

---

VOLUMEN 25. 1972

OCTUBRE - DICIEMBRE. NUMERO 4

# *Microbiología Española*

*Revista*

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



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

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

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

Vocales: Dr. Fernando Baquero, Dr. Antonio Portolés, Prof. Agustín Pumarola, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó y Dr. Gonzalo Sierra.

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

---

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

**MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA**

Calle de Joaquín Costa, 32 MADRID-6 (España)

Suscripción (4 números): España, 300 PTA; extranjero, 400 PTA

Número: España, 85 PTA; extranjero, 120 PTA

## RECOMENDACIONES A LOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La responsabilidad de los conceptos escritos corresponde a los autores.

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

## INDICE

	Página
Una estirpe del virus del Mosaico del tabaco procedente de <i>Digitalis thapsi</i> , por <i>Amparo Vela</i> ... .. .	211
Estudio microbiológico en diversos "composts" de turba. I. Efecto del inóculo de estiércol y la fermentación a 28 °C, por <i>F. Gallardo-Lara, J. Olivares y V. Callao</i> ... .. .	225
Identificación, por espectroscopia infrarroja, de moléculas inmunosensibilizantes originadas a partir de antibióticos beta-lactámicos, por <i>A. Portolés, A. Hidalgo y F. Ramos</i> ... .. .	241
Ultraestructura de la fase L estable de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> capaz de formar tumores en <i>Phaseolus vulgaris</i> L., por <i>M. Rubio-Huertos, R. Beltrá y M. Santaolalla</i> ... .. .	263
Aislamiento del virus respiratorio sincitial. A propósito del estudio de un brote epidémico, por <i>A. Pumarola, A. Rodríguez-Torres, María Beltrán y M. Carbonell-Juanico</i> ... .. .	275
Prof. Gerardo Clavero del Campo (†), por <i>L. Vilas</i> ... .. .	287
Junta Directiva de la Sociedad ... .. .	288
Reunión sobre Microbiología Hospitalaria ... .. .	288
Congreso Internacional de Bacteriología ... .. .	288
I Congreso Interseccional de la AISM ... .. .	289

---

## CONTENTS

	Page
Study of a strain tobacco mosaic virus from <i>Digitalis thapsi</i> , by <i>Amparo Vela</i> ... .. .	211
Microbiological study of several composts of peat. I. Effect of the use of farmyard manure as inoculant and the fermentation at 28 °C, by <i>F. Gallardo-Lara, J. Olivares and V. Callao</i> ... .. .	225
Identification, by infra red spectroscopy, of the immunogenic molecules produced from beta-lactam antibiotics, by <i>A. Portolés, A. Hidalgo and F. Ramos</i> ... .. .	241
Ultrastructure of stable L phase of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> causing tumor formation in <i>Phaseolus vulgaris</i> L., by <i>M. Rubio-Huertos, R. Beltrá and M. Santaolalla</i> ... .. .	263
Isolation of respiratory syncytial virus. Study of an epidemic outbreak, by <i>A. Pumarola, A. Rodríguez-Torres, María Beltrán and M. Carbonell-Juanico</i> ... .. .	275
Prof. Gerardo Clavero del Campo (†), by <i>L. Vilas</i> ... .. .	287
Directive Board of the Society ... .. .	288
Meeting on Hospitalary Microbiology ... .. .	288
International Congress for Bacteriology ... .. .	288
I Intersectional Congress of IAMS ... .. .	289

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

UNA ESTIRPE DEL VIRUS  
DEL MOSAICO DEL TABACO PROCEDENTE DE  
*DIGITALIS THAPSI* L.

por

AMPARO VELA

INTRODUCCION

El virus del Mosaico del tabaco es dentro de los virus de plantas uno de los más extendidos, debido a su fácil transmisión y a su poder infectivo.

Durante algunos años se pensó que sólo podía infectar plantas de la familia Solanáceas hasta que Fernow (3) dio a conocer experimentalmente que también podría producir enfermedad en otras plantas como *Martynia louisiana*. También Price (6) observó que algunas variedades de *Phaseolus vulgaris* eran susceptibles a la infección por este virus y Severin (7) vio que en plantas de la familia Compuestas producía lesiones necróticas en las hojas inoculadas. Hoy se ha visto que tiene una gran variedad de plantas huésped; sin embargo, este virus no siempre produce la misma sintomatología en solanáceas. Basándose en esto, Siegel y Wildman (8) clasificaron 8 estirpes denominadas U<sub>1</sub>, U<sub>2</sub>, U<sub>3</sub>, U<sub>4</sub>, U<sub>5</sub>, U<sub>6</sub>, U<sub>7</sub> y U<sub>8</sub>, que a su vez están incluidas en 4 grupos.

Nosotros, en este trabajo, hemos realizado un estudio sintomatológico y al microscopio electrónico de una estirpe aislada de hojas de *Digitalis thapsi* infectadas espontáneamente, que presentaban un típico mosaico y reducción de tamaño de las hojas y de toda la planta.

## MATERIAL Y METODOS

### *Plantas utilizadas*

Las hojas de *Digitalis thapsi* con síntomas de virosis fueron desecadas entre 45° y 50 °C. Con el polvo de estas hojas se inocularon plantas procedentes de semillas sanas cultivadas en invernadero. La inoculación se hizo mecánicamente, por frotamiento de la epidermis, usando celite como abrasivo (*cuadro 1*).

### *Microscopía electrónica*

Tomamos muestras de las zonas afectadas de hojas de *Petunia hybrida* y se fijaron durante 4 h en glutaraldehído al 5 %, en tampón de veronal, a pH 6,9. Después de lavadas durante toda la noche con el mismo tampón, se postfijaron durante 2 h, a 4 °C, con tetraóxido de osmio, al 2 % también, tamponado con acetato de veronal y al mismo pH; la deshidratación se hizo con acetonas de concentraciones crecientes y se incluyeron en durcupan. Se endurecieron en estufa a 55 °C durante las primeras 24 h y a continuación, durante otras 24 h, a 70 °C.

Las secciones se realizaron con ultramicrotomo LKB, con cuchillas de vidrio.

Los cortes se recogieron en alcohol al 10 %, se estiraron con vapores de cloroformo y se colocaron sobre rejillas protegidas por una película de formwar. Después de montadas se tiñeron con una solución de citrato de plomo y fueron observadas en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Plantas inoculadas*

Las plantas inoculadas que presentaron síntomas externos están reflejadas en el *cuadro 2*.

Como se puede observar, de todas las plantas ensayadas solamente las correspondientes a las familias Solanáceas y Quenopodiáceas presentaron síntomas externos, y dentro de la familia Solanáceas, las únicas que dieron resultado positivo fueron las correspondientes a los géneros *Nico-*

Cuadro 1. Plantas inoculadas

Familia	Plantas
Rosáceas	<i>Fragaria vesca</i>
Quenopodiáceas	<i>Beta vulgaris</i> <i>Atriplex hortensis</i> <i>Espinacea oleracea</i> <i>Chenopodium quinoa</i> <i>Ch. amaranticolor</i> <i>Ch. fetidum</i> <i>Ch. murale</i>
Crucíferas	<i>Brassica capita</i> <i>B. napus</i>
Compuestas	<i>Lactuca sativa</i> <i>Zinnia elegans</i> <i>Helianthus annuum</i> <i>Chichorium endivia</i>
Leguminosas	<i>Pisum sativum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Glycina max</i> <i>Vigna sinensis</i> <i>Medicago sativa</i>
Solanáceas	<i>Nicotiana clevelandii</i> <i>N. tabacum</i> v. <i>sansum</i> <i>N. glutinosa</i> <i>N. tabacum</i> v. <i>white burley</i> <i>N. tabacum</i> v. <i>turkish</i> <i>N. tabacum</i> v. <i>xantii</i> <i>N. silvestris</i> <i>N. rustica</i> <i>Capsicum annuum</i> <i>Lycopersicum sculentum</i> <i>Petunia hybrida</i>
Cucurbitáceas	<i>Cucumis sativus</i> <i>C. melo</i> <i>C. pepo</i> <i>Citrullus vulgaris</i> <i>Luffa cylindrica</i>
Umbelíferas	<i>Apicum graveolens</i> <i>Daucus carota</i>
Cariofiláceas	<i>Lychnis dioica</i>

*tiana* y *Petunia*; todas ellas presentaron manchas cloróticas en las hojas inoculadas a los 2 días de la infección, que aumentaron de tamaño, formándose a los 4 días grandes lesiones necróticas. En *Petunia hybrida* también se formaron lesiones necróticas iguales a las anteriores, pero a los 20 días de inoculación la infección se hizo generalizada, presentando necrosis de tallos y venas de las hojas jóvenes, produciendo enanismo de éstas y terminando por morir la planta (*figura 1*).

Todas las plantas utilizadas del género *Chenopodium* presentaron manchas cloróticas pequeñas en las hojas inoculadas, que más tarde también se hicieron necróticas; éstas fueron mucho más pequeñas que las formadas en solanáceas y en ninguna de ellas la infección llegó a ser generalizada (*figura 2*).

Los resultados obtenidos en las plantas indicadoras nos muestran que el virus Mosaico del tabaco procedente de *Digitalis thapsi* difiere de los ya descritos. Así, en el *cuadro 3* podemos ver los resultados obtenidos por Siegel y Wildman (8) en un estudio sobre la sintomatología de diferentes razas del virus del Mosaico del tabaco en el género *Nicotiana* y los que hemos obtenido con este virus, en las mismas plantas utilizadas por ellos.

*Cuadro 2. Plantas inoculadas que presentaron síntomas*

Familia	Plantas inoculadas	Síntomas
Quenopodiáceas	<i>Chenopodium quinoa</i>	L <sub>n</sub>
	<i>Ch. amaranticolor</i>	L <sub>n</sub>
	<i>Ch. fetidum</i>	L <sub>n</sub>
	<i>Ch. murale</i>	L <sub>n</sub>
Solanáceas	<i>Nicotiana glutinosa</i>	L <sub>n</sub>
	<i>N. tabacum</i> v. white burley	L <sub>n</sub>
	<i>N. tabacum</i> v. sasum	L <sub>n</sub>
	<i>N. tabacum</i> v. turkish	L <sub>n</sub>
	<i>N. tabacum</i> v. xantii	L <sub>n</sub>
	<i>N. silvestris</i>	L <sub>n</sub>
	<i>N. rustica</i>	L <sub>n</sub>
	<i>Petunia hybrida</i>	L <sub>n</sub> y N <sub>nt</sub>

L<sub>n</sub> = lesiones necróticas. N<sub>nt</sub> = necrosis de nervios y tallos.

Cuadro 3. Síntomas en plantas del género *Nicotiana* inoculadas con 8 estirpes del virus del Mosaico del tabaco y el estudiado aquí

Grupo	Raza	Síntomas	
		<i>N. tabacum</i>	<i>N. silvestris</i>
1	U <sub>1</sub>	Mosaico típico	Infección generalizada
	U <sub>3</sub>	Veteado de nervios	Infección generalizada
	U <sub>4</sub>	Ninguno	Infección generalizada
	U <sub>7</sub>	Mosaico débil	Infección generalizada
2	U <sub>2</sub>	Mosaico débil	Lesiones locales
	U <sub>5</sub>	Rugosidad en las hojas	Lesiones locales
3	U <sub>6</sub>	Mosaico amarillo	Lesiones locales
4	U <sub>8</sub>	Manchas necróticas y bandeado de venas	Lesiones locales
	Procedente de <i>Digitalis thapsi</i>	Lesiones necróticas	Lesiones locales

Comparando estos resultados vemos que el virus del Mosaico del tabaco aislado de *Digitalis thapsi* difiere de las razas correspondientes al grupo 1 por producir lesiones necróticas y no infección generalizada en todas ellas, y de las pertenecientes a los grupos 2, 3 y 4 por producir lesiones necróticas y no infección generalizada en *Nicotiana silvestris*.

Por otra parte, teniendo en cuenta los síntomas en *Chenopodium amaranticolor* también vemos que difiere de la U<sub>1</sub> por producir lesiones necróticas y no lesiones cloróticas, y de la U<sub>2</sub> que produce principalmente necrosis y la infección llega a hacerse generalizada.

De acuerdo con estas reacciones sobre las plantas huéspedes, particularmente las producidas en *Nicotiana silvestris*, vemos que el virus del Mosaico del tabaco que estudiamos está más relacionado con las estirpes de los grupos 2, 3 y 4 que con las del 1; pero con la que más parece estar relacionada es con una estirpe del virus del Mosaico del tabaco que Chessin y colaboradores (1) encontraron en plantas de *Lychnis alba*. Esta también formaba lesiones necróticas en *N. silvestris* y en *N. tabacum* var. white burley, lesiones locales y necrosis de nervios en hojas jóve-

nes no inoculadas, aunque nosotros no hemos observado los cuerpos X vistos por ellos.

#### *Microscopía electrónica*

El estudio al microscopio electrónico ha sido realizado en plantas de *Petunia hybrida*, ya que de todas las plantas inoculadas fue la única que presentó infección generalizada. Siguiendo la técnica de cortes ultrafinos, pudimos observar partículas de virus en el citoplasma y cloroplastos.

La apariencia intracelular del virus en el citoplasma es de tres formas. Así en la *figura 3* las partículas aparecen muy diseminadas entremezcladas con ribosomas, forma parecida a la descrita por Vela y Rubio-Huertos (9) en hojas de *Digitalis thapsi*, donde se encontraba este mismo virus con otro del grupo Y, y a la de Kolehmainen y colaboradores (4) en plantas también infectadas con el virus del Mosaico del tabaco, aunque aquí los ribosomas fueron mucho menos abundantes. También Esau y Cronshaw (2) observaron estas mismas disposiciones de las partículas, pero en la vacuola.

Otras veces las partículas son mucho más abundantes y se encuentran formando grandes masas libres de elementos celulares, agrupadas y orientadas en distintas direcciones (*figura 4*) de forma semejante a como fue observado por Milne (5).

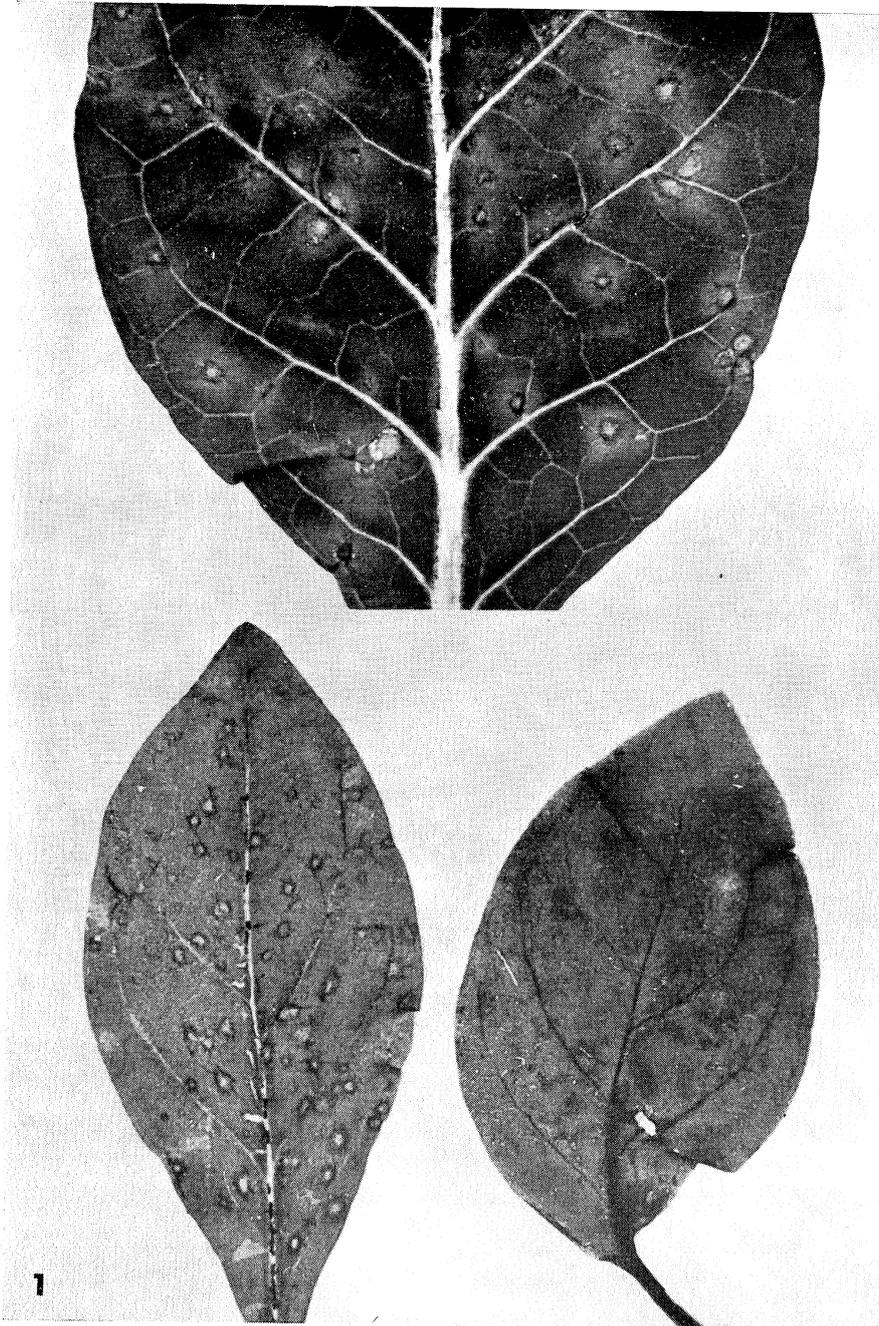
Además de estas dos formas también las hemos observado formando verdaderos cristales (*figura 5*).

Si tenemos en cuenta que las inclusiones se forman cuando la infección es ya un poco avanzada, podríamos considerar estos resultados como las distintas disposiciones que adopta el virus a medida que avanza la infección.

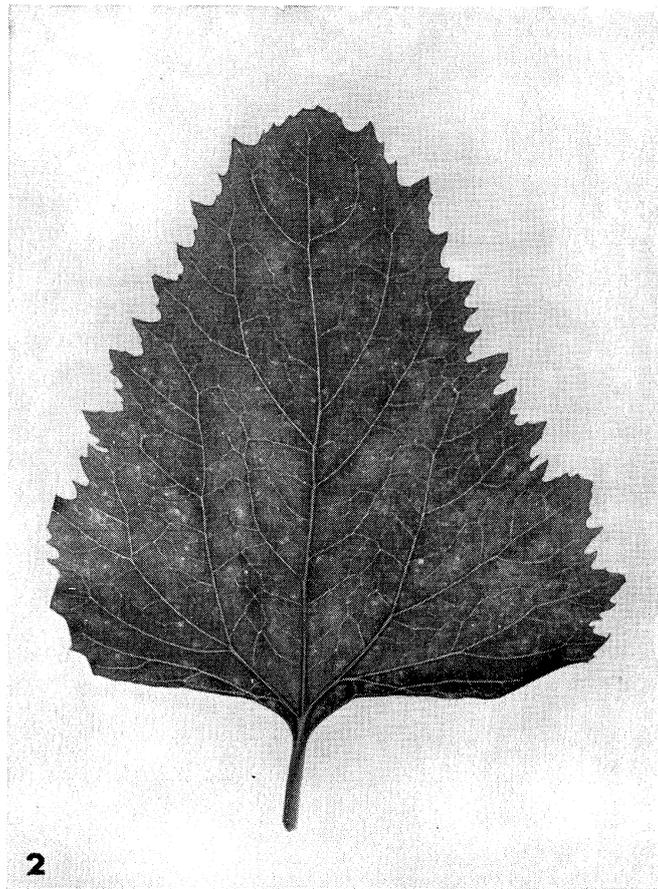
Los cloroplastos contienen frecuentemente partículas de virus más o menos ordenadas, pero nunca presentaron cristales (*figura 6*). La apariencia de estos cloroplastos es semejante a la observada por Esau y Cronshaw (2); en ellos se ve cómo la estructura laminar está desplazada en la zona en que se encuentran las partículas de virus, pero no presentaron vacuolas, como fue observado por Vela y Rubio-Huertos en digitales.

No hemos visto alteraciones en el núcleo ni partículas de virus en su interior, así como tampoco cuerpos X.

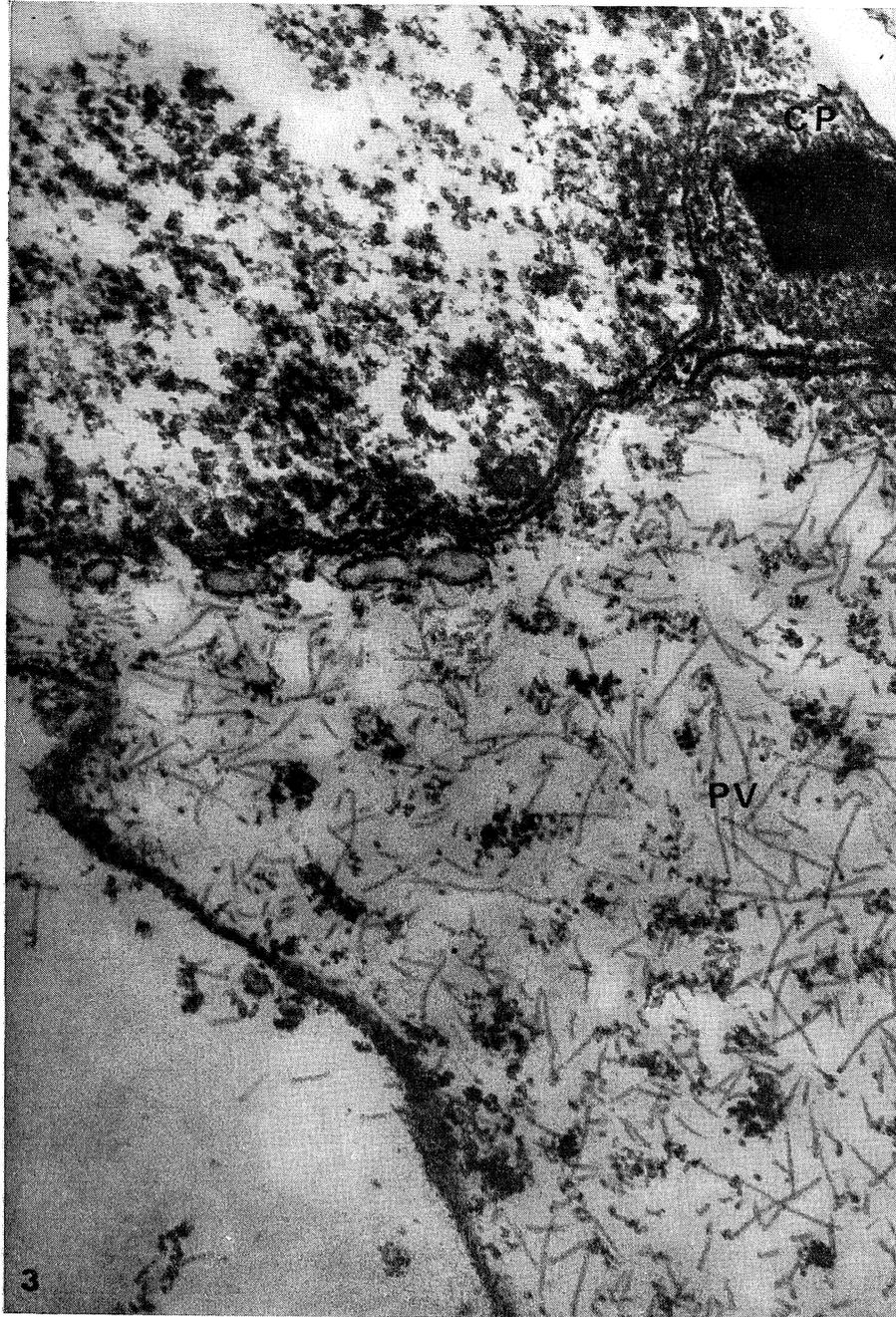
A pesar de que este virus presenta cierta analogía según su disposición intracelular con la observada por otros autores en la estirpe común



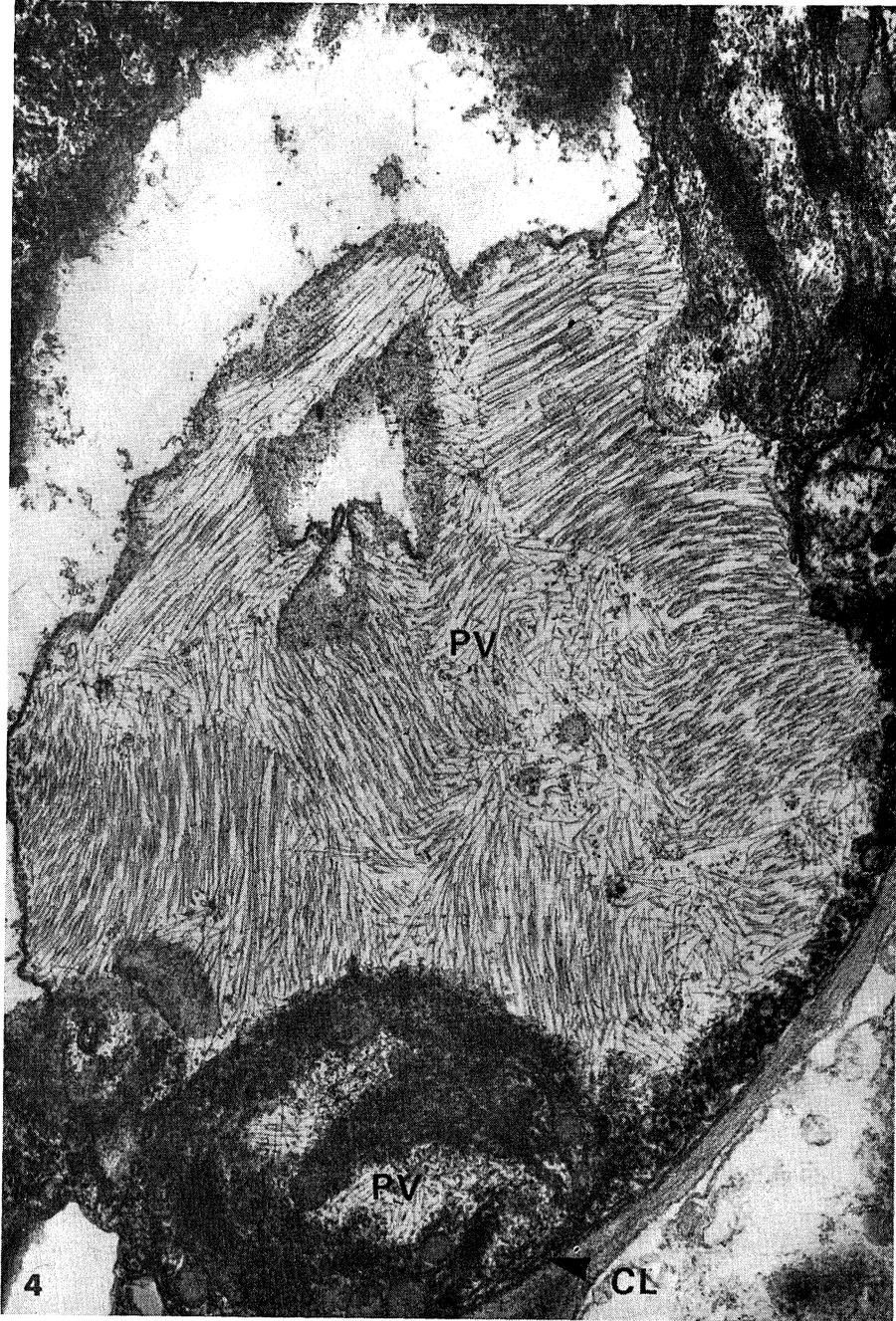
*Figura 1. Arriba, hoja de Nicotiana tabacum var. white burley mostrando lesiones locales necróticas. Abajo, izquierda, hoja de Petunia hybrida también con lesiones necróticas y derecha, hoja de P. hybrida presentando necrosis de nervios*



*Figura 2. Hoja de Chenopodium amaranticolor mostrando pequeñas lesiones necróticas*



*Figura 3. Sección ultrafina de P. hybrida con partículas de virus (PV) muy dispersas en el citoplasma y cristal de proteína (CP).  $\times 59.200$*



*Figura 4. Citoplasma celular presentando una gran masa de partículas de virus (PV) ordenadas en distintas direcciones, y cloroplastos (Cl) con partículas de virus (PV) en su interior.  $\times 34.500$*

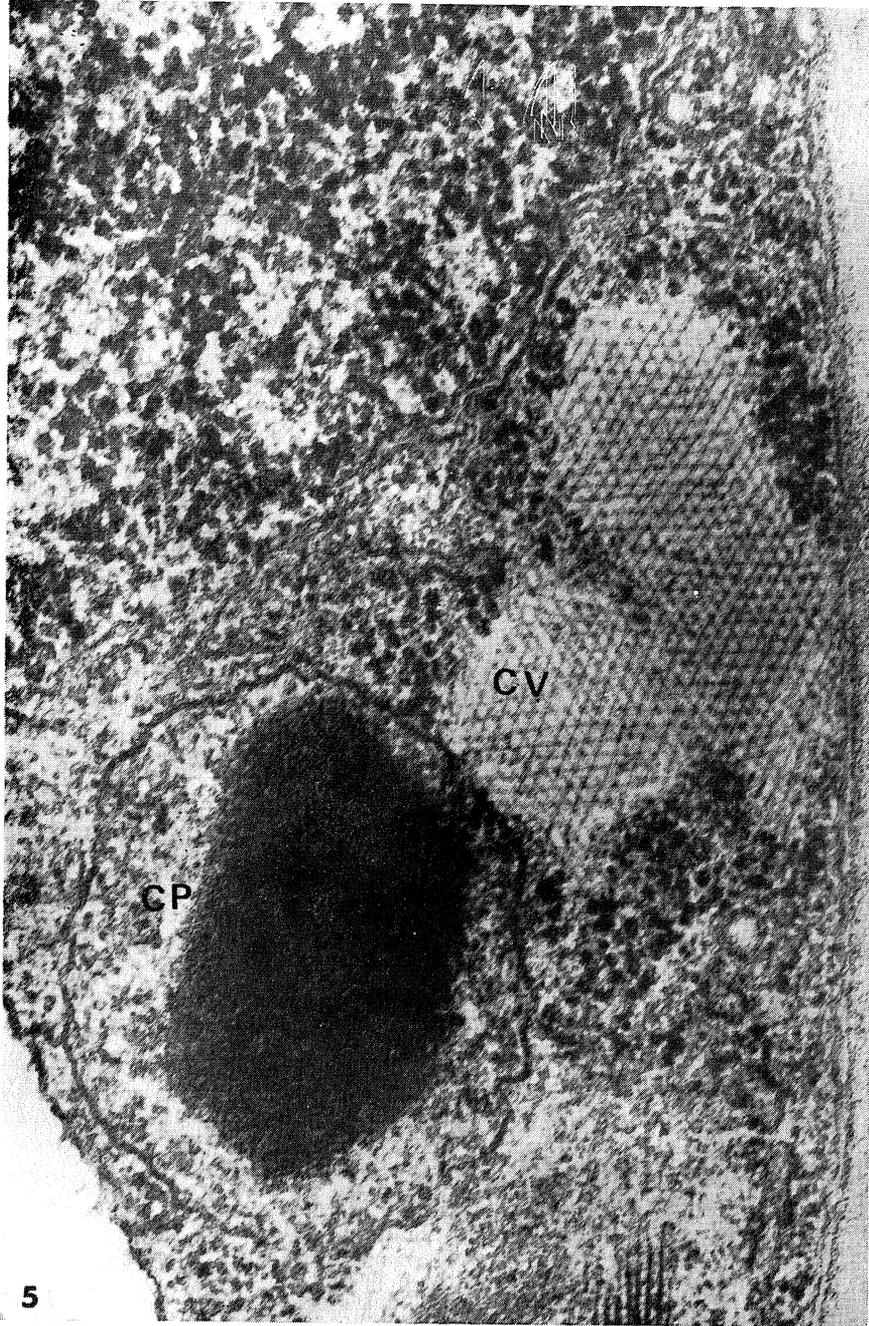


Figura 5. Sección ultrafina mostrando cristal de virus (CV), cristal de proteína (CP) y núcleo (N).  $\times 111.000$



*Figura 6. Cloroplasto con partículas de virus (PV) en su interior y lípidos (L). × 69,000*

del virus Mosaico del tabaco, el que no se hayan observado cuerpos X nos prueba una vez más que se trata de otra estirpe.

### RESUMEN

Se ha hecho un estudio sintomatológico y al microscopio electrónico de una estirpe del virus del Mosaico del tabaco en *Digitalis thapsi*, infectada espontáneamente. Este virus es capaz de producir lesiones necróticas en: *Nicotiana tabacum*, *N. rústica*, *N. glutinosa*, *N. silvestris*, *Petunia hybrida* y todas las ensayadas del género *Chenopodium*. En *P. hybrida*, además de lesiones necróticas, la infección se hizo generalizada, produciendo necrosis de tallos y venas de las hojas jóvenes, terminando por morir la planta.

Al microscopio electrónico, la disposición de las partículas y su distribución dentro de la célula y orgánulos celulares es semejante a la de la estirpe común del virus del Mosaico del tabaco, pero no se han observado los cuerpos X correspondientes a éste.

### AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. Peña Iglesias, de la Sección de Virología del INIA, la cesión de plantas herbáceas indicadoras.

### SUMMARY

#### *Study of a strain of tobacco mosaic virus from Digitalis thapsi*

A necrotic strain of tobacco mosaic virus (TMV) was isolated from *Digitalis thapsi* in the field showing mosaic and stunting. This strain was only systemic in *D. thapsi* and *Petunia hybrida* Wilm. It gave necrotic lesions on *Nicotiana tabacum* var. white burley, *N. glutinosa*, *N. silvestris*, *N. rustica* and in different *Chenopodium* species. In *P. hybrida* systemic infection was followed by necrosis of the veins, stems and necrotic lesions in the young leaves and death of the inoculated plants.

This strain induced the formation of crystalline inclusions in the cells of *Digitalis thapsi*, *Petunia hybrida* and in the necrotic areas of *Nicotiana tabacum*. In none of the inoculated plants, as well as in *D. thapsi*, amorphous inclusions or X bodies, were found.

## BIBLIOGRAFIA

1. CHESSIN, M.; ZAITHIN, M., y SOLBERG, R. A. 1967. A new strain of tobacco mosaic virus from *Lychnis alba*. *Phytopathology*, 57, 452.
2. ESAU, K., y CRONSHAW, J. 1967. Relation of tobacco mosaic virus to the host cells. *J. Cell Biol.*, 33, 665.
3. FERNOW, K. H. 1925. Interspecific transmission of mosaic diseases of plants. N. Y. State Agr. Exp. Sta. Cornell Univ., Mem. 96.
4. KOLEHMAINEN, J.; ZECH, H., y VON WETTSTEIN, D. 1965. The structure of cells during tobacco mosaic virus reproduction. Mesophyle cells containing virus crystal. *J. Cell. Biol.*, 25, 77.
5. MILNE, R. G. 1966. Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf palisade cells. *Virology*, 28, 79.
6. PRICE, W. C. 1930. Local lesions on bean leaves inoculated with tobacco mosaic virus. *Amer. J. Bot.*, 17, 694.
7. SEVERIN, H. P. 1945. Virus diseases of guayule. *Phytopathology*, 35, 737.
8. SIEGEL, A., y WILDMAN, S. G. 1954. Some natural relation ships among strains of tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 44, 277.
9. VELA, A., y RUBIO-HUERTOS, M. 1971. Ultraestructura de hojas de *Digitalis thapsi* infectadas espontáneamente con dos virus. *Microbiol. Españ.*, 25, 1.

## ESTUDIO MICROBIOLOGICO EN DIVERSOS «COMPOSTS» DE TURBA

### I. Efecto del inóculo de estiércol y la fermentación a 28 °C

por

F. GALLARDO-LARA, J. OLIVARES y V. CALLAO

#### INTRODUCCION

La continua degradación de la materia orgánica en el suelo es un hecho suficientemente conocido, por lo cual es lógico pensar que este desgaste debe ser compensado con un constante suministro de nuevos materiales orgánicos. Tradicionalmente, este problema se ha solucionado mediante el uso de los diversos tipos de estiércoles que proporciona la explotación ganadera, en la mayoría de los casos emparejada a la agrícola, pero las exigencias de la agricultura, cada vez más patentes, han obligado a dar cabida a otros muchos productos de naturaleza orgánica, pretendiendo satisfacer dicha necesidad. Dentro de estos sustitutivos del estiércol, merece consideración especial la utilización de la turba con dichos fines.

En la bibliografía sobre el tema, con bastante frecuencia se alude al empleo de diversos tipos de turba con esta finalidad (3, 15 y 23) y a pesar de indicarse en la mayoría de los casos unos resultados favorables en su utilización como fertilizante orgánico, se encuentran igualmente criterios discrepantes que muestran cierta reserva al uso de productos de naturaleza similar; así, Marksimow y Grudzinski (18), y Kaplunova y Myachina (14), no consiguen provecho alguno al trabajar con turba natural, y

sí, en cambio, cuando se le añade amoníaco. Igual le ocurre a Hewitt (11) con una turba excesivamente ácida y que al contener sustancias tóxicas obtiene resultados negativos.

Subsanar estas anomalías, o simplemente incrementar las cualidades fertilizantes innatas, han sido los motivos que directamente han influido en la aparición de toda una variada gama de tratamientos de la turba. Precisamente, el objetivo fundamental de este trabajo no ha sido otro que estudiar el posible incremento de la actividad biológica de una turba de la región cuando se somete a un proceso de fermentación. Este material procedente de El Padul (Granada), es de naturaleza neutro-alcalina y por su elevado estado de degradación y bajo contenido en microflora, presenta unas propiedades fertilizantes muy limitadas.

Con esta finalidad, la materia prima fue sometida a diversos tratamientos y procesos de fermentación, en el planteamiento de los cuales sirvieron de orientación las distintas normas, referentes a la preparación de "composts", recogidas de la bibliografía, además de otros factores, como son: el económico, falta de buen estiércol y la propia naturaleza de la turba y de nuestros suelos. Simultáneamente a la realización de estos tratamientos, y en las mismas condiciones, se preparó un estiércol artificial a base de paja de cereal, el cual, en el momento oportuno, sirvió de abono orgánico tipo.

## MATERIAL Y METODOS

### *Material de partida*

La materia prima inicial empleada ha sido turba del yacimiento de El Padul (Granada).

Las determinaciones analíticas llevadas a cabo por Hoyos y González (12) indican que las características fundamentales que la califican son su naturaleza neutro-alcalina y su elevado estado de degradación, dado su bajo contenido en celulosa.

### *Tratamientos realizados*

Este tipo de turba, con, aproximadamente, un 60 % de humedad, y pasada a través de un tamíz de 2 mm de luz de malla, fue adicionada de diversas sustancias y sometida posteriormente a un proceso de fer-

mentación a 28 °C. Los tratamientos llevados a cabo fueron los siguientes:

1. Turba natural sin inóculo.
2. Turba natural + inóculo.
3. Turba natural + inóculo + N, P, K, + melaza 4 % (peso seco).
4. Turba natural + inóculo + N, P, K + paja 30 % (peso seco).
5. Turba estéril + inóculo + N, P, K + paja 30 % (peso seco).
6. Paja + inóculo + N, P, K.

El inóculo utilizado fue estiércol (mezcla de carnero y caballo) en proporción de un 10 % (peso seco).

El tratamiento 6 sirve como base comparativa de fertilizante orgánico.

En los tratamientos 3, 4, 5 y 6, nitrógeno, fósforo y potasio (como  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ,  $(\text{PO}_4\text{H}_2)_2\text{Ca}$  y  $\text{SO}_4\text{K}_2$ ) se adicionaron hasta niveles de 3,75 % N; 1,85 %  $\text{P}_2\text{O}_5$  y 1,25 %  $\text{K}_2\text{O}$  por peso seco de turba, de acuerdo con los datos obtenidos en la bibliografía (21).

En la preparación de cada tratamiento se realizó una mezcla homogénea de los diversos componentes y después de humedecer hasta los 2/3 de su capacidad de saturación, se colocó a 28 °C para, en estas condiciones, iniciar el correspondiente proceso de fermentación durante un mes. Diariamente se tuvo como norma reponer las pérdidas de agua habidas por evaporación y controlar la temperatura.

El estudio microbiológico fue efectuado 15 días después de finalizado el proceso de fermentación.

#### *Determinaciones microbiológicas*

##### *Microflora total*

El método general seguido está basado en la preparación de diluciones seriadas 1/10, según recomiendan las técnicas de Allen (2) y Pochon (20), convenientemente modificadas por nosotros, en el sentido de adoptar un sistema mecánico de realizar las suspensiones mediante un agitador BTL que sustituye la agitación manual. Tras la obtención de las diluciones se lleva a cabo un recuento en placa, empleando el medio de cultivo de Thornton (26). La obtención de los resultados se lleva a cabo mediante el método representativo gráfico de Lavergne (16).

##### *Grupos específicos de microorganismos*

a) *Recuento de Azotobacter*. Se ha utilizado la técnica de Pochon y Tardieux (22).

b) *Determinación de la actividad amonificante.* Se ha seguido la técnica de la tirosina (8).

c) *Determinación de la actividad nitrificante.* Se ha empleado la técnica descrita por Pochon y Tardieux (22), original de Coppier y De Barjac (5).

d) *Determinación de la actividad desnitrificante.* Se ha realizado según la técnica de De Barjac (6).

f) *Determinación de la actividad celulolítica.* Se ha empleado la técnica de silico-gel y papel de filtro (Winograsky).

## RESULTADOS

### *Evolución de la temperatura en el proceso de formación de los distintos productos a partir de la turba*

En la *figura 1* se muestra la evolución de la temperatura durante el proceso de fermentación.

### *Determinaciones microbiológicas*

#### *Microflora total*

En el *cuadro 1* y *figura 2* se muestran los resultados relativos a microflora total (mesófila y termófila) en los diversos productos obtenidos.

*Cuadro 1. Valores de microflora total aerobia (mesófila y termófila) en la turba natural y en los diversos tratamientos obtenidos. Los resultados expresan número de microorganismos en millones/g (peso seco) de la muestra*

Muestra	* Mesófilos	Termófilos
Turba natural	7	0,3
Productos de fermentación		
1	50	1
2	80	40
3	390	215
4	2.120	1.040
5	2.300	1.090
6	1.850	810

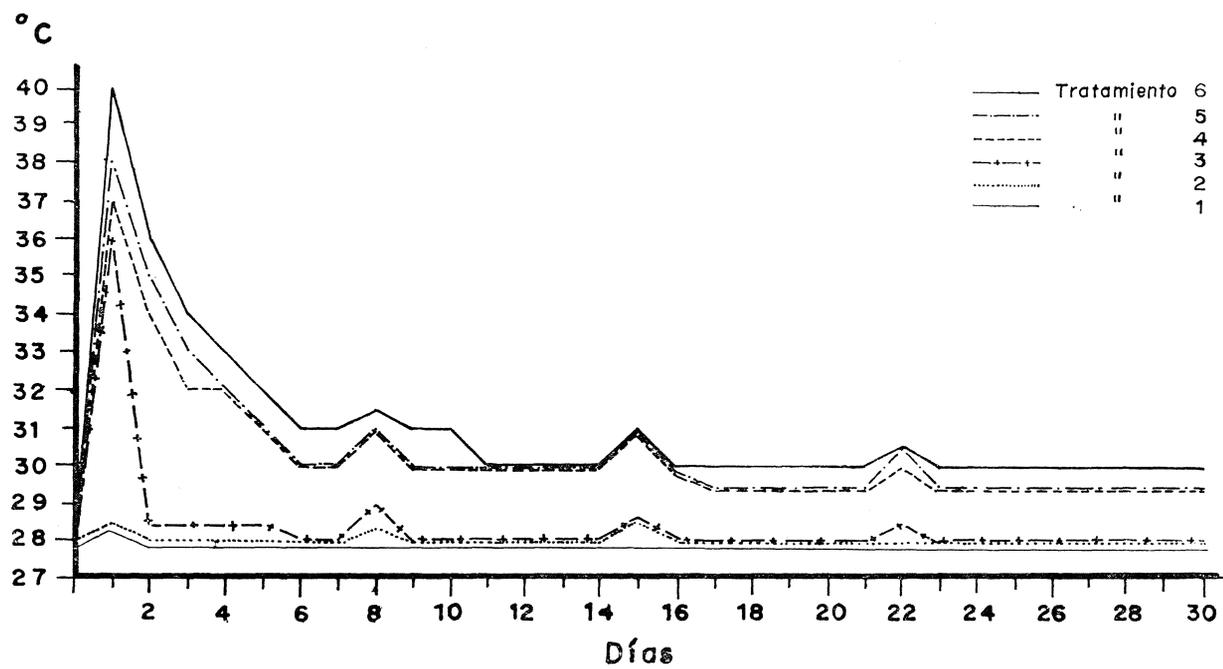


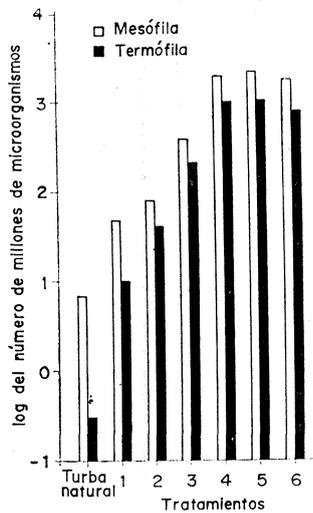
Figura 1. Evolución de la temperatura durante el proceso de fermentación

*Fijación del nitrógeno aerobio y libre. Azotobacter.*

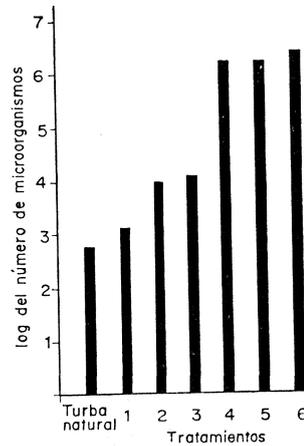
En el *cuadro 2* y *figura 3* se exponen los resultados correspondientes a contenido en *Azotobacter* de la turba natural y de los diversos productos obtenidos.

*Cuadro 2. Contenido en Azotobacter de la turba natural y de los diversos tratamientos. Los resultados expresan NMP de microorganismos/g (peso seco)*

Muestra	NMP de microorganismos
Turba natural	625
Productos de fermentación	
1	1.280
2	8.970
3	12.500
4	1.620.000
5	1.640.000
6	2.430.000



*Figura 2. Microflora total en la turba natural y en los diversos tratamientos*



*Figura 3. Contenido de Azotobacter en la turba natural y en los diversos tratamientos*

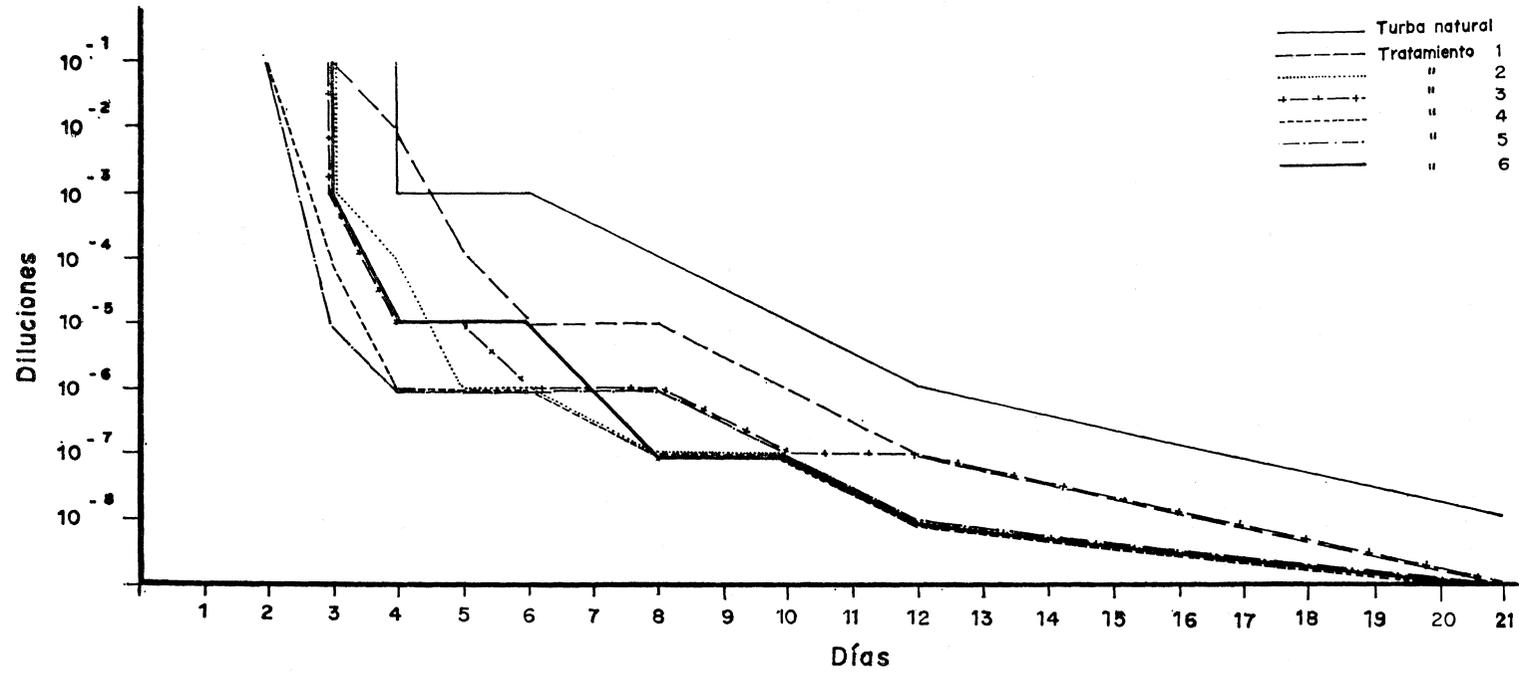


Figura 4. Actividad amonificante en la turba natural y en los diversos tratamientos. La gráfica indica la desaparición de tirosina en función del tiempo

*Actividad amonificante*

La auténtica dinámica de la amonificación en la turba natural y en los diversos tratamientos queda reflejada en la *figura 4*. Además de la anterior gráfica se ha creído oportuno adjuntar el *cuadro 3*, en el que se ofrece una visión de la actividad amonificante, según el criterio de la llamada técnica simplificada (20).

*Cuadro 3. Actividad amonificante en la turba natural y en los diversos tratamientos. Los resultados indican la dilución más alta en la que ha desaparecido la tirosina los días 3.º, 5.º, 10.º y 21.º después de la siembra*

Muestra	3.º	5.º	10.º	21.º
Turba natural	—	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-8</sup>
Productos de fermentación				
1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-9</sup>
2	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-9</sup>
3	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-9</sup>
4	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-9</sup>
5	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-9</sup>
6	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-9</sup>

*Microflora nitrificante*

El *cuadro 4* y la *figura 5* muestran el contenido en microflora nitrificante (nitrosa y nítrica) de la turba natural y de los diversos tratamientos.

*Cuadro 4. Microflora nitrificante (nitrosa y nítrica) en la turba natural y en los diversos tratamientos. Los resultados expresan NMP de microorganismos/g (peso seco)*

Muestra	Nitrosos	Nítricos
Turba natural	125.000	400.000
Productos de fermentación		
1	179.000	410.000
2	179.000	410.000
3	175.000	1.250.000
4	270.000	2.702.000
5	438.000	2.739.000
6	1.800	7.000

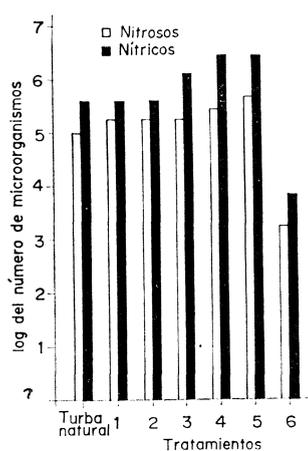


Figura 5. Microflora nitrificante en la turba natural y en los diversos tratamientos

Actividad desnitrificante

La actividad desnitrificante de la turba natural y de los diversos tratamientos se expone en la figura 6. El cuadro 5 muestra esta misma actividad desnitrificante según el criterio de la llamada técnica simplificada (20).

Cuadro 5. Actividad desnitrificante en la turba natural y en los diversos tratamientos. Los resultados indican la dilución más alta en la que hay nitratos los días 5.º, 10.º y 13º después de la siembra

Muestra	5.º	10.º	13.º
Turba natural	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>
Productos de fermentación			
1	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>
2	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>
3	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>
4	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	
5	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	
6	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>

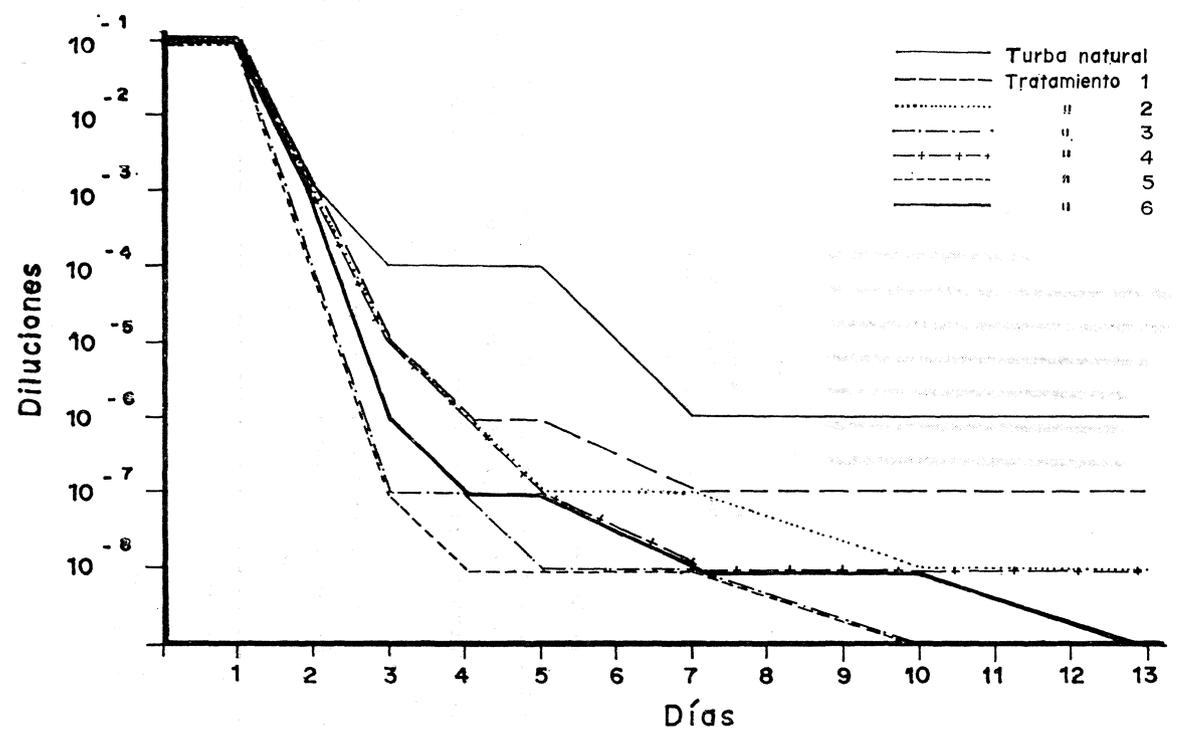


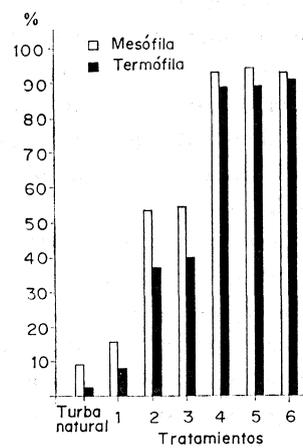
Figura 6. Actividad desnitificante en la turba natural y en los diversos tratamientos. La gráfica indica desaparición de nitratos en función del tiempo

*Actividad celulolítica*

En el *cuadro 6* y *figura 7* se muestran los resultados correspondientes a actividad celulolítica (mesófila y termófila) en la turba natural y en los diversos tratamientos.

*Cuadro 6. Actividad celulolítica (mesófila y termófila) en la turba natural y en los diversos tratamientos. Los valores indican tanto por ciento de granos positivos*

Muestra	Mesófilos	Termófilos
Turba natural	9	3
Productos de fermentación		
1	15	8
2	52	36
3	53	39
4	93	89
5	95	89
6	93	91



*Figura 7. Actividad celulolítica en la turba natural y en los diversos tratamientos, expresada en tanto por ciento de granos positivos*

## DISCUSION

En la *figura 1*, en la cual se muestra la evolución de la temperatura durante el proceso de fermentación de los diferentes tratamientos, basta observar el comportamiento del tratamiento 1, que solo lleva turba, o bien del 2, que además de turba posee inóculo, para deducir las pocas posibilidades que este material, por sí solo, presenta en intentos de fermentación, y que, sin ningún género de dudas, se debe a su pobre contenido en sustancias fermentescibles. Esta misma observación coincide con el comportamiento de los tratamientos con melaza, ya que en ellos, salvo una rápida elevación que desciende cuando ha sido consumida, el resto del proceso transcurre de forma similar.

En los restantes tratamientos en los que entra en juego la paja, también se aprecia en los primeros días un considerable incremento, iniciándose a continuación un descenso menos brusco que en los casos anteriores, para después estabilizarse a 2° ó 3 °C sobre la temperatura de la estufa, apareciendo sólo unos ligeros incrementos, consecuentes a la aireación semanal a que se someten los diversos tratamientos. Según puede observarse, la paja ofrece de forma continuada y duradera, unos recursos energéticos que en el caso de la melaza desaparecen rápidamente.

En cuanto a los resultados microbiológicos, en lo relativo a microflora total, si se toma como punto de referencia la pobreza que manifiesta la turba natural [Tescic y colaboradores (24) indican esto mismo para una turba similar] se deduce fácilmente que la simple incubación de dicha turba, sola o con la única variante que supone el consiguiente inóculo, contribuye a incrementar la microflora total de la turba; tal apreciación coincide con anteriores experiencias nuestras (10) y con lo que manifiestan Petrov y colaboradores (19), que consiguen el enriquecimiento de la microflora de una turba al agregarle una dosis de estiércol, aún en menor cuantía a la utilizada en las experiencias que aquí se han expuesto.

No obstante, el incremento máximo en microflora total lo ostentan aquellos tratamientos en que se aporta algún elemento energético, principalmente los que llevan paja.

Particularizando en otros aspectos, se ha de hacer constar que se presenta un predominio de microorganismos mesófilos sobre termófilos, lo cual resulta lógico si se considera que la temperatura de fermentación fue de 28 °C.

En relación con los resultados de la microflora específica, en lo referente a contenido en *Azotobacter*, nuevamente se pone en evidencia que esta turba de El Padul presenta un nivel bajo en este tipo de microorganismos. Esto en cierta manera resulta explicable si se considera su avanzado estado de degradación y la consiguiente ausencia de sustancias hidrocarburadas, tan necesarias para los *Azotobacter*. Confirmando en parte esta observación, son abundantes las citas bibliográficas que, incluso, señalan la falta de *Azotobacter* en turbas de naturaleza similar (1 y 24).

Sucede también que la adición de melaza, sustancia energética factible de ser utilizada directamente por este tipo de microorganismos, apenas incrementa su número, ocurriendo en contraposición que la paja, por su naturaleza predominantemente rica en celulosa y, por tanto, no accesible en forma directa al *Azobacter*, sí ejerce una influencia estimable en el aumento de los mismos. La explicación de este comportamiento se vuelve a encontrar en lo fugaz que debe ser la presencia de la melaza, que es rápidamente consumida, mientras que el efecto motivado por la paja hay que admitirlo, necesariamente, como derivado de un sinergismo de la microflora celulolítica y *Azotobacter* (13).

En lo que corresponde a actividad amonificante, el examen de los resultados hace ver que los tratamientos que llevan paja son los que proporcionan un mayor poder amonificante. Dicha apreciación está aparentemente en contradicción con la naturaleza de este material, rico en celulosa y deficiente en sustancias orgánicas nitrogenadas, pero que resulta explicable si se tienen en cuenta las cuestiones ya analizadas, relativas a desarrollo en microflora total y *Azotobacter*, más incrementadas en estos tratamientos, y que, por constituir el principal medio a través del cual se enriquecen en nitrógeno orgánico estos preparados, pueden ser, por tanto, el factor limitante de la amonificación.

Los resultados relativos a microflora nitrificante, ponen de manifiesto características propias del comportamiento de este grupo de microorganismos, ya que se puede considerar que esta actividad microbiana es la que, paradójicamente, de forma más acentuada, se presenta en este tipo de turba. Característica que se puede explicar si se tiene presente la naturaleza neutro-alcalina de esta turba, indudable consecuencia de su elevado contenido en  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , compuesto capaz de estimular la actividad nitrificante, ya sea debido a la opinión tradicional que lo atribuye a que favorece los fenómenos de superficie, que coadyuvarán a la oxidación del

amoníaco fijado sobre las partículas (17) o bien a la más actual y, por supuesto, más aceptada, que ve en esta sustancia una fuente de  $\text{CO}_2$ , que simultáneamente tampona el medio (9).

Con respecto al efecto que ejerce el proceso de fermentación a 28 °C, queda patente que favorece la nitrificación, sobre todo en aquellos tratamientos en que se ha adicionado  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . Hasta cierto punto resulta comprensible que con la fermentación no se acrecienta aún más el poder nitrificante, si se considera el factor adverso que, para el desarrollo de esta función, constituye la acidez de muchos de los preparados obtenidos, motivada en parte por la propia naturaleza de las sales adicionadas, y de otro lado, por acidificación que en sí implica la fermentación. Varios investigadores han comprobado, incluso, la total ausencia de bacterias nitrificantes en determinadas turbas ácidas (4 y 25).

De igual manera, las consideraciones anteriores pueden explicar que el tratamiento 6 (paja fermentada) presente una actividad nitrificante notoriamente inferior a la de los tratamientos que llevan turba y, por tanto, cierta cantidad de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ .

A la vista de los resultados relativos a actividad desnitrificante, se observa que dicha actividad se ve coadyuvada por la fermentación a 28 °C, y aún de forma más acentuada, en aquellos tratamientos que llevan paja; tal apreciación coincide con el criterio cada vez más generalizado, según el cual la actividad desnitrificante no hay que considerarla sólo como un fenómeno negativo, ya que constituye una actividad microbiana normal, que camina a la par del resto de la microflora (7). Este comportamiento resulta, por tanto, explicable, desde el momento en que son, concretamente, estos tratamientos los que poseen mayor actividad biológica.

Finalmente, en lo relativo a actividad celulolítica, se deduce que la celulolisis se estimula con la fermentación a 28 °C, resultando además que los niveles más altos en gérmenes celulolíticos los ostentan, según cabía esperar, los tratamientos en que entra la paja.

## RESUMEN

Se ha pretendido incrementar las propiedades fertilizantes de una turba neutro-alcalina, bastante degradada, sometiéndola a diversos tratamientos y a un proceso de fermentación a 28 °C durante un mes.

En los diversos "composts" obtenidos se ha llevado a cabo un estu-

dio microbiológico sobre la microflora total y determinados grupos específicos de microorganismos. Dicho estudio pone de manifiesto, en general, una evidente reactivación biológica en todos los tratamientos destacando particularmente aquellos que han recibido un aporte energético en forma de paja; los cuales muestran una considerable actividad biológica, principalmente, en lo referente a microflora total, *Azobacter* y actividad celulítica.

### SUMMARY

*Microbiological study of several composts of peat. I. Effect of the use of farmyard manure as inoculant and the fermentation at 28 °C*

To increase the fertilizing properties of a alkaline-neutral highly degraded peat, several treatments have been carried out together with a process of fermentation at 28 °C for a month.

A microbiological study has been carried out of the total microflora and several specific groups of microorganisms. Of such a study, it is concluded that a clear biological reactivation occurs in all composts, specially in those which have received an energetic product such as straw. This activity is mainly evident in total microflora, *Azobacter* content and cellulose decomposition.

### BIBLIOGRAFIA

1. ABYZOV, S. S. 1960. Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol., 1, 154.
2. ALLEN, O. N. 1951. Experiments in Soil Bacteriology. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Min.
3. BAKHULIN, M. D. 1949. Pochvovedenie, 540.
4. BOSWELL, J. G., y SCHELDON, J. 1951. New Phytol., 50, 172.
5. COPPIER, O., y DE BARJAC, H. 1952. Ann. Inst. Pasteur. Paris, 83, 118.
6. DE BARJAC, H., 1952. Ann. Inst. Pasteur Paris, 83, 207.
7. DE BARJAC, H. 1954. Ann. Inst. Pasteur Paris, 87, 440.
8. DE BARJAC, H., y POCHON, J. 1953. Ann. Inst. Pasteur Paris, 85, 82.
9. DOMMERGUES, Y., y MANGENOT, F. 1970. Ecologie Microbienne du Sol. Masson et Cie. Editeurs, Paris.
10. GALLARDO, F.; OLIVARES, J., y CALLAO, V. 1971. Ars. Pharm., 12, 98.
11. HEWITT, B. R. 1968. Proc. Linn. Soc. N.S. W., 92, 266.
12. HOYOS, A., y GONZÁLEZ, F. 1948. An. Edafol. Fisiol. Veg., 7, 83.
13. IMSHENETSKY, A. 1968. Decomposition of Cellulose in Soil. The Ecology of Soil Bacteria. Liverpool Univ. Press.

14. KAPLUNOVA, L. S., y MYACHINA, M. N. 1969. Effectiveness of ammonia water and peat-ammonia composts in Smolensk region conditions. *Pochvy Derno-vo-Podzol. Zony Ikh Ratsion. Ispol'z.* Edited by Evdokimov, T.I. Izd. Mosk. Univ., Moscow.
15. KUDRYACHEV, A. I. 1968. *Vesti Akad. Navuk Belarus. SSR, Ser. Biyal. Navuk*, 1, 49.
16. LAVERGNE, D. 1954. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 86, 503.
17. LEES, H., y QUASTEL, J. H. 1946. *Biochem. J.*, 40, 815.
18. MAKSIMOW, A., y GRUDZINSKI, A. 1952. *Rocz. Nauk Roln.* 66, Ser. A, 1, 65.
19. PETROV, P.; ILKOV, D.; VOINOVA, Z.; BUCHVAROVA, I., y BAKALOVA, V. 1967. *Pochvozn. Agrokhim.*, 2, 31.
20. POCHON, J. 1954. *Manuel Technique D'Analyse Microbiologique du Sol.* Masson et Cie. Editeurs, Paris.
21. POCHON, J., y DE BARJAC, H. 1958. *Traité de Microbiologie des Sols.* Dunod, Paris.
22. POCHON, J., y TARDIEUX, P. 1962. *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol.* Editions de la Tourelle.
23. STEINBRENNER, K. 1965. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt.* 2, 119, 448.
24. TESIC, A.; BOGDANOVIC, M.; TODOROVIC, M., y PETROVIC, M. 1960. *Zemljiste Biljka*, 9, 109.
25. TESIC, Z., y TODOROVIC, M. 1963. *Zemljiste Biljka*, 12, 333.
26. THORNTON. 1922. *Ann. Appl. Biol.*, 9, 241 [citado por Allen (2)].

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

*INSTITUTO DE OPTICA «DAZA DE VALDÉS» (C S I C)*  
*DEPARTAMENTO DE ESPECTROS*  
*SECCION DE ESPECTROS MOLECULARES*

## IDENTIFICACION, POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA, DE MOLECULAS INMUNOSENSIBILIZANTES ORIGINADAS A PARTIR DE ANTIBIOTICOS BETA - LACTAMICOS

por

A. PORTOLÉS, A. HIDALGO y F. RAMOS

### INTRODUCCION

La capacidad de desencadenar una hipersensibilización frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos depende normalmente, en su origen, de que el compuesto antibiótico sufra alteraciones bioquímicas que den lugar a radicales libres o moléculas de gran capacidad reaccionante en un medio proteico, según se señala para mezclas de penicilina-procaína (24), para penicilina (23) y para otras penicilinas semisintéticas (18); y las moléculas que más activamente pueden intervenir en el fenómeno son los ácidos penicilánico, penicilénico, peniciloico y penicilamina (11-12, 14-17 y 28).

Por otra parte, Batchelor y colaboradores (2) y también Stewart (25), encontraron algunos residuos polipeptídicos derivados de la fabricación penicilínica con manifiesto carácter alérgico; a ellos atribuye Wellensiek (29) algunas posibles reacciones anafilácticas originadas por los deri-

vados  $\beta$ -lactámicos de tipo semisintético. Asimismo, el hecho de que Bunn y colaboradores (5), y nosotros en varias ocasiones (19-20), hayamos obtenido anticuerpos circulantes (en animales) empleando moléculas normales de antibióticos demuestra que, en determinadas condiciones experimentales, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no alterados también pueden producir algunos anticuerpos.

Sea cual fuere la causa por la que una molécula  $\beta$ -lactámica se convierte en hapteno capaz de originar sensibilizaciones, resulta de gran interés poder detectar previamente, y no *in vivo*, la presencia de las modificaciones moleculares que pudieran condicionar el origen de la posible sensibilización. En este caso nos proponemos identificar, mediante espectroscopia infrarroja, la presencia de contaminantes activos con capacidad inmunosensibilizante y estudiar las posibles variaciones moleculares en función de condiciones anormales de conservación de distintas soluciones  $\beta$ -lactámicas.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Antibióticos y sustancias con ellos relacionadas

Para este trabajo se han utilizado 4 antibióticos  $\beta$ -lactámicos, que fueron: penicilina G (PG), ampicilina (APC), cefalotina (CFT) y cefaloridina (CFR), y otras sustancias derivadas de la molécula bencilpenicilínica, tales como los ácidos penicilánico (6-APA), peniciloico (PNCO), penicilénico (PNCE), penílico (PNLI) y peniloico (PNLO), además de penicilamina (PNCA) y peniciloil-polilisina (Cilligen). De este segundo grupo de sustancias empleamos diferentes tipos de muestras, unas comerciales de la casa Sigma y otras obtenidas experimentalmente por degradación química mediante hidrólisis alcalina con sosa 20N a temperatura ambiente durante 1 h, o bien por tratamientos térmicos a 40 °C (durante 5 h) de soluciones concentradas de penicilina G potásica.

Asimismo, se han empleado distintas soluciones bencilpenicilínicas sometidas a tratamientos variables, en cuanto a pH y temperatura, de los que se hablará en el apartado correspondiente.

### 2. Reactivos biológicos

Para conocer la capacidad potencial de sensibilización se prepararon *conjugados de antibiótico-albúmina* de suero de conejo según el método

de Torii y Kohoriuchi (27), modificado por Arcos y Chordi (1). En otras ocasiones, se prepararon *mezclas antigénicas*, a volúmenes iguales de antibiótico ( $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) y coadyuvante de Freund (Difco).

Los *sueros de conejo* se obtuvieron a partir de muestras de sangre extraída por punción cardíaca. Se repartían en ampollas estériles y se conservaban a  $-20^\circ\text{C}$ .

También, en las pruebas de hemaglutinación, se emplearon *hematíes antibiótico-sensibilizados*, procedentes de sangre de conejo y suspendidos en solución salina al 2 %; éstos eran sometidos a un tratamiento con ácido tánico al 1/10.000, antes de fijar el antibiótico (19).

### 3. Animales de experimentación

En todos los casos se usaron distintos lotes de conejos, de 2,5-3,2 kg de peso, después de mantenerlos durante una semana (como mínimo) en observación.

### 4. Técnicas de espectroscopia infrarroja

Los espectros de absorción en la zona infrarroja fueron obtenidos en un espectrofotómetro de Perkin-Elmer modelo 457. Para la preparación de las células de absorción se empleó la técnica de los comprimidos de BrK, disgregando alrededor de 1 mg de la muestra en 300 mg del soporte.

Cuando, según el protocolo experimental, habían de estudiarse las posibles modificaciones químicas producidas en las disoluciones antibióticas, la muestra líquida se liofilizaba después del tratamiento y a continuación se preparaban los comprimidos de BrK.

### 5. Ensayos de *protein-ligadura*

En ocasiones se hizo necesario ensayar las variaciones de *protein-ligadura* de los distintos antibióticos o sustancias con ellos relacionadas y acudimos a un método semejante al de Tennen y colaboradores (26), sobre tampón de fosfato, a pH 7,4 y manteniendo los contactos durante 48 h, a  $4^\circ\text{C}$ . Las variaciones de concentración de las moléculas liberadas en el eluyente se controlaban por espectroscopia ultravioleta con espectrofotómetro de Beckman D-BG, utilizando patrones de concentración conocida.

### 6. Técnicas inmunológicas

Para conocer el grado de hipersensibilización condicionado por las alteraciones moleculares de las soluciones antibióticas mantenidas a distintos pH y temperaturas, se prepararon animales inmunosensibilizados frente a PG, CFT, 6-APA, PNCE y PNCA (con conjugados de antibiótico-albúmina) y se utilizaron como animales reactivos para pruebas intradérmicas; mientras que para la producción de anticuerpos circulantes se inmunizaron con las distintas sustancias mezcladas con coadyuvante de Freund. En todos los casos, los animales recibieron 8 inyecciones de 0,25 cm<sup>3</sup> de cada antígeno correspondiente, administradas conjuntamente (una en cada pata y las cuatro restantes distribuidas en distintas zonas dorsales); este tratamiento, que era semanal, se repitió 6 veces (cuatro en un mes y los dos restantes a los 15 y 30 días más tarde, respectivamente).

Para reconocer la inmuno-sensibilización condicionada por las alteraciones moleculares se practicaron reacciones intradérmicas en los animales de ensayo, con 0,1 cm<sup>3</sup> de solución problema (100-120 µg de sustancia), mediante la técnica de Gayet (7), utilizando como patrón peniciloil-polilisina (28).

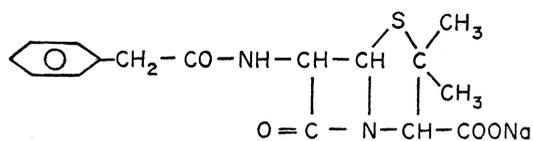
La investigación de anticuerpos circulantes, en el suero de los animales tratados con las distintas sustancias, se realizó mediante pruebas de hemaglutinación por el método de Levine (13), que resultó de gran sensibilidad.

## RESULTADOS

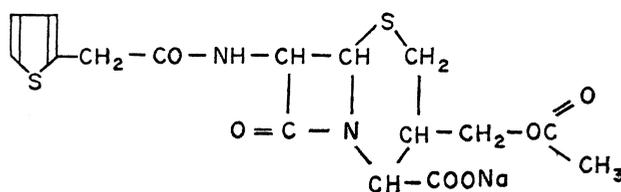
Los diferentes datos experimentales obtenidos se presentan a continuación, agrupados en los cuatro apartados que constituyen las sucesivas fases de este estudio.

### 1. Caracterización de los antibióticos β-lactámicos por sus espectros infrarrojos

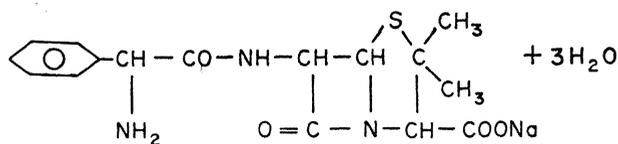
En la *figura 1* se dan los espectros infrarrojos obtenidos a partir de los cuatro antibióticos utilizados, cuyas fórmulas estructurales se indican a continuación; y en el *cuadro 1* se hace una asignación de las frecuencias más características encontradas en dichos espectros de absorción. Esta asignación se ha realizado de acuerdo con los datos de diferentes autores (3-4, 6-10 y 21).



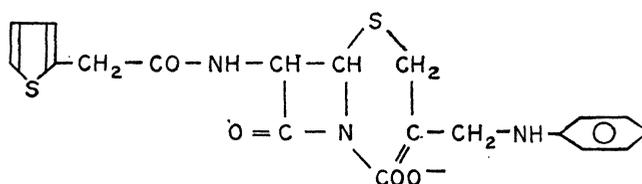
*Penicilina G*



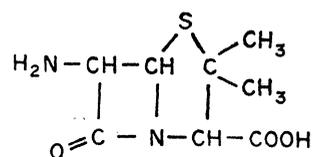
*Cefalotina*



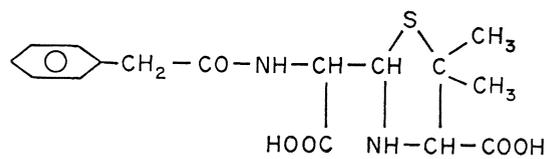
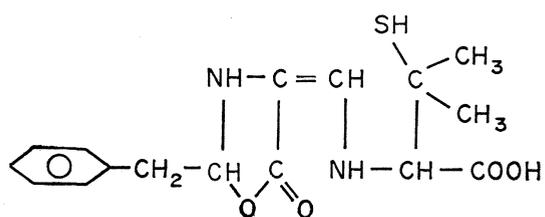
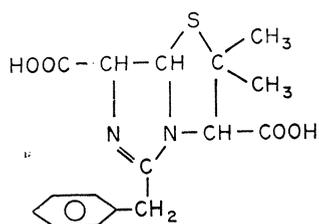
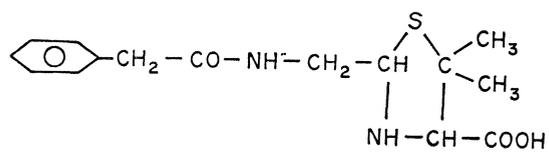
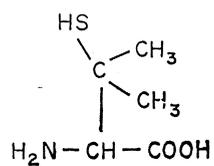
*Ampicilina*



*Cefaloridina*

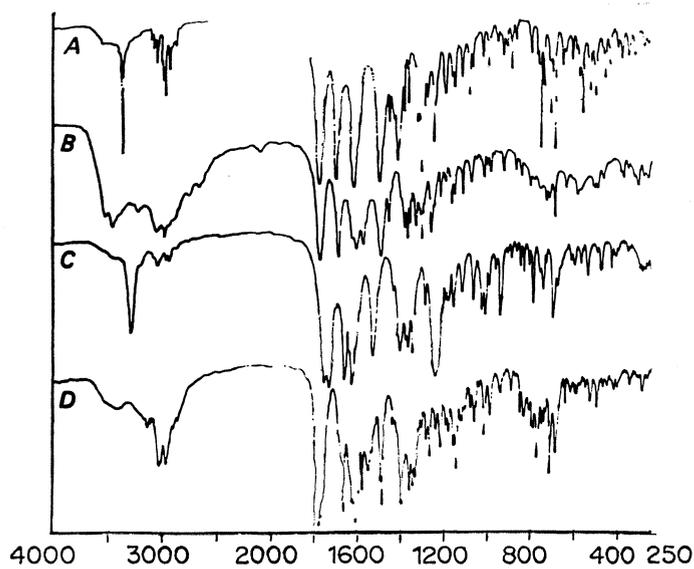


*A. penicilánico*

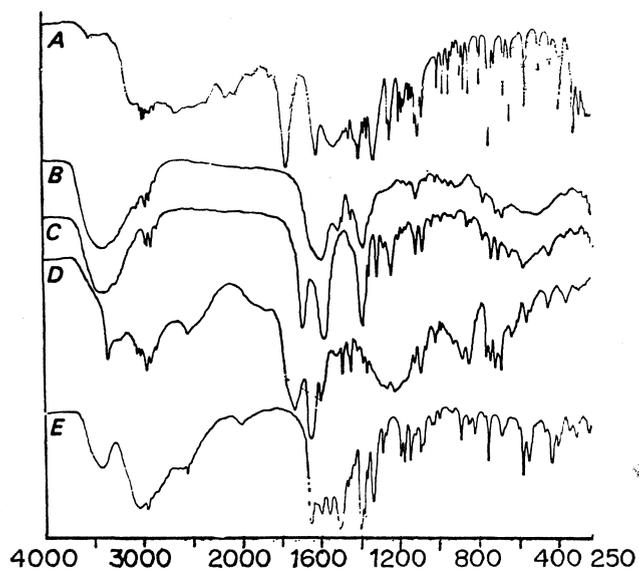
*A. peniciloico**A. penicilénico**A. penílico**A. peniloico**Penicilamina*

Cuadro 1. Asignación de frecuencias características para la identificación molecular de cuatro antibióticos  $\beta$ -lactámicos

Grupos funcionales característicos, vibraciones de	Frecuencias correspondientes en $\text{cm}^{-1}$ , para los distintos grupos en las moléculas de			
	Penicilina	Ampicilina	Cefalotina	Cefaloridina
Bandas del grupo — $\text{NH}_2$		3.520 3.460		
Valencia — $\text{NH}$ —	3.360	3.220	3.285	3.180
Valencia de los — $\text{CH}$ — aromáticos	3.080 3.060 3.020	3.060 3.020	3.080 3.040	3.100 3.080 3.030
Antisimétrica y simétrica de valencias — $\text{CH}_3$ y $=\text{CH}_2$ y simétrica de — $\text{CH}$ — en alifáticos	2.980 2.965 2.920 2.870	2.980 2.940	2.960 2.930 2.875	2.960 2.950 2.890 2.850
Grupos funcional aldehído			2.760	
$\text{C} = \text{O}$ beta-lactama	1.780	1.775	1.755	1.780
$\text{C} = \text{O}$ aldehído			1.730	
$\text{C} = \text{O}$ amida (banda I)	1.700	1.690	1.655	1.665
Grupo $\text{COO}^-$	1.620	1.610	1.620	1.605
Deformación del — $\text{NH}_2$		1.575		
Del anillo piridínico				1.575
$\text{C} = \text{O}$ amida con predominio de la vibración — $\text{NH}$ — (banda II)	1.500	1.498	1.530	1.550
De anillo piridínico				1.492 1.487 1.395
Grupo — $\text{CH}_2$ — (en tijera)	1.455		1.450	
Grupo — $\text{CH}_3$ acoplado al $\text{C} = \text{O}$			1.380 1.370	
Deformación simétrica del grupo isopropilo — $\text{CH} = (\text{CH}_3)_2$	1.390 1.370	1.390	1.360 1.340	
Valencia — $\text{C} - \text{N}$ en aminas		1.365		
Grupo — $\text{CH}$ —	1.330	1.335		
$\text{C} = \text{O}$ amida (banda III)	1.309	1.310	1.350	1.360
De la piridina monosustituida				772 715
Monosustitución del anillo bencénico	768 700	761 700		
Deformación alabeada de los — $\text{CH}$ — en el tiofeno, en derivados monosustituidos en 2			708	690



*Figura 1. Diferencias entre los espectros infrarrojos —sobre comprimidos de BrK— de penicilina G sódica (A), ampicilina trihidrato (B), cefalotina (C) y cefaloridina (D)*



*Figura 2. Espectros moleculares al infrarrojo de penicilánico (A), peniloico (B), penilénico (C), penicilénico (D) y penicilamina (E)*

*Cuadro 2. Variaciones en la capacidad inmunosensibilizante de las distintas moléculas  $\beta$ -lactámicas y derivados, ensayados en este estudio*

Moléculas	Grado de protein-ligadura	Variaciones en el grado de antigenicidad sobre conejos inmunizados con									
		PG		CFT		6-APA		PNCE		PNCA	
		I-D	H-G	I-D	H-G	I-D	H-G	I-D	H-G	I-D	H-G
PG	+++	+	1/128	—	—	+	1/8	++	1/16	±	—
APC	±	—	1/8	—	—	++	1/16	+	1/4	±	—
CFT	++	—	1/2	++	1/64	±	—	±	—	—	—
CFR	++	—	—	+	1/32	—	—	±	—	—	—
6-APA	+	±	—	—	—	++	1/64	±	—	±	—
PNCO	++	±	—	—	—	—	—	±	—	—	—
PNCE	+++	++	1/16	±	—	—	—	+++	1/32	±	—
PNLI	±	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
PNLO	+	±	—	—	—	±	—	—	—	±	—
PNLA	±	±	1/4	—	—	—	—	±	—	++	1/8

I-D: intradérmico. H-G: hemaglutinación.

Para las intradermo-reacciones se establece comparación con las producidas por moléculas de peniciloil-polilisina.

Los anticuerpos circulantes se valoraron, en el suero de los conejos inmunizados, mediante hemaglutinación frente a hematíes sensibilizados con las distintas moléculas.

### 2. Caracterización de variaciones moleculares en los antibióticos

Los principales productos de degradación que, con interés inmunológico, se originan a partir de la bencilpenicilina, son el 6-APA, PNCO, PNCE, PNLI, PNLO y PNCA, ya indicados en el apartado correspondiente a material y cuyas fórmulas se adjuntan. Sus espectros de absorción infrarrojos se indican en la *figura 2*.

Como es lógico, en las penicilinas semisintéticas y en las cefalosporinas será posible también encontrar modificaciones moleculares equivalentes a las señaladas para la bencilpenicilina, que tendrán su respuesta en las frecuencias características correspondientes.

### 3. Estudio de la capacidad inmunosensibilizante de las distintas moléculas

Sobre distintos lotes de conejos sometidos a dos tipos de tratamientos inmunizantes con PG, CFT, 6-APA, PNCE y PNCA se investigó la producción de inmunoglobulinas específicas y de anticuerpos dermosensibilizantes. Asimismo, se hicieron algunos ensayos de tipo cualitativo para tener una orientación del grado de protein-ligadura de las distintas moléculas estudiadas. Los resultados se indican en el *cuadro 2*.

### 4. Identificación de contaminantes activos capaces de producir sensibilización anti-penicilina

Después de estudiar y conocer bien los espectros infrarrojos de los cuatro distintos antibióticos y sus derivados, intentamos determinar los contaminantes activos existentes en el producto sólido, haciendo distintas mezclas con penicilina G y 10 a 30 % de ácido peniciloico (*figura 3*), y también con este mismo antibiótico y ácido penicilénico (*figura 4*), por ser las dos sustancias que más fácilmente se originan y que muestran posibilidades de producir sensibilización.

En el primer caso (*figura 3*), observamos disminución de intensidad y ligeros desplazamientos de las bandas a 1.780, 1.500 y 1.309  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes al anillo  $\beta$ -lactámico, y también de las bandas situadas a 1.620 (del grupo ácido) y a 1.420  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente; mientras que en el otro caso (*figura 4*) hay una mayor modificación general del espectro, en el que, aunque se aprecian las bandas más características de la penicilina, se observan modificaciones en la zona de los 1.800 a 1.600  $\text{cm}^{-1}$

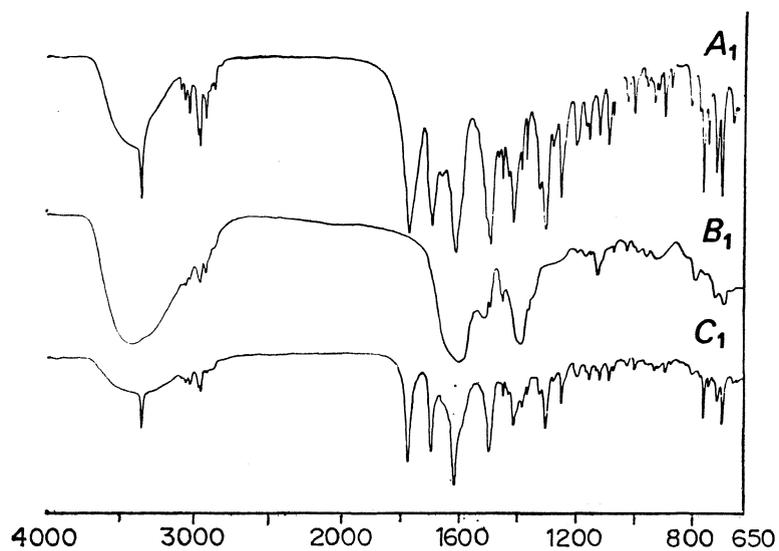


Figura 3. Espectros infrarrojos de penicilina (A<sub>1</sub>), de ácido peniciloico (B<sub>1</sub>) y de penicilina con un 1% de peniciloico (C<sub>1</sub>)

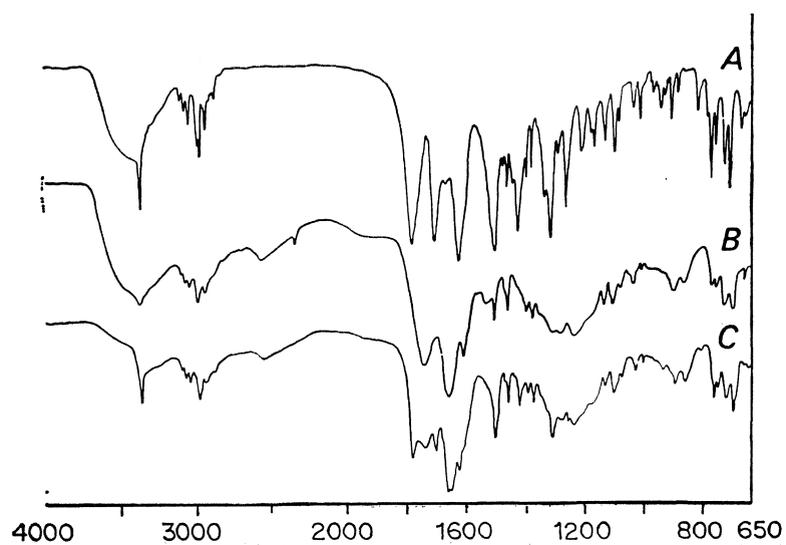


Figura 4. Espectros infrarrojos de penicilina (A), de ácido penicilénico (B) y de penicilina con un 15% de penicilénico (C)

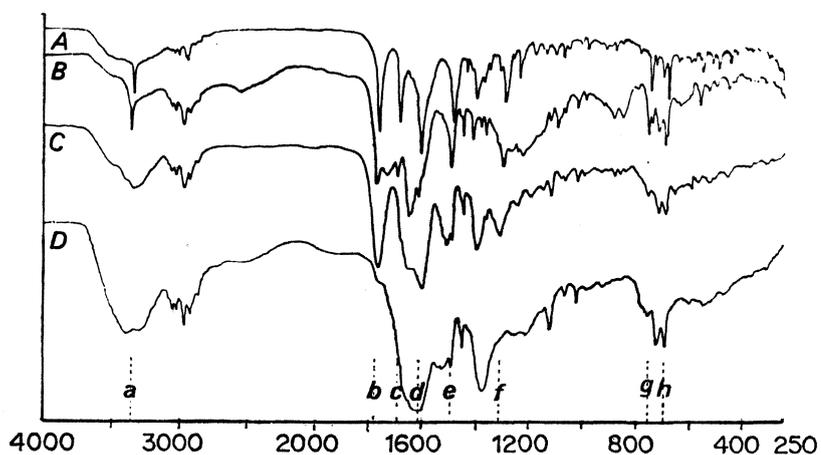


Figura 5. Espectros infrarrojos de muestras de penicilina sometida a distintos tratamientos químicos degradantes que producen mezclas de penicilina y peniciloico (A), penicilina y penicilénico (B), penílico y penicilénico (C), y penicilina con peniciloico y penicilénico (D). Las letras sobre las rayas de puntos señalan la posición de bandas características de penicilina: 3.360 (a), 1.780 (b), 1.700 (c), 1.620 (d), 1.500 (e), 1.309 (f), 768 (g), 700 (h), cuya asignación correspondiente puede encontrarse en el cuadro 1

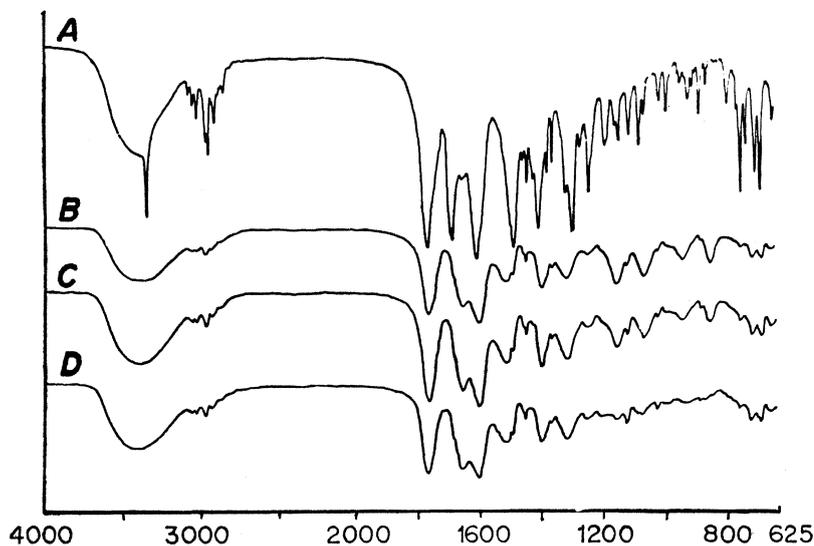


Figura 6. Variaciones del espectro infrarrojo procedente de una solución de penicilina G normal a pH 7,2 (A) cuando se mantiene durante 24 h a 37 °C y a pH 8,2 (B); o durante 36 h a 37 °C y a pH 7,2 (C); o durante 36 h a 18 °C y a pH 6,2 (D)

y aparecen las bandas situadas a 2.560, 1.735 y 1.230  $\text{cm}^{-1}$ , que señalan, sin duda, la presencia de penicilénico.

A continuación, se examinan comparativamente los espectros infrarrojos obtenidos con diferentes productos derivados de la penicilina G por los tratamientos hidrolíticos degradantes de la misma (*figura 5*). Según parece, estas muestras están formadas por mezclas de penicilina, penicilénico y peniciloico en distintas proporciones, que ocasionan las variaciones que se aprecian en sus espectros infrarrojos; sin embargo, en todos ellos se pueden distinguir algunas bandas típicas de la penicilina, según indicamos gráficamente. Las distintas mezclas se produjeron por hidrólisis alcalina (A), hidrólisis ácida de distinta intensidad (B, C) o hidrólisis suave seguida de tratamiento térmico (D).

Como puede verse, en todos los casos, además de una modificación general del espectro infrarrojo, se aprecian variaciones en la intensidad relativa de las bandas específicas de la penicilina que nos señalan la impureza del producto y —con bastante certeza— el tipo de molécula contaminante.

Por otra parte, dado que la aparición de antigenicidad comienza por la biotransformación o degradación de la molécula antibiótica, hemos intentado estudiar mediante espectroscopia infrarroja las posibilidades de formación de las distintas moléculas derivadas de la penicilina en soluciones antibióticas sometidas a distintos pH y temperaturas, durante tiempos variables.

La experiencia consistió en preparar, en primer lugar, tres series de soluciones penicilínicas a diferentes pH (8,2, 7,2 y 6,2), y después dividir las en tres lotes, que se mantenían a distinta temperatura (4°, 18° y 37 °C) durante tiempos distintos (12, 24 y 36 h, respectivamente).

De esta forma —para estas tres variables de pH, temperatura y tiempo de conservación— se conseguían un total de 27 muestras distintas que, en su momento oportuno, se congelaban a —20 °C y después se liofilizaban para estudiar sus espectros infrarrojos sobre comprimidos de BrK.

Los resultados obtenidos en estas condiciones no fueron todo lo demostrativos que son de desear, en cuanto a la proporción de las moléculas contaminantes producidas por degradación química, pero sí en cuanto a su naturaleza. En todos los casos se produjo gran cantidad de PNCO, con una cierta proporción de PNCE, según se deduce de los espectros infrarrojos (*figura 6*), que parecen bastante semejantes a la muestra C de

la figura que precede, en la que se demostró la presencia del PNCO por sus bandas infrarrojas características y su contaminación en PNCE por pruebas intradérmicas y por su absorción a  $323 \text{ m}\mu$ .

El resto de las muestras de la serie PG, hasta las 27 ensayadas, dieron resultados negativos en las prueba de intradermo-reacción.

*Cuadro 3. Grados de dermosensibilización condicionados por alteraciones moleculares durante la conservación*

Muestras	Dermosensibilización frente a conejos inmunizados con moléculas de		
	PG	PNCE	PNCA
M-A	—	—	—
M-B	±	+	—
M-C	+	+++	±
M-D	±	++	±
PG-8 (pH 6,2/18 °C/36 h)	±	+	—
PG-9 (pH 6,2/37 °C/36 h)	+	++	±
PG-6 (pH 7,2/37 °C/36 h)	±	+	—
PG-3 (pH 8,2/37 °C/36 h)	—	±	—

En cuanto a la capacidad dermosensibilizante de estas muestras, ensayadas sobre los distintos animales reactivos, el *cuadro 3* es suficientemente demostrativo.

## DISCUSION

Como la estructura molecular de los cuatro antibióticos presenta una cierta semejanza, es normal que aparezcan series de bandas que se repiten en los diferentes espectros. Sin embargo, es posible diferenciarlos por ciertas frecuencias características. La situada a  $3.360 \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la vibración de valencia del grupo —NH— de la penicilina G,

no aparece en la ampicilina ni cefaloridina y se encuentra desplazada a  $3.300\text{ cm}^{-1}$  en la cefalotina.

Las bandas correspondientes a la vibración de valencia del grupo  $> \text{CO}$   $\beta$ -lactámico (hacia  $1.780\text{ cm}^{-1}$ ), amida (hacia  $1.700\text{ cm}^{-1}$ ) y el grupo carbonilo ácido (hacia  $1.620\text{ cm}^{-1}$ ) se encuentran, naturalmente, en los cuatro antibióticos.

Le cefalotina, que es el único antibiótico que contiene la función aldehído, presenta dos bandas en la región  $2.720$  a  $2.820\text{ cm}^{-1}$  que, unidas a la posición de la banda  $> \text{CO}$  a  $1.730\text{ cm}^{-1}$ , constituyen una prueba espectroscópica que indica la existencia del grupo aldehído en la molécula.

Los antibióticos cefalotina y cefaloridina poseen un anillo tiofénico, y, por tanto, las bandas a  $708$  y  $690\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, muy intensas, corresponden a la vibración de valencia alabeada de los grupos  $-\text{CH}-$  de dicho anillo y sirven para caracterizarlos.

La cefaloridina, además, contiene en su molécula un anillo piridínico caracterizable por las bandas a  $1.492$ ,  $1.487$ ,  $1.395$ ,  $772$  y  $715\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, con las asignaciones que figuran en el *cuadro 1*.

Una vez diferenciado el espectro infrarrojo de la penicilina del de los otros antibióticos, también se pueden detectar sus variaciones por transformación bioquímica; así, cuando la bencil-penicilina, mediante una amido-hidrolasa bacteriana, se transforma en el ácido 6-amino penicilánico (6-APA), en el espectro infrarrojo se observa la desaparición de las tres bandas características del grupo  $> \text{CO}$  amida, situadas a  $1.700\text{ cm}^{-1}$  (I), a  $1.500\text{ cm}^{-1}$  (II) y a  $1.309\text{ cm}^{-1}$  (III); mientras que la situada a  $3.360\text{ cm}^{-1}$  se desplaza hasta los  $3.440\text{ cm}^{-1}$ , por transformarse el grupo  $-\text{NH}-$  en amina primaria. Asimismo, aparece la banda a  $1.540\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la de deformación del grupo  $-\text{NH}_2$  y, entre los  $2.300$  y  $2.700\text{ cm}^{-1}$ , se puede observar la absorción característica de los hidróxilos del grupo ácido. Este espectro puede resultar aún más modificado cuando la sustancia se dimeriza o polimeriza.

Cuando la penicilina G, por degradación espontánea, mediante una hidrólisis suave se transforma en ácido peniciloico por rotura del anillo  $\beta$ -lactámico, se observa la desaparición de la banda  $\beta$ -lactama (característica a  $1.780\text{ cm}^{-1}$ ), un desplazamiento de la banda amida I hacia una frecuencia más baja (de  $1.700$  a  $1.655\text{ cm}^{-1}$ ) y la ausencia de la banda a  $1.500\text{ cm}^{-1}$ ; asimismo se aprecian algunos desplazamientos más ligeros de la banda ácido, que pasa desde  $1.620$  a  $1.600\text{ cm}^{-1}$ , y también de

la banda situada a  $1.420\text{ cm}^{-1}$ , que se sitúa a los  $1.400\text{ cm}^{-1}$ . Por otra parte, también se producen las modificaciones generales del espectro, que se intensifican cuando la molécula está más hidratada.

Si la degradación molecular de la penicilina es más intensa, y a la hidrólisis sigue una descarboxilación, se produce el paso de penicilina a ácido peniloico; en este caso, las modificaciones más importantes que se observan son la desaparición de la banda  $\beta$ -lactama a  $1.780\text{ cm}^{-1}$  y también de las bandas a  $1.500$  y a  $1.309\text{ cm}^{-1}$ , características de la molécula antibiótica; asimismo, se desplaza la  $1.420$  hacia los  $1.400\text{ cm}^{-1}$ , y la banda ácido situada a  $1.620\text{ cm}^{-1}$  pasa a los  $1.590\text{ cm}^{-1}$ .

Por otra parte, si la degradación penicilínica tiene lugar en un medio ácido, puede producirse una reordenación intramolecular que da lugar a la formación del ácido penicilénico, que por isomerización puede pasar a penílico (ambos, antibióticamente inactivos). En estas condiciones, sigue invariable la banda a  $3.360\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo  $\text{—NH—}$  (aunque éste ocupe otra posición en la molécula), en tanto que desaparecen la banda  $\beta$ -lactama a  $1.780\text{ cm}^{-1}$  y la  $>\text{CO}$  amida I (situada a  $1.700\text{ cm}^{-1}$ ). En la zona de los  $1.600$  a  $1.800\text{ cm}^{-1}$  se aprecian bastantes modificaciones, en las que posiblemente influyen el aumento de los grupos  $\text{COO}^-$  ácidos; así, en lugar de las tres bandas características del antibiótico, aparecen otras tres a  $1.735$ ,  $1.652$  y  $1.603\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, que pueden justificarse por la reestructuración intramolecular que ha sufrido el antibiótico. Asimismo se aprecia una fuerte absorción en la región comprendida entre los  $1.000$  y  $1.250\text{ cm}^{-1}$ , observándose una banda característica a los  $1.100\text{ cm}^{-1}$ , con dos bandas intensas y anchas, una, a  $1.270$ , con un hombro a  $1.300\text{ cm}^{-1}$ , y otra, a  $1.230$ , con otro hombro a  $1.175\text{ cm}^{-1}$ . Bandas específicas del ácido penicilénico son las del grupo  $\text{—SH}$  a  $2.560\text{ cm}^{-1}$ , la del grupo  $>\text{CO}$  cetónico del anillo que se localiza a  $1.735\text{ cm}^{-1}$  y la característica del grupo ariléter  $\text{—C—O—C=}$ , que aparece a  $1.230\text{ cm}^{-1}$ ; además, la banda  $\text{COO}^-$  ácido se desplaza hasta los  $1.652\text{ cm}^{-1}$  y aparecen dos bandas intensas y anchas a  $895$  y a  $860\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

Por último, la penicilina puede degradarse mediante una fuerte hidrólisis alcalina y originar penicilamina, primero, por rotura del anillo  $\beta$ -lactámico dando ácido penicilín-dicarboxílico (peniciloico) y después, por sucesiva rotura del anillo tiazolidínico. Como era de esperar, en este caso, desaparecen la banda a  $1.780\text{ cm}^{-1}$  del grupo  $\beta$ -lactama y también las situadas a  $1.700$  y  $1.620\text{ cm}^{-1}$ , apareciendo tres bandas intensas, a

1.642, 1.605 y  $1.500\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Con carácter específico, aparece una banda débil a  $2.564\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración de valencia del grupo —SH, y bastantes desplazamientos de las bandas de la penicilina, aunque se conserva la situada a  $1.500\text{ cm}^{-1}$ ; en este caso, también se ven las bandas típicas del grupo amina primaria —la de valencia hacia  $3.440\text{ cm}^{-1}$  (algo enmascarada por una ligera hidratación de la sustancia) y la de deformación a  $1.560\text{ cm}^{-1}$ — y también la del grupo isopropilo, que aparece muy intensa a  $1.395\text{ cm}^{-1}$ .

En cuanto al problema inmunoquímico, el escaso conocimiento de la biodegradación de las moléculas  $\beta$ -lactámicas *in vivo*, sobre todo en organismos hipersensibles, dificulta al verdadero conocimiento del fenómeno biológico; no obstante, el carácter de hapteno se manifiesta preferentemente cuando en las muestras existen ácido penicilénico o penicilamina. Así, podemos señalar como frecuencias más significativas de dermosensibilización por penicilénico —según el espectro infrarrojo— a las bandas específicas situadas a  $2.500\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente al grupo SH) y otra a  $1.230\text{ cm}^{-1}$ , característica del grupo aril-éter; mientras que en el caso de la penicilamina, el grupo —SH se detecta por una banda débil a  $2.564\text{ cm}^{-1}$ , apareciendo además una banda intensa del grupo isopropilo a  $1.396\text{ cm}^{-1}$  y las características del grupo amina primaria, a  $3.440$  y  $1.560\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

Por otra parte, las dermosensibilizaciones que hemos observado en presencia de ácido peniciloico, parecen de acuerdo con las opiniones de Schneider y Weck (22) y las de Batchelor y colaboradores (2) en relación con la intervención del radical peniciloilo, en las inmunosensibilizaciones por moléculas de aminopenicilánico, bencil-penicilina y cefalosporinas.

Aunque Siegel, en 1962 (23), comprobara la exaltación de las propiedades antigénicas en soluciones penicilínicas incubadas a distintas temperaturas, nosotros hemos ampliado el estudio a  $18^{\circ}$  y  $37^{\circ}\text{ C}$ , incluyendo ensayos de control a  $4^{\circ}\text{ C}$  y estudiando el fenómeno a distintos pH. En nuestras condiciones hemos controlado las variaciones moleculares, por espectroscopia infrarroja, en función del tiempo; así se ha visto que al cabo de 36 h se producía una cierta cantidad de ácido peniciloico con escasas proporciones de ácido penicilénico que parecían condicionar la intensidad de las reacciones intradérmicas.

En estos últimos ensayos, los resultados no fueron todo lo demostrativos que desearíamos en cuanto a la proporción del contaminante activo,

pero sí en cuanto a su naturaleza. Un buen recurso en estos casos y con el fin de tener una idea más exacta de las concentraciones que intervienen, consistiría en preparar distintas series de mezclas experimentales en las que se establezcan proporciones variables, pero exactamente conocidas, del contaminante activo; utilizando como patrones de referencia estos espectros se estudian las variaciones de intensidad producidas en las bandas que, en la discusión, indicamos como características para los distintos compuestos de degradación y con ello se puede conseguir una identificación semicuantitativa de la mezcla.

### RESUMEN

Mediante espectroscopia infrarroja se han estudiado las variaciones moleculares subsiguientes a la degradación bioquímica de algunas moléculas  $\beta$ -lactámicas de las que, por otra parte, también se determinaron sus propiedades inmunosensibilizantes a través de reacciones intradérmicas en conejos y por pruebas de hemaglutinación.

Así se ha demostrado que los mayores incrementos en inmunogenicidad van acompañados de la presencia de indicios del ácido penicilénico; el cual puede producirse, junto con mayores cantidades de ácido peniciloico, en las alteraciones por deficiente conservación.

En cuanto a la formación de moléculas de carácter hapténico, éstas pueden aparecer en las soluciones penicilínicas débilmente ácidas cuando se mantienen a 37 °C durante 36 h y su presencia se pone de manifiesto por análisis infrarrojo mediante las bandas específicas situadas a 2.500 y 1.230  $\text{cm}^{-1}$  para PNCE, y a 2.564 y 1.396  $\text{cm}^{-1}$  para PNCA.

### AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro reconocimiento a los laboratorios de Antibióticos, S. A.; Lilly Indiana, S. A., e Inibsa, por su amabilidad al suministrarnos las muestras de antibióticos, y también nuestro particular agradecimiento a los Dres. Zugaza y García Ferrándiz por facilitarnos algunos productos de degradación de la penicilina.

Asimismo, agradecemos la asistencia técnica prestada por las Srtas. M. L. del Pozo y M. T. Alda, del Instituto "Jaime Ferrán", y a la señorita Fca. García, del Instituto "Daza de Valdés".

## SUMMARY

*Identification, by infra red spectroscopy, of the immunogenic molecules produced from beta-lactam antibiotics*

Molecular variations produced by biochemical degradation in some  $\beta$ -lactam antibiotics as well as the immunoreactive properties were studied by infra red spectroscopy and intradermo reactions on rabbits, respectively.

Once again the higher levels of immunogenicity were conditioned in the presence of penicillenic acid (PNCE) —as a major antigenic determinant— which may be produced together with other amount of penicilloic acid (PNCA) during unsuitable conservative conditions of the antibiotic solutions.

These haptenic molecules can be formed as impurities in the slightly acidified penicillin solutions when they have been submitted to 37 °C for 36 h. The presence of this substances can be detected by the following characteristic bands; for PNCE, they are located at the 2,500 and 1,230  $\text{cm}^{-1}$  and for PNCA at 2,564 and 1,396  $\text{cm}^{-1}$ , respectively.

## BIBLIOGRAFIA

1. ARCOS, J. M., y CHORDI, A. 1968. Efectos de la glucosamina sobre conjugación de penicilina-albúmina sérica. *Laboratorio*, 278, 401.
2. BATCHELOR, F. R.; DEWDNEY, J. M.; FEINBERG, J. G., y WESTON, R. D. 1967. A penicilloylated protein impurity as a source of allergy to benzylpenicillin and 6-amino-penicillamic acid. *Lancet*, I, 1.175.
3. BELLAMY, L. J. 1964. *The infrared spectra of complex molecules*. Methuen & Co., Londres.
4. BELLAMY, L. J. 1968. *Advances in infrared group frequencies*. Methuen & Co., Londres.
5. BUNN, P.; CANARILE, L., y O'BRIEN, J. 1963. Immunologic distinction among six penicillins as measured by a hemagglutination technique. *Proc. Int. Congr. Chemother.* 3rd, 1.442.
6. DUNCAN, A. B. F.; GORDY, W.; JONES, R. N.; NATSEN, F. A.; SANDORFY, C., y WEST, W. 1956. *Techniques of Organic Chemistry. IX. Chemical Applications of Spectroscopy*. Interscience Publ., Londres-N. Y.
7. GAYET, J. 1967. Valeur du test cutané à la penicilloyl polylysine pour le diagnostic biologique des allergies à la penicilline. Thèse, Faculté de Médecine et Pharmacie, Lyon.

8. HIDALGO, A. 1955. Spectres d'absorption infrarouge du thiophene et de derivés mono et disstitués. *J. Phys. Radium*, 16, 366.
9. JONES, R. N., y SANDORFY, C. 1956. *Techniques of Organic Chemistry. IX. Chemical Applications of Spectroscopy*, 247. Interscience Publ., Londres-N. Y.
10. LECOMTE, J. 1958. *Spectroscopie dans l'infrarouge*. *Hadb. Phys. II*. Ed. H. von S. Flugge-Springer Verlag, Berlín.
11. LEVINE, B. B. 1964. Immunochemical mechanisms involved in penicillin hypersensitivity in experimental animal and in human beings. Therapy with the new penicillins. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 24, 45.
12. LEVINE, B. B. 1965. The nature of the antigen-antibody complexes which initiate anaphylactic reactions II. The effect of molecular size on the abilities of homologous multivalent benzylpenicillyl haptens. *J. Immunol.*, 94, 121.
13. LEVINE, B. B.; FELLNER, M., y LEVYTSKA, V. 1966. Benzylpenicilloyl specific serum antibodies to penicillin in man. I. Development of a sensitive haemagglutination assay method and haptenic specificities of antibodies. *J. Immunol.*, 96, 707.
14. PARKER, C. W. 1964. The immunochemical basis for penicillin allergy. Therapy with the new penicillins. *Proc. Conf. Apoth. Hall London*.
15. PARKER, C. W. 1965. Immunochemical mechanisms in penicillin allergy. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 24, 51.
16. PARKER, C. W.; ALAIN, L.; WECK, M. D. de; MILTON, K., y EISEN, H. N. 1962. The preparation and some properties of penicillic acid derivatives relevant to penicillin hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 115, 805.
17. PARKER, C. W.; SHAPIRO, J.; MILTON, K., y EISEN, H. N. 1962. Hypersensitivity of penicillic acid derivatives in human beings with penicillin allergy. *J. Exp. Med.*, 115, 821.
18. PLOQUIN, J. de; LE RESTE, S., y SPARFIEL, L. 1968. Les nouvelles penicillines. *Prod. Probl. Pharm.*, 23, 258.
19. PORTOLÉS, A. 1972. Estudio sobre reacciones inmunitarias frente a los antibióticos beta-lactámicos. Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid.
20. PORTOLÉS, A.; TEJERINA, G., y PÉREZ-UREÑA, T. 1967. Studium der Penicillin-antikörperbildung in Anwesenheit von Glucosamin. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 7, 263.
21. RAO, C. N. R. 1963. *Chemical Applications of Infrared Spectroscopy*. Acad. Press., N. Y.
22. SCHNEIDER, C. H., y WECK, A. L. de. 1965. A new chemical aspect of penicillin allergy: the direct reaction of penicillin with  $\epsilon$ -aminogroups. *Nature*, 208, 57.
23. SIEGEL, B. B. 1962. Studies in penicillin hypersensitivity. V. Further studies on antigenic properties of altered penicillin. *J. Allergy*, 33, 349.
24. SIEGEL, B. B., y COLEMAN, M. 1957. Studies in penicillin hypersensitivity. IV. Antigenic properties of altered procaine penicillin. *J. Allergy*, 28, 264.
25. STEWART, G. T. 1967. Allergenic residues in penicillins. *Lancet*, 1, 1.177.

26. TENNET, D. M.; MASON, R. C.; KURON, G. W.; WALIANT, M. E., y SOLOTOVSKY, M. 1957. Binding of novobiocin with plasma proteins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94, 814.
27. TORII, T., y KOHORIUCHI, Y. 1961. Antigenicity of penicillin and its relation to albumin binding. *Nature*, 192, 429.
28. WECK, A. L. de, y BLUM, G. 1963. Un nouveau test cutané pour la detection de l'allergie à la penicilline. *Prax. Rev. Suis. Med.*, 52, 67.
29. WELLENSIEK, H. J. 1969. Immunogenicity of semisynthetic penicillins. *Bayer-Symposium. I. Current Problems in Immunology*, 310. Springer Verlag, Berlin.

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

ULTRASTRUCTURE OF STABLE  
L PHASE OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*  
CAUSING TUMOR FORMATION IN  
*PHASEOLUS VULGARIS* L. (\*)

by

M. RUBIO-HUERTOS, R. BELTRÀ and M. SANTAOLALLA

INTRODUCTION

L forms induced by high concentrations of glycine have been reported for several species of bacteria (4, 5, 8, 15 and 19).

In *Agrobacterium tumefaciens* L forms induced by glycine were described by Rubio and Desjardins (16). These L forms were unstable or revertant; thus, when they were cultivated in a medium without glycine or inoculated on *Phaseolus vulgaris* they reverted to the normal bacillary form.

Rubio-Huertos and Beltrà (15), working with a different strain of *Agrobacterium tumefaciens* and by means of more than 40 passages through media with 4 % glycine, obtained L forms which did not revert to the normal form when subcultured in media without glycine. These L forms were pathogenic on *Phaseolus vulgaris* L., forming tumors of the same appearance and histology as ones induced by normal *A. tumefaciens*.

---

(\*) Parte del trabajo presentado al X Congreso Internacional de Microbiología, Méjico, 1970.

L forms were recovered from tumors induced by them and subcultured in normal culture media. This, we believed, was the first report of experimentally induced L forms being pathogenic for plants.

In view of the recent discovery of *Mycoplasma*-like organisms causing different diseases in plants which until now were believed caused by viruses (2, 6 and 12) and due to the similarity between L forms and *Mycoplasma*, we studied the electron microscopy of these L forms outside and inside the host cells.

## MATERIAL AND METHODS

### *L phase*

L phase from *Agrobacterium tumefaciens* obtained previously by the authors (15) were cultured in agar glucose slants and in broth-glucose. From these we made inoculations into stems of *Phaseolus vulgaris* L to obtain the tumors which were used for ultrathin sections. These L forms are resistant to osmotic shock and can be suspended in distilled water with no lysis.

### *Electron microscopy*

Suspension in distilled water of L forms from cultures on solid media were shadow-casted, after drying, with gold palladium for direct observation with the electron microscope. Ultrathin sections were made of pellets of centrifuged L forms from liquid cultures and fixed for 2 hours at 4 °C in 2 % osmium tetroxide in Palade's veronal acetate buffer containing 1 % CaCl<sub>2</sub>.

Tissues were excised from 3 week old tumors induced in *Phaseolus vulgaris* by inoculations with L forms. These tissues were fixed in the same fixative as for L form cultures; both L forms from cultures and tissues from tumors were dehydrated in acetone after fixation and embedded in durcupan. Thin sections cut in an LKB ultramicrotome with glass knives, and stained with lead citrate for 15 minutes were observed with a Siemens Elmiskop I electron microscope.

## OBSERVATIONS

*Agrobacterium tumefaciens* L forms or spheroplasts in a shadow-casted suspension were spherical 0,8 diameter except for a few cells which were two or three times bigger; they had an external plastic or flexible

cell wall and a cytoplasmic membrane. These L forms had a thick capsule composed by two morphologically different materials, one granular and the other fibrillar; the granular one can be removed by stirring the cells in cold distilled water and the fibrillar part by treatment with hot water or by strong agitation in cold water (*figure 1*).

Ultrathin sections of pellets from liquid cultures of *Agrobacterium tumefaciens* L forms showed two peripheral membranes both morphologically similar to unit membranes. A few fibrilles from the capsular material were attached to the external membrane. The cytoplasm contained ribosomes, and the nuclear material was sometimes located in the center of the cell, but generally it was diffused through the cytoplasm (*figure 2*).

Most of the cells of tissues excised from tumors induced by L forms were devoid of these microorganisms; they were vacuolated with a thin layer of cytoplasm close to the cell wall containing mitochondria, Golgi apparatus and all other normal elements of the cytoplasm; the nuclei were normal, but their nucleoli seemed to be bigger than those in normal cells of *Phaseolus vulgaris*.

In the tumoral tissues L forms were present in cells in which all the cellular elements were destroyed and in phloem tissues. They had the same ultrastructure as the ones observed from cultures, viz. a plastic or flexible outer membrane and an internal one close to the protoplast, a dark zone of cytoplasm and a nucleoid region (*figures 3-4 and 6*).

In other cells the L forms were surrounded by a dense substance which seems to affect the integrity of the microorganisms by reducing their size, modifying their shape and darkening of the entire protoplast (*figure 5*). In some of these cells only the dark substance and some remains of L forms were observable.

The modifications of shape are most remarkable. Star shaped forms are frequently observed with the protruding arms of the star being formed by prolongations of the external membrane (*figure 8*).

## DISCUSSION

Ultrastructure studies of L forms of Gram negative bacteria induced by exposure to penicillin (9, 24-25 and 27) indicated that stable L forms have only one outer layer (unit membrane) except for Hotschneider and Lorek (9) who found two membranes.

L forms of the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis* were studied by electron microscopy by Ryter and Landman (20); these L forms induced by lysozyme had no cell wall nor mesosomes. On the other hand, the stable L forms of *Clostridium tetani* obtained by glycine culture had two outer layers and mesosomes and were pathogenic (18) (figure 9).

Ultrathin sections of unstable spheroplasts of *Agrobacterium tumefaciens* induced by glycine had two outer layers. The cell wall of glycine treated cells showed a decrease in thickness of 20 % as compared with the cell wall of *A. tumefaciens* normal bacillary cells (10).

In the L forms of *Agrobacterium tumefaciens* we have studied, two outer membranes are clearly observable. Thus, morphologically, they can be termed as spheroplasts following the terminology of Brenner et al. (3). Santaolalla (21 and 23) obtained purified outer membranes or modified cell walls of these L forms and found that they were different in sugar and amino acid composition from the cell wall of the normal parental bacillary forms. He also found that the ultrastructure of the polysaccharide L phase was identical to the normal *A. tumefaciens* whereas their chemical composition differed being rhamnose and fucose absent in the L phase and were present in five oligosaccharides of the normal phase (22).

Pathogenicity and virulence of *Agrobacterium tumefaciens* usually are affected by exposure of the cells to small concentrations of glycine depending on the strains used (1 and 11); most strains do not form stable L colonies, and when inoculated into plants in L form some were pathogenic and some were not. From tumors formed by the pathogenic ones normal bacillary forms were recovered. Only two strains, both isolated from crown gall of *Vitis vinifera*, formed stable L colonies; one of these was used in the present work. Both strains were able to induce tumor formation in *Phaseolus vulgaris*, and L forms were recovered from the tumors.

Virulence in our L strains seems to be reduced by cultivation of the cells during long periods (more than 12 months) in normal culture media, but this happened to the normal parental forms too; in such cases virulence could be restored by 10 to 20 serial transfers to Pâtel medium (14). The mechanism by which virulence is lost or recovered is not known, but glycine seems only to affect the outer envelope or cell wall of *Agrobacterium tumefaciens* which probably does not account completely for loss of virulence. Mutants selected by the action of glycine probably would usually be less virulent than the normal parental strains.

The deformation and darkening of the L forms inside the host plant

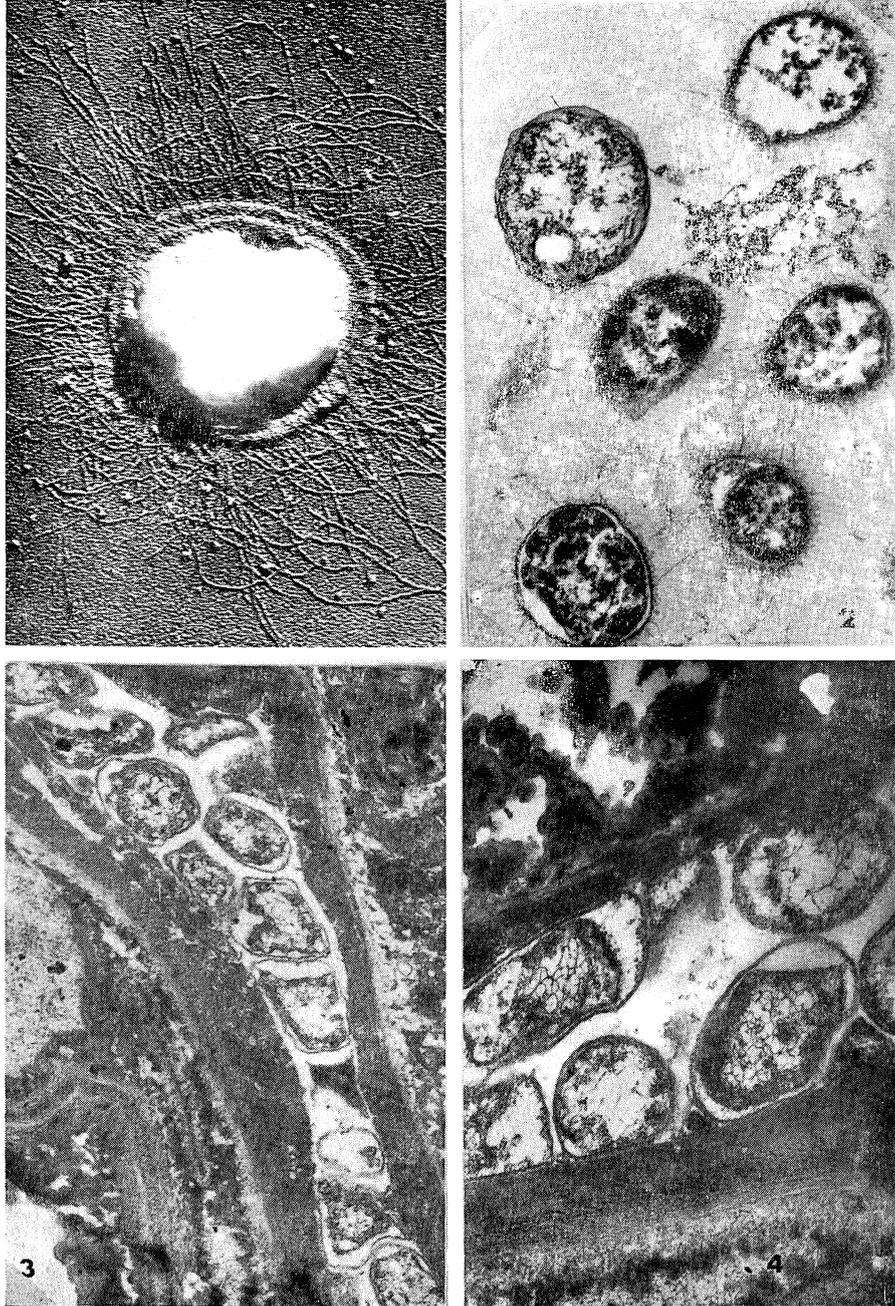


Figure 1. Shadow-casted L phase cell of *Agrobacterium tumefaciens*.  $\times 25,800$ . Figure 2. Ultrathin section of a culture of *A. tumefaciens*.  $\times 17,500$ . Figure 3. Ultrathin section of a tumor cell showing L phase cells.  $\times 16,000$ . Figure 4. The same as figure 3.  $\times 26,700$

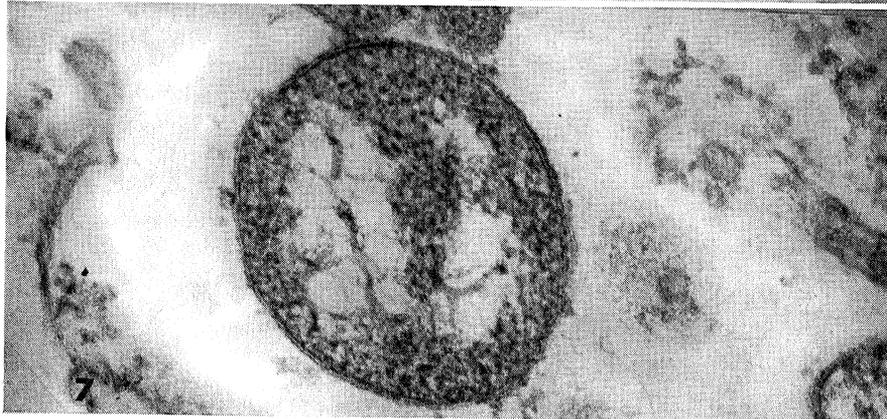
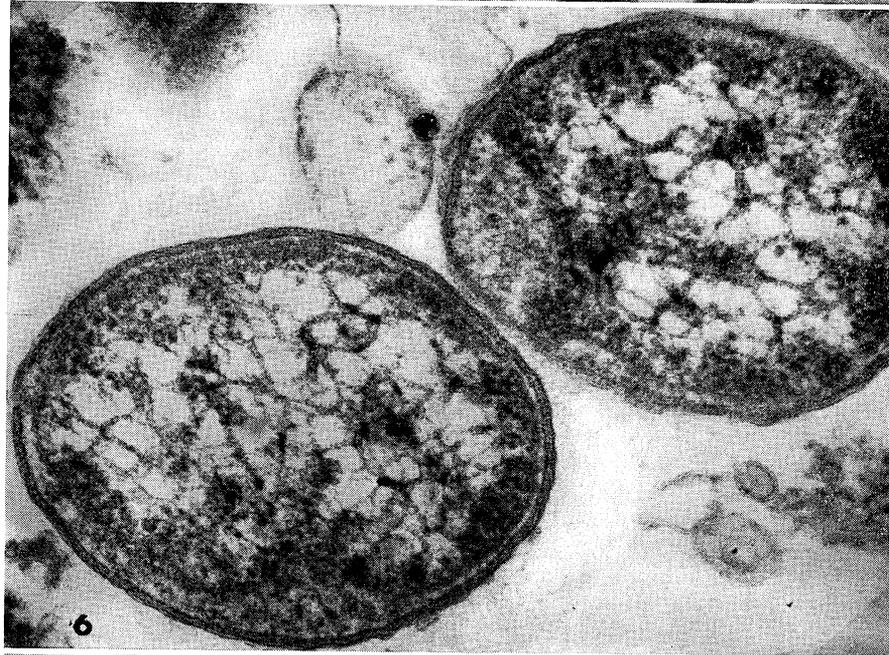
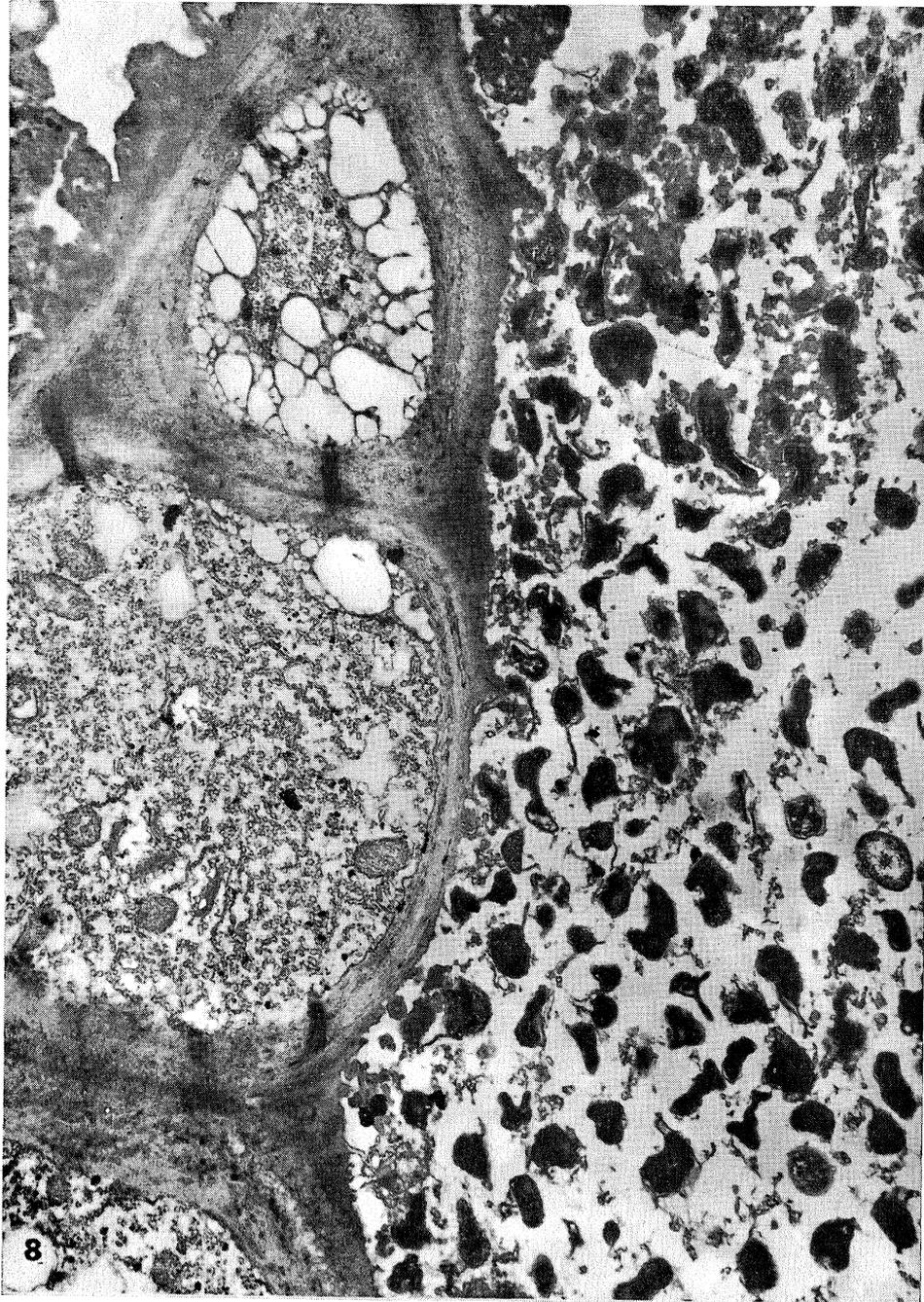


Figure 5. Degenerate L phase in the vacuole of a tumor cell.  $\times 20,000$ . Figure 6. Two non degenerated L phase cells of *A. tumefaciens* inside a tumor cell.  $\times 92,000$ . Figure 7. A Mycoplasma cell from a contaminated HeLa cell culture.  $\times 35,000$ . Compare with figure 6



*Figure 8. Degenerated L phase cells in the vascular tissue of a tumor.  $\times 13,680$*



*Figure 9. L phase cells from Clostridium tetani showing in some of them mesosomes.  $\times 31,000$*

is probably caused by interactions between the microorganisms and the host cell.

This dark substance, probably secreted by the host plant as a defensive medium, could also play some role in the formation of the new gall tissue.

The filamentous and star shaped forms found near the dark substance are morphologically similar to those found by Giannotti et al. (7) in tomato stolbur, a *Mycoplasma* disease of tomato in France.

Until now, the *Mycoplasma*-like organisms found in ultrathin sections of plants affected by several diseases believed to be caused by viruses have been shown to be bounded only by one unit membrane (figure 7), and thus are morphologically different from the L phase of *Agrobacterium tumefaciens* we have studied. However, there is a possibility that *Mycoplasma*-like organisms associated with several plant diseases are spontaneous L forms of pathogenic bacteria which, after a long period as such, do not revert to the normal parental form. Spontaneous formation of L forms in cultures was described by Klieneberger-Nobel as far as 1936 and the presence of L forms in soil, probably due to interaction between microorganisms was found by Vilas et al. (26) thus the chance of this happening seems not to be impossible.

#### SUMMARY

Ultrathin sections and shadow-casted preparations of whole cells of stable pathogenic L phase of *Agrobacterium tumefaciens* grown in broth medium showed two external layers considered as cytoplasmic membrane and defective, non rigid, cell wall.

Ultrathin sections of tumor tissues induced by inoculation of *Phaseolus vulgaris* L. with L forms contained in phloem cells L forms with the same ultrastructure as the ones grown in culture media. Some phloem cells contained a dark substance that surrounded the *Agrobacterium tumefaciens* L phase cells and seem to affect the shape and the entire spheroplast appearance.

Structural similarities and differences of L forms and the L phase of *Agrobacterium tumefaciens* are discussed in view of the possibility of plant pathogens *Mycoplasma* being spontaneous L phase derived from normal plant pathogenic bacteria.

## RESUMEN

*Ultraestructura de la fase L estable de Agrobacterium tumefaciens capaz de formar tumores en Phaseolus vulgaris L*

Secciones ultrafinas y preparaciones sombreadas con oro-paladio de la fase L estable de *Agrobacterium tumefaciens* cultivado en caldo, mostraron poseer dos membranas externas, correspondientes a la membrana citoplásmica y a la pared celular flexible.

Los tejidos tumorales inducidos por la fase L de *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. contenían formas L con la misma ultraestructura que las cultivadas en caldo. Algunas células del tumor contienen una sustancia oscura que se infiltra en las formas L produciendo su degeneración con cambio de morfología y ultraestructura.

Se discuten las diferencias y analogías entre las formas L descritas y los *Mycoplasma*, y se admite la posibilidad de que estos últimos sean formas L espontáneas de bacterias patógenas de plantas.

## REFERENCES

1. BEARDSLEY, R. E. 1962. Glycine resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol., 83, 6-13.
2. BOWYER, J. W.; ATHERTON, J. G.; TEAKLE, D. S., and AHERN, A. G. 1969. *Mycoplasma*-like bodies in plants affected by legume little leaf, tomato big bud and lucerne witches broom diseases. Aust. J. Biol. Sci., 22, 271-74.
3. BRENNER, S.; DARK, F. A.; GERHARDT, P.; JEYNES, M. H.; KANDLER, O.; KELLEMBERGER, E.; KLIENEBERGER-NOBEL, E.; MCQUILLEN, K.; RUBIO-HUERTOS, M.; SALTON, M. R. J.; STRANGE, R. E.; TOMSIK, J., and WEIBULL, C. 1958. Bacterial protoplasts. Nature, 181, 1713.
4. DIENES, L.; WEINBERGER, H. J., and MADOFF, S. 1950. The transformation of typhoid bacilli into L form under various conditions. J. Bacteriol., 59, 755-64.
5. DIENES, L., and ZAMECNIK, P. C. 1952. Transformation of bacteria into L form by amino acids. J. Bacteriol., 64, 770-71.
6. DOI, Y.; TERANAKA, M.; YORA, K., and ASUYAMA, H. 1967. *Mycoplasma* —or-PLT group— like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows, or *Paulownia* witches broom. Ann. Phytopathol. Soc. Jap., 33, 259-66.
7. GIANNOTTI, J.; MARCHOUX, G., et DEVAUCHELLE, G. 1969. Remarques à propos de l'observation des microorganismes de type mycoplasme chez les Solanées maraichères. Ann. Phytopathol., 1, 419-32.

8. GORDON, J., and GORDON, M. 1943. Involution forms of the genus *Vibrio* produced by glycine. *J. Pathol. Bacteriol.*, 55, 63-68.
9. HOFSCHEIDER, P. H., and LOREK, H. 1962. Studies on the residual cell wall structures of *E. coli* and *B. megaterium* spheroplasts and of L forms of *Proteus mirabilis*. *Electron Microsc. Proc. Int. Congr.* 5th.
10. KURDJIAN, A.; RYTER, A., et MANIGAULT, P. 1966. Action de la glycine sur la structure de la paroi de différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*Escherichia coli*. *J. Microsc.*, 5, 605-18.
11. LANEN, J. M. van; BALDWIN, I. L., and RIKER, A. 1952. Attenuation of crown gall bacteria by cultivation in media containing glycine. *J. Bacteriol.*, 63, 715-21.
12. MARAMOROSCH, K.; SHIKATA, E., and GRANADOS, R. R. 1968. Structures resembling *Mycoplasma* in diseased plants and insect vectors. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 30, 841-55.
13. MCQUILLEN, K. 1960. Bacterial protoplasts. *Bacteria*, 1, 249-359.
14. PATEL, M. K. 1926. An improved method of isolating *Pseudomonas tumefaciens* Smith and Town. *Phytopathology*, 16, 577-79.
15. RUBIO-HUERTOS, M., and BELTRÁ, C. 1962. Fixed pathogenic L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 195, 101.
16. RUBIO-HUERTOS, M., and DESJARDINS, P. R. 1956. Microscopía electrónica de las formas L y filtrables del *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, 9, 375-80.
17. RUBIO-HUERTOS, M., and GONZÁLEZ, C. 1960. Morphology and pathogenicity of L forms of *Clostridium tetani* induced by glycine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 79, 626-31.
18. RUBIO-HUERTOS, M., y GONZÁLEZ, C. 1965. Estudio de secciones ultrafinas de *Clostridium tetani* y sus formas L fijas, por microscopía electrónica. *Microbiol. Españ.*, 18, 1-11.
19. RUBIO-HUERTOS, M.; KUSTER, E., und FLAIG, W. 1955. Licht und elektronenmikroskopische untersuchungen and L-formen bei *Pseudomonas fluorescens*, *B. proteus* und *Rhizobium*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1*, 162, 24-31.
20. RYTER, A., and LANDMAN, O. E. 1968. Morphological study of the attachment of nucleoid to membrane in bacilli, protoplasts and reverting protoplasts of *Bacillus subtilis*. *Microbiol protoplasts, spheroplasts and L forms*, 110-23. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
21. SANTAOLALLA, M. 1963. Obtención y análisis químico de paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas. *Microbiol. Españ.*, 16, 25-39.
22. SANTAOLALLA, M. 1971. Estructura y composición química del lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, 24, 243-56.
23. SANTAOLALLA, M., y RUBIO-HUERTOS, M. 1969. Ultraestructura y análisis químico de las paredes celulares de *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas L. Libro-homenaje al Prof. D. Obdulio Fernández y Rodríguez, 403-18. Real Academia de Ciencias.

24. THORSSON, K. G., and WEIBULL, C. 1958. Studies on the structure of bacterial L forms, protoplasts and protoplasts-like bodies. *J. Ultrastruct. Res.*, 1, 412-27.
25. TULASNE, R.; MINCK, R., and KIRN, A. 1962. Etude comparative au microscope électronique, d'un *Proteus* et des formes L des types A et B correspondantes. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 102, 292-99.
26. VILAS, L.; TEJERINA, G., et RUBIO, M. 1954. Présence des bactéries du sol sous leur forme filtrable. *C. R. V<sup>e</sup> Congr. Int. Sci. Sol. III*, 141-50.
27. WEIBULL, C. 1965. Structure of bacterial L forms and their parent bacteria. *J. Bacteriol.*, 90, 1467-80.

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

OMS  
CENTRO NACIONAL DE LA GRIPE. BARCELONA

## AISLAMIENTO DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL. A PROPOSITO DEL ESTUDIO DE UN BROTE EPIDEMICO

por

A. PUMAROLA, A. RODRÍGUEZ-TORRES, MARÍA BELTRÁN  
y M. CARBONELL-JUANICO

### INTRODUCCION

El virus respiratorio sincital es el agente productor de enfermedades respiratorias agudas más importantes en la primera infancia, considerándose responsable del 15 % de los casos en comunidades abiertas y del 21 al 25 % de los procesos respiratorios infantiles que requieren hospitalización (1, 6-7, 9 y 11). En trabajos anteriores describimos el diagnóstico serológico de varios brotes epidémicos por virus respiratorio sincital en una comunidad infantil (15) y de casos en niños hospitalizados (13).

Durante los meses de diciembre de 1968 y enero de 1969 pudimos estudiar, mediante aislamiento y serología, un brote epidémico de procesos respiratorios agudos en una comunidad infantil, en el curso del cual logramos aislar 2 cepas de virus respiratorio sincital por primera vez en nuestro país. El estudio biológico del mencionado brote es el objeto del presente trabajo.

## DESCRIPCION DEL BROTE EPIDEMICO

A mediados del mes de diciembre de 1968 enfermaron varias niñas de la sala de destetes II del Instituto de Puericultura de la Maternidad Provincial de Barcelona. Resultaron afectadas un 40 % de las niñas albergadas, cuyas edades oscilaban entre los 2 y 3 años y medio de edad. El proceso respiratorio agudo que presentaron fue de bronquitis febril, que en 2 de los 8 casos registrados dio lugar a un síndrome bronconeumónico ligero.

A finales del mes de diciembre y comienzos de enero se produjeron numerosos casos de rinofaringitis con fiebre elevada, simultáneamente en una sala de niños de 2 a 3 años y medio de edad (Cambó I), y en dos salas de niños cuyas edades oscilaban entre 1 y los 2 años (salas 7 y 5). En la sala de los mayores enfermó el 52,3 % de los niños y el cuadro por la temperatura elevada, parecía un síndrome gripal; en las salas de los niños y niñas menores, el proceso afectó a la casi totalidad de los mismos (*cuadro 1*).

En conjunto, de los 86 niños residentes en las cuatro salas sufrieron la enfermedad en forma clínicamente aparente 61 (70,9 %).

En la misma Institución, pero en diferentes salas, se produjo durante la misma época un brote epidémico, por virus parainfluenza tipo 3, cuyo estudio biológico fue objeto de una comunicación (14).

## MATERIAL Y METODOS

### *Material clínico*

Para conocer la etiología del brote epidémico se seleccionó una muestra del 20 % de los enfermos, aproximadamente. Estos casos se estudiaron mediante el intento de aislamiento de virus a partir de frotis faríngeo y la obtención de 2 sueros (en algunos casos 3) para la práctica de reacciones serológicas (*cuadro 1*). En total, se estudiaron 16 casos: 10 mediante aislamiento y serología, 4 sólo por serología y 2 sólo por aislamiento (*cuadro 2*). El aislamiento se practicó en 12 casos y la serología en 14.

*Cuadro 1. Brote epidémico de procesos respiratorios agudos por virus respiratorio sincitial en 4 salas del Instituto de Puericultura, en diciembre de 1968-enero de 1969*

Niños residentes				Niños con procesos respiratorios agudos		Casos estudiados mediante:							
						Aislamiento del virus				Serología (reacción fijon. compl.)			
Sala	Sexo	Edades	Número	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje de enfermos	Diagnóstico (virus aislados)	Porcentaje	Número	Porcentaje de enfermos	Diagnóstico serológico	Porcentaje
Destetes II	H.	2-3½ años	20	8	40	2	25	0	0	2	25	2	100
Cambó I	V.	2-3½ años	21	11	53,3	5	45,4	0	0	3	27,2	3	100
Sala 7	V. y H.	1-2 años	23	21	91,3	4	19,04	2	50	6	28,5	4	66,6
Sala 5	V. y H.	1-2 años	22	21	95,4	1	4,7	0	0	3	14,2	2	66,6
			86	61	70,9	12	19,6	2	16,6	14	22,9	11	78,5

*Cuadro 2. Casos de infección por virus respiratorio sincitial*

Aislamiento							Serología				
Sala	Fecha del comienzo de la enfermedad	Nombre	Años y meses	Cuadro clínico	Días en relación con el comienzo	Resultado	Días de los sueros en relación con el comienzo	Reacción fijon. compl.			
								Resp. sincitial	Parainfluenza		
								1	2	3	
Destete II	13-12-68	Margarita	3,6	Neumonía	+ 5	—	+ 5	64	0	0	0
	16-12-68	Esther	3,0	Bronquitis	+ 2	+	+ 22	32	0	0	0
							Herpes simplex	+ 2	0	0	0
							+ 19	32	0	0	0
Cambó I	30-12-68	Miguel A.	1,9	Rinofaringitis febril	+ 2	—	+ 3	64	0	0	0
	30-12-68	Jorge T.	3,0	Rinofaringitis febril	+ 2	—	+ 19	256	0	0	0
							+ 45	32	0	0	0
	30-12-68	Jorge R.	1,6	Rinofaringitis febril	+ 2	—					
	3-1-69	Pedro	3,0	Rinofaringitis febril	+ 2	—	+ 6	512	0	0	0
+ 31							512	0	0	0	
4-1-69	Mauricio	3,0	Rinofaringitis	+ 1	—	+ 4 ½	16	0	0	32	
						+ 5	64	0	0	0	

Sala 7	29-12-68	Paquito	1,0	Rinofaringitis febril	+ 5	+	+ 11	8	0	0	0
						Herpes simplex	+ 21	8	0	0	0
	3-1-69	Javier	2,6	Rinofaringitis febril	+ 1	+	+ 6	128	0	0	0
						Resp. sincitial	+ 26	512	0	0	0
							+ 31	512	0	0	0
	4-1-69	Federico	2,3	Rinofaringitis febril	+ 1	—	+ 5	256	0	0	0
							+ 25	64	0	0	0
	4-1-69	Jorge	2,5	Rinofaringitis febril	+ 1	+	+ 5	64	0	0	0
						Resp. sincitial	+ 25	32	0	0	0
	4-1-69	Manuel	1,9	Rinofaringitis febril			+ 5	64	0	0	0
							+ 30	256	0	0	0
	4-1-69	Juan Carlos	2,1	Rinofaringitis febril			+ 5	8	0	0	0
							+ 25	0	0	0	0
Sala 5	2-1-69	M. <sup>a</sup> Gloria	1,0	Rinofaringitis febril			+ 2	0	0	0	0
							+ 16	128	0	0	0
	3-1-69	Juan Carlos	1,2	Rinofaringitis febril			+ 1	8	0	0	0
							+ 15	64	0	0	0
	4-1-69	Francisco	1,6	Rinofaringitis febril	+ 1	—	+ 5	8	0	0	0
							+ 30	16	0	0	0

---

### *Métodos*

#### *Aislamiento de virus*

Se utilizaron células KB desarrolladas en medio de hidrolizado de lactoalbúmina en solución de Hanks, con 10 % de suero de ternera. Para la supervivencia sustituimos el suero de ternera por un 30 % de líquido amniótico bovino. En algún caso, los segundos pases se realizaron sobre células HEP-2, desarrolladas y mantenidas en los medios anteriores.

El frotis faríngeo obtenido durante los 5 primeros días de la enfermedad fue sembrado directamente, a la cabecera del enfermo, sobre frascos de 60 ml de capacidad, con el cultivo celular bien desarrollado en supervivencia.

A las 4 h realizamos un tratamiento antibiótico para suprimir la contaminación bacteriana, cambiando el medio de supervivencia por otro nuevo adicionado de 9.000 U/ml de penicilina, 900  $\mu$ g/ml de estreptomomicina y 0,5 U/ml de micostatina. Tras 30 min, a 33 °C, se cambió de nuevo el medio por otro con las cantidades habituales de antibióticos.

El cultivo celular se incubó a 33 °C. La lectura para la detección de la aparición de acciones citopáticas la realizamos diariamente, durante 14 días, cambiando el medio de supervivencia cada 4 días, o más precozmente si se observaba acidificación excesiva.

De todos los aislamientos se realizaron 3 pases sucesivos antes de considerarlos negativos.

#### *Serología*

Se obtuvo un suero precoz durante los 5 primeros días de la enfermedad y un suero tardío, aproximadamente, a los 15 días del anterior. En algunos casos, para detectar un posible descenso del título de anticuerpos, se obtuvo un tercer suero. Los sueros repartidos en pequeños volúmenes se conservaron a — 20 °C hasta el momento de su ensayo.

Se estudiaron los sueros obtenidos mediante la reacción de fijación del complemento, realizada por el micrométodo en tubos de Sohler (16), del tipo Kolmer, con fijación en frío. La reacción se consideró positiva cuando la hemólisis fue nula (++++) o como máximo del 20 % (+++). Se utilizaron 2 U de antígeno fijador de complemento de virus respiratorio sincitial preparado mediante cultivo de la cepa Long sobre cé-

lulas KB. Se ensayaron simultáneamente los sueros en su primera dilución frente a un antígeno de células KB.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el estudio de los 16 casos se resumen en el *cuadro 2*.

### *Aislamiento de virus*

De los 12 casos estudiados, se aislaron 4 cepas de virus, 2 de ellas con una acción citopática intensa y característica, se identificaron fácilmente por reacción de fijación del complemento como virus herpes simplex, virus que se encontraba probablemente en fase de latencia y que se reactivó por el proceso respiratorio.

En 2 casos de la sala 7, se aisló un virus con acción citopática sincitial (*cuadro 3*). Dicha acción se observó en ambos casos al segundo pase, que en uno de ellos fue realizado sobre células HEp-2. En ambos casos, desde el momento en que la acción citopática fue evidente, la reacción de fijación del complemento resultó positiva, poniendo de manifiesto la existencia del antígeno fijador del complemento del virus respiratorio sincitial. Por consiguiente, para la identificación no fue necesario practicar la reacción de neutralización. Teniendo en cuenta que la acción citopática es idéntica a la que produce el virus parainfluenza tipo 3, se realizó una prueba de hemaglutinación con hematíes de cobayo, que en ambos casos resultó negativa.

Mediante cultivos de células KB en cubreobjetos por la técnica de Barski pudimos estudiar preparaciones teñidas (eritrosina-orange G-azul de toluidina) en las que se apreció la típica acción citopática del virus aislado, formación de sincitios con los núcleos en la periferia e inclusiones citoplásmicas eosinófilas rodeadas de un halo claro.

### *Serología*

En conjunto, de los 14 casos estudiados mediante la reacción de fijación del complemento, practicada en 2 ó 3 sueros, se consiguió el diagnóstico serológico de infección por virus respiratorio sincitial en 11 (78,5 %). En todos los casos, la reacción de fijación del complemento frente a los antígenos de virus parainfluenza tipos 1, 2 y 3, fue negativa.

*Cuadro 3 Aislamiento de virus respiratorio sincitial*

Nombre	Años y meses	Cuadro clínico	Días en relación con el comienzo de la enfermedad	Primer pase		Segundo pase		Tercer pase		Identificación
				Células	Acción citopática	Células	Acción citopática	Células	Acción citopática	
Javier	2,6	Rinofaringitis febril	+ 1	KB	0 al 12.º d	HEp-2	+ al 7.º d	HEp-2	+ al 6.º d	Reacción fijon. compl.
Jorge	2,5	Rinofaringitis febril	+ 1	KB	0 al 12.º d	KB	+ al 8.º d	KB	+ al 3.º d	Reacción fijon. compl.

El diagnóstico serológico (*cuadro 4*) se consiguió en 6 casos por la demostración de un aumento significativo de anticuerpos (4 veces) en 2 sueros sucesivos, 5 casos presentaron títulos de 64, en algunos acompañados de una disminución 4 veces en un tercer suero, lo que si tiene valor de presunción diagnóstica en el estudio de casos aislados, adquiere en este brote epidémico un valor más concluyente. Sólo en 3 casos la reacción de fijación del complemento no permitió el diagnóstico, pero en todos ellos se observaron títulos positivos no significativos.

*Cuadro 4. Diagnóstico serológico*

Número de casos estudiados (2 ó más sueros)	Reacción de fijación del complemento, virus respiratorio sincitial			
	Aumento significativo (*)	Títulos significativos (**)	Títulos no significativos	Títulos negativos
14	6 (42,8 %)	5 (35,7 %)	3 (21,4 %)	0
	11 (78,5 %)		3 (21,4 %)	

(\*) 4 veces el título. (\*\*) 64 veces el título.

## DISCUSION

La importancia y amplia difusión del virus respiratorio sincitial en las comunidades infantiles cerradas ha sido puesta de manifiesto por diversos autores (2, 4-5, 10 y 17-18). En un trabajo anterior (15) demostramos que dicho virus era el responsable del 24,82 % de todos los procesos respiratorios agudos ocurridos entre diciembre de 1965 y abril de 1967 en la misma Institución que ahora estudiamos.

La difusión epidémica del virus respiratorio sincitial en el Instituto de Puericultura tuvo lugar en invierno (diciembre, 1968-enero, 1969). El brote se inició en una sala de niñas de 2 a 3 años y medio de edad, propagándose después a otras tres salas. El porcentaje de niños afectados fue variable (entre el 40 y el 95,4 %), pero destaca que la morbilidad fue mucho menor entre los niños mayores que entre los de 1 a 2 años, quienes resultaron afectados en su casi totalidad. Estos datos son similares

a los que observamos en el estudio de tres brotes epidémico en años anteriores (15), aunque algo superiores entre los niños de menor edad.

Clínicamente, los cuadros fueron benignos y, en general, con afectación exclusiva del tracto respiratorio superior. Los 2 únicos casos de afectación severa del tracto respiratorio inferior fueron procesos bronconeumónicos en 2 niñas de más de 3 años de edad albergadas en una sala donde la infección cursó con afectación bronquial.

El aislamiento del virus respiratorio sincitial resulta extremadamente difícil por las razones siguientes:

1. Es extraordinariamente lábil a la acción de los agentes exteriores y soporta mal la congelación, por cuyos motivos debe realizarse la inoculación directa.
2. Aunque las líneas celulares continuas se prefieren para el aislamiento, su sensibilidad al crecimiento del virus varía notablemente de unas cepas celulares a otras.
3. En los medios de cultivo celular existen con frecuencia inhibidores del virus respiratorio sincitial, en particular en el suero.

Las muestras deben ser inoculadas lo más rápidamente posible (8), y diversos autores (6 y 10) han demostrado que la congelación de los productos patológicos es nefasta para el virus. La técnica de la inoculación directa de los cultivos celulares a la cabecera del enfermo, introducida por Berglund (3), aumenta notablemente las posibilidades de aislamiento.

En el presente trabajo hemos intentado el aislamiento del virus según la técnica de inoculación directa que se sigue en el laboratorio de Virología del Prof. Sohier, de Lyon (12). Teniendo en cuenta la influencia de la presencia del suero como posible inhibidor, el medio de supervivencia celular contiene en su lugar un 30 % de líquido amniótico bovino.

De los 12 casos estudiados logamos el aislamiento de virus respiratorio sincitial en 2 (16,6 %), cifra baja, indudablemente, pero muy satisfactoria si se considera cuán difícil resulta el aislamiento de este virus. En ambos casos, el frotis faríngeo fue practicado durante el primer día de enfermedad.

La identificación mediante la reacción de fijación del complemento fue muy rápida y evidente en los 2 casos, haciendo innecesaria la práctica de reacciones de neutralización.

Hemos realizado la reacción de fijación del complemento utilizando 2 U de antígeno, como hacemos sistemáticamente con todos los antígenos de virus respiratorios. No repetimos la reacción con 4 U, en los casos en

que aquélla resultó negativa, lo que nos hubiera permitido probablemente reducir el número de dichos casos, porque en estas circunstancias epidemiológicas la reacción con 2 U se mostró satisfactoria en nuestros trabajos anteriores (15).

En el 75,5 % de los casos se consiguió el diagnóstico serológico, y los restantes presentaron también títulos indicativos de infección con el virus respiratorio sincitial, pero que no permitían la certeza de enfermedad actual. Los casos en niños de 2 a 3 y medio años de edad se diagnosticaron en su totalidad, mientras que en los menores (1-2 años) sólo se consiguió el diagnóstico en el 66,6 %, lo cual se debe sin duda a la deficiente respuesta inmunitaria en los niños pequeños.

#### RESUMEN

Durante el mes de enero de 1969 se presentó un brote epidémico de procesos respiratorios agudos entre los niños acogidos en una institución de Barcelona. Resultó afectado un 70 % de los niños de 1 a 3 años y medio de edad, residentes en salas de la institución.

En una muestra de los enfermos se investigó la etiología mediante el aislamiento de virus a partir de frotis faríngeos inoculados directamente sobre células KB y la práctica de la reacción de fijación del complemento en 2 sueros sucesivos.

Se aislaron 2 cepas de virus respiratorio sincitial, y se diagnosticó serológicamente la infección por el mismo virus en un 75 % de los casos estudiados.

Se describen las características clínicas y epidemiológicas del brote y se comentan los resultados del estudio virológico.

#### SUMMARY

*Isolation of respiratory syncytial virus. Study of an epidemic outbreak*

In January 1969, an outbreak of respiratory virus disease in a children's community occurred. 70 % of the children, aged 1 to 3 ½ years, were affected.

For the first time in Spain, two strains of respiratory syncytial virus

were isolated and the serological diagnostic was established in 75 % of paired sera.

The main clinical and epidemiological features of the epidemic are described and the serological results discussed.

### BIBLIOGRAFIA

1. BERGLUND, B. 1967. *Acta Paediat. Scand.*, 56, 395.
2. BERGLUND, B., y STRAHLMANN, C. H. 1967. *Acta Paediat. Scand.*, Suppl., 176.
3. BERGLUND, B.; VIHMA, L., y WICKSTROM, J. 1964. *Amer. J. Epidemiol.*, 81, 271.
4. BERKOVICH, S., y TARANKO, L. 1964. *Pediatrics*, 34, 753.
5. BRETON, A.; SAMAILLE, J.; GAUDIER, B.; LEFEVRE, G., y BONTE, C. 1961. *Arch. Fr. Pediat.*, 18, 459.
6. CHANOCK, R. M.; KIM, H. W.; VARGOSKO, A. J.; DELEVA, A.; JOHNSON, K. M.; CUMMING, G., y PARROT, R. H. 1961. *J. Amer. Med. Ass.*, 176, 647.
7. CHANOCK, R. M., y PARROT, R. H. 1965. *Pediatrics*, 36, 21.
8. HAMPARIAN, V. V.; KETLER, A.; HILLEMANN, M. R.; REILLY, C. M.; McLELLAND, L.; CORNFELD, D., y STOKES, J. 1961. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 106, 717.
9. HILLEMANN, M. R.; HAMPARIAN, V. V.; KETLER, A.; REILLY, C. M.; McLELLAN, L.; CORNFELD, D., y STOKES, J. 1962. *J. Amer. Med. Ass.*, 180, 445.
10. KAPIKIAN, A. Z.; BELL, J. A.; MASTROTA, F. M.; JOHNSON, K. M.; HUEBNER, R. J., y CHANOCK, R. M. 1961. *Amer. J. Hyg.*, 74, 234.
11. PARROT, R. H.; VARGOSKO, A. J.; KIM, H. W.; CUMMING, G.; TURNER, H. C.; HUEBNER, R. J., y CHANOCK, R. M. 1961. *J. Amer. Med. Ass.*, 173, 653.
12. PEYRON, L. 1968. Thèse pour le doctorat de l'Université de Lyon. Section de Pharmacie.
13. PUMAROLA, A.; CRUZ, M.; RODRÍGUEZ-TORRES, A.; CORRETGER, J. M., y SÁNCHEZ, E. 1967. *Arch. Pediat.*, 105, 571.
14. PUMAROLA, A.; RODRÍGUEZ-TORRES, A., y BELTRÁN, M. 1969. Virus parainfluenza tipo 3 en una colectividad infantil. Resúmenes II Congr. Nacl. Microbiol., Madrid, 50.
15. PUMAROLA, A.; RODRÍGUEZ-TORRES, A.; CARBONELL-JUANICO, J., y CARBONELL-ESTRANY, X. 1968. *Rev. Hyg. Méd. Prev.*, 16, 281.
16. SOHIER, R.; PEILLARD, M. M.; GINESTE, J., y PREYDIER, J. 1956. *Ann. Biol. Clin.*, 14, 281.
17. STERNER, G.; DE HEVESY, G.; PORSGREN, M.; TUNEVALL, G., y WOLONTIS, S. 1965. *Acta Paediat. Scand.*, 54, 336.
18. STERNER, G.; WOLONTIS, S.; BLOTH, B., y DE HEVESY, G. 1966. *Acta Paediat. Scand.*, 55, 273.

## PROF. GERARDO CLAVERO DEL CAMPO (†)

Como triste recuerdo de este año, 1972, hemos de lamentar el fallecimiento del que fue Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles —hoy, Sociedad Española de Microbiología— Prof. Gerardo Clavero del Campo. Por razón de edad se había retirado de las actividades que con gran celo había desempeñado en los campos de la ciencia, la docencia y la organización sanitaria. Su temperamento abierto, amistoso y generoso, clave de su amable humanidad, nos ha dejado un ejemplar recuerdo.

Fue Catedrático de Higiene en las Facultades de Medicina de las Universidades de Cádiz y Zaragoza, Director de la Escuela Nacional de Sanidad, en Madrid, y representante de España, durante muchos años, en la Organización Mundial de la Salud, en su sede de Ginebra. Luchó con éxito contra el brote epidémico de tifus exantemático que surgió en la postguerra española, datando de entonces la cepa "E" de *Rickettsia prowazeki*, de singulares cualidades, aislada por Clavero y Pérez Gallardo. Luchó, también, contra el endémico paludismo de algunas zonas españolas, logrando un triunfo definitivo, al hacerlo desaparecer. Inició el combate final contra el tracoma en el sureste de la península y siempre reveló su maestría en la organización de las campañas sanitarias.

Nuestra revista conservará vivo el recuerdo del apoyo y aliento que le dio este querido compañero durante su mandato en la Presidencia de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

L. VILAS

### JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD

En la Asamblea General celebrada por la Sociedad Española de Microbiología el día 14 de octubre, se efectuó la elección para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva, quedando ésta, en consecuencia, constituida de la siguiente forma:

*Presidente:* Dr. David Vázquez Martínez.

*Vicepresidente:* Prof. Agustín Pumarola Busquets.

*Secretario:* Dr. Antonio Portolés Alonso.

*Tesorero:* Dr. Domingo Rodríguez Sánchez.

*Bibliotecario:* Dr. Emilio Ronda Laín.

*Vocal:* Dr. Fernando Baquero Mochales.

*Vocal:* Dra. Ramona Beltrá Martínez de Velasco.

*Vocal:* Dr. Emiliano Esteban Velázquez.

*Vocal:* Dr. Baldomero Iñigo Leal.

*Vocal:* Dr. Jorge Francisco López Tello.

*Vocal:* Dr. José Olivares Pascual.

*Vocal:* Dr. Jesús M.<sup>a</sup> Repáraz Martínez de Azagra.

*Vocal:* Prof. Julio Rodríguez Villanueva.

### REUNION SOBRE MICROBIOLOGIA HOSPITALARIA

Se celebrará esta Reunión, organizada por la Sección Regional del Noroeste, de la SEM, en Santiago de Compostela, durante los días 1 y 2 del próximo mes de junio.

El Presidente del Comité Organizador es el Prof. Benito Regueiro, Director del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago.

### CONGRESO INTERNACIONAL DE BACTERIOLOGIA

Patrocinado por la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, tendrá lugar en Jerusalén, del 2 al 7 de septiembre del año actual. Correspondencia: International Congress for Bacteriology, P. O. B. 16271, Tel Aviv (Israel).

### JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD

En la Asamblea General celebrada por la Sociedad Española de Microbiología el día 14 de octubre, se efectuó la elección para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva, quedando ésta, en consecuencia, constituida de la siguiente forma:

*Presidente:* Dr. David Vázquez Martínez.

*Vicepresidente:* Prof. Agustín Pumarola Busquets.

*Secretario:* Dr. Antonio Portolés Alonso.

*Tesorero:* Dr. Domingo Rodríguez Sánchez.

*Bibliotecario:* Dr. Emilio Ronda Laín.

*Vocal:* Dr. Fernando Baquero Mochales.

*Vocal:* Dra. Ramona Beltrá Martínez de Velasco.

*Vocal:* Dr. Emiliano Esteban Velázquez.

*Vocal:* Dr. Baldomero Iñigo Leal.

*Vocal:* Dr. Jorge Francisco López Tello.

*Vocal:* Dr. José Olivares Pascual.

*Vocal:* Dr. Jesús M.<sup>a</sup> Repáraz Martínez de Azagra.

*Vocal:* Prof. Julio Rodríguez Villanueva.

### REUNION SOBRE MICROBIOLOGIA HOSPITALARIA

Se celebrará esta Reunión, organizada por la Sección Regional del Noroeste, de la SEM, en Santiago de Compostela, durante los días 1 y 2 del próximo mes de junio.

El Presidente del Comité Organizador es el Prof. Benito Regueiro, Director del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago.

### CONGRESO INTERNACIONAL DE BACTERIOLOGIA

Patrocinado por la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, tendrá lugar en Jerusalén, del 2 al 7 de septiembre del año actual. Correspondencia: International Congress for Bacteriology, P. O. B. 16271, Tel Aviv (Israel).

### JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD

En la Asamblea General celebrada por la Sociedad Española de Microbiología el día 14 de octubre, se efectuó la elección para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva, quedando ésta, en consecuencia, constituida de la siguiente forma:

*Presidente:* Dr. David Vázquez Martínez.

*Vicepresidente:* Prof. Agustín Pumarola Busquets.

*Secretario:* Dr. Antonio Portolés Alonso.

*Tesorero:* Dr. Domingo Rodríguez Sánchez.

*Bibliotecario:* Dr. Emilio Ronda Laín.

*Vocal:* Dr. Fernando Baquero Mochales.

*Vocal:* Dra. Ramona Beltrá Martínez de Velasco.

*Vocal:* Dr. Emiliano Esteban Velázquez.

*Vocal:* Dr. Baldomero Iñigo Leal.

*Vocal:* Dr. Jorge Francisco López Tello.

*Vocal:* Dr. José Olivares Pascual.

*Vocal:* Dr. Jesús M.<sup>a</sup> Repáraz Martínez de Azagra.

*Vocal:* Prof. Julio Rodríguez Villanueva.

### REUNION SOBRE MICROBIOLOGIA HOSPITALARIA

Se celebrará esta Reunión, organizada por la Sección Regional del Noroeste, de la SEM, en Santiago de Compostela, durante los días 1 y 2 del próximo mes de junio.

El Presidente del Comité Organizador es el Prof. Benito Regueiro, Director del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago.

### CONGRESO INTERNACIONAL DE BACTERIOLOGIA

Patrocinado por la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, tendrá lugar en Jerusalén, del 2 al 7 de septiembre del año actual. Correspondencia: International Congress for Bacteriology, P. O. B. 16271, Tel Aviv (Israel).

## I CONGRESO INTERSECCIONAL DE LA AISM

Este Congreso, que se proyecta celebrar en Tokio, del 1 al 7 de septiembre de 1974, es el primero de carácter interseccional desde la reorganización de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología y reemplaza a los anteriores congresos internacionales, el último de los cuales tuvo lugar en Méjico, en 1970.

La correspondencia debe dirigirse a: Dr. Daizo Ushiba, Secretary General, First Intersectional Congress of IAMS, c/o Science Council of Japan, 7-22-34, Roppongi, Minato-ku, Tokyo 106 (Japón).

Depósito legal: M. 702 - 1968.

---

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid