica de Cosméticos	207
Conferencia sobre Consecuencias de la Microbiología Aplicada.	207
Bibliografía, por <i>L. Vilas</i>	209

C O N T E N T S

	Page
Antiviral activity of a compound of new synthesis on vaccinia virus, by <i>Sacramento Rico</i> and <i>A. García-Gancedo</i>	145
Effect of DIBATOD on dermic lesions produced by vaccinia virus, by <i>Sacramento Rico</i> and <i>A. García-Gancedo</i>	165
New methods for ecological analysis of microorganisms of eutrophic waters, by <i>F. Emiliani</i>	175
The structure and chemical composition of lipopolysaccharide from stable L phase of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , by <i>M. Santaolalla</i>	179
Yeast occurrence and significance in the fermentation of Spanish-green olives, by <i>M. Castañón</i> and <i>B. Iñigo</i>	195
Course on Cosmetics Basic Microbiology	207
Conference on Impacts of Applied Microbiology	207
Bibliography, by <i>L. Vilas</i>	209

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

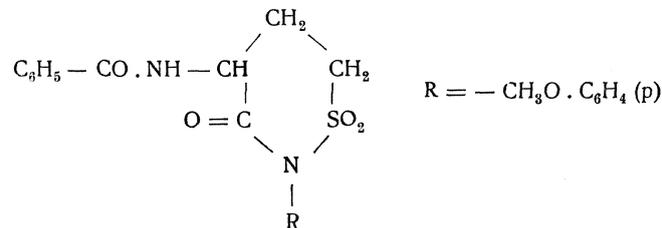
ACTIVIDAD ANTIVIRICA DE UNA SUSTANCIA DE NUEVA SINTESIS SOBRE EL VIRUS VACUNAL

por

SACRAMENTO RICO y A. GARCIA-GANCEDO

INTRODUCCION

En una serie de estudios sobre síntesis de anticancerosos potenciales Lora-Tamayo y colaboradores (5) han obtenido, entre otros, un grupo de sustancias integrado por los ácidos α -benzamido- γ -sulfamoil-butíricos sustituidos y ésteres éflicos de los mismos. De este grupo nos han cedido, para su ensayo frente a virus, diversas sustancias cuya estructura guarda ciertas analogías con la cicloheximida. En este trabajo se exponen los resultados obtenidos frente al virus vacunal con una sustancia de este grupo, que nosotros denominamos como DIBATOD y cuya fórmula es:



MATERIALES Y METODOS

Sustancia

Las soluciones madres del DIBATOD se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) en la proporción 1/10 (g/cm³). En el momento de su utilización fueron diluidas en medio de cultivo, ajustándolas a pH neutro con solución de bicarbonato sódico del 2,8 %.

Virus

El virus utilizado en este trabajo es el Vaccinia, procedente de linfa vacunal de ternera, adaptado a células HeLa a través de 24 pases y mantenido en este Departamento de Virología.

Cultivos celulares y medios utilizados

Los cultivos primarios de células de embrión de pollo fueron preparados por tripsinización a partir de embriones de pollo de 10 días de incubación. El medio de mantenimiento utilizado para los cultivos infectados con virus, contenía solución tamponada de Hanks, 0,2 % de hidrolizado de lactoalbúmina, 2 % de suero de ternera, 100 UI/cm³ de penicilina G, 100 µg/cm³ de sulfato de estreptomycin y 20 UI/cm³ de nistatina. El medio de multiplicación llevaba doble cantidad de suero de ternera.

Ensayos para determinar la citotoxicidad de la sustancia

Se emplearon cultivos celulares de embrión de pollo sobre cubreobjetos contenidos en tubos de Leighton. Estos se incubaron en medio de mantenimiento al que se le incorporó la sustancia durante 24 h a 37 °C. Los cultivos testigos no contenían DIBATOD o llevaban incorporado DMSO en la proporción del 3,5 % (0,035 cm³/1 cm³ y tubo), que es la cantidad de DMSO que acompaña como máximo al DIBATOD al hacer los tratamientos. Los efectos citotóxicos se determinaron por observación microscópica, tiñendo los cubreobjetos por el método de May Grunwald-Giemsa.

También se determinó la toxicidad del DIBATOD siguiendo el método de Herrmann y colaboradores (3) midiendo el halo de toxicidad a los 5 días de haber incorporado la droga; el medio sólido utilizado en este ex-

perimento fue el siguiente: 50 partes de bactoagar (Difco) en agua bides-tilada y 50 partes de medio de mantenimiento 2x. El diámetro de la caja de Petri utilizada es de 7 cm y el diámetro del disco de papel whatman núm. 3 es de 1 cm.

Ensayos para determinar la actividad antivírica de la sustancia

El DIBATOD se incorporó directamente al medio de mantenimiento antes o después de la infección de los cultivos con el virus. El rendimiento en virus se calculó midiendo halos de inhibición, o contando el número de marcas infectivas en cultivos de células o el número de pápulas en membrana corio-alantoidea (MCA) de embrión de pollo. Las diferencias existentes entre la media de los resultados obtenidos de los testigos y los obtenidos mediante tratamiento y la media de los resultados, indican la actividad de la sustancia.

La reacción de hemaglutinación se realizó en placas de perpex con pocillos, colocando en cada uno de ellos 0,25 cm³ de la suspensión de virus en contacto con 0,25 cm³ de la suspensión extemporánea de hematíes de pollo (al 0,5 %) en atmósfera húmeda, para evitar la evaporación; una hora después se procedió a su lectura. Tanto la suspensión de virus como la de hematíes se han realizado en solución salina, para evitar el uso de tampones que contienen una serie de sustancias que pudieran reaccionar con la droga en estudio, interfiriendo o enmascarando su posible acción. El pH de ambas suspensiones se ajustó a 7.

RESULTADOS

Determinación de la citotoxicidad del DIBATOD

Utilizando el método de Herrmann y colocando 72 μg y 326 μg de sustancia, incorporada al disco de papel colocado en el centro de la caja de Petri, no se ha observado la aparición de halo de toxicidad.

Con el fin de observar la posible acción de la sustancia sobre la capacidad de fijación de las células al vidrio y su capacidad de multiplicación, se incorporó el DIBATOD a la dosis de 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ y tubo a la suspensión de células de embrión de pollo recién tripsinizadas, las cuales se repartieron en tubos de cultivo, observándose la evolución de éstos y comparándolos con cultivos testigo sin DIBATOD incorporado. Los cultivos

con DIBATOD incorporado presentan monocapa continua a las 72 h mientras que los cultivos testigos lo hacen a la 24 h. Posteriormente se realizó subcultivo, tanto de las células tratadas como de las testigos, obteniéndose la monocapa continua en ambos a las 48 h. Estos resultados indican que el DIBATOD no inhibe la fijación ni la multiplicación celular, aunque ésta resulte más lenta, y no se provoca en las células modificación transmisible al subcultivo.

Por otra parte, se hicieron cultivos de células de embrión de pollo sobre cubreobjetos en tubos de Leighton y estos cultivos se dividieron en 3 grupos. Un grupo recibió medio con DIBATOD incorporado, otro con diluyente (DMSO) incorporado al medio y el grupo restante recibió medio normal como testigo. A las 24 h se tiñen los cubreobjetos de todos los grupos por el método de May Grunwald-Giemsa y se observa microscópicamente el aspecto de los cultivos, no encontrándose diferencias significativas entre los tres grupos en su aspecto morfológico y estructural.

Según Valle (6), el DMSO es tóxico para las células de embrión de pollo sólo a concentraciones superiores al 0,1 cm³/cm³.

Determinación de la actividad antivírica del DIBATOD

Utilizando el método de Herrmann se han obtenido los resultados que se indican en el *cuadro 1*; empleando la dosis de 326 µg de DIBATOD y como testigo la dilución del DMSO en igualdad de volumen. Las cifras indican el diámetro en milímetros de los halos y expresan la media de 5 cajas de Petri, al menos.

Cuadro 1. Determinación de la actividad antivírica del DIBATOD

	Halo de toxicidad	Halo de inhibición total	Halo de inhibición parcial
DIBATOD	0	16	45
DMSO	0	0	0

El halo de inhibición total se expresa como el diámetro del círculo en el que la inhibición de la formación de marcas infectivas es total; y el

halo de inhibición parcial, como el diámetro del círculo en el cual hay disminución del número y tamaño de las marcas infectivas.

La acción inhibitoria del DIBATOD es muy acentuada, observándose la aparición de halos de inhibición de marcas infectivas y también una disminución de tamaño en las que aparecen dentro del halo de inhibición parcial. No se observa ninguna actividad del DMSO a la concentración utilizada.

En las *figuras 1-2* se muestra el aspecto de las cajas de Petri correspondientes a este experimento.

Con el fin de comprobar si el DMSO a la dosis utilizada modifica de alguna forma la actividad del DIBATOD sobre la síntesis del virus, se han realizado experimentos con diluciones finales de la sustancia en su diluyente primario (DMSO) y en medio de mantenimiento, a partir de una dilución muy concentrada del DIBATOD en DMSO. Mediante el método de Herrmann se prueba la actividad inhibitoria del DIBATOD sobre la síntesis del virus, observando si existe diferencia entre los halos de inhibición que sea dependiente del diluyente utilizado. Los resultados obtenidos se indican en el *cuadro 2*. Las cifras indican el diámetro del halo de inhibición parcial en milímetros y expresan la media de los resultados obtenidos en 5 cajas de Petri. No se observan diferencias significativas que pudieran depender del diluyente.

Cuadro 2. Influencia del diluyente sobre la acción virostática del DIBATOD

DMSO 0,03 cm ³ /disco 300 µg de sustancia	Medio de mantenimiento 0,003 cm ³ DMSO/disco 300 µg de sustancia
41	37

Para conocer mejor el modo de acción del DIBATOD es indispensable determinar si existe actividad directa de la sustancia sobre la partícula vírica, es decir, si ejerce acción viricida. La técnica utilizada para ello ha consistido en poner en contacto una suspensión de virus, previamente titulado, con una dosis conocida de DIBATOD durante un período de 24 h,

haciendo titulaciones del virus a las 0, 1, 2, 3, 6, 8 y 24 h. Paralelamente se coloca la misma suspensión de virus frente al diluyente del DIBATOD a la dosis utilizada y también el mismo virus frente a la solución salina, obteniéndose así los datos control que nos indicarán si el diluyente por sí solo ejerce acción viricida, o si la sustancia lo ejerce por sí sola. Todo ello se coloca a 4 °C para evitar en lo posible la inactivación del virus por el calor. La titulación se ha hecho en MCA de embrión de pollo y viene expresado el título en UFP/cm³ (unidades formadoras de pápulas). Dicho título se obtiene haciendo diluciones decimales de la suspensión de virus a titular, inoculando en grupos de 6 huevos, al menos, y hallando la media del número de lesiones producidas en los grupos en que aquéllas son contables. En el *cuadro 3* se expresan los resultados obtenidos. No se observa actividad viricida ni del DIBATOD ni del DMSO, ya que las ligeras diferencias que existen no son significativas.

A lo largo de las 24 h se observa una ligera disminución del título, común a las tres series y debida posiblemente a la acción de un factor común a ellas, tal vez la temperatura.

Cuadro 3. Acción viricida del DIBATOD sobre el virus vacunal

En contacto	Horas de contacto						
	0	1	2	3	6	8	24
Virus + DIBATOD	10 ^{4.2}	10 ^{4.2}	10 ^{4.2}	10 ^{4.2}	10 ^{4.0}	10 ^{4.0}	10 ^{4.0}
Virus + DMSO	10 ^{4.1}	10 ^{4.0}	10 ^{3.8}	10 ^{3.9}	10 ^{3.9}	10 ^{3.9}	10 ^{3.8}
Virus + sol. salina	10 ^{4.1}						10 ^{3.8}

Posteriormente se han realizado diversos experimentos para estudiar el efecto virostático de la sustancia. Con el DIBATOD incorporado al medio sólido de recubrimiento de las células de embrión de pollo cultivadas en caja de Petri, previamente infectadas con el virus, se obtienen unos resultados que indican la existencia de una fuerte inhibición de la formación de marcas infectivas a la dosis de 400 µg/cm³ mientras que la dosis de 800 µg/cm³ resulta tóxica en este tipo de experimento. El motivo de utili-

halo de inhibición parcial, como el diámetro del círculo en el cual hay disminución del número y tamaño de las marcas infectivas.

La acción inhibitoria del DIBATOD es muy acentuada, observándose la aparición de halos de inhibición de marcas infectivas y también una disminución de tamaño en las que aparecen dentro del halo de inhibición parcial. No se observa ninguna actividad del DMSO a la concentración utilizada.

En las *figuras 1-2* se muestra el aspecto de las cajas de Petri correspondientes a este experimento.

Con el fin de comprobar si el DMSO a la dosis utilizada modifica de alguna forma la actividad del DIBATOD sobre la síntesis del virus, se han realizado experimentos con diluciones finales de la sustancia en su diluyente primario (DMSO) y en medio de mantenimiento, a partir de una dilución muy concentrada del DIBATOD en DMSO. Mediante el método de Herrmann se prueba la actividad inhibitoria del DIBATOD sobre la síntesis del virus, observando si existe diferencia entre los halos de inhibición que sea dependiente del diluyente utilizado. Los resultados obtenidos se indican en el *cuadro 2*. Las cifras indican el diámetro del halo de inhibición parcial en milímetros y expresan la media de los resultados obtenidos en 5 cajas de Petri. No se observan diferencias significativas que pudieran depender del diluyente.

Cuadro 2. Influencia del diluyente sobre la acción virostática del DIBATOD

DMSO 0,03 cm ³ /disco 300 μg de sustancia	Medio de mantenimiento 0,003 cm ³ DMSO/disco 300 μg de sustancia
41	37

Para conocer mejor el modo de acción del DIBATOD es indispensable determinar si existe actividad directa de la sustancia sobre la partícula vírica, es decir, si ejerce acción viricida. La técnica utilizada para ello ha consistido en poner en contacto una suspensión de virus, previamente titulado, con una dosis conocida de DIBATOD durante un período de 24 h,

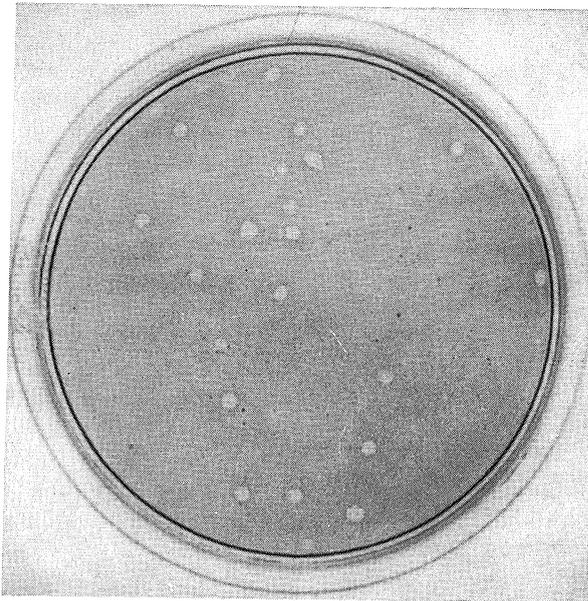


Figura 3. Testigo virus vacunal

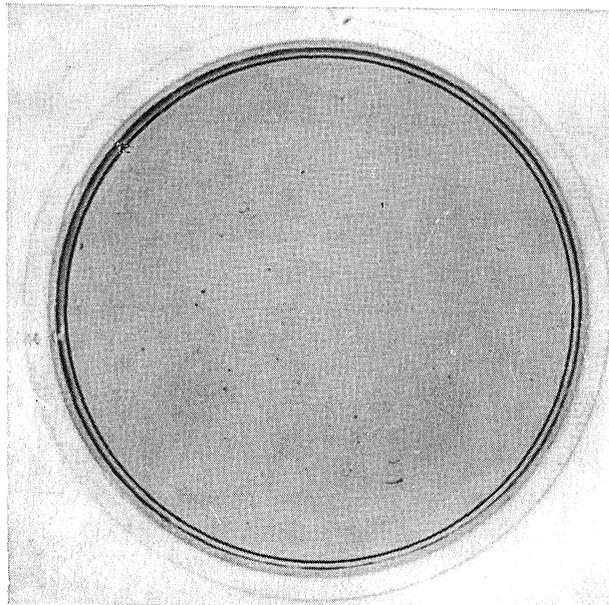


Figura 4. Virus vacunal + DIBATOD (400 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$)

zar tan altas dosis se fundamenta en la menor difusibilidad de la sustancia al ser incorporada a un medio sólido y a que ha de repartirse ésta sobre la totalidad del medio que recubre toda la superficie de la caja de Petri. Los resultados se indican en el *cuadro 4*, así como en las *figuras 3-4*. En el cuadro, las cifras indican las medias del número de marcas infectivas, correspondientes a 5 cajas de Petri.

Cuadro 4. Acción virostática del DIBATOD sobre cultivos de células de embrión de pollo infectados con el virus. (Incorporando la sustancia a la primera capa de recubrimiento; período de contacto: 4 días)

Dosis de DIBATOD, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$		Testigo no tratado
800	400	
Tóxico	0	31

Determinación de la posible acción previa a la infección del DIBATOD

Con el fin de observar la posible acción de la sustancia antes de la infección de las células, se han realizado experimentos que consisten en tratar con el DIBATOD las células cultivadas en caja de Petri, cuando ya han formado la monocapa, manteniéndole en contacto durante 3 h; se lavan después las células con solución de Hanks para eliminar la sustancia, se inocula el virus y a partir de este paso se sigue el método de formación de marcas infectivas ya descrito. Al mismo tiempo se realizan paralelamente los controles de diluyentes y de las células no tratadas, obteniéndose los resultados que se indican en el *cuadro 5*.

Cuadro 5. Determinación de la posible acción previa a la infección, del DIBATOD

DIBATOD 350 $\mu\text{g}/\text{caja}$ de Petri	DMSO	Testigo no tratado
49	49	51

La dosis utilizada ha sido de 350 μg /caja de Petri de la sustancia en un volumen de 0,5 cm^3 , suficiente para cubrir la monocapa celular. Las cifras indican la media del número de marcas infectivas correspondientes a 5 cajas de Petri.

Estos resultados, expresados por la media del número de marcas infectivas obtenidas, indican que no existe acción previa significativa, tanto por el DIBATOD como por el diluyente (DMSO), no siendo afectados, por lo tanto, los mecanismos de infección celular, tales como los receptores celulares específicos y la capacidad de penetración del virus.

De todos los resultados obtenidos hasta ahora se deduce que la actividad del DIBATOD tiene lugar cuando las células son tratadas después de la infección. Por ello, los siguientes experimentos tienen como propósito comprobar dicha actividad.

Determinación de la acción del DIBATOD a diferentes intervalos de tiempo, posteriores a la infección celular

Cultivos de células de embrión de pollo en tubos estacionarios han sido infectados con el virus y después del período de adsorción son tratados con el DIBATOD incorporado al medio líquido de mantenimiento.

Para determinar al mismo tiempo el momento de tratamiento más adecuado, la incorporación de la sustancia se hace a diferentes períodos de tiempo después de la infección (0, 1, 2, 4 y 6 h). Un grupo de tubos testigo, infectados, pero sin tratar, nos dará el dato base para determinar la inhibición de la síntesis de virus por la acción de la sustancia. A las 24 h del último tratamiento, se recoge el virus sintetizado en todos los grupos de tubos, rompiendo las células mediante congelación y descongelación y se titula el rendimiento en virus en MCA, expresándolo en UFP/ cm^3 . El DIBATOD se incorporó a la dosis de 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ y tubo. Al mismo tiempo y de la misma forma, se ha ensayado la posible actividad del diluyente del DIBATOD a la dosis empleada en experimentos semejantes; incorporando únicamente el DMSO a la dilución en que acompaña al DIBATOD en el experimento anterior.

Los resultados obtenidos se presentan en los *cuadros 6-7*.

Cuadro 6. Determinación de la acción del DIBATOD a diferentes intervalos de tiempo, posteriores a la infección celular

Intervalo en horas	Rendimiento en virus UFP/cm ³
0	6×10^3
1	$6,7 \times 10^4$
2	$1,2 \times 10^5$
4	8×10^5
6	9×10^5
Testigo virus	$3,2 \times 10^8$

Cuadro 7. Determinación de la acción del DMSO a diferentes intervalos de tiempo, posteriores a la infección celular

Intervalo en horas	Rendimiento en virus UFP/cm ³
0	5×10^5
1	5×10^5
2	5×10^5
4	$7,5 \times 10^5$
6	3×10^5
Testigo virus	$1,5 \times 10^6$

Estos resultados confirman los obtenidos anteriormente, resultando claramente sensible el virus a la acción del DIBATOD y muestran que el DMSO ejerce una ligera acción inhibidora.

Determinación de la proporcionalidad entre dosis de DIBATOD y respuesta de inhibición de la síntesis vírica

Aunque en los ensayos realizados mediante el método de Herrmann, ya se observó la proporcionalidad entre dosis de sustancia y respuesta de inhibición, se han realizado experimentos por otro procedimiento que consiste en incorporar dosis crecientes del DIBATOD al medio de cultivo de tubos con monocapa de células de embrión de pollo e inocular inmediata-

mente la misma suspensión de virus a todos los tubos y también a los dos grupos testigos, con la dilución de DMSO y con medio de mantenimiento respectivamente. A las 48 h se rompen las células para obtener el virus sintetizado, tanto intracelular como extracelular y se titula en MCA para determinar el rendimiento en virus de cada grupo de tubos.

En la *figura 5* se muestran los resultados obtenidos que confirman la proporcionalidad entre dosis de DIBATOD y respuesta.

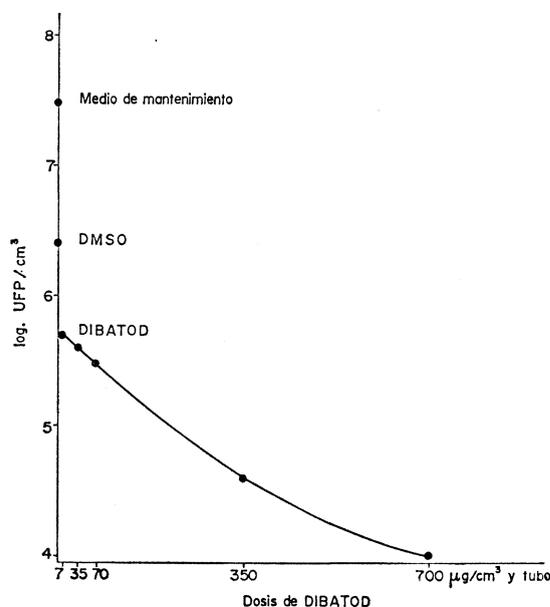


Figura 5. Determinación de la proporcionalidad entre dosis de DIBATOD y respuesta de inhibición de la síntesis vírica

Ensayo de la posible actividad del DIBATOD sobre los receptores que intervienen en la hemaglutinación

Algunos autores aplican un procedimiento para determinar si una sustancia actúa sobre el fenómeno de fijación del virus a los receptores celulares. Este procedimiento consiste en aprovechar las propiedades hemaglutinantes de ciertos virus, fenómeno que guarda cierto parecido, según muchos autores, con el de la fijación del virus a las células, introduciendo

la sustancia a ensayar en el sistema virus-hematíes y observando sus efectos. Si la sustancia no altera la reacción de hemaglutinación en las condiciones adecuadas, puede pensarse que los receptores de los hematíes no han sido alterados. Para realizar estos experimentos se necesita virus que posea capacidad hemaglutinante, hematíes sensibles a dicho virus y que las condiciones del sistema (pH, temperatura, presión osmótica y tiempo de reacción) sean las que exigen el tipo de virus y hematíes elegidos. El virus vacunal es hemaglutinante frente a hematíes de pollo, aunque no todos los lotes de hematíes procedentes de esta especie son sensibles, por lo que debe controlarse previamente dicha sensibilidad.

Como primer paso es necesario determinar si la sustancia o su diluyente (DMSO) son capaces por sí solos de provocar la hemaglutinación sin intervención del virus; para ello realizamos un experimento colocando diluciones crecientes del DIBATOD o de DMSO en solución salina y a pH ajustado a 7, frente a la suspensión de hematíes. La dilución primera corresponde a 10^{-2} .

El resultado que se expresa en el *cuadro 8* es prácticamente negativo.

Cuadro 8. Determinación de la posible acción del DIBATOD y del DMSO sobre los hematíes de pollo

	Diluciones de la sustancia o de DMSO						
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Sustancia	+	0	0	0	0	0	0
DMSO	+	0	0	0	0	0	0

Con virus hemos llevado a cabo un experimento manteniendo constante el DIBATOD (dilución: 10^{-2}) o el DMSO y variando la suspensión de virus en forma decreciente. Las variaciones de título hemaglutinante de la suspensión de virus con respecto al testigo nos indicarían su actividad. Los resultados se muestran en el *cuadro 9*, resultando el título semejante tanto en el testigo como con el DIBATOD o el DMSO. Por tanto, no hay alteración de la reacción y por consiguiente tampoco de los receptores. El título corresponde a una hemaglutinación del 50 %, que corresponde al 2.

Cuadro 9. Acción del DIBATOD y el DMSO sobre la hemaglutinación inducida por el virus vacunal. (Dosis constante de la sustancia y suspensiones variables del virus)

	Suspensiones del virus						
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Sustancia	4	3	2	0	0	0	0
DMSO	4	3	2	1	0	0	0
Testigo	4	3	2	1	0	0	0

DISCUSION

La estructura molecular del DIBATOD guarda cierta semejanza con la de la cicloheximida. Es conocida la actividad de esta sustancia que según Ennis y Lubin (1) inhibe la síntesis de proteínas por inhibición de la transferencia de aminoácidos del ARN al polipéptido. Hasta ahora carecemos de datos sobre la actividad del DIBATOD a nivel molecular, pero posteriores trabajos tratarán de dilucidar este problema y determinar si existe semejanza en el modo de acción entre ambas sustancias.

La duración del ciclo de replicación del virus vacunal varía de 5 a 14 h; oscilando entre estos límites según los factores, tanto ambientales como los genéticos propios de la cepa con la cual se trabaja, que intervienen en la síntesis vírica. Por ello, las diferencias de rendimiento en virus, existentes entre las células no tratadas y las tratadas se hacen significativas a las 24 h de infección. Durante la fase de eclipse no hay disminución acusada de título en nuestros experimentos, porque con el simple lavado de las células, tras el período de adsorción del virus, es imposible eliminar numerosos viriones que permanecen sobre el cultivo y no se han utilizado antiseros neutralizantes, para neutralizar aquéllos, con el fin de no introducir un factor que podría enmascarar la actividad inhibidora propia de la sustancia a ensayar.

Un inconveniente frecuente en el ensayo de sustancias antivíricas consiste en que muchas veces éstas no son solubles directamente en agua o

en los medios de cultivo utilizados en los cultivos celulares. Pero es absolutamente preciso que dichas sustancias estén en solución para que las células puedan absorberlas. El DIBATOD ha tenido que ser disuelto previamente en DMSO, sustancia que posee características muy interesantes. Freeman y colaboradores (2) dan al DMSO una actividad \pm para el virus vacunal y negativa para polioma (ADN), sarcoma de Rous y encefalomio-carditis (ambos ARN).

Por nuestra parte hemos determinado, como dato previo para su utilización, que el DMSO a las concentraciones utilizadas no ejerce acción citotóxica sobre los cultivos de células de embrión de pollo. Diversos autores han utilizado este diluyente en experimentos análogos a los realizados por nosotros (4).

En los experimentos correspondientes realizados con el fin de determinar la posible acción de la sustancia en ensayo sobre la capacidad de multiplicación de las células, se ha encontrado cierta reducción en la velocidad de multiplicación celular, que no influye en el resultado final de ésta, ni es transmisible por subcultivo. Por tanto, puede considerarse que este retraso no significa un factor que pueda influir decisivamente en la acción antivírica de la sustancia, ya que además de que no es el resultado de una alteración celular irreversible. Las células son utilizadas en nuestros experimentos cuando ya han formado epitelio y se encuentran con su capacidad de multiplicación frenada al haber sustituido el medio de multiplicación por el de mantenimiento. Sin embargo, supone un dato que indica que la fisiología celular ha sido influida por la sustancia, cosa que debe ocurrir forzosamente de algún modo, si la sustancia es activa y ejerce una acción antivírica intracelular.

Para estudiar la actividad antivírica de la sustancia hemos utilizado diversos procedimientos que nos aseguran así la fiabilidad de los resultados, al ser obtenidos éstos mediante técnicas diferentes. El método de inhibición de marcas infectivas propuesto por Herrmann, permite una selección eficiente y económica de compuestos antivíricos (3) y la determinación conjunta de la toxicidad y la actividad antivírica de la sustancia, ya que al difundirse ésta a través del agar se produce un gradiente de difusión que va disminuyendo la dosis de sustancia puesta en contacto con las células infectadas a medida que crece la distancia de éstas al punto de aplicación de dicha sustancia.

Debe tenerse en cuenta que las condiciones bajo las cuales se realizan los experimentos pueden ser de vital importancia para los efectos anti-

víricos que resultan. Por ejemplo, en el estudio de las pirimidinas halogenadas utilizando un sistema de cultivos celulares en tubo de ensayo a los cuales se les agrega al tiempo de la infección la 5-flúor-2'-desoxiuridina (FDU), este agente resulta un inhibidor potente de la multiplicación de herpes simplex, vaccinia y otros virus ADN. Empleando el método de inhibición de marcas infectivas, la FDU no presenta actividad antivírica detectable para aquellos mismos virus. La razón de estos resultados no es clara, pero posiblemente sea debida al factor que varía entre la técnica de recubrimiento con agar y el método simple de cultivos celulares; así cuando las células están cubiertas con el agar y con la sustancia a ensayar, se requiere que ésta se difunda a las células; por ello la droga en estudio necesita un tiempo considerable para llegar hasta el tejido infectado; este plazo en realizarse el contacto de la droga con la célula infectada por el virus puede, en efecto, dar lugar a que realmente la droga se aplique después que ha comenzado el proceso de la invasión de la célula por el virus y la producción de enzimas inductoras de la multiplicación del virus específico dentro de la célula.

Con el método de Herrmann hemos obtenido unos resultados que indican actividad antivírica, probablemente virostática, puesto que la sustancia se agregó al sistema cuando las células ya habían sido infectadas. Mediante la utilización de otros métodos de ensayo, tales como la medida del rendimiento en virus de los cultivos tratados y la determinación del efecto viricida de dicha sustancia, se obtuvieron resultados que nos orientan sobre la forma de actuar de ésta y que discutiremos más adelante.

Otro dato fundamental que es necesario determinar cuando se estudia el efecto antivírico de una sustancia, es el de su posible actividad viricida. Existen dos motivos fundamentales para ello: uno, para conocer si esta actividad es una de las propiedades de la sustancia, y otro, para evitar que al ser inactivado el virus liberado de las células infectadas, ocurra que al determinar el rendimiento en virus de las células infectadas y tratadas, la disminución del título del virus con respecto al del testigo no tratado nos induzca a error al achacar dicha disminución del título del virus a una acción virostática intracelular. La actividad viricida ejercida por una sustancia sobre un virus se manifiesta rápidamente, pero nosotros, para mayor seguridad, hemos sometido al virus a largos períodos de contacto (24 h), controlándolo a diferentes intervalos; llegándose a la conclusión de que el DIBATOD no ejerce acción viricida sobre el virus ensayado.

De los resultados obtenidos puede deducirse que la actividad manifes-

tada en los experimentos según la técnica de Herrmann, es de tipo viroestático intracelular, como se demuestra mediante diversos métodos que aumentan la fiabilidad de los resultados. Empleamos dos tipos de experimentos *in vitro*, el de inhibición de marcas infectivas y el de disminución del rendimiento en virus, todo ello en función de la acción de la sustancia sobre las células infectadas.

Para la obtención de datos que nos den a conocer el modo de acción de la sustancia en ensayo, es conveniente determinar el período óptimo de tratamiento de las células; si éste se realiza antes de la infección durante un corto período de tiempo (30 min) y se elimina la sustancia de la superficie celular mediante lavado, no da lugar a inhibición de la multiplicación del virus.

Ya anteriormente habíamos deducido que la acción de la sustancia era de tipo viroestático y ahora concluimos que no actúa en el período anterior a la infección celular; por ello se han realizado una serie de experimentos para comprobar que la sustancia actúa cuando las células son tratadas posteriormente a la infección y a diferentes intervalos, comparándose el rendimiento final en virus a las 24 h de la infección con el rendimiento en virus del testigo infectado, pero no tratado con la sustancia. Los resultados obtenidos muestran la acción del DIBATOD sobre la síntesis del virus vacunal.

Se hace constar que las diferencias de título obtenidas serían mayores si el período de tiempo de 24 h se ampliase, ya que aumentaría el rendimiento en virus de los testigos con respecto a los tratados, como se observa en los resultados representados en la *figura 6*, cuyo período de infección fue de 48 h.

Se observa cierta tendencia a una mayor actividad inhibidora cuanto menor es el intervalo entre infección y tratamiento.

Los experimentos de hemaglutinación realizados sirven para demostrar que las partículas víricas no sufren alteración (efecto viricida) al ponerse en contacto con la sustancia, ya que muy posiblemente, si este efecto se produjese se manifestaría también en la alteración de su capacidad infectiva y hemaglutinante de forma simultánea.

RESUMEN

Una sustancia obtenida por síntesis química (DIBATOD) presenta clara actividad antivírica, inhibiendo la multiplicación del virus vacunal en cultivos de células de embrión de pollo. Utilizando dosis no tóxicas para dichas células y mediante diversos experimentos, se ha encontrado que dicha sustancia actúa viroestáticamente cuando se aplica a los cultivos después de la infección de éstos por el virus; no ejerce acción viricida directa sobre el virus aislado, como tampoco sobre los receptores celulares específicos que dan lugar a la fijación del virus a la célula. En algún tipo de experimentos, el diluyente de la sustancia (DMSO) ejerce una ligera acción antivírica que potencia la actividad de la sustancia. La actividad viroestática guarda dependencia con la dosis del DIBATOD, así como con el momento del tratamiento de las células infectadas.

RECONOCIMIENTO

Deseamos hacer patente nuestro agradecimiento al Prof. Ramón Mardero Peláez, del Instituto de Química Orgánica General (CSIC), que nos ha cedido la sustancia objeto de este trabajo. Agradecemos también a la Srta. M.^a del Carmen Granados Crespo su asistencia técnica.

SUMMARY

Antiviral activity of a compound of new synthesis on vaccinia virus

DIBATOD is a new compound obtained by chemical synthesis which presents a clear antiviral activity, by inhibiting the multiplication of vaccinia virus in chick embryo cells cultures.

It has been found that the substance added at non-toxic doses to these cultures after infection by virus, shows a virustatic effect; it has not any direct virucidal effect on the isolated virus, neither on the specific cellular receptors.

The diluent (DMSO) has a slight antiviral effect which increases substance activity.

There is a direct relation between virustatic activity and the dose of DIBATOD as well as with the beginning of treatment of infected cells.

BIBLIOGRAFIA

1. ENNIS, H. L., y LUBIN, M. 1964. *Science*, 146, 1.474.
2. FREEMAN, G.; KUEHN, A., y SULTANIAN, I. 1965. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 130, 330-42.
3. HERRMANN (Jr.), E. C.; GABLIKS, J.; ENGLE, C., y PERLMAN, P. L. 1960. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103, 625-28.
4. INGLOT, A. D. 1969. *J. Gen. Virol.*, 4, 203-14.
5. LORA-TAMAYO, M.; MADROÑERO, R., e IGLESIAS, J. 1966. *An. Real Soc. Españ. Fis. Quim., Ser. B.*, LXII, 1.037-50.
6. VALLE, M. 1971. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* 219.

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

ACCION *IN VIVO* DEL DIBATOD
SOBRE LESIONES DERMICAS PRODUCIDAS
POR EL VIRUS VACUNAL

por

SACRAMENTO RICO y A. GARCIA-GANCEDO

INTRODUCCION

Con el nombre de DIBATOD denominamos una sustancia sintetizada en el Departamento de Química Médica, del Instituto de Química Orgánica General (CSIC). En otro trabajo anterior (5) hemos expuesto su fórmula y actividad a nivel celular frente al mismo virus.

Uno de los pasos obligados en una investigación sobre sustancias antivíricas consiste en el ensayo sobre animales infectados. Está demostrado que no existe correlación forzosa entre la actividad *in vitro* a nivel celular y una actividad *in vivo*, ya que el ser vivo puede reaccionar de diversas formas, alterando la sustancia o impidiendo su acceso a los lugares donde tiene lugar la síntesis vírica. Las pruebas sobre animales consisten en hallar la dosis de sustancia más efectiva sin que sea tóxica y determinar la vía de tratamiento más eficaz.

Para las pruebas en animales con el DIBATOD, hemos tropezado con el inconveniente de disponer de una pequeña cantidad de producto, debido a que al ser de nueva síntesis no se encuentra en el mercado y debe ser sintetizado en el Laboratorio antes mencionado.

MATERIALES Y METODOS

Sustancia

Las soluciones madres del DIBATOD se prepararon y utilizaron en dimetilsulfóxido (DMSO) a la proporción 1/100 (g/cm³). El DMSO procede de BDH Chemicals Ltd. Poole, Inglaterra.

Virus

El virus utilizado en este trabajo es el Vaccinia, procedente de linfa vacunal de tercera; adaptado a células HeLa a través de 24 pases y mantenido en este Departamento de Virología.

Animales

Conejos jóvenes de 2.000-2.500 g, los cuales se mantienen en observación antes de ser utilizados, con el fin de controlar en lo posible la existencia de una infección natural que nos enmascararía los resultados.

Método de inoculación y método general de tratamiento. Lectura de los resultados

La técnica de inoculación del virus, utilizada por nosotros, es la de punturas intradérmicas de Groth y consiste en inocular intradérmicamente una dosis determinada de cada una de las diluciones del virus en estudio; siendo en este caso de 0,2 cm³.

En el tratamiento de las lesiones dérmicas, inducidas por el virus, se realizó por medio de pincelaciones con la sustancia, diluida en DMSO al 10⁻²; expresándose los resultados por el diámetro de las lesiones (medido en milímetros) producidas por cada una de las diluciones inoculadas.

RESULTADOS

Actividad in vivo del DIBATOD frente al virus vacunal

En los cuadros 1-2 presentamos los resultados obtenidos mediante el tratamiento con el DIBATOD diluido al 10⁻² y con el diluyente (DMSO) como testigo. Ambos tratamientos se han realizado siempre sobre el mis-

mo animal para que los resultados fueran comparables, al evitar la diversidad de reacción que siempre existe entre dos animales frente al mismo agente, tanto sea virus como sustancia. Las cifras indican el diámetro en milímetros alcanzado por la lesión.

En el primer experimento (*cuadro 1*) se han realizado dos series paralelas de dos punturas con las diluciones de virus: 10^{-2} y 10^{-3} . Tratándose de inmediato y diariamente una serie con pincelaciones del DIBATOD y dejando la otra serie sin tratamiento, se observa que las punturas de inoculación tratadas con la sustancia no han desarrollado lesión, en contraste con las no tratadas o testigo. Por tanto, el tratamiento ha resultado positivo.

Con el fin de comprobar si la actividad se debía a la sustancia o al diluyente, en otro experimento semejante al descrito anteriormente, el tratamiento de una serie se realizó con DMSO y la otra serie quedó sin tratar (*cuadro 2*). Las diferencias observadas entre la serie tratada y la testigo no son significativas. Por ello se deduce que la acción antivírica reside fundamentalmente en la sustancia ensayada.

Formación de eritema por la acción del tratamiento

Como se observó la aparición de un eritema en las punturas tratadas que no se presentaba en las punturas sin tratar, pensamos que éste era producido por el tratamiento. En experimentos posteriores hemos medido dicho eritema y hemos seguido su evolución, ya que este eritema evidentemente era debido al tratamiento y convenía controlarlo. Un experimento análogo al presentado en el *cuadro 1* y que presentamos en el *cuadro 3*, nos muestra que el eritema sólo aparece como efecto del tratamiento, que se mantiene sin apenas evolucionar mientras dura éste y que además su diámetro es independiente de la dosis de virus. Por otra parte, en este experimento, cuya primera dilución de virus es más concentrada que la de la primera puntura de los anteriores, aparece lesión nodular en las punturas tratadas en las dos primeras diluciones de virus, pero cuyo aspecto es diferente y cuya evolución hacia su desaparición es más rápida que en las punturas sin tratar. Por tanto, este experimento nos confirma la causa del eritema y la acción curativa del tratamiento.

Para determinar si este eritema está originado por el DIBATOD o por el diluyente, se realizó un experimento semejante al anterior, pero realizando el tratamiento de una serie de punturas con DMSO y dejando

Cuadro 1. Actividad in vivo del DIBATOD diluido al 10^{-2} en DMSO frente al virus vacunal, en conejos inoculados por punturas intradérmicas

Lectura de las lesiones a los días que se indican, después de la inoculación	Diluciones del virus		
		10^{-2}	10^{-3}
5	Tratadas	0	0
	Testigo	17	8
6	Tratadas	0	0
	Testigo	16	4
7	Tratadas	0	0
	Testigo	16	0
10	Tratadas	0	0
	Testigo	13	0

Cuadro 2. Acción in vivo del DMSO frente al virus vacunal en conejos inoculados por punturas intradérmicas

Lectura de las lesiones a los días que se indican, después de la inoculación	Diluciones del virus		
		10^{-2}	10^{-3}
5	Tratadas	16	13
	Testigo	16	13
6	Tratadas	15	15
	Testigo	18	15
7	Tratadas	14	15
	Testigo	16	15
10	Tratadas	10	10
	Testigo	15	15

Cuadro 3. Actividad del DIBATOD in vivo frente al virus vacunal en conejos inoculados por punturas intradérmicas DIBATOD diluido al 10^{-2} en DMSO

Lectura de las lesiones, en milímetros, a los días que se indican, después de la inoculación	Dilución del virus											
	10^0				10^{-1}				10^{-2}			
	Tratado		Testigo		Tratado		Testigo		Tratado		Testigo	
	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema
1	0	0	8	0	0	0	5	0	0	0	±	0
2	14 (*)	25	13	0	8 (*)	25	8	0	±	25	±	0
3	11 (*)	24	13	0	7 (*)	25	8	0	±	25	0	0
4	±	23	11	0	±	26	6	0	±	23	0	0
5	±	21	6	0	0	21	0	0	0	21	0	0
6	0	20	6	0	0	20	0	0	0	21	0	0
7	0		5	0	0		0	0	0		0	0

(*) Nódulo muy blando.

la serie de punturas testigos sin tratar. Los resultados que se indican en el *cuadro 4* muestran que el eritema es semejante en todas las punturas tratadas con el DMSO, con independencia de la dosis de virus que es variable. Aunque aparece una ligera actividad antivírica, puede decirse que la actividad ejercida es debida fundamentalmente al DIBATOD y no al diluyente.

Influencia del intervalo de tiempo transcurrido entre la inoculación del virus y el tratamiento

Este experimento ha consistido en inocular la misma dosis de virus a todas las punturas (0,2 cm³ de la dilución 10⁻¹) y comenzar el tratamiento a diferentes intervalos, tales como, inmediatamente a la inoculación, 24, 48 y 72 h más tarde. A partir de la iniciación del tratamiento, éste se continúa diariamente y en este caso por la mañana y por la tarde. Los resultados obtenidos, expresados en el *cuadro 5*, indican la mayor eficacia del tratamiento cuando éste se lleva a cabo inmediatamente, siendo eficaz a las 24 h y algo menor a las 48 y 72 h; resultando más rápida la evolución de las lesiones tratadas con respecto al testigo sin tratar. Por otra parte, sigue confirmándose la aparición del eritema originado por el DMSO.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo complementan estudios anteriores realizados por nosotros sobre la actividad antivírica *in vitro* del DIBATOD. En este caso hemos encontrado una correlación entre la actividad *in vitro* a nivel celular y la actividad *in vivo* a nivel de organismo en tratamiento local.

Algunas drogas se emplean también en forma local, como la 5-iodo-2'-desoxiuridina que se aplica en forma de colirio o de unguento. La instilación debe hacerse cada 2 h durante el día y 1 vez por la noche; el unguento oftálmico debe ser aplicado 4 veces/día. El tratamiento de las afecciones cutáneas sigue el mismo esquema. Esta terapéutica se mantiene hasta la desaparición de las lesiones, pero sin que sobrepase de 1 semana a 10 días. La interrupción brusca del tratamiento da lugar a la recaída (1).

El diluyente empleado (DMSO) produce un eritema en la zona de tratamiento, pero quizá favorece la acción de la sustancia debido a sus propiedades, entre las que citaremos su fácil mezcla con el agua (4); extracor-

Cuadro 4. Actividad del diluyente DMSO in vivo frente al virus vacunal en conejos inoculados por punturas intradérmicas

Lectura de las lesiones, en milímetros, a los días que se indican, después de la inoculación	Dilución del virus											
	10 ⁰				10 ⁻¹				10 ⁻²			
	Tratado		Testigo		Tratado		Testigo		Tratado		Testigo	
	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema
1	0	0	9	0	0	0	5	0	0		0	0
2	0	21	10	0	0	21	6	0	0	25	0	0
3	10	16	12	0	8	16	10	0	0	20	5	0
4	11		12	0	10		20	0	4		6	0
5	12		12	0	12		11	0	±		7	0
6	12		10	0	12		11	0	0		5	0
7	10		8	0	8		7	0	0		5	0

Cuadro 5. Actividad del DIBATOD in vivo frente al virus vacunal en conejos inoculados por punturas intradérmicas. Influencia de la fecha de iniciación del tratamiento. DIBATOD diluido al 10^{-2} en DMSO. 2 tratamientos diarios

Lectura de las lesiones, en milímetros, a los días que se indican, después de la inoculación	Tratamiento inmediato		A las 24 h		A las 48 h		A las 72 h		Sin tratar	
	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema	Nódulo	Eritema
1	0	0	11	0	11	0	10	0	9	0
2	0	28	13	28	11	0	12	0	10	0
3	0	25	0	25	14	18	13	0	13	0
4	0	22	0	22	13	18	14	18	11	0
5	0	16	0	16	0	16	0	14	9	0
6	0	16	0	16	0	16	0	14	9	0
7	0	16	0	16	0	16	0	14	8	0

dinario poder de penetración percutánea aumentando la permeabilidad de las membranas biológicas y su capacidad analgésica, bacteriostática, diurética y sedativa. Su toxicidad es muy escasa, utilizándose incluso como conservador de células, protegiéndolas sobre todo cuando éstas se congelan (3), así como a los orgánulos.

Hemos observado que para que sea eficaz el tratamiento debe aplicarse a intervalos próximos al momento de la infección, pero esto suele ser común a las sustancias antivíricas conocidas. Las lesiones herpéticas del ojo responden favorablemente al tratamiento con la IDU, a condición que aquéllas sean recientes y superficiales (1).

Consideramos que los datos obtenidos en este trabajo no son suficientes para elaborar conclusiones definitivas sobre el valor terapéutico del DIBATOD, ni sobre su eficacia antivírica. Son necesarios mayor número de experimentos, estudiándose diferentes modos de infección y diversas pautas de tratamiento utilizando diferentes vías. También es imprescindible un estudio anatómico patológico, cariológico, posible producción de anomalías congénitas en la descendencia de los animales tratados, etc. Pero la realización de estos estudios requiere una considerable cantidad de sustancia difícil de obtener y, por otra parte, un largo período de tiempo. Por tanto, los datos hasta ahora expuestos tienen un valor fundamentalmente orientativo y sólo pueden ser utilizados como base positiva de trabajo.

Otro problema a resolver es el mecanismo de acción en el organismo, que puede ser debido a una inhibición de la síntesis celular del virus, pero también sería conveniente determinar su posible acción sobre la producción de anticuerpos o de interferón.

RESUMEN

Las lesiones dérmicas producidas por el virus vacunal *in vivo* en lomo de conejo, tratadas localmente con DIBATOD, desaparecen con mayor rapidez que las no tratadas; y en el caso de que la dosis de virus inyectada no sea muy concentrada, no aparecen lesiones cuando el lugar de la inoculación ha sido tratado inmediatamente.

Se observa una relación entre el intervalo de infección y el tratamiento y la respuesta de la lesión, como asimismo entre dosis de virus inoculado y respuesta al tratamiento.

El DMSO aplicado como disolvente de la sustancia, produce un eritema en la piel de conejo, pero no interfiere con la acción curativa del DIBATOD.

SUMMARY

Effect of DIBATOD on dermic lesions produced by vaccinia virus

The dermic lesions, produced by vaccinia virus on inoculated rabbit treated topically with DIBATOD, disappear more quickly than those untreated.

In the case that the inoculated dose of virus is not very high and the rabbit was locally treated immediately after dermical infection, lesions do not appear.

It is observed a relation between both the interval of infection and the treatment and response of the lesions as well as between the dose of inoculated virus and response of treatment.

DMSO used as diluent of the substance produces an erythema on the rabbit skin, but does not interfere with the protective effect of DIBATOD.

BIBLIOGRAFIA

1. BERNHEIM, PH., y LIEBESKIND, B. 1965. *Antibiot. Chemother. Basel.* 13, 227-99.
2. DICKINSON, D. B.; MISCH, M. J., y DRURY, R. E. 1967. *Science*, 156, 1.738.
3. LOVELOCK, J. E., y BISHOP, M. V. H. 1959. *Nature*, 183, 1.394-95.
4. RAMMLER, D. H., y ZAFFARONI, A. 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 141, 13-23.
5. RICO, S., y GARCÍA-GANCEDO, A. 1972. *Microbiol. Españ.*, 25, 145-63.

INSTITUTO NACIONAL DE LIMNOLOGIA. SANTO TOME (ARGENTINA)

NUEVOS METODOS PARA EL ESTUDIO ECOLOGICO DE MICROORGANISMOS EN AGUAS EUTROFICAS (*)

por

F. EMILIANI

El objetivo de la presente nota fue encontrar métodos y medios de cultivo adecuados para estimar y aislar la población microbiana capaz de multiplicarse naturalmente en el agua. Este es un problema muy actual y su importancia se intuye fácilmente, porque sólo con técnicas de cultivo idóneas se conseguirá aislar la microflora de real importancia en los procesos bioquímicos del ecosistema acuático (1-2). Como antecedentes se pueden citar otros trabajos (3, 5 y 10).

METODO Y RESULTADOS

El agua de lago, p. ej., se esteriliza en frío a través de filtros de membrana (FM) con poros de 0,01 a 0,22 μ de diámetro, mediante un dispositivo especial (tipo "Sartorius") y técnicas ya descritas (8). Para la obtención de bacterias sobre los FM se pueden utilizar los aparatos y métodos descritos por Millipore (6). Como almohadillas absorbentes se utilizan discos de vidrio poroso tipo "Sovirel" núm. 7 (9). Si se emplean las

(*) Primera nota de una comunicación presentada al III Congreso Nacional de Microbiología, Barcelona, junio de 1971.

almohadillas comunes de celulosa (tipo "Millipore" AP10047SO), el medio se puede volver selectivo para organismos celulosolíticos.

A cada una de las cápsulas de Petri (de 100 mm de diámetro) se agregan, estérilmente, los discos de vidrio fritado, uno sobre otro. Luego, en las mismas placas, se añade el medio de cultivo (agua de lago esterilizada por filtración) hasta enrasar con el borde del disco superior. Sobre la superficie de éste, se adhiere un FM a través del cual se filtró un volumen determinado de la dilución que resultó más adecuada según exámenes previos.

La caja, sin la tapa, se la coloca dentro de otra cápsula de Petri estéril (de 160 mm de diámetro) a la que se adiciona agua, a fin de utilizarla como cámara húmeda; en la cara interna de la tapa, se le adosa un papel de filtro destinado a absorber el agua de condensación con el objeto de evitar que ésta gotee sobre el FM (figura 1).

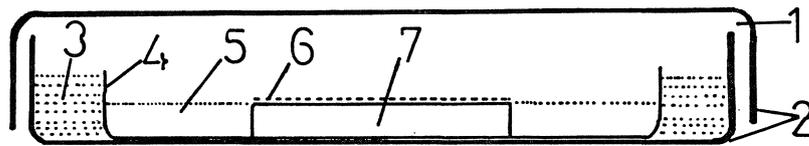


Figura 1. Disposición del material (corte vertical): 1: papel de filtro. 2: cápsula de Petri, de 160 mm de diámetro. 3: cámara húmeda. 4: cápsula de Petri (sin tapa), de 100 mm de diámetro. 5: agua de lago esterilizada por filtración. 6: filtro de membrana. 7: disco de vidrio fritado

El conjunto se incubaba a la temperatura promedio del agua de lago a la profundidad de muestreo, dejándolo durante 15 a 30 días. Las demás condiciones ambientales se regulan de acuerdo con el registro que se haya realizado de los factores abióticos que actuaban en el cuerpo de agua en estudio (11).

El medio de cultivo debe prepararse con parte de la misma muestra de la cual se desea realizar el estudio microbiológico; lo contrario implicaría una mezcla de aguas distintas con nutrientes complementarios, lo que confundiría la interpretación ecológica de los resultados.

Mediante una pipeta o jeringa estéril, se renueva periódicamente el medio de cultivo. El presente método es aplicable en aguas clasificadas como "eutróficas" y "muy eutróficas".

Si se adicionan soluciones nutritivas estériles, se puede estudiar, además, la actividad metabólica potencial. Como sugirió Margalef (4), ello

puede ir complementado por un análisis de la toxicidad del agua sobre determinadas especies o de su capacidad para promover el desarrollo de otras.

Al término del tiempo de incubación, se realiza el recuento de las colonias de algas o de bacterias; los resultados se expresan en número de colonias/ml, teniendo en cuenta el volumen filtrado y las diluciones utilizadas. Previa a la coloración (6) o al fijado (7), se pueden aislar, e identificar posteriormente, los distintos grupos de microorganismos mediante las conocidas técnicas de análisis sistemático.

RESUMEN

Se describe un sencillo método adecuado para el aislamiento y recuento de microorganismos acuáticos, empleando filtros de membrana y agua de lago como medio de cultivo renovable.

SUMMARY

New methods for ecological analysis of microorganisms of eutrophic waters

A new simple cultural method for isolation and enumeration indigenous fresh-water microorganisms is described, employing MF and lake water as renewable medium.

BIBLIOGRAFIA

1. CAFARELLI, A., y MELCHIORRI-SANTOLINI, U. 1968. Coltura di batteri pelagici lacustri in terreni liquidi a diverse concentrazioni di sostanza organica. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 24, 225-34.
2. HEUKELEKIAN, H., y DONDERO, N. C. 1964. Principle and Application in Aquatic Microbiology. Willey, Nueva York.
3. JANNASCH, H. W., y JONES, G. E. 1959. Bacterial population in sea water as determined by different methods of enumeration. Limnol. Oceanogr., 4, 128-39.
4. MARGALEF, R. 1969. El concepto de polución en limnología y sus indicadores biológicos. Doc. Inv. Hidrol., 7, 105-33.
5. MELCHIORRI-SANTOLINI, U., y CAFARELLI, A. 1967. Lake water as medium to cultivate fresh-water pelagic bacteria. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 22, 289-98.

6. Millipore, Co. 1967. Techniques for microbiological analysis, ADM 40. Millipore Co., Bedford, Mass.
7. PERRAMON, J. 1965. Técnica de fijación estable de colonias aerobias y anaerobias sobre membranas filtrantes. *Agua*, 31, 18-20.
8. Sartorius, Co. 1970. Dispositivo de Plástico para Filtración. Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen.
9. Sovirel, Co. 1969. Verrerie de Laboratoire. Sovirel Co., Paris.
10. STRASKRABOVA-PROKESOVA, V. 1966. Seasonal changes in the reproduction rate of bacteria in two reservoirs. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 16, 1.527-33.
11. VOLLENWEIDER, R. A. 1969. Primary Production in Aquatic Enviroments. Blackwell, Oxford.

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

ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DEL LIPOPOLISACARIDO DE LA FORMA L FIJA DEL *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

por

M. SANTAOLALLA

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (21), estudiamos la estructura y composición química del lipopolisacárido de la forma normal del *Agrobacterium tumefaciens*; en el presente realizamos un estudio semejante del lipopolisacárido de la forma L fija del *A. tumefaciens* obtenida por inducción con glicocola.

Estructuralmente, el lipopolisacárido de los microorganismos gram-negativos constituye una parte importante de la pared celular (su capa externa), su composición química corresponde a una macromolécula compleja formada por una parte lipídica y un polisacárido complejo; en los lipopolisacáridos correspondientes a las estirpes de tipo silvestre, se distinguen dos regiones principales, una correspondiente al denominado "corazón", y otra formada por las cadenas laterales portadoras del antígeno O. En los últimos años y en la actualidad, el estudio del lipopolisacárido, sobre todo en las enterobacteriaceas *Salmonella* y *Escherichia coli* es de gran importancia, habiendo servido a Kauffman (7) para su ya clásica clasificación serológica de las numerosas especies del género *Salmonella*; su importancia, como sabemos, se debe a ser un componente integral de

la endotoxina, complejo proteína-lípido-lipopolisacárido; entre sus propiedades biológicas más importantes sólo mencionaremos la de poseer un alto poder antigénico debido a su gran contenido específico de antígeno O.

En el presente estudio señalamos las principales diferencias encontradas entre los lipopolisacáridos de las formas normales y L del *Agrobacterium tumefaciens* y el interés que esto puede suponer.

MATERIAL Y METODOS

Empleamos la forma L fija del *Agrobacterium tumefaciens* obtenida mediante la inducción con glicocola, por los Drs. Rubio-Huertos y Beltrá (16), que amablemente nos la suministraron. La cultivamos en caldo común, a 25 °C, en fermentador con aireación, durante 48 h, al cabo de las cuales separamos los microorganismos por centrifugación, y los lavamos con agua estéril tres veces consecutivas; también por centrifugación, a continuación liofilizamos.

Obtención del lipopolisacárido

Obtenemos el lipopolisacárido bruto por el método fenol-agua, según describen Westphal y Jann (23). Después de una parcial purificación por ultracentrifugación, disolvemos el lipopolisacárido en una solución de ClNa 0,1 M que contenga PO_4Na_2 0,01 M, pH-7, y le añadimos ribonucleasa, dializando esta solución a 25 °C contra el mismo tampón, según indican Leive y colaboradores (9). Este lipopolisacárido purificado lo liofilizamos.

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

Microscopía electrónica

a) *Tinción positiva.* Hacemos la tinción positiva sobre rejillas porta-objetos preparadas con carbón, usando para la tinción una solución acuosa de acetato de uranilo al 2 %, recientemente preparada y filtrada; colocamos una pequeña gota de la suspensión del lipopolisacárido sobre la rejilla y añadimos otra gota de la solución de acetato de uranilo, manteniendo así la rejilla durante 30 min; lavamos con agua destilada, secamos y ponemos la rejilla en contacto con otra solución de citrato de plomo,

según la técnica de Reynolds (15), y a continuación volvemos a lavar.

b) Tinción negativa. Las tinciones negativas se hicieron por el método general con ácido fosfotúngstico.

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

Obtención del lípido A

Separamos la parte lipídica, denominada lípido A, por hidrólisis con ácido acético al 1 %, a reflujo, durante 75 min. Después de frío, el residuo insoluble blanco, constituido por el lípido A, lo lavamos con cloroformo y agua.

Análisis del lípido A

Realizamos el análisis de la parte lipídica por cromatografía sobre capa fina, según el método de Kelley (18).

Hidrólisis suave del polisacárido y obtención de los oligosacáridos correspondientes

El polisacárido separado del lípido A lo hidrolizamos con SO_4H_2 0,5 N, en tubo cerrado, a 100 °C, durante 15-20 min. Neutralizamos el exceso de SO_4H_2 con $(\text{HO})_2\text{Ba}$, separamos el precipitado de SO_4Ba por centrifugación, evaporamos el líquido en vacío, disolvemos en una pequeña cantidad de agua y hacemos cromatografía de los oligosacáridos y posibles componentes aminados.

Hidrólisis de los oligosacáridos

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

Cromatografía sobre papel

Empleamos papel whatman núm. 1. Disolventes: A) butanol-ácido acético-agua (40; 10; 50, v) B) butanol-piridina-agua (60; 40; 30, v). Reveladores: Solución de nitrato de plata, según Trevelyan y colaboradores (24). Ftalato de anilina, según Partridge (14). Reactivo de Anderson (3) para el ácido 3-desoxi-d-mano-octulosónico. Para azúcares aaminados empleamos el reactivo de Elson y Morgan (4).

Cromatografía en capa fina

Empleamos placas preparadas con silicagel G, según Stahl, de unas 300 $m\mu$ de espesor; empleando distintos disolventes y reveladores para la identificación de los correspondientes monosacáridos, según el método de Gal (5).

La parte lipídica correspondiente al lípido A la analizamos siguiendo el método de Kelley (18), revelando las manchas con 2'-7'-diclorofluoresceína.

Investigación de heptosas

La realizamos por cromatografía sobre papel whatman núm. 1, según el procedimiento seguido por Adams y colaboradores (1), hidrolizando con SO_4H_2 N, durante 8 h, a 100 °C, en tubo cerrado y precipitando el exceso de SO_4H_2 con $(\text{HO})_2\text{Ba}$; con la solución concentrada a presión reducida hacemos la cromatografía empleando como disolventes acetona-agua (95: 5, v). Revelando con el reactivo de Greene y Morris (6), las aldoheptosas originan una mancha color rosa. También determinamos heptosas en el polisacárido sin hidrolizar, muy diluido, siguiendo el método de Dische, modificado por Osborn (13), usando el espectrofotómetro Unicam S.P. 500.

RESULTADOS

Partimos de 4,5 g de microorganismos liofilizados, de los que obtenemos por tratamiento con fenol-agua, según el método de Westphal y Jann (23), después de liofilizar, 0,504 g de lipopolisacárido bruto, que equivalen a un 11,2 % referidos a peso seco del microorganismo. Este

lipopolisacárido bruto, suspendido en agua en la proporción del 3 %, lo purificamos por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa, obteniendo después de liofilizado un peso de 0,0934, que equivale a un 2,07 % del peso seco de microorganismos de que partimos. En las curvas de máxima absorción en el ultravioleta (*figura 1*) se aprecian perfectamente las diferencias en cuanto a ácidos nucleicos del lipopolisacárido bruto y el purificado, ya exento de ellos, después de su purificación por ultracentrifugación y tratamiento, con ribonucleasa en la forma expuesta anteriormente.

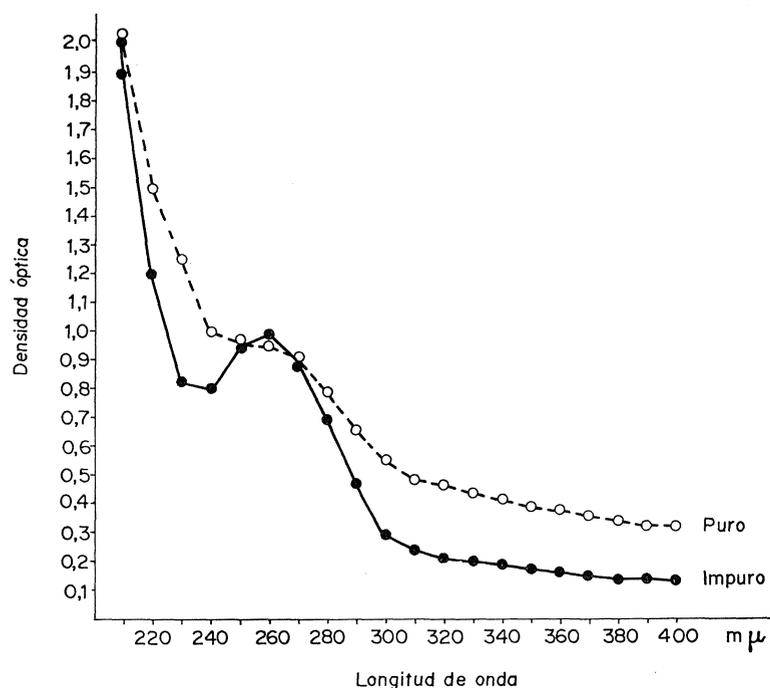


Figura 1

El lipopolisacárido así obtenido, y suspendido en solución acuosa, fue examinado al microscopio electrónico empleando las tinciones positiva y negativa; observado por ambos métodos aparece en forma de esferoides o discos, apreciándose en algunas zonas una estructura trilaminar perfectamente definida (*figuras 2-3*).

El lipopolisacárido hidrolizado con ácido acético al 1 % a reflujo durante 75 min dio lugar a un residuo insoluble constituido por el lípido A. Este lípido A, después de disuelto en cloroformo, lavado con agua destilada tres veces y seco pesó 0,025 g, que representa un 26,7 % del peso del lipopolisacárido; su contenido en nitrógeno es de 1,02 %.

Hidrolizamos este lípido A obteniendo una parte soluble en cloroformo, compuesta de distintos ácidos grasos y otra acuosa en la que identificamos 2-ceto-3-desoxi-d-mano-octuloseonato con un Rfg = 1,3, glucosa, glucosamina, etanolamina e ión PO_4''' . Se aprecian también dos manchas que dan reacción positiva a la ninhidrina, cuyos Rfg son 0,82 y 1,2.

El polisacárido, tal como queda después de separar el lípido A, tiene un contenido en nitrógeno del 2,5 %.

En este polisacárido hidrolizado investigamos heptosas por cromatografía sobre papel siguiendo el método expuesto de Adams y colaboradores (1), con un resultado positivo, apareciendo al revelar con urea-fosfato una mancha perfectamente delimitada de color morado-rojizo, con un Rfg de 0,87; también comprobamos su presencia espectrofotométricamente por el método de Dische, modificado por Osborn (13), en el polisacárido sin hidrolizar, muy diluido.

Hidrolizamos este polisacárido suavemente con SO_4H_2 0,5 N a 100 °C, durante 15-20 min, y haciendo cromatografía sobre papel vemos que está compuesto por 6 oligosacáridos distintos, cuyos Rfg y reacciones a distintos reveladores exponemos en el *cuadro 1*.

Cuadro 1

Oligosacáridos	Rfg	Reveladores	
		Plata alcalina	Ninhidrina
1	0,15-0,20	+	+
2	0,36	+	+
3	0,88	+	—
4	1,04	+	—
5	1,79	+	—
6	2,12	+	—

Eluimos los distintos oligosacáridos separados del polisacárido complejo y los hidrolizamos con ClH 2 N y 6 N a 100 °C, durante 2 h; los monosacáridos identificados en cada uno de ellos, vienen consignados en el cuadro 2.

Cuadro 2

Oligosacáridos	Monosacáridos
1	Glucosamina Acido 3-desoxi-d-mano-octulosónico Glucosa
2	Glucosamina Acido 3-desoxi-d-mano-octulosónico (indicios) Glucosa
3	Glucosamina Glucosa
4	Glucosamina Glucosa (indicios) Acido 3-desoxi-d-mano-octulosónico (indicios)
5	Glucosamina Glucosa Xilosa
6	Glucosamina Glucosa

Proporcionalmente, el oligosacárido que aparece más abundante es el que hemos señalado con el núm. 3, seguido en proporción por los núms. 1 y 2.

DISCUSION

Encontramos un porcentaje de lipopolisacárido puro de 2,07, ligeramente superior al encontrado para el lipopolisacárido de la forma normal del *Agrobacterium tumefaciens* que correspondía al 1,39 (21); este resultado no coincide con los señalados por Nesbitt y Lennarz (12), quienes estudiando comparativamente los lipopolisacáridos de las formas bacilar y L del *Proteus* P 18 indican que la forma bacilar contiene tres o cuatro veces más lipopolisacárido que la forma L. El grupo de Westphal (9) realiza un estudio comparativo de la endotoxina y el lipopolisacárido de las for-

mas normal y L del *Proteus mirabilis*; en cuanto a la endotoxina, encuentran mucha menor proporción en la forma L, al mismo tiempo el producto difiere de la endotoxina procedente de la forma normal y no es tóxico; respecto al lipopolisacárido de ambas formas expresan su similitud en cuanto a porcentaje, composición química y propiedades biológicas. En ambos trabajos, las formas L del *Proteus* son obtenidas por inducción con penicilina, las del *Proteus* P 18 se lisan con facilidad, y los autores no indican nada respecto a su virulencia, señalando únicamente en el caso del *P. mirabilis* la ya mencionada ausencia de toxicidad de su endotoxina.

Las formas L del *Agrobacterium tumefaciens* empleado en nuestros estudios son obtenidas por inducción con glicocola, perfectamente resistentes a la lisis, virulentas, puesto que producen tumores en las plantas no diferenciables estructuralmente de aquellos producidos por la forma normal, y permanentemente estables, cultivadas en medios desprovistos del agente inductor que dio origen a su formación, presentan una pared perfectamente diferenciada, aunque su composición química es diferente a la de la forma normal de que proceden; por lo que creemos que estas formas L fijas obtenidas por inducción con glicocola son distintas a aquéllas que se obtienen mediante la penicilina.

En estudios realizados anteriormente por nosotros (17-18) sobre los lípidos de ambas formas de microorganismos cultivados en medios de crecimientos idénticos y en las mismas condiciones, extraíbles con alcohol-éter (3 : 1, v) y cloroformo-metanol (2 : 1, v), encontramos unos porcentajes de lípidos para las formas normal y L del *Agrobacterium tumefaciens* de 8,75 y 10,23, respectivamente, resultados en partes coincidentes con los de los investigadores mencionados, quienes identifican mayor cantidad de lípidos extraíbles por los disolventes grasos usuales (fosfolípidos, en general) en las formas L del *Proteus*; sin embargo, al purificar estas grasas, nos encontramos que la correspondiente a la forma L es una lipoproteína con un 40 % aproximado de aminoácidos, por lo que el porcentaje real de sustancias lipídicas es de 6,19, inferior al de la forma normal, que queda reducido al 8,18. En la forma L del *A. tumefaciens* todavía se obtienen porcentajes de grasas inferiores, del orden del 5,88 cuando se cultiva en un medio sintético, cuya única fuente de carbono es la glucosa. Distintos resultados obtuvimos en estudios sobre los lípidos de la forma L obtenida por inducción con glicocola de *Clostridium tetani* (19), donde el porcentaje de los correspondientes a la forma normal es de 0,22 y 1,09 el

Table 2. Taxonomic study of 23 strains of yeasts

Strain	Surface colony	Ch. g solid medium	Ch. g liquid medium	Ch. vegetative cells	Pseudomycelium	Presence ascospores	Fermentation of						Assimilation of									Splitting arbutin	Ester production	Gelatin liquefaction	Reaction litmus milk	g vitamin-free-m.	Diagnostic			
							Glucose	Galactose	Maltose	Sucrose	Lactose	Raffinose	Melibiose	Glucose	Galactose	Maltose	Sucrose	Lactose	Raffinose	Melibiose	Nitrate							Ethanol	Lactic acid	Citric acid
GL-1-3	S	S	p ^e	b	T	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—	—	+	<i>Candida krusei</i>
GL-1-5	R	W	p ^e	c	M	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—	—	+	<i>C. pelliculosa</i>
GL-1-6	S	W	+	a	C	—	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	w	<i>C. parasilopsis</i> var. interm.	
GL-2-3	S	W	+	a	C	—	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	w	<i>C. parasilopsis</i> var. interm.	
GL-2-6	S	S	p ^e	b	T	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	+	—	—	—	+	<i>C. krusei</i>	
GL-2-8	R	W	p ^e	c	M	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	<i>C. pelliculosa</i>	
GL-3-3	S	W	+	a	C	—	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	w	<i>C. parasilopsis</i> var. interm.	
GL-3-6	R	W	p ^e	c	M	h	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	<i>Hansenula anomala</i>	
GL-3-12	R	W	p ^e	c	M	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	<i>C. pelliculosa</i>	
ML-2-3	S ^p	S ^p	p ^t	c	—	o	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—	<i>Saccharomyces lactis</i>	
ML-2-5	R	W	+	a	C	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	w	<i>C. parasilopsis</i> var. interm.	
ML-2-7	S	S	p ^e	b	T	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	+	—	+	—	—	—	+	<i>C. krusei</i>	
ML-2-13	R	W	p ^e	c	M	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	<i>C. pelliculosa</i>	
ML-3-4	S	W	+	a	C	—	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	w	<i>C. parasilopsis</i> var. interm.	
ML-3-5	S	S	p ^e	b	T	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	+	—	+	—	—	—	+	<i>C. krusei</i>	
ML-3-9	R	W	p ^e	c	M	h	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	<i>H. anomala</i>	
ML-3-10	R	W	p ^e	c	M	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	<i>C. pelliculosa</i>	
ML-3-11	S ^p	S ^p	p ^t	c	—	o	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—	<i>S. lactis</i>	
RL-2-1	S	S	+	d	M	—	+	—	—	+	—	—	+	—	+	—	—	—	+	w	w	w	+	+	+	—	—	w	<i>C. utilis</i>	
RL-3-2	R	W	p ^e	c	M	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	<i>C. pelliculosa</i>	
RL-3-4	S	S	p ^e	d	M	—	w	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	<i>C. mycoderma</i>	
RL-3-6	R	W	p ^e	c	M	h	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	<i>H. anomala</i>	
RR-3-7	S	S	+	d	M	—	+	—	—	+	—	—	+	—	+	—	—	—	+	w	w	w	+	+	+	—	—	w	<i>C. utilis</i>	

S = smooth, S^p = smooth, light-pink-colored. R = rough. W = wrinkled. p^t = thin pellicle. p^e = creeping pellicle. p^e = creeping up high against the glasswall pellicle. w = weak. Vegetative cells: a = oval and long cells; b = elongate and cylindrical cells; c = roundish and oval cells; d = oval and cylindrical cells; all of them present multilateral budding. Pseudomycelium: C = *Candida* type (figure 2); *Mycocandida* type (figure 3); T = *Mycotorula* type (figure 4). Ascospore shape: o = spheroidal, 1-4/ asca; h = hat-shaped, 1-4/ asca.

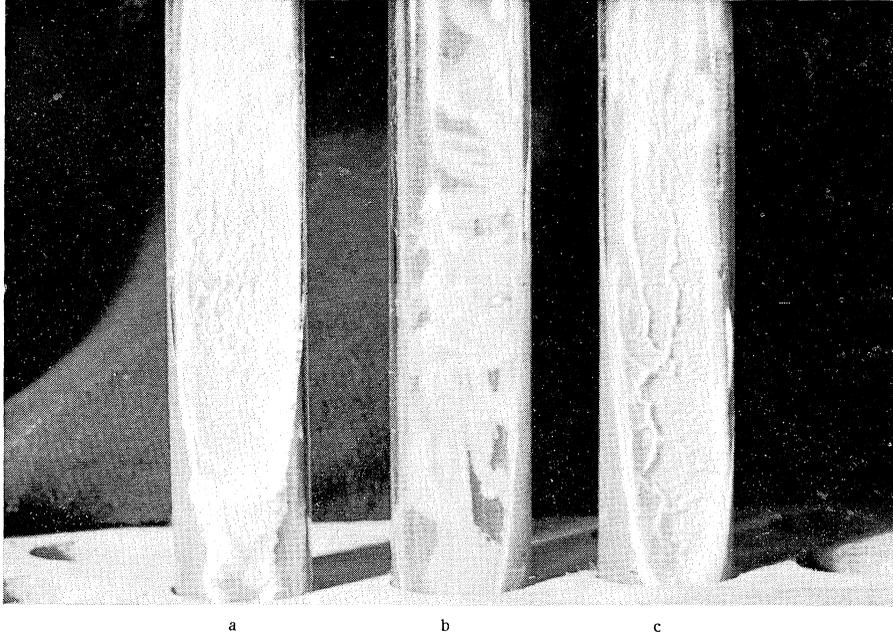


Figure 1. a) GL-1-6: *Candida parasilopsis* var. *intermedia*. b) GL-2-9: *C. krusei*. c) GL-3-12: *C. pelliculosa*

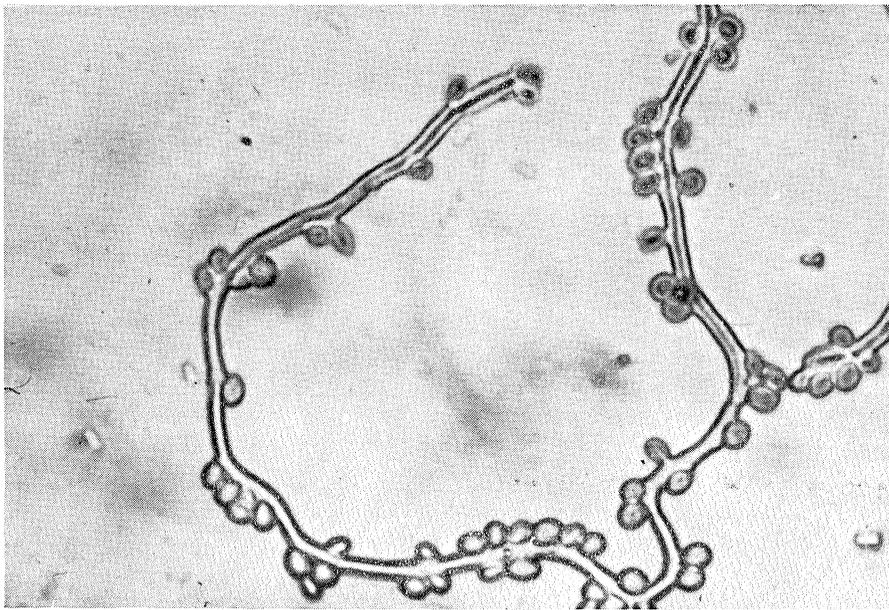


Figure 2. GL-1-6: *C. parasilopsis* var. *intermedia*. Pseudomycelium

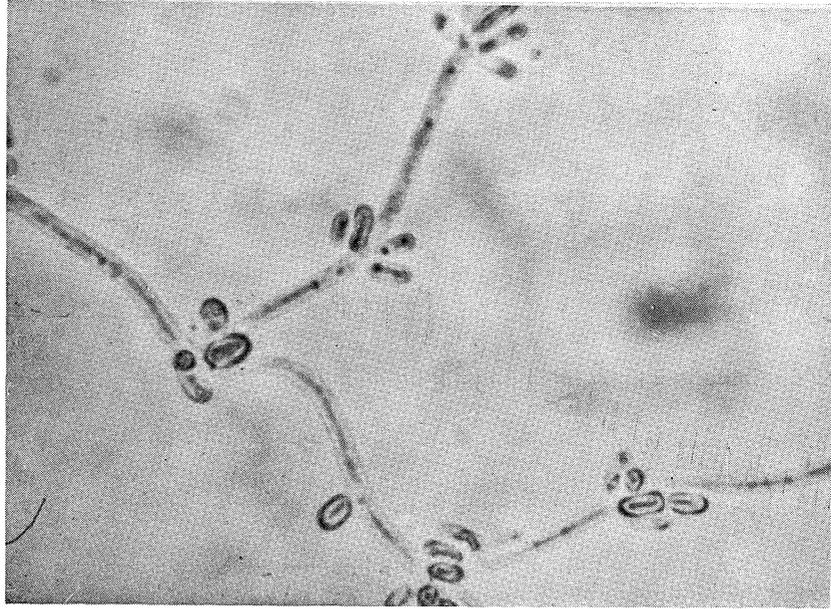


Figure 3. RL-3-2: *C. pelliculosa*. Pseudomycelium

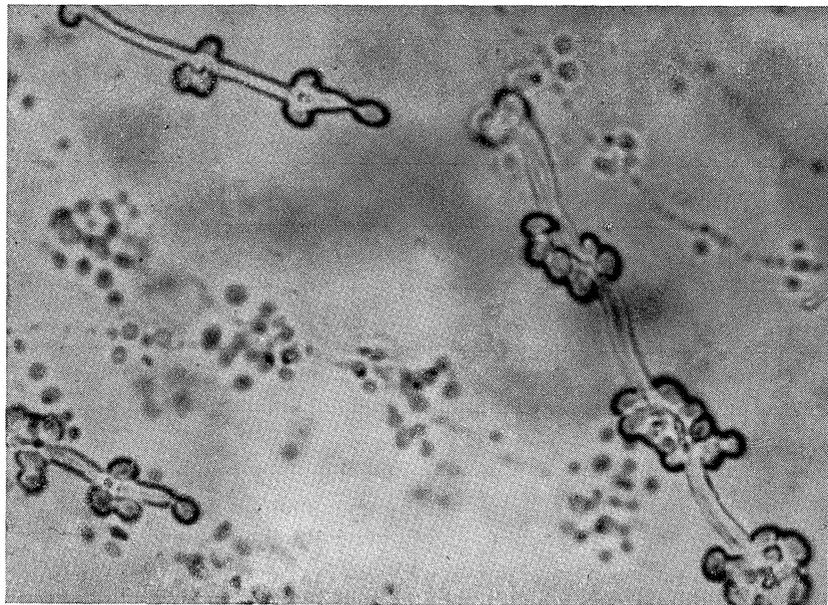


Figure 4. GL-2-6: *C. krusei*. Pseudomycelium

de la forma L, resultado éste que concuerda plenamente con los obtenidos por otros autores (9 y 12).

El aspecto físico y la estructura observada al microscopio electrónico, del lipopolisacárido de la forma L del *Agrobacterium tumefaciens*, tanto bajo la forma de tinción positiva como negativa, no presenta ninguna diferencia con la correspondiente al lipopolisacárido de la forma normal, como indicamos en un trabajo anterior (21). Cuando se observa en forma de tinción negativa, el lipopolisacárido aparece como cuerpos ovoides, con aspecto de cuerda enrollada y también ocasionalmente como esferoides (figura 3). Observado por tinción positiva aparece en forma de cinta aplastada con tendencia a la formación de anillos imperfectos de diferente tamaño, siendo en algunas zonas de estas preparaciones perfectamente visible la estructura trilaminar (figuras 2 y 4). La estructura en forma de cinta trilaminar que presenta el lipopolisacárido observado bajo la forma de tinción positiva fue descrita por Shands y colaboradores (22) en estudios realizados sobre diferentes lipopolisacáridos de distintas especies de *Salmonella typhimurium*. También Lopes e Inniss (10-11) encuentran una estructura trilaminar en el lipopolisacárido de *Escherichia coli* cuando lo observan por tinción positiva.

No conocemos ningún trabajo sobre ultraestructura del lipopolisacárido de formas L; nuestros anteriores estudios (21) y éste parecen confirmar que no existe diferencia entre la estructura submicroscópica del lipopolisacárido correspondiente a las formas normal y L.

La figura 5 representa el lípido A separado por hidrólisis del lipopolisacárido observado en forma de tinción negativa y aparece como un conglomerado de pequeños esferoides.

La composición química del lipopolisacárido de la forma L del *Agrobacterium tumefaciens* difiere de la encontrada por nosotros en el lipopolisacárido de la forma normal (20).

En cuanto a la composición del lípido A identificamos ácidos grasos, 2-ceto-3-desoxi-d-mano-octulosonato, glucosa, glucosamina, etanolamina, ión PO_4''' , apareciendo también dos manchas no identificadas que dan reacción positiva a la ninhidrina; y que tal vez correspondan a aminoácidos. Adams y colaboradores (2) ya encontraron aminoácidos en la fracción correspondiente al lípido A de los lipopolisacáridos de *Moraxella duplex* y *Micrococcus calca-acéticus*. La diferencia más significativa, en cuanto al lípido A, de esta forma L y el correspondiente al lipopolisacárido de la

Cuadro 3

Forma normal		Forma L	
Oligosacáridos Rfg	Monosacáridos	Oligosacáridos Rf	Monosacáridos
0,29	Acido 3-desoxi-d-mano-octulosónico Glucosamina Xilosa Fucosa Ramnosa	0,15-0,20	Glucosamina Acido 3-desoxi-d-mano-octulosónico Glucosa
0,75	Acido 3-desoxi-d-mano-octulosónico Glucosamina Xilosa Fucosa Ramnosa	0,36	Glucosamina Acido 3-desoxi-d-mano-octulosónico (indicios) Glucosa
1,10	Acido 3-desoxi-d-mano-octulosónico (indicios) Xilosa Fucosa Ramnosa	0,88	Glucosamina Glucosa
1,36	Glucosamina Xilosa Glucosa Ramnosa	1,04	Glucosamina Glucosa (indicios) Acido 3-desoxi-d-mano-octulosónico (indicios)
1,64	Fucosa Ramnosa	1,79	Glucosamina Glucosa Xilosa
1,96	Glucosamina Glucosa Ramnosa	2,12	Glucosamina Glucosa
2,78	Fucosa Ramnosa	5,6	

forma normal, es que mientras en éste encontrábamos indicios de ramnosa, en el de la forma L aparece ostensiblemente la glucosa.

Por hidrólisis suave del polisacárido separado del lípido A, aislamos 6 oligosacáridos totalmente distintos a los encontrados en el polisacárido procedente de la forma normal, la mayor proporción corresponde al que hemos señalado con el núm. 3, con un Rfg aproximado a 0,88. Los monosacáridos que componen estos oligosacáridos además del ácido 3-desoxi-d-mano-octulosónico, son glucosamina, glucosa y únicamente en un oligosacárido encontramos xilosa. El *cuadro 3* indica claramente las diferencias encontradas entre los polisacáridos correspondientes a ambas formas.

Por último creemos interesante señalar que los monosacáridos encontrados en el lipopolisacárido de la forma L del *Agrobacterium tumefaciens*, con excepción de la xilosa, son típicos de la porción del lipopolisacárido denominada "corazón", mientras que en el lipopolisacárido correspondiente a la forma normal encontramos además otros monosacáridos típicos de las cadenas laterales antigénicas O, como son la ramnosa, glucosa y xilosa.

RESUMEN

Estudiamos el lipopolisacárido de la forma L fija del *Agrobacterium tumefaciens* extraído por el método de Westphal y Jann (23), purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa, obteniendo un 2,07 % referido a peso seco de los microorganismos liofilizados de que partimos.

Observado al microscopio electrónico resultó idéntico al obtenido de la forma normal; aparece por tinción positiva, en forma de cintas aplastadas formando anillos irregulares, pudiéndose apreciar en algunas zonas una estructura trilaminar; en tinción negativa se aprecian formas ovales.

Separamos el lípido A por hidrólisis suave. En este lípido A identificamos, ácidos grasos, 2-ceto-3-desoxi-d-mano-octulosonato, glucosa, glucosamina, etanolamina e ión PO_4''' ; en el polisacárido separado identificamos una heptosa. Por hidrólisis parcial de este polisacárido encontramos 6 oligosacáridos de distintos Rf, cuyos monosacáridos básicos son la glucosamina y glucosa, aunque en algunos de ellos se identificó el ácido 3-desoxi-d-mano-octulosónico y xilosa.

Se compara su composición química con aquella encontrada en un trabajo anterior, sobre el lipopolisacárido de la forma normal del *Agrobac-*

terium tumefaciens, cultivado en condiciones análogas; encontrando las siguientes diferencias principales: en el lipopolisacárido de la forma normal identificamos ramnosa que no se pudo identificar en la forma L, tampoco en el polisacárido hidrolizado de la forma L pudimos encontrar fucosa, monosacárido que aparece en cinco de los oligosacáridos de la forma normal.

SUMMARY

The structure and chemical composition of lipopolysaccharide from stable L phase of Agrobacterium tumefaciens

The lipopolysaccharide (LPS) of the stable L phase of *Agrobacterium tumefaciens* induced by glicine was extracted by the method of Westphal and Jann and purified by ultracentrifugation and ribonuclease it was obtained in a 2.07 % from the dried weight of the lyophilized cells.

The LPS observed at the electron microscope by negative and positive staining had the same ultrastructure than the LPS from the normal parental *Agrobacterium tumefaciens*, viz: ribbons with a trillaminar structure and oval forms by negative staining.

The lipid A was separated by mild hidrolisis, and in it fatty acids, KDO, glucose, glucosamine, ethanalamine and PO₄''' were identified.

In the polisaccharide separated from the lipid A one heptose was identified. After hidrolisis of this polisaccharide 6 oligosaccharides of different R_f which basic monosaccharides were glucosamine and glucose were found. KDO and xilose were also found.

The chemical composition of LPS of this L phase of *Agrobacterium tumefaciens* was compared with the LPS of the normal parental *A. tumefaciens*, being rhamnosa and fucose absent in the L phase whereas it was present in five oligosaccharides of the normal form.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, G. A.; QUADLING, C., y PERRY, M. B. 1967. D-glycero-D-manno-heptose as a component of lipopolysaccharide from Gram negative bacteria. Can. J. Microbiol., 13, 1.605-13.

2. ADAMS, G. A.; QUADLING, C.; YAGUCHI, M., y TORNABENE, T. G. 1970. The chemical composition of cell-wall lipopolysaccharides from *Moraxella duplex* and *Micrococcus calco-aceticus*. *Can. J. Microbiol.*, 16, 1-8.
3. ANDERSON, P. J. 1966. A sensitive reagent for detecting 2-deoxysugars and 3-deoxypolyols- *J. Chromatogr.* 21, 163-64.
4. ELSON, L. A., y MORGAN, W. T. J. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and condrosamine. *Biochem. J.*, 27, 1.824-28.
5. GAL, A. E. 1968. Separation and identification of monosaccharides from biological materials by thin layer chromatography. *Anal. Biochem.*, 25, 452-61.
6. GREENE, F. L., y MORRIS, P. 1958. Urea phosphate reagent as a specific test for heptoses on paper chromatograms. *Anal. Chem.*, 30, 1.164.
7. KAUFFMANN, F. 1964. Das Kauffmann-White-Schema, 21-26. In E. VAN OYE (ed.). *The world problem of Salmonellosis*. Uitgeverij, Dr. W. Junk, La Haya.
8. KELLEY, T. F. 1966. Separation with unidimensional TLC of all neutral lipid classes. *J. Chromatogr.*, 22, 456-57.
9. LEIVE, L.; SHOVLIN, U. K., y MERGENHAGEN, L. E. 1968. Physical chemical and immunological properties of lipopolysaccharide released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate. *J. Biol. Chem.*, 243, 6.384-91.
10. LOPES, J., e INNISS, W. E. 1969. Electron microscopy of effect of polymixin on *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 100, 1.128-30.
11. LOPES, J., e INNISS, W. E. 1970. Electron microscopy study of lipopolysaccharide from an avian strain of *Escherichia coli* 018. *J. Bacteriol.*, 103, 238-43.
12. NESBITT, J. A., y LENNARZ, W. J. 1964. Comparison of lipids and lipopolysaccharide from the bacillary and L forms of *Proteus* P 18. *J. Bacteriol.*, 89, 1.020-25.
13. OSBORN, M. J. 1963. Studies on the Gram negative cell-wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3- deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 50, 499-506.
14. PARTRIDGE, S. M. 1949. Aniline hydrogen pthalate as a spraying reagent for chromatography of sugar. *Nature* 164, 443.
15. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high put as an electron-opaque in electron microscope. *J. Cell. Biol.*, 17, 208-12.
16. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Fixed pathogenic L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 195, 4.836.
17. SANTAOLALLA, M. 1965. Estudio comparativo del componente graso del *A. tumefaciens* y de sus formas L fijas. I. Aislamiento de las distintas fracciones lipídicas. *Microbiol. Españ.*, 18, 13-21.
18. SANTAOLALLA, M. 1966. Estudio comparativo del componente graso del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas. II. Variaciones según el medio de cultivo y estudio de los fosfolípidos. *Microbiol. Españ.*, 19, 1-10.
19. SANTAOLALLA, M. 1966. Identificación de esteroides en la grasa neutra del *Clostridium tetani* y sus formas L fijas. *Microbiol. Españ.*, 19, 87-91.

-
20. SANTAOLALLA, M. 1971. Estructura y composición química del lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*. Microbiol. Españ., 24, 243-56.
 21. SANTAOLALLA, M., y ESPLÁ, M. D. 1972. Electron microscopy of lipopolysaccharides from *Erwinia carotovora* and the bacillary and L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. Microbiol. Españ., 25, 91-104.
 22. SHANDS (Jr.), J. W.; GRAHAM, J. A., y NATH, K. 1967. The morphology and structure of isolated bacterial lipopolysaccharide. J. Mol. Biol., 25, 15-21.
 23. WESTPHAL, O., y JANN, K. 1965. Methods Carbohydr. Chem., 5, 83-91.
 24. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P., y HARRISON, J. S. 1950. Detection of sugar on paper chromatograms, Nature, 166, 444.

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (C S I C)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

YEAST OCCURRENCE AND SIGNIFICANCE IN THE FERMENTATION OF SPANISH-GREEN OLIVES

by

M. CASTAÑÓN and B. IÑIGO

INTRODUCTION

In the natural fermentation of Spanish-type green olives, one part of the microbiological activity is due to yeasts. This was first reported by Smyth (24). Vaughn et al. (25) greatly expanded the pioneering studies of Cruess (7-8) about the heterogeneous microflora of the fermentation, which has been divided into three different periods clearly delimited by the brine's pH and the nature of the microbial population. Yeasts are present throughout the fermentation and storage.

Spanish workers (10, 14 and 17-18) have shown, as a result of an organized programme on the technology of green olives, that fermentation in Spain is somewhat different to the one reported in California (25) especially referring to the primary stage. This phase of the fermentation normally requires 2-3 days, from the 7-14 days described by Vaughn, and during this time a large number of sporulated bacteria can be isolated, but not *Leuconostoc* nor heterofermentative Lactobacilli. González Cancho (11-12) inquired further into the matter of the principal yeasts in olive brines and inferred their insignificant incidence in the Spanish first stage.

It has been well established that the primary stage is the most important phase of the fermentation and mainly responsible for its further behaviour. Even as this critical periods ends, if it has proceeded in a normal way, the

natural microbial flora presented in the brine is replaced by lactic acid bacteria, until the heterogeneous population is effectively monopolized. The finding for a statistical estimation of the lactic acid bacteria dominance, calculated by Castañón (5) was 8 days.

Consequently a series of works will be undertaken which seek to investigate the early phase of the fermentation. First steps were conducted to determine the microbial occurrence. Therefore, this paper was directed towards establishing the identity of the individual species comprising the total yeast population in olive brines, during the first 10 days.

Our main purpose is to attempt a following study of some of the interesting aspects of yeast behaviour in relation to: lactic acid dissimilation, aroma production, growth factor synthesis and the interactions of the microbiological groups and species to ascertain whether the effective control, or modification, of the fermentation proper can be obtained as a direct result of the inoculation of some profitable yeasts associated with lactic acid bacteria.

It is known that early studies about green olive preparation, considered yeasts undesirable: they could grow on the surface and may reduce the lactic acid levels, to allow the development of other types of spoilage organisms (13 and 15); or they could grow to the near exclusion of the desired lactic, as in the case of "stuck" fermentation which commonly occur in Manzanillo olives (2).

In contrast, and more recently, Mrak et al. (29) have reported the occurrence of a predominantly fermentative yeast population, when active lactic fermentation is established, and advocated for their contribution to the development of flavor-enhancing properties on the final product. This presumptive share of yeasts involved in the lactic fermentation could not have been easily assessed, due to the complex nature of this process. Alcohols, organic acids, carbonyl compounds and esters are among end products of yeast metabolism; brines also support a completely different microflora, comprising several genera and species, which have their peculiar end products, and the interaction of all of them, may be important. Recent studies have begun to contrate upon these approaches (9).

Anyway, it must be remembered that the variation from a merely oxidative to predominantly fermentative yeast metabolism, depends on the environment characteristics, such as substrate and nutrients, oxygen availability, pH, temperature, salt content, etc. (22).

Furthermore, Cantarelli (3) has suggested the role of yeasts as factors

that stimulate lactic acid activity, although yeast activity causes a decrease in tryptophane levels (6). Growth promoting substances, essential vitamins and amino acids have been shown to be stimulatory or essential for Lactobacilli and Pediococci (21). Some of them can be synthesized by certain yeasts. Under such conditions, a previously selected yeast may reduce the time required to reach the Lactobacilli dominance, decreasing the potential danger of spoilage.

MATERIAL AND METHODS

A stainless glass tube was used for sampling. Samples were collected by inserting the tube and syphoning the brine into sterile sample flasks. They were immediately transferred to the laboratory where chemical and microbiological analysis were made.

Samples were taken 48 h 6 and 10 days after the olive-brining operation. Strains were isolated from brines by spreading 0.1 ml of the decimal dilutions on the surface of dried plates.

Purification and maintenance of cultures

Isolates were plated twice, or as often as was considered necessary to ensure purity.

Stock cultures were maintained on malt agar at room temperature. New transfers were made at 3-monthly intervals.

Preparation of inocula

For use as inocula, cultures were obtained by making at least two subcultures. The inoculum used was one loopful, unless stated

Methods of cultivation

The optimal incubation temperature was 30 °C, and the incubation

Morphological characters

Vegetative reproduction and characteristics of vegetative cells were observed in liquid (15° Be. malt extract) and solid medium (Bacto-yeast-morphology agar, Difco) (*figure 1*).

The slide culture method described by Rivalier and Seydel [see Lodder (20)] for the formation of pseudomycelium was employed. The slides were observed after 20 days incubation period at room temperature (*figures 2-4*).

Ascospore formation

In testing for the ability to form ascospores two media were used: the Gorodkova agar modified by Lodder (20) and the Hansen [see Iñigo et al. (16)]. Cultures were examined microscopically at weekly intervals for at least 3 weeks. Shaeffer-Fulton's modification of the Wirtz method was employed as staining technique (19).

Cultural characters

The kind of surface colony was noted after incubation for 4 days; and the form of growth in agar stab cultures or liquid media was observed after 3 days.

Biochemical tests

Fermentation tests were carried-out in Durham tubes containing 2 % tested sugar in the following basal medium: yeast extract (Difco) 0.1 %; beef extract (Difco) 0.3 %.

Assimilation tests were conducted in solid medium as is recommended by Capriotti (4).

Ethanol, lactic, citric and succinic acids were tested in 100 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of a synthetic medium described by Lodder (20).

The splitting of arbutin was studied as shown by Lodder (20).

Assimilation of nitrate was performed in the same way as for the assimilation of sugar, employing as basal medium Bacto-yeast-carbon base (Difco) with and added amount of 0.078 % of potassium nitrate.

Ester production is detected by odor after incubation in the liquid medium recommended by Weber [see Lodder (19)].

Litmus milk cultures were examined for change of color, coagulation or peptonization.

Gelatin liquefaction: malt extract with 12 % gelatin is inoculated by puncture and incubated at room temperature for at least 3 weeks.

Growth in vitamin-free-medium: Bacto-vitamin-free-yeast base (Difco) was used and it was inoculated as was described by Wikerham [see Lodder (19)].

RESULTS

23 of the isolated strains were representative of some hundred isolated taken, as shown *table 1*.

Table 1

Days	Gordal	Manzanillo	Rapasaya
2	GL-1-3		
	GL-1-5		
	GL-1-6		
6	GL-2-3	ML-2-3	RL-2-1
	GL-2-6	ML-2-5	
	GL-2-8	ML-2-7	
		ML-2-13	
10	GL-3-3	ML-3-4	RL-3-2
	GL-3-6	ML-3-5	RL-3-4
	GL-3-12	ML-3-9	RL-3-6
		ML-3-10	RL-3-7
		ML-3-11	

DISCUSSION

The schemes proposed by Lodder and Krejer van Rij (20) and by Beech et al. (1) for identifying yeast cultures were followed.

Typical strains of ascosporeogeneous yeasts are included on the basis of their morphological characters, on the Subfamilia Saccharomycetoideae, Tribe Saccharomyceteae.

Strains such as GL-3-6, ML-3-9 and RL-3-6 were readily enclosed on the general *Hansenula* by their ability to assimilate nitrate.

The others, with spheroidal ascospores, which do not assimilate nitrate but ferment glucose strongly, can be included on the genera *Pichia* or *Saccharomyces*. The slight and late pellicle formation of our strains, confirmed their identification with the genera *Saccharomyces*.

The result of carbohydrate fermentation tests (table 2) of the *Hansenula* strains led up to their recognition as *H. anomala*. Strains which only differ on their characteristic patterns from *H. anomala* in the ascospore formation, have been classified as *Candida pelliculosa*. Actually, some authors (20) consider *C. pelliculosa* as the haploid form of *H. anomala*, but we have preferred the traditional denomination.

Nonsporoforming yeasts, with non pigmented streak cultures, belong to the genera *Candida*. For a group of these strains, the only sugar fermented and assimilated was glucose; but, one of them, RL-3-4, shows a very slight fermentation. This is the distinctive character between *C. mycoderma* and *C. krusei*, beside the development of the pseudomycelium. On the other hand, *C. mycoderma* is clearly separated from the other neighbouring species *C. lipolytica* and *C. zeilanoïdes*, by its behaviour in litmus milk and the early formation of a creeping pellicle in malt extract.

Another group of strains ferment glucose, sucrose and raffinose, but not melibiose. Their assimilation patterns, in which nitrate is utilized, exclude the possibility of identifying them as *C. guillermondii*, and were thus recognized as *C. utilis*.

The remaining strains show an intermediate position between *C. parasilopsis* and *C. guillermondii* and appear to be identical with *C. parasilopsis* var. *intermedia*.

SUMMARY

According to the data reported above and taking into consideration the frequency with which species were encountered, we can summarize the results as follows:

1. Yeasts are found quite regularly in olive brines.
2. The variety of olives seems to affect their yeast content appreciably. Certainly, the incidence of a characteristic yeast in each variety is evident (figure 5): *Candida parasilopsis* var. *intermedia* in Gordal; *Saccharomyces lactis* in Manzanillo and *C. utilis* in Rapasaya.
3. The peculiar yeast of a certain variety has only been found on it, except in the case of *Candida parasilopsis* var. *intermedia* which is more outspread.

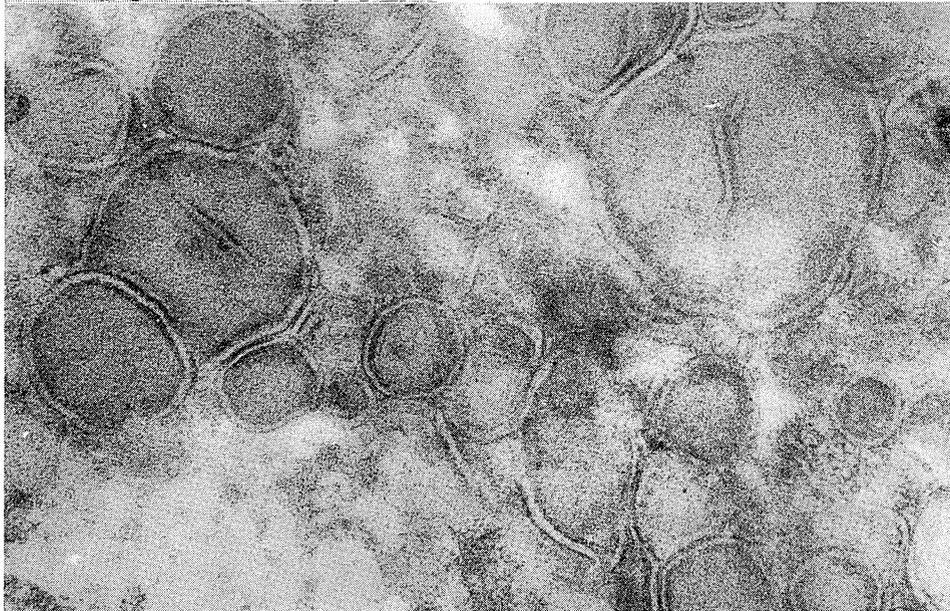


Figura 2. Microfotografía electrónica del lipopolisacárido de la forma L del *Agrobacterium tumefaciens* (tinción positiva). $\times 171.400$

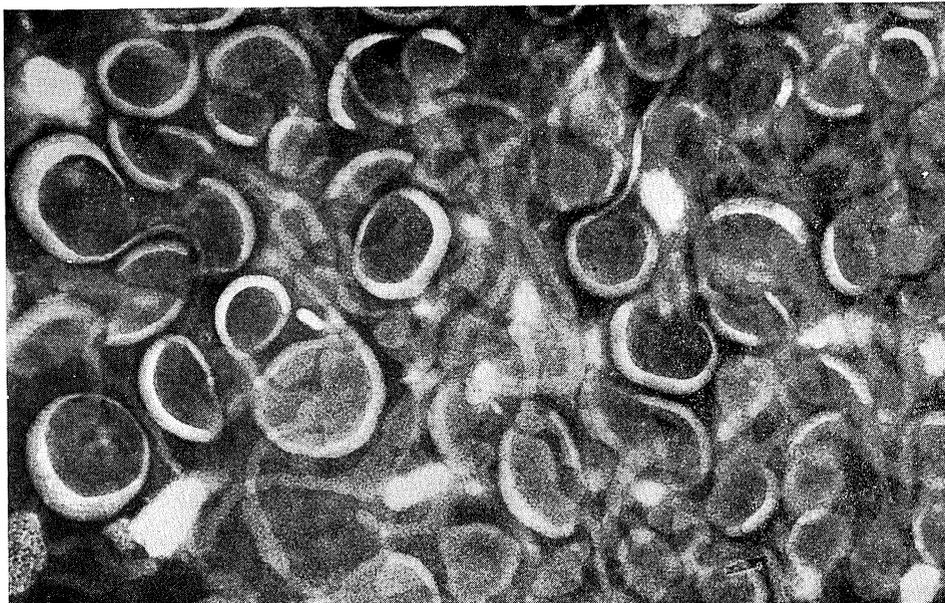


Figura 3. Microfotografía electrónica del lipopolisacárido de la forma L del *A. tumefaciens* (tinción negativa). $\times 171.400$

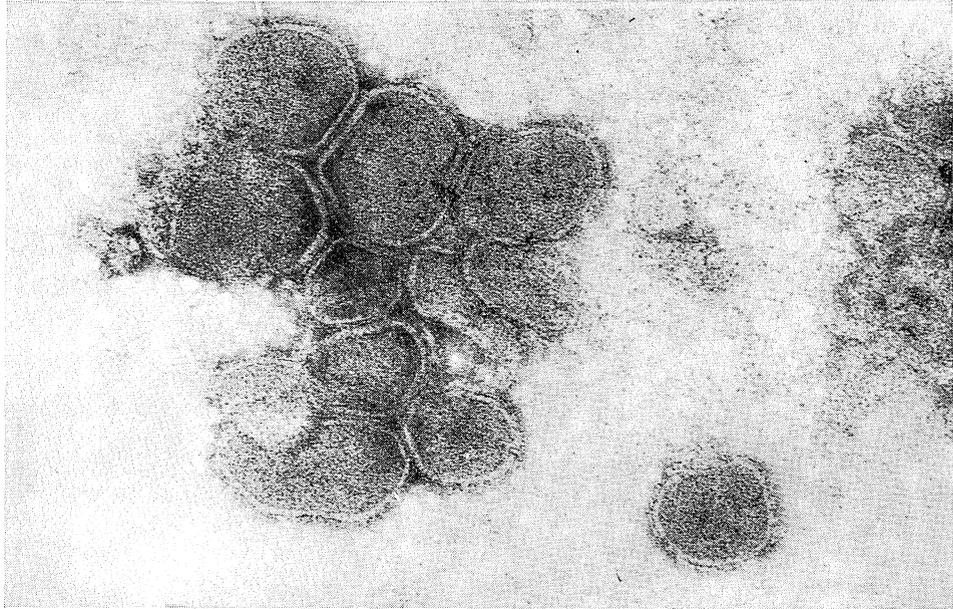


Figura 4. Microfotografía electrónica del lípido A separado del lipopolisacárido de la forma L del *A. tumefaciens* (tinción positiva). $\times 164.600$

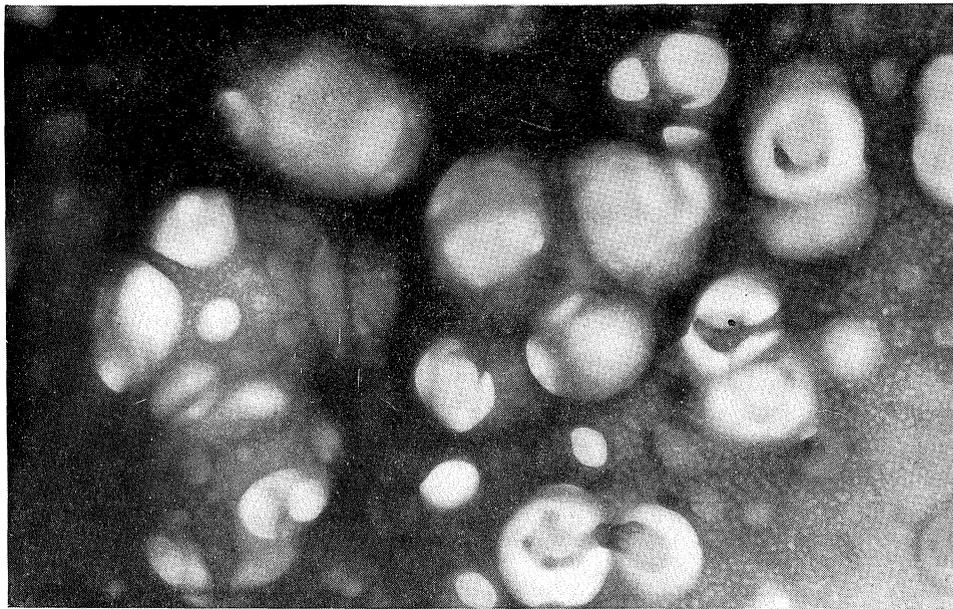


Figura 5. Microfotografía electrónica del lípido A separado del lipopolisacárido de la forma L del *A. tumefaciens* (tinción negativa). $\times 68.500$

4. It is necessary to make a remark about the largest occurrence of these three yeasts in their respective brines, from the total yeast population.

5. Seconds in number and importance, and common to all of them are *Hansenula anomala* and *Candida pelliculosa*, followed by *C. krusei*.

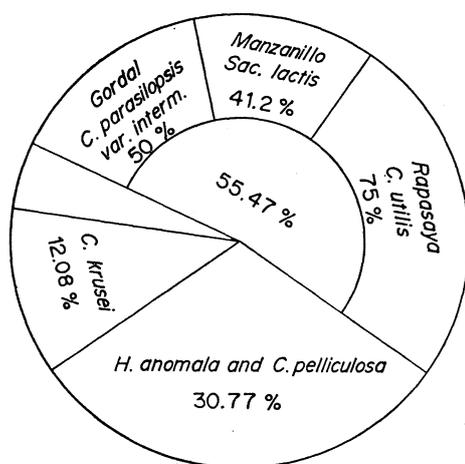


Figure 5

6. Yeasts were only found in Gordal variety from the first hours after the olive-brining operation; while after 48 h they appeared in all varieties, increasing their number at the same time as fermentation progresses.

RESUMEN

Levaduras y su significancia en la fermentación láctica de aceitunas verdes

Que las levaduras participan en la fermentación láctica por la que se conservan las aceitunas verdes "estilo sevillano" es conocido desde hace tiempo (24). Diferentes autores han abordado su estudio desde diferentes ángulos: unos, describiéndolas (11-13) y poniendo de manifiesto lo comprometido de su presencia por la posibilidad de manifiesto lo comprometido de su presencia por la posibilidad de metabolizar ácido láctico reduciendo sus niveles en la salmuera (15); y otros, destacando su contribución en la producción de aromas que mejorarían las características or-

ganolépticas del producto final (9 y 23) o como aporte de factores de crecimiento (3).

En este trabajo se buscan las levaduras presentes en la etapa fundamental y decisiva de la fermentación, o sea hasta que se alcanza la dominancia de bacterias lácticas, cuya duración calculada matemáticamente (5) se ha estimado de 8 días. Aisladas e identificadas, la población se incluye en 7 especies.

Los resultados obtenidos sobre su aparición y frecuencia permiten deducir la existencia, para cada variedad de aceituna, de una levadura característica y dominante. Lo cual obliga a estudiar la causa de esa asociación natural y ver si esa levadura característica y dominante puede ser, junto con las bacterias lácticas, empleada como iniciador de la fermentación, tras un detenido estudio de las facetas de su metabolismo que pueden afectar a los fines de la fermentación, objeto de una siguiente publicación.

REFERENCES

1. BEECH, F. W., y DAVENPORT, R. R. 1968. Two simplified schemes for identifying yeast cultures. *In* Identification Methods for Microbiologists, Academic Press.
2. BORBOLLA, J. M. R. de la; GÓMEZ-HERRERA, C.; GONZÁLEZ-CANCHO, F.; FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J.; GUTIÉRREZ-G.-QUIJANO, R.; IZQUIERDO-TAMAYO, A.; GONZÁLEZ-PELLISÓ, F.; VÁZQUEZ-LADRÓN, R., y GUZMÁN-GARCÍA, R. 1961. El Aderezo de Aceitunas Verdes. Patronato de Investigación Científica y Técnica "Juan de la Cierva", Madrid.
3. CANTARELLI, C. 1958. Fermentici lattici e lieviti nella fermentazione delle olive in salamoia. *Ind. Ital. Conserve. Aliment.*, 2, 106.
4. CAPRIOTTI, A. 1955. Intorno al saggio di assimilazione degli zuccheri da parte dei lieviti. *Biochim. Appl.*, 2, 31.
5. CASTAÑÓN, M. 1971. Microbiología del proceso fermentativo heteroláctico que tiene lugar en el aderezo de aceitunas verdes. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid.
6. COSTILLOW, R. N., y FABIAN, F. W. 1953. Effect of various microorganisms on the vitamin and amino acid content of cucumber brines. *Appl. Microbiol.*, 1, 327.
7. CRUESS, M. W. 1924. Olive pickling in Mediterranean countries. *Calif. Agr. Exp. Sta. Cir.*, 278, 1.
8. CRUESS, M. W. 1930. Pickling green olives. *Calif. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 498, 1.
9. FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L., y BELL, T. A. 1969. Vapor analysis of fermented Spanish-type olives by gas chromatography. *J. Food Sci.*, 34, 419.
10. GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1956. Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes. XIV. La población microbiana de las salmueras de aceitunas. *Grasas Aceites*, 7, 79.

11. GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1960. Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes. XVII. Levaduras presentes en la fermentación. *Grasas Aceites*, 11, 18.
12. GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1965. Levaduras en el aderezo de aceitunas verdes "estilo español" y su estudio cuantitativo. *Grasas Aceites*, 16, 230.
13. GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1966. Levaduras en la fermentación de aceitunas verdes "estilo español". *Rev. Cienc. Apl.*, 108, 24.
14. GONZÁLEZ-CANCHO, F.; BORBOLLA, J. M. R. de la; GÓMEZ-HERRERA, C., y FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J. 1958. Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes. XV. La primera fase de la fermentación. *Grasas Aceites*, 9, 118.
15. GONZÁLEZ-CANCHO, F., y RUIZ-CRUZ, J. 1969. Metabolismo de levaduras aisladas de salmueras de aceitunas aderezadas "estilo español". I. Asimilación de los ácidos láctico, acético y cítrico. *Grasas Aceites*, 20, 6.
16. IÑIGO, B.; VÁZQUEZ, D., y ARROYO, V. 1958. *Schizosaccharomyces pombe* agente específico de una alteración en pulpa conservada de membrillo. Su inhibición mediante el ácido sórbico. *Rev. Cienc. Apl.*, 65, 516.
17. IZQUIERDO-TAMAYO, A. 1952. Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes. IV. El proceso microbiano de la fermentación. *Grasas Aceites*, 3, 79.
18. IZQUIERDO-TAMAYO, A. 1953. Fermentación microbiana en el aderezo de aceitunas verdes. *Microbiol. Españ.*, 6, 169.
19. LODDER, J. 1970. *The Yeasts*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam-London.
20. LODDER, J., y KREJER-VAN RIJ, N. J. W. 1967. *The Yeasts*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
21. LYMAN, C. M.; MOSELEY, O.; WOOD, S.; BUTLER, B., y HALE, P. 1947. Some chemical factors with the influence the amino acid requirements of lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.*, 167, 177.
22. MILLS, A. K., y KREBS, H. 1968. *Aspects of Yeast Metabolism*. Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburg.
23. MRAK, E. M.; VAUGHN, R. H.; MILLER, M. W., y PHAFF, H. J. 1956. Yeast occurring in brines during the fermentation and storage of green olives. *Food Technol.*, 10, 416.
24. SMYTH, H. F. 1927. A bacterial study on Spanish-green olives. *J. Bacteriol.*, 13, 56.
25. VAUGHN, R. H.; DOUGLAS, H. C., y GILILLAND, J. R. 1943. Production of Spanish-type green olives. *Calif. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 678, 1.

CURSO DE MICROBIÓLOGIA BASICA DE COSMETICOS

Este curso, organizado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Complutense y la Sociedad Española de Químicos Cosméticos, se celebrará del 9 al 27 del próximo mes de octubre, en el Laboratorio del Departamento citado.

CONFERENCIA SOBRE CONSECUENCIAS DE LA MICROBIOLOGIA APLICADA

Se proyecta celebrar la IV Conferencia Internacional sobre las Consecuencias Mundiales de la Microbiología Aplicada en el Parque Anhembi de Sao Paulo (Brasil), del 23 al 28 de julio de 1973. La organización correrá a cargo del Comité de Microbiología Aplicada de la Organización Internacional de Investigaciones Celulares y de la Sociedad Brasileña de Microbiología. Los idiomas oficiales serán el español, el inglés y el portugués.

Las personas interesadas pueden dirigirse al Dr. João S. Furtado, Secretario General, GIAM IV, Rua Gabriel dos Santos, 443. 01231, Sao Paulo, SP (Brasil).

CURSO DE MICROBIÓLOGIA BASICA DE COSMETICOS

Este curso, organizado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Complutense y la Sociedad Española de Químicos Cosméticos, se celebrará del 9 al 27 del próximo mes de octubre, en el Laboratorio del Departamento citado.

CONFERENCIA SOBRE CONSECUENCIAS DE LA MICROBIOLOGIA APLICADA

Se proyecta celebrar la IV Conferencia Internacional sobre las Consecuencias Mundiales de la Microbiología Aplicada en el Parque Anhembi de Sao Paulo (Brasil), del 23 al 28 de julio de 1973. La organización correrá a cargo del Comité de Microbiología Aplicada de la Organización Internacional de Investigaciones Celulares y de la Sociedad Brasileña de Microbiología. Los idiomas oficiales serán el español, el inglés y el portugués.

Las personas interesadas pueden dirigirse al Dr. João S. Furtado, Secretario General, GIAM IV, Rua Gabriel dos Santos, 443. 01231, Sao Paulo, SP (Brasil).

BIBLIOGRAFIA

FIEBRE TIFOIDEA Y SANEAMIENTO EN ESPAÑA (tomo I), por A. Prieto Lorenzo. 1971. Dirección General de Sanidad, Madrid. 231 páginas y 73 figuras.

Esta obra es el tomo I de la serie que el mismo autor está a punto de publicar para presentar el tema detalladamente, por provincias, de manera que pueda estar a disposición del lector y de forma manejable, la riqueza estadística que sobre el tifus hídrico conserva la Sanidad española. El tomo I, de buena presentación y fácil lectura, contiene los datos, a nivel nacional, desde el año 1900 hasta 1965, en algunas ocasiones hasta 1967, además de la exposición del criterio que preside la lucha contra el tifus hídrico realizada por la Dirección de Sanidad (doctrina, métodos de laboratorio, técnicas y planes de campaña, etc.), con los comentarios críticos correspondientes. Es una exposición completa de lo que se ha hecho y se sigue haciendo en España para eliminar esta enfermedad. De los resultados obtenidos nos informará la comparación de la tasa de mortalidad debida a esta enfermedad por cada 10.000 habitantes, que en 1900 fue de 6,10 y en 1967 de 0,01 (58 personas en todo el país).

Esperamos que el esfuerzo económico que está haciendo actualmente el Gobierno para el saneamiento de todas las aguas del país, acabará con este pequeño residuo.

La obra es de ineludible consulta para opinar sobre el tifus hídrico en España. Tiene los siguientes capítulos: Mortalidad, Letalidad, Cloranfencol, Vacunación antitifo-paratífica, Saneamiento, Epidemiología hídrica, Campañas de vigilancia sanitaria de abastecimientos de agua, Estudio sanitario de las aguas españolas, Evacuación de las aguas residuales, Campaña de vigilancia sanitaria de manipuladores de alimentos, Desinsectación, Conclusiones y Bibliografía.

L. VILAS

GRUNDRISS DER ALLGEMEINEN VIROLOGIE, por *Gunter Starke* y *Peter Hlinak*. 1972. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 329 páginas y 46 figuras.

Si queremos resaltar las cualidades de esta obra, podemos decir que es un texto escrito con estilo de conferenciante especializado, que abarca toda la doctrina fundamental sobre virus, tal como hoy se profesa, y que no toca las enfermedades más de lo indispensable para comprender a los virus, que son el objetivo primario de la obra. Los autores son un médico y un veterinario, a pesar de lo cual parece que la obra está escrita para invitar a químicos y biólogos a que profundicen en la Virología.

Tiene unos apéndices muy útiles: vocabulario trilingüe (inglés, alemán, ruso) de términos virológicos y lista de abreviaturas internacionales utilizadas en la literatura virológica. Los capítulos de la obra son: 1. Historia, 2. El virión, 3. Multiplicación del virión, 4. Propiedades del virión, 5. Genética del virión, 6. Patogenia de las infecciones de virus, 7. Inmunidad en las infecciones de virus, 8. Interferencia en los virus, 9. Ecología y transmisión de los virus, 10. Clasificación de los virus, 11. Descripción de los grupos y tipos de virus animales.

Es un libro muy conveniente para primera lectura en esta importante materia.

L. VILAS