

---

VOLUMEN 27. 1974

JULIO - DICIEMBRE. NUMEROS 3 - 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. Fernando Baquero, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

**Vocales:** Dr. Jorge López Tello, 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, estarán 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; no deberán de exceder de 10 holandesas. 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, para los textos en español.

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

Ultraestructura de bazo e hígado de cerdo infectado con peste porcina africana, por <i>A. García-Gancedo, E. Ronda-Láin y M. Rubio-Huertos</i> ...	177
Detección y corrección de deficiencias nutricionales durante el cultivo aeróbico de microorganismos, por <i>E. Hernández y A. Chordi</i> ...	191
Incorporación de uridina-H <sup>3</sup> en el esbozo macronuclear de <i>Stylonychia mytilus</i> , por <i>Pilar Alonso y M.<sup>a</sup> Asunción Jareño</i> ...	199
Estudio micrográfico de la acción del ion amonio y de la carencia de nitrógeno en <i>Chlorella</i> , por <i>M. Rodríguez-López, M. L. Muñoz y M. Villarroya</i> ...	213
Coliformes y <i>Escherichia coli</i> en frutas y verduras de mercado, por <i>M. Rodríguez-Rebollo</i> ...	225
Estudio microbiológico de esferoplastos de <i>Pseudomonas</i> patógenos producidos por antibiosis a nivel de pared y membrana, por <i>M.<sup>a</sup> Teresa Pérez-Ureña, M. Espinosa, I. Barasoain y A. Portolés</i> ...	235
Ultraestructura y composición química del lipopolisacárido de la <i>Erwinia carotovora</i> , por <i>M. Santaolalla y M.<sup>a</sup> Dolores Esplá</i> ...	257
Aislamiento de membranas de <i>Escherichia coli</i> K 12, con tamaño de células y sin mureína, por <i>Marianella de Corao, J. A. Serrano, J. A. Leal, J. Puig y E. Muñoz</i> ...	283
Algunas condiciones de cultivo que influyen en la 17 $\alpha$ -hidroxilación de la progesterona con <i>Tricothecium roseum</i> , por <i>L. A. R. Sallam, I. A. El-Kady y A. H. El-Refai</i> ...	299
Cambios en la composición antigénica del <i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 7055 en presencia de la sustancia S de Reichstein, por <i>R. M. Martín y A. Chordi</i> .	309
Congreso de Microbiología ...	319
Bibliografía, por <i>J. R. Villanueva, L. Vilas y F. Baquero</i> ...	321

# CONTENTS

Page

Ultrastructure of spleen and liver of swine infected with African swine fever, by <i>A. García-Gancedo, E. Ronda-Láin and M. Rubio-Huertos</i> ...	177
Detection and correction of nutritional deficiencies during aerobic growth of microorganisms, by <i>E. Hernández and A. Chordi</i> ...	191
Incorporation of uridine-H <sup>3</sup> into the macronuclear anlage of <i>Stylonychia mytilus</i> , by <i>Pilar Alonso and M.<sup>a</sup> Asunción Jareño</i> ...	199
Micrographic study of <i>Chlorella</i> grown in a culture medium without nitrogen or with ammonium-N, by <i>M. Rodríguez-López, M. L. Muñoz and M. Villarroya</i> ...	213
Coliforms and <i>Escherichia coli</i> on market fruits and vegetables, by <i>M. Rodríguez-Rebollo</i> ...	225
Microbiological study of spheroplasts from pathogenic <i>Pseudomonas</i> strains produced by antibiotics acting to the cell wall and membrane levels, by <i>M.<sup>a</sup> Teresa Pérez-Ureña, M. Espinosa, I. Barasoain and A. Portolés</i> ...	235
Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide from <i>Erwinia carotovora</i> , by <i>M. Santaolalla and M.<sup>a</sup> Dolores Esplá</i> ...	257
Isolation of murein-free spheroplasts "ghosts" from a strain of <i>Escherichia coli</i> K 12, by <i>Marianella de Corao, J. A. Serrano, J. A. Leal, J. Puig and E. Muñoz</i> ...	283
Some culture conditions influencing the 17 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone with <i>Tricothecium roseum</i> , by <i>L. A. R. Sallam, I. A. El-Kady and A. H. El-Refai</i> ...	299
Modifications about antigenic composition of <i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 7055 in presence of Reichstein's substance, by <i>R. M. Martín and A. Chordi</i> .	309
V National Congress of Microbiology ...	319
Bibliography, by <i>J. R. Villanueva, L. Vilas and F. Baquero</i> ...	321

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

## ULTRAESTRUCTURA DE BAZO E HIGADO DE CERDO INFECTADO CON PESTE PORCINA AFRICANA

por

A. GARCÍA-GANCEDO, E. RONDA-LAÍN y M. RUBIO-HUERTOS

### INTRODUCCION

El virus de la peste porcina africana, descrito por Montgomery (6), en 1921, en Kenia, causa una enfermedad con una mortalidad que se aproxima al 100 % y que habiéndose extendido a Europa constituye una de las epizootias de mayor importancia económica.

El desarrollo del virus de la peste porcina africana ha sido estudiado extensamente por microscopia electrónica en cultivos celulares inoculados con dicho virus, principalmente en cultivos de linfocitos y células de riñón de cerdo (1 y 4).

La hemadsorción es una de las propiedades mejor estudiadas de este virus (7-9) y también ésta ha sido bien estudiada por microscopia electrónica (2 y 5).

En el animal enfermo se han hecho observaciones muy completas de tipo macroscópico en diferentes órganos y también se ha estudiado la histología de los tejidos infectados, pero hasta ahora no se ha realizado, que nosotros sepamos, un estudio por microscopia electrónica del desarrollo de las partículas víricas en células de órganos de un animal enfermo.

Smith (10) concluye una revisión de los mecanismos de patogenicidad

de los virus con la siguiente frase: "In conclusion, this review will have achieved its purpose if it encourages some virologists well versed in the elegant methods of tissue culture to turn their attention and adapt their methods to less well-defined organ culture and whole animal systems. In this way we may learn more about virus disease".

Con lo que reconoce la importancia del estudio de los virus directamente en el animal enfermo y en sus diferentes órganos.

En el presente trabajo hemos estudiado bazo e hígado de animal infectado, buscando principalmente la distribución de las partículas víricas y su formación en los tejidos, viendo si existen diferencias con las descritas en cultivos de tejidos, ya que en el animal vivo, infectado, existen una serie de factores naturales de defensa que no existen en los tejidos cultivados y pueden interferir con la multiplicación del virus.

## MATERIAL Y METODOS

### *Obtención del material infectado*

Cerda de 2 meses de edad, 22 kg de peso y de raza York, inoculada con 2 ml de suspensión de bazo infectado con peste porcina africana (cepa R-306, cedida por el Prof. Sánchez Botija).

La suspensión fue preparada después de triturar un fragmento del bazo, añadiendo posteriormente solución de Hanks con antibióticos, hasta lograr una dilución aproximada del 1/20. La inoculación fue efectuada por vía intramuscular en el cuello.

Al 5.º día, la cerda presentó los primeros síntomas de enfermedad: tristeza, hipotermia, disnea y dificultad en la deglución; aparecen algunas convulsiones del tercio posterior.

El día 6.º, los síntomas son más acentuados, apareciendo erizamiento del pelo e hipertermia.

Se sacrificó el día 8.º por presentar un cuadro agudo de enfermedad con parálisis completa del tercio posterior y acusadas hipertermia y disnea.

Fueron recogidas, en condiciones asépticas, muestras de bazo, hígado y riñón.

Después de efectuadas las tomas se procedió a un reconocimiento general del cadáver que presentaba gran cantidad de petequias en pulmón y abundante exudado serohemorrágico, hemorragias difusas en intestino

grueso, edema de la vesícula biliar y acentuada esplenomegalia con aspecto hemorrágico y consistencia friable.

#### *Microscopia electrónica*

Trocitos de 1 mm<sup>3</sup> aproximadamente de los tejidos de bazo, hígado y riñón del animal enfermo se sumergieron en una solución fijadora formada por glutaraldehído al 5 %, en tampón de veronal, a pH 6,9, durante 4 h, a 4 °C. Después de lavados durante toda la noche con el mismo tampón, se fijaron durante 2 h a 4 °C, con tetraóxido de osmio, al 2 %, tamponado también con acetato de veronal y al mismo pH, se deshidrataron en acetonas de concentraciones crecientes e incluidos en durcupán fueron endurecidos en estufa, a 55 °C, durante las primeras 24 h, y seguidamente, durante otras 24 h, a 70 °C.

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

El microscopio electrónico ha sido un Siemens Elmiskop I.

## RESULTADOS

Las observaciones realizadas, tanto en hígado como en bazo, han resultado muy semejantes, por ello, dichos resultados se indican simultáneamente para los dos tipos de tejidos, teniendo en cuenta, además, que la localización de las partículas de virus en bazo e hígado se ha realizado en tejidos de pulpa roja, es decir, células endoteliales del sinus en el bazo; y células parenquimatosas en el hígado.

En el riñón han sido encontradas partículas víricas en las células epiteliales de túbulos.

Después de numerosas observaciones, hemos podido comprobar que el número de células del tejido de pulpa roja del bazo y de células parenquimatosas del hígado, en las que se encuentran partículas de virus, es muy pequeño en relación con aquellas aparentemente sanas o sin virus. El tanto por ciento aproximado de células con virus es de 3 %, encon-

trándose irregularmente distribuidas en el tejido, aunque, preferentemente, se encuentran cerca de las zonas de acumulación de los hematíes.

La mayoría de las células observadas contienen muy escasas partículas víricas maduras, distribuidas en el citoplasma y generalmente próximas a las membranas (*figura 1*); en muy pocas ocasiones hemos encontrado series de células infectadas, en las que nos ha sido posible seguir la secuencia de formación de las partículas víricas; generalmente se encuentran células aisladas que presentan diferentes aspectos de la multiplicación de los viriones.

De los resultados obtenidos, y de los que se presentan las correspondientes fotografías, se puede deducir la secuencia de formación del virus. En una determinada zona del citoplasma (viroplasma), generalmente gris, algo más densa que el citoplasma normal y sin ribosomas, aparecen, primeramente, pequeñas vacuolas con una unidad de membrana (*figura 2*) y trozos de membrana, y al mismo tiempo, algunas formas hexagonales mayores, con este mismo tipo de membrana y que aparecen vacías (*figuras 2 y 4*), o bien llenas de la sustancia gris o matriz (*figura 3*); en algunas células se pueden observar, junto con estas formas, partículas ya maduras, fase más avanzada del ciclo, de contorno hexagonal, de 175 a 215 nm de diámetro, que incluyen un nucleoide central, denso, de unos 70 a 85 nm de diámetro, rodeado de un área más clara que, a veces, se puede observar como limitada por otra membrana. Todo ello envuelto en la membrana hexagonal externa (*figuras 5-9*).

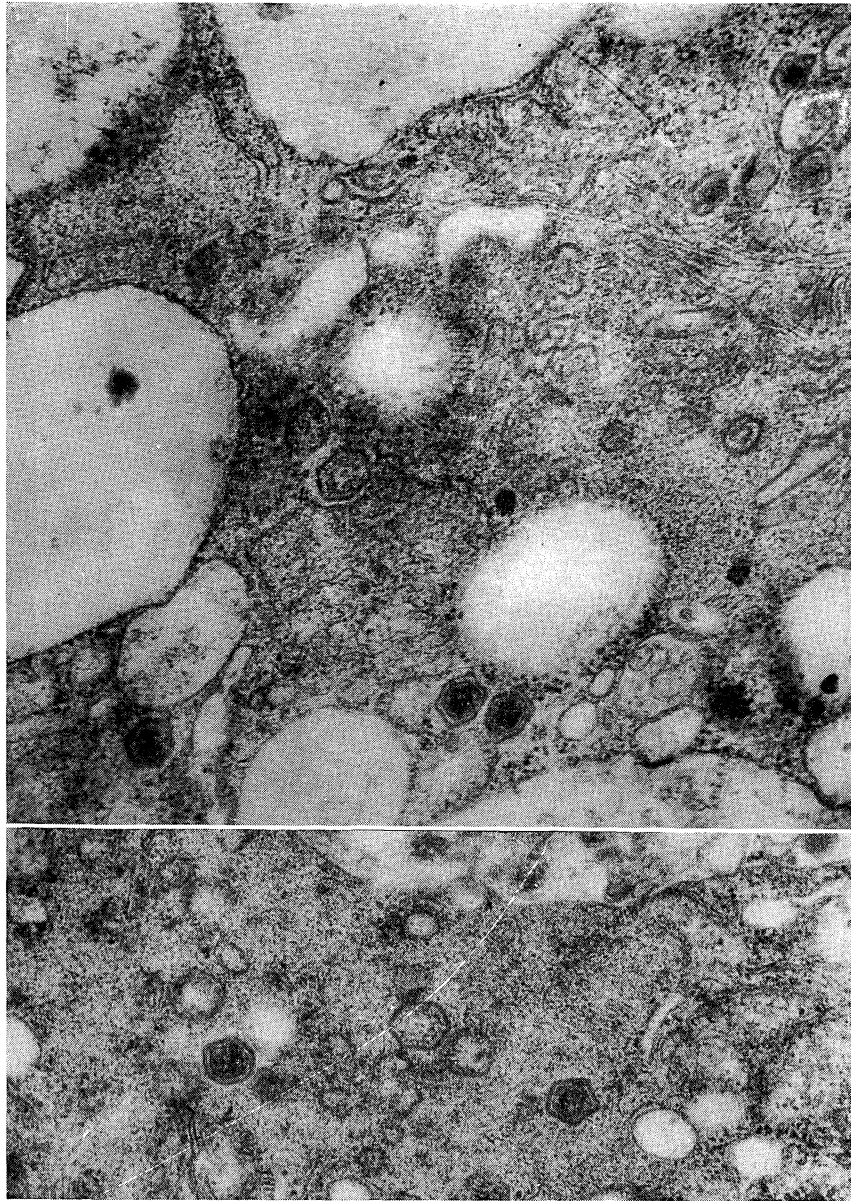
No hemos observado partículas de virus en los núcleos de las células huésped.

El virus, últimamente, al salir de la célula, cosa que hemos observado en algunos casos, se recubre de otra membrana perteneciente a la misma célula huésped, es decir, el plasmalema. En los casos que hemos observado, la hemadsorción *in situ*, esta membrana externa se adhiere primero y luego se funde con la membrana externa del eritrocito, quedando incorporada la partícula de virus al protoplasto del eritrocito (*figuras 7 y 11*).

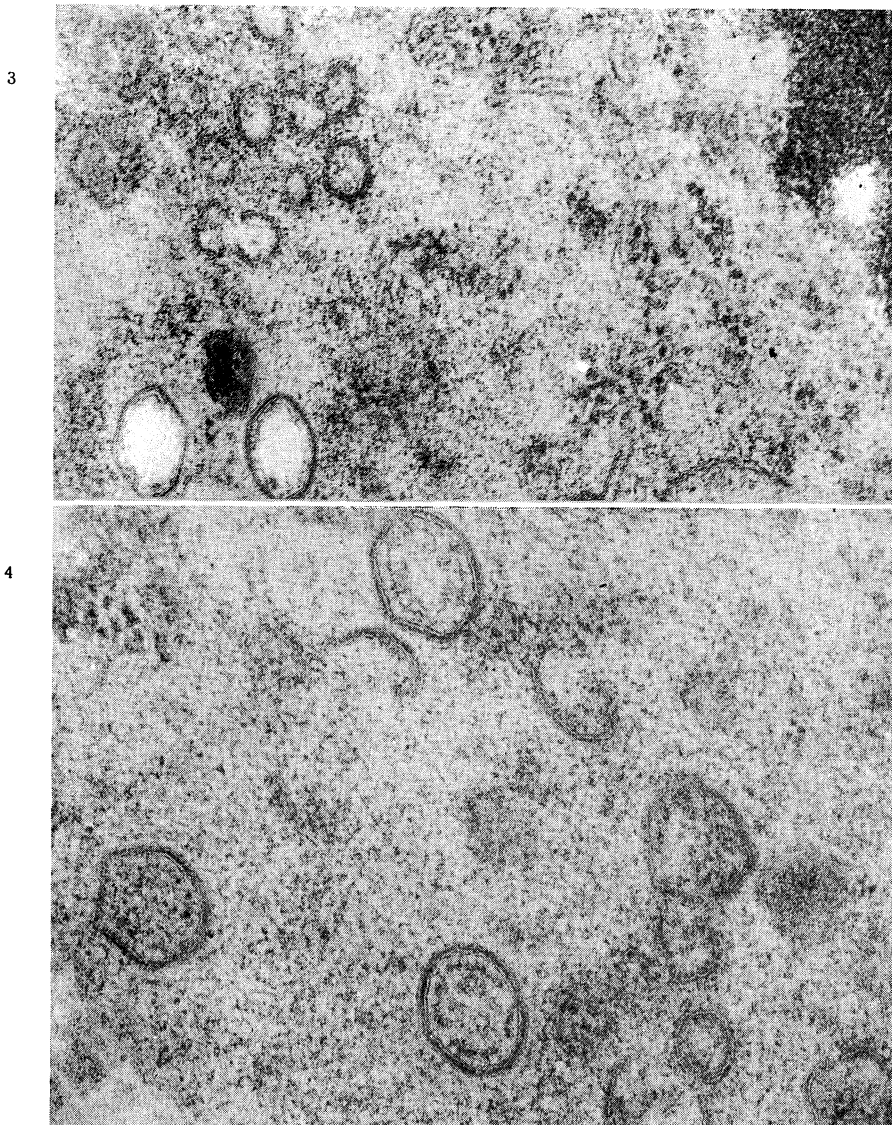
Hemos observado necrosis general en algunas células, en las cuales se podían apreciar partículas de virus maduras (*figura 10*).

No hemos observado acumulaciones de partículas víricas en formación cristalina.

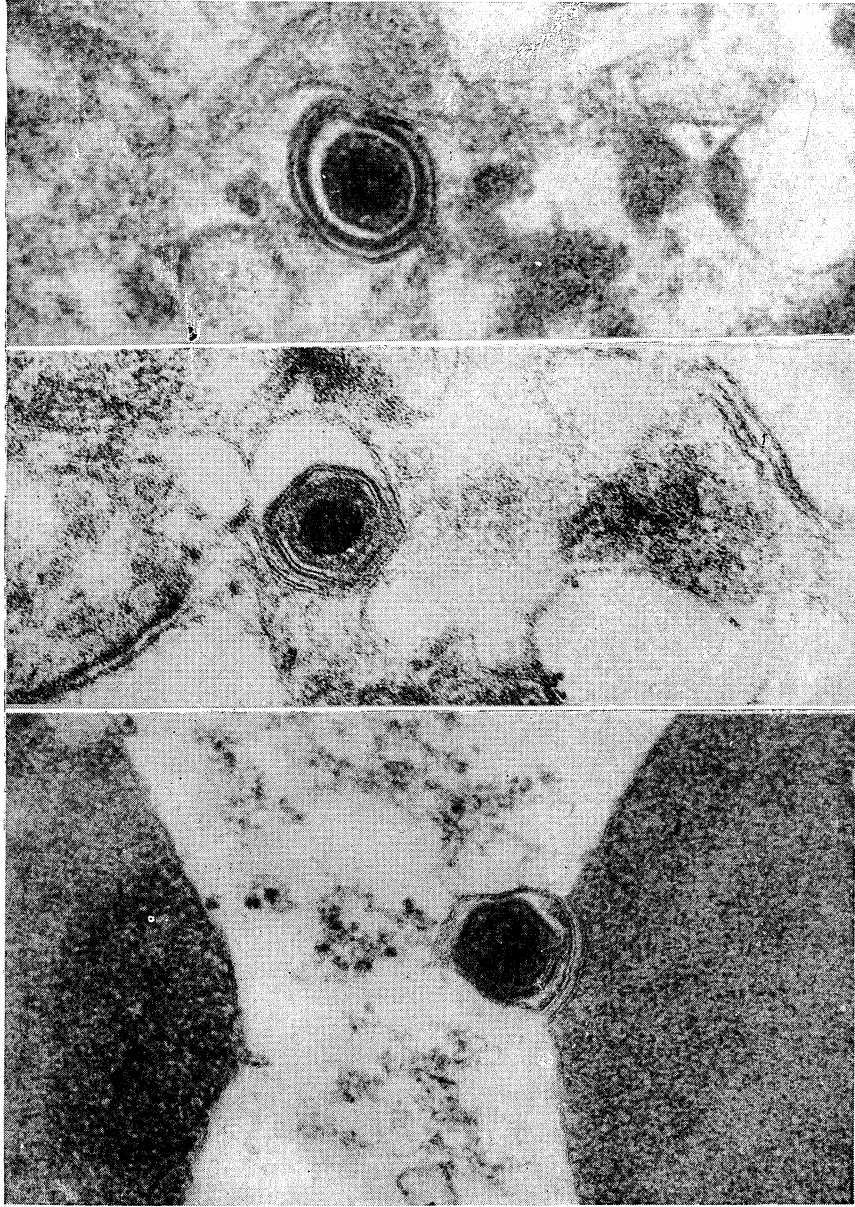




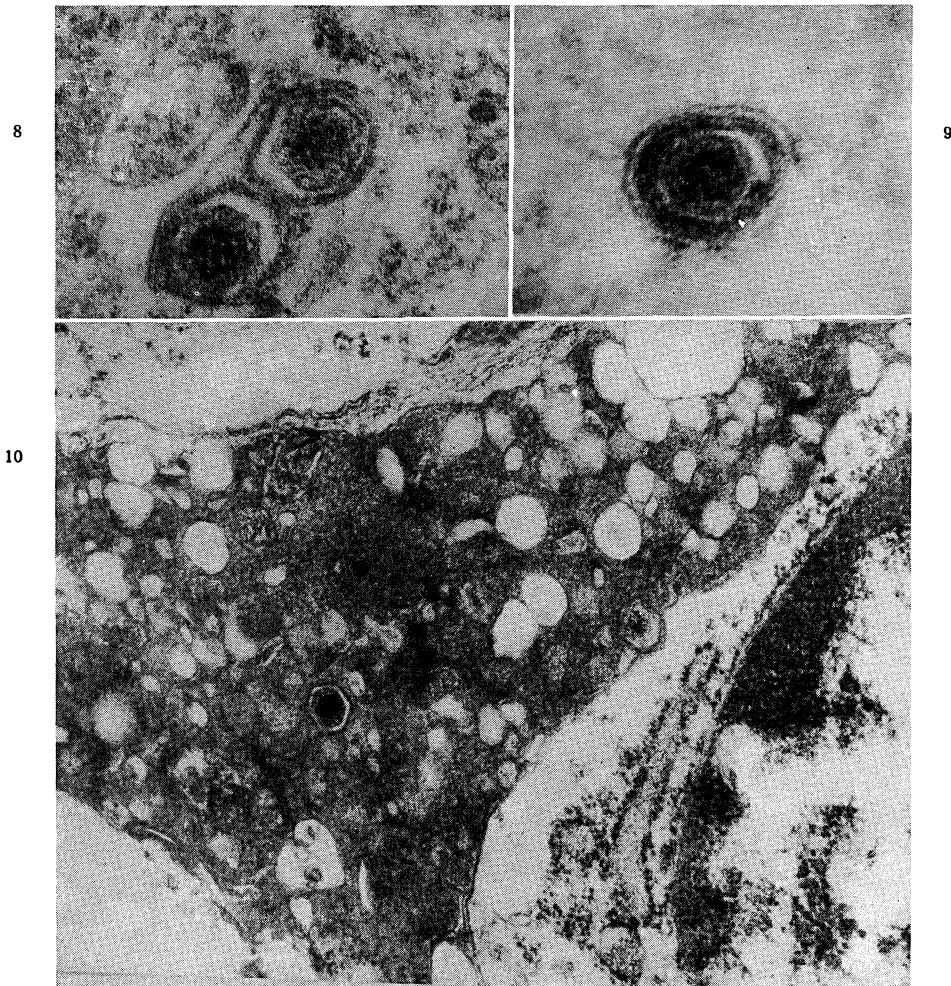
*Figura 1. Parte del citoplasma de una célula endotelial de bazo en la que se pueden ver distintas fases en la multiplicación del virus.  $\times 23.500$ . Figura 2. Partículas maduras, membrana + nucleóide complejo y partículas en formación con la membrana hexagonal solamente.  $\times 23.500$*



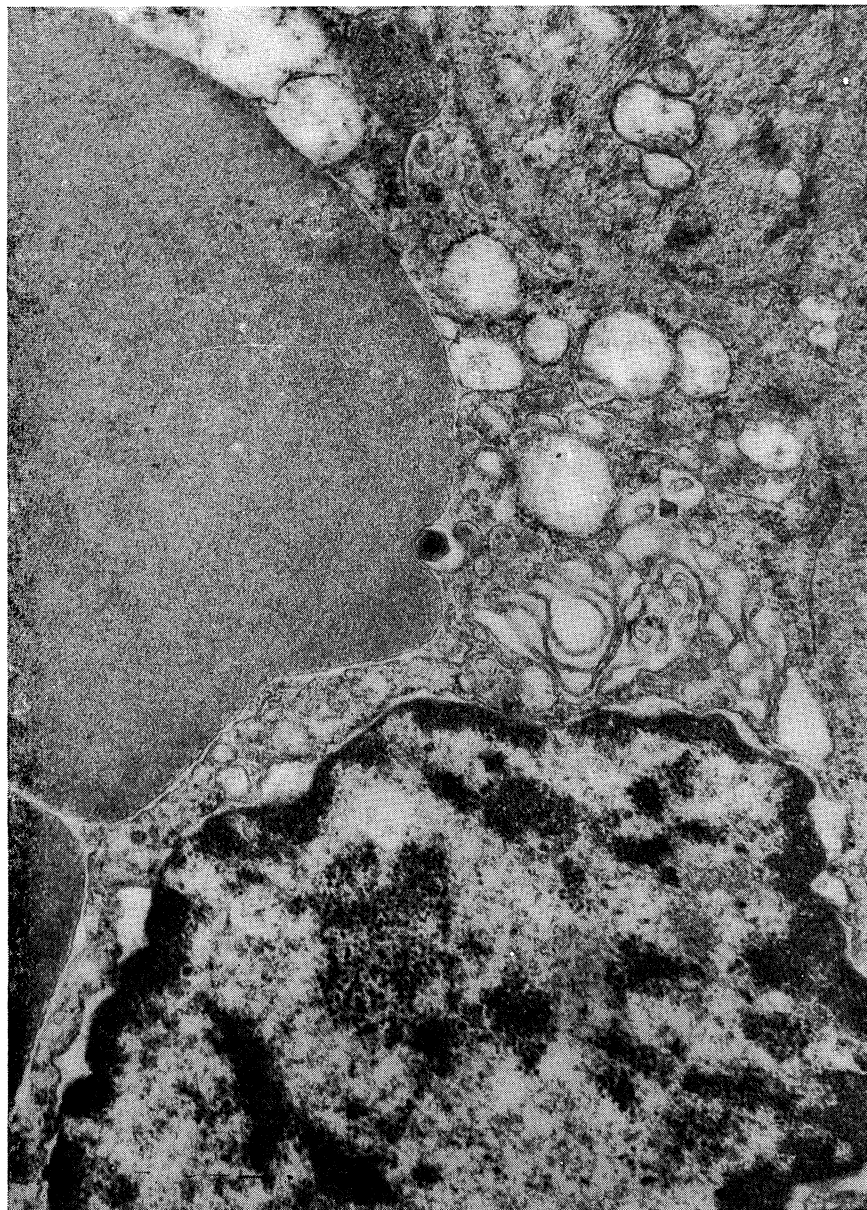
*Figuras 3-4. Fases tempranas de formación de los viriones (bazo). × 65.000 y 92.000*



*Figuras 5-6. Partículas de virus rodeadas de una doble membrana; en el resto de la célula no se encuentran partículas ni pro-partículas en ambos casos. 5) Bazo. 6) Riñón.  $\times 150.000$ . Figura 7. Partícula vírica adsorbida en un glóbulo rojo.  $\times 130.000$*



*Figuras 8-9. Partículas de virus rodeadas de doble membrana encontradas aisladas en células sin otras partículas víricas.  $\times 105.000$ . Figura 10. Parte de una célula necrótica conteniendo partículas de virus.  $\times 23.000$*



*Figura 11. Hemadsorción in situ. X 21.500*

## DISCUSION

En las escasas células en las que se ha podido observar la secuencia de formación y maduración de partículas víricas ésta coincide con la descrita en cultivos de tejidos infectados con el virus (1), aunque no hemos podido encontrar acúmulos de viriones en formación cristalina.

La salida del virión al exterior de la célula, según Breese, se efectúa recubriéndose la partícula vírica con la membrana celular externa íntimamente pegada a la partícula, por lo que se conserva la forma hexagonal perfectamente regular que ésta tiene. En nuestro trabajo hemos observado partículas recubiertas de dos membranas (*figuras 7-9*), posiblemente porque al salir de una célula toman una membrana y al entrar en la contigua toman otra y así con ambas se encuentran dentro del citoplasma de la segunda célula. Esto se puede observar también al producirse la hemadsorción en que se juntan la membrana adquirida al salir de la célula madre y la membrana del hematocito, hemadsorción espontánea que se produce en las zonas de acumulación de hematíes que corresponden a las zonas del tejido en donde se encuentra el mayor número de células con partículas víricas en su interior.

Breese y De Boer (1) describen también zonas en las que, junto a numerosas partículas víricas, aparece un aumento de retículo endoplásmico granular, en forma convolulada. Nosotros no hemos podido encontrar este tipo de modificación, pero es posible que corresponda a una intensa vacuolización de ciertas regiones del citoplasma en algunas células infectadas, que presentan numerosas partículas de virus cerca de dichas regiones (*figuras 1 y 10*).

En resumen, la multiplicación del virus en los tejidos del animal vivo se efectúa de una manera similar que en los cultivos de tejidos; sin embargo, en su distribución y en la infección de nuevas células parecen existir otros factores que, en ciertos casos, pueden limitar o impedir la multiplicación del virus en determinados grupos de células, y la formación de agregados cristalinos víricos.

Teóricamente, cuando una partícula vírica madura penetra en una célula debe poner en marcha, en un período de tiempo muy pequeño, una serie de mecanismos que la llevan a su fase de eclipse, previa a la de la multiplicación y ensamblaje de sus elementos para dar lugar a nuevas

partículas víricas. En el caso de los tejidos infectados que hemos estudiado, hemos encontrado un tanto por ciento muy grande de células aparentemente no infectadas y también células en las que se podían encontrar una o dos partículas de virus maduras, recubiertas de doble membrana, y sin que en el resto de la célula apareciesen formas intermedias u otro signo morfológico de infección, pareciendo indicar una especie de encapsulamiento de las partículas o una acción de la célula sobre los viriones que no permite a éstos el iniciar la infección. Las causas pueden ser muchas y de muy diferente tipo, aquí sólo nos limitamos a llamar la atención sobre lo que hemos observado directamente.

#### RESUMEN

En tejidos de bazo y de hígado de un cerdo de 2 meses de edad, inoculado con el virus de la peste porcina africana y sacrificado al presentar un cuadro agudo de la enfermedad, se ha podido observar que la multiplicación del virus se realiza de la misma forma que en cultivos de tejidos, aunque la distribución de las células infectadas y su número difiere mucho de las observadas en cultivos de tejidos.

Especialmente en los tejidos de órganos de animal infectado, se encuentran partículas aisladas de virus, rodeadas de una doble membrana externa, en células aparentemente sanas, es decir, donde parece que estas partículas están como enquistadas, sin reproducirse.

#### SUMMARY

*Ultrastructure of spleen and liver of swine infected with African swine fever*

Liver and spleen tissues of an African swine fever infected swine, were observed by electron microscopy. The multiplication of the virus particles takes place in the same way as has been observed in African swine fever infected tissue culture, except for the formation of crystalline aggregates. However, the number of infected cells in both liver and spleen tissues was comparatively less than in tissue cultures.

Some cells showed only one or two virus particles enveloped with a double membrane and no sign of virus multiplication (intermediate stages of virus formation).

#### BIBLIOGRAFIA

1. BREESE, S. S. (jr.), and BOER, C. J. DE. 1966. Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology*, 28, 420-28.
2. BREESE, S. S. (jr.), and HESS, W. R. 1966. Electron microscopy of African swine fever virus hemadsorption. *J. Bacteriol.*, 92, 272-74.
3. CHEN, L., y WEISS, L. 1972. Electron microscopy of human spleen. *Amer. J. Anat.*, 134, 425-58.
4. HAAG, J.; LUCAS, A.; LARENAUDIE, B.; RUIZ-GONZALVO, F., et R. CARNERO. 1966. Peste porcine africaine. Recherches sur la taille et la morphologie du virus. *Rec. Méd. Vét.*, 142, 801-8.
5. LARENAUDIE, B.; TOULIER, M. C.; SANTUCCI, J., et CARNERO, R. 1967. Etude en microscopie électronique de l'hémadsorption provoquée par le virus de la peste porcine africaine. *Rec. Méd. Vét.*, 143, 925-35.
6. MONTGOMERY, R. E. 1921. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol.*, 34, 159-91, 243-62.
7. SÁNCHEZ-BOTIJA, C. 1962. Estudios sobre la peste porcina africana en España. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 58, 707-27.
8. SÁNCHEZ-BOTIJA, C. 1963. Reservorios del virus de la peste porcina africana. Investigación del virus de la peste porcina africana en los artrópodos mediante la prueba de la hemadsorción. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 60, 895-99.
9. SÁNCHEZ-BOTIJA, C., y SÁNCHEZ-BOTIJA, R. 1965. El diagnóstico de la peste porcina africana por la prueba de la hemadsorción (test de Malmquist y Hay). La interferencia del virus de la peste clásica del virus de la peste africana como medio de identificación del virus de la peste clásica en los cultivos de leucocitos. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 63, 239-51.
10. SMITH, H. 1972. Mechanisms of virus pathogenicity. *Bacteriol. Rev.*, 36, 291-310.



FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA.  
MARACAIBO (VENEZUELA)

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (TENERIFE)

## DETECCION Y CORRECCION DE DEFICIENCIAS NUTRICIONALES DURANTE EL CULTIVO AEROBICO DE MICROORGANISMOS

por

E. HERNÁNDEZ y A. CHORDI

### INTRODUCCION

Tanto en la producción de proteínas microbiana, donde uno de los objetivos es la obtención del máximo rendimiento de células en el menor tiempo posible, como en la producción de compuestos de interés (antibióticos, enzimas, antimetabolitos, etc.), es importante usar medios y condiciones de cultivo que sean óptimos para lograr los objetivos buscados. En el presente trabajo se presenta una técnica que permite detectar y corregir deficiencias nutricionales en un medio para el cultivo aeróbico de microorganismos, con la consiguiente mejora del mismo.

### MATERIAL Y METODOS

#### 1. *Microorganismo*

Se utilizó *Pseudomonas fluorescens* (cepa UW), conservado en agar nutritivo inclinado.

## 2. Medio de cultivo

El medio mínimo contenía (cantidades por litro):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13,6 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,5 g;  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 mg; glucosa, 18 g. La glucosa fue esterilizada separadamente. Antes de inocularlo, el medio se ajustó al pH a utilizar en cada experimento, con  $\text{NH}_4\text{OH}$  aproximadamente 3,5N.

Cuando se añadieron aminoácidos, sus concentraciones en el medio fueron las siguientes, expresadas en mg/l:

L-histidina, HCl	19,2	L-arginina, HCl	56,9
L-leucina	73,0	L-isoleucina	48,3
L-metionina	18,9	L-treonina	39,4
L-triptófano	7,7	D-alanina	20,4
Acido L-glutámico	179,1	Glicina	70,9
L-prolina	54,3	L-serina	39,6
L-hidroxiprolina	41,4	L-glutamina	350,0
L-lisina, 2 HCl	98,8	L-valina	55,0
L-fenilalanina	33,2	L-tirosina	36,4
Acido L-aspártico	84,9	L-cisteína, HCl	17,0

La utilización de estas cantidades de aminoácidos se basó en el contenido de aminoácidos esenciales de las bacterias (8) y en la composición en aminoácidos no esenciales del músculo animal (1). Se añadió L-glutamina, porque este aminoácido aumentó los rendimientos de células en cultivos de tejidos de mamíferos (7).

Cuando se añadieron vitaminas, las concentraciones en el medio fueron las siguientes expresadas en  $\mu\text{g/l}$ :

Tiamina, HCl	48	Riboflavina	103
Acido nicotínico	329	Pantotenato cálcico	107
Piridoxina, HCl	12	Biotina	13
Acido fólico	17	Inositol $2\text{H}_2\text{O}$	3.090

Se usaron estas cantidades en base al contenido de vitaminas B en las bacterias (6).

Cuando se añadieron precursores de ácidos nucleicos, las concentraciones en el medio fueron las siguientes, expresadas en mg/l:

Sulfato de adenina 2H <sub>2</sub> O	25,7	Guanina, HCl	24,0
Uracilo	10,7	Citosina	14,9
Timina	4,3		

Estas cantidades se fijaron en función de la composición en ácidos nucleicos de las bacterias (6) y suponiendo cantidades equimoleculares de las cuatro bases.

Estas cantidades de sales, glucosa, aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos son suficientes para producir aproximadamente 2 g de peso seco de células/l. La solución de aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos fue esterilizada por filtración y añadida asépticamente al medio.

### 3. Temperatura

Los cultivos se realizaron a  $30,0 \pm 0,2$  °C.

### 4. Fermentador

El fermentador, que ha sido descrito por Hernández y Johnson (3), se presenta en la figura 1. El recipiente se conectó con un transductor de presión (Giannini and Co., Inc., Pasadena, California) y con un registrador. El sistema es, esencialmente, un manómetro de Barcroft, es decir, un sistema cerrado formado por dos recipientes conectados por un manómetro. Uno de los recipientes es el fermentador, el otro es el compartimento del transductor de presión no conectado al fermentador. Un cambio de presión en el fermentador, causado por el consumo de oxígeno por las células, produjo un cambio en el voltaje de salida del transductor, cambio que fue registrado gráficamente. A partir de estos cambios de presión, debidos al consumo de oxígeno, se calculó la cantidad de oxígeno usada durante el crecimiento de

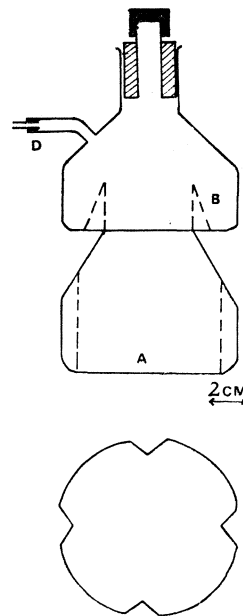


Figura 1

los microorganismos y se registró el logaritmo del consumo de oxígeno en función del tiempo (o logaritmo del voltaje en el registrador vs. tiempo).

### 5. Inóculo

El inóculo se preparó transfiriendo el cultivo de agar inclinado a un matraz de Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio. El matraz se incubó a 30 °C en un agitador rotatorio. Después de 24 h de crecimiento, las células se centrifugaron asépticamente, se resuspendieron en agua destilada estéril y una parte alícuota de esta suspensión se añadió asépticamente al medio en el fermentador. La cantidad de inóculo utilizada fue aproximadamente el 1 % del rendimiento final del cultivo.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El consumo de oxígeno por el cultivo se siguió con ayuda del registrador y se trazaron gráficos de consumo de oxígeno en función del tiempo. Como puede verse en la *figura 2* (*curvas 5-6*), al añadir vitaminas y precursores de ácidos nucleicos al medio de cultivo, el crecimiento fue exponencial. Sin embargo, al añadir aminoácidos, la velocidad de consumo de oxígeno fue exponencial únicamente durante una cuarta parte del ciclo de crecimiento total. En este punto, alguna limitación en el medio

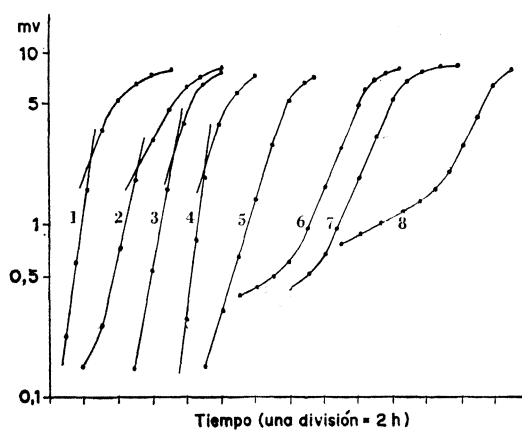


Figura 2

cambió la velocidad del consumo de oxígeno de exponencial a lineal. Este fenómeno no se observó en medios donde no se añadieron aminoácidos, indicando que el factor limitante del crecimiento, y causante del cambio de exponencial a lineal en la velocidad de consumo de oxígeno, fue probablemente un aminoácido. Para averiguar cuál de los 20 aminoácidos presentes en el medio estaba limitando el crecimiento exponencial, se añadieron 10 de los aminoácidos a cuatro veces su concentración en el medio original. Como puede verse en la *curva 1* de la *figura 3*, el cambio de crecimiento exponencial a lineal, cuando sólo una cuarta parte del ciclo total de crecimiento había tenido lugar, desapareció, indicando que uno de estos 10 aminoácidos era el factor limitante del crecimiento en los experimentos previos. Se añadieron entonces 5 de estos 10 aminoácidos a cuatro veces su concentración en el medio original. La *curva 2* de la *figura 3* muestra que el aminoácido responsable del cambio de crecimiento exponencial a lineal podría ser uno de estos cinco. Se añadió, entonces, arginina, lisina y leucina a cuatro veces su concentración en el medio original. El cambio permaneció, indicando que el aminoácido limitante no es uno de estos tres (*curva 3*). Las *curvas 4-5* muestran resultados si-

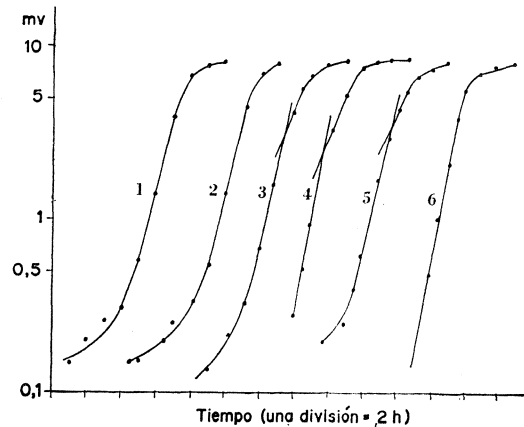


Figura 3

milares para valina e isoleucina. Aparentemente, el cambio de exponencial a lineal en la velocidad de consumo de oxígeno está causado por más de un aminoácido. La adición de valina e isoleucina juntos, a cuatro ve-

ces su concentración en el medio original, produjo la *curva 6*, indicando que estos dos aminoácidos eran los que estaban limitando el crecimiento. Este tipo de experimento podría ser útil para detectar y corregir deficiencias en medios usados para el cultivo aeróbico de microorganismos.

La inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* K12 por valina parece ser causada por la inhibición (4) y represión (9) de la enzima responsable de la formación de alfa-aceto-lactato por valina. La enzima es usada por *E. coli* K12 en la síntesis de valina e isoleucina (5). El efecto de la valina sobre el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* parece ser un fenómeno similar.

#### RESUMEN

Se describe una técnica para detectar y corregir deficiencias nutricionales en un medio para el cultivo aeróbico de microorganismos. El sistema usado es, esencialmente, un manómetro de Barcroft, con un fermentador y un transductor de presión constituyendo los dos recipientes del sistema cerrado. El sistema permite estudiar la cinética de utilización de oxígeno por el cultivo y detectar deficiencias nutricionales a partir de las curvas de consumo de oxígeno.

#### AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Departamento de Bioquímica de la Universidad de Wisconsin las facilidades dadas a uno de los autores para la realización de este trabajo.

#### SUMMARY

##### *Detection and correction of nutritional deficiencies during aerobic growth of microorganisms*

A technique for the detection and correction of nutritional deficiencies in media for aerobic culture of microorganisms is described. Essentially, the system used is a Barcroft manometer with a fermentor and a pressure transducer as the two parts of the closed system. From the kinetics of oxygen utilization, nutritional deficiencies can be detected.

## BIBLIOGRAFIA

1. BLOCK, R. J., and WEISS, K. W. 1956. Amino Acid Handbook, Charles C. Thomas, publisher. Springfield, Illinois.
2. COOPER, C. M.; GERNSTROM, G. A., and MILLER, S. A. 1944. Performance of agitated gas-liquid contactors. *Ind. Eng. Chem.*, 36, 504-9.
3. HERNÁNDEZ, E., and JOHNSON, M. J. 1967. Energy supply and cell yield in aerobically grown microorganisms. *J. Bacteriol.*, 94, 996-1001.
4. LEAVITT, R. I., and UMBARGER, H. E. 1952. Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. XI. Valine inhibition of the growth of *Escherichia coli* strain K12. *J. Bacteriol.*, 83, 624-30.
5. LEAVITT, R. I., and UMBARGER, H. E. 1961. Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. X. The enzymatic formation of acetohydroxybutyrate. *J. Biol. Chem.*, 236, 2486-91.
6. LURIA, S. E. 1960. The bacterial protoplasm: composition and organization. En I. C. GUNSALUS and R. Y. STAINER (eds.). *The Bacteria*, 1, 1-34. Academic Press, New York.
7. MOHBERG, J., and JOHNSON, M. J. 1963. Amino acid utilization by 929-L fibroblasts in chemically defined media, *J. Nat. Cancer Inst.*, 31, 611-25.
8. STOKES, J. L., and GUNNESS, M. 1946. The amino acid composition of microorganisms. *J. Bacteriol.*, 52, 195-207.
9. UMBARGER, H. E., and BROWN, B. 1958. Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VIII. The formation of acetolactate. *J. Biol. Chem.*, 233, 1156-60.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)  
DEPARTAMENTO DE PROTOZOLOGIA  
SECCION DE CITOLOGIA DE PROTOZOOS

## INCORPORACION DE URIDINA-H<sup>3</sup> EN EL ESBOZO MACRONUCLEAR DE *STYLONYCHIA MYTILUS*

por

PILAR ALONSO y M.<sup>a</sup> ASUNCIÓN JAREÑO

### INTRODUCCION

Cuando observamos por primera vez numerosas regiones ensanchadas en los cromosomas politénicos de *Stylonychia* y otros ciliados hipotricos (1, 2 y 12) comparables a los "puffs" de los cromosomas de las glándulas salivales de los dípteros, pensamos en la posible actividad de dichos cromosomas gigantes de los ciliados.

Una vez que se descartó la posibilidad de que tales regiones ensanchadas pudieran deberse al método utilizado (9), empleamos las técnicas de autorradiografía, tratando de obtener pruebas de la incorporación de la uridina marcada en el esbozo macronuclear de *Stylonychia mytilus*.

Este trabajo constituye un estudio preliminar cualitativo de la incorporación del isótopo.

### MATERIAL Y METODOS

La estirpe de *Stylonychia mytilus* usada en estos experimentos se cultivó y mantuvo a  $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , según se ha descrito en trabajos anteriormente publicados (8-9).



El isótopo se añadió directamente al medio de cultivo que contenía exconjugantes de unas 26 h. En aquel momento, las células presentaban el esbozo macronuclear con cromosomas politénicos en desarrollo, en los que podían observarse algunas regiones ensanchadas (véanse Resultados). Junto con los exconjugantes se expusieron a la acción del medio radiactivo algunos individuos vegetativos.

Algunas de las preparaciones se hicieron siguiendo el método de Prescott y Bender (13), pudiéndose obtener núcleos aislados sin contaminación citoplásmica.

La incorporación del isótopo se estudió en dos series de experimentos utilizando dos tipos de uridina marcada. En la primera serie se usó uridina generalmente marcada (activ. espec. 2,5 C/mM) a una concentración final de 120  $\mu\text{C}/\text{ml}$ ; en la segunda serie se empleó uridina-5- $\text{H}^3$  (activ. espec. 29 C/mM) a una concentración final de 60  $\mu\text{C}/\text{ml}$ . Ambas uridinas fueron suministradas por The Radiochemical Centre, Amersham (Inglaterra).

Los exconjugantes estuvieron constantemente expuestos a uno u otro tipo de uridina en cada caso, y se iban tomando muestras a diferentes intervalos de tiempo (desde 15 min a 24 h). Algunas de las muestras, después de ser cuidadosamente lavadas, se fijaron inmediatamente con metanol-ácido acético (3 : 1), otras se dejaron en medio de cultivo sin isótopo durante diferentes intervalos de tiempo antes de fijarlas. Las preparaciones se trataron por las técnicas normalmente utilizadas en autorradiografía, digiriendo previamente algunas de ellas con nucleasas. La RN-asa pancreática (Sigma) se usó a una concentración de 1,0 mg/ml en agua destilada, durante 3 h, a 37 °C. La DN-asa-I (Sigma) se utilizó a una concentración de 0,5 mg/ml en regulador de fosfatos 0,2M a pH 7,0, que contenía  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,003M. La extracción se llevó a cabo durante 12 h, a 37 °C.

Las radioautografías se prepararon por la técnica del "stripping film", usando Kodak AR-10. Se revelaron después de 20 días de exposición y se tiñeron con la mezcla verde de metilo-pironina-anaranjado G.

## RESULTADOS

Como ya indicamos en un trabajo anterior (9), los cromosomas politénicos de *Stylonychia mytilus* pasan por algunos estados en los que se observan una especie de hinchamientos y regiones más o menos ensan-

chadas. Anteriormente hemos indicado que el isótopo se añadió a exconjugantes jóvenes (de unas 26 h), precisamente antes de que los cromosomas alcanzaran su máximo desarrollo y mostraran su bandeo típico. Las *figuras 1-2* muestran un ejemplo del aspecto de los cromosomas politénicos en ese estado.

Los resultados de los experimentos con ambos tipos de uridina marcada son básicamente coincidentes. Por tanto, describiremos los obtenidos con la uridina- $H^3$  (2,5 C/mM); las diferencias con la otra uridina (29 C/mM) se indicarán más adelante.

Después de 30 min de incubación con el isótopo, los exconjugantes ya presentan un esbozo macronuclear ligeramente marcado. A los 90 min de incubación, el esbozo macronuclear aparece claramente marcado, mientras que los micronúcleos y los fragmentos del macronúcleo viejo permanecen sin marcar (*figura 3*). Asimismo, se observa que los macronúcleos de los individuos vegetativos han incorporado claramente el isótopo (*figura 4*). Además, los macronúcleos de los individuos que están iniciando la división están uniformemente marcados, excepto las bandas de replicación que aparecen sin marcar (*figura 5*).

Después de 5 h de incubación con uridina marcada, la radiactividad sobre el esbozo macronuclear es aún más pronunciada (*figura 6*).

En casos favorables, al hacer la preparación, la membrana del esbozo macronuclear se rompe liberando su contenido. En este caso, los gránulos de plata yacen sobre el material cromosómico (*figura 9*). Hacia ese momento, algo de radiactividad aparece sobre el citoplasma, como está indicado en la *figura 8*, aumentando el número de gránulos al aumentar el tiempo de incubación. Así, después de 24 h de incubación, puede observarse el citoplasma algo más marcado, mientras que el esbozo macronuclear aparece aproximadamente tan marcado como en los exconjugantes incubados con el isótopo durante 5-6 h.

Por otra parte, los individuos vegetativos muestran macronúcleos y citoplasma muy marcados, incluso con tiempos cortos de incubación en la uridina radiactiva.

En cuanto a los exconjugantes mantenidos en medio "frío" después de la incubación con el isótopo, el esbozo macronuclear está menos marcado que en los exconjugantes no sometidos a tratamiento "frío", mientras que el citoplasma aparece más o menos intensamente marcado que en los precedentes.

En los experimentos en los que se ha utilizado la uridina-5-H<sup>3</sup> se han encontrado algunas diferencias ligeras con los mencionados anteriormente. Por ejemplo, para idénticos tiempos cortos de incubación, el número de gránulos de plata sobre el esbozo macronuclear es menor en el último experimento, pero sucede lo contrario con tiempos de incubación más largos (24 h). La *figura 7* muestra un ejemplo de una incubación de 24 h con la uridina-5-H<sup>3</sup>.

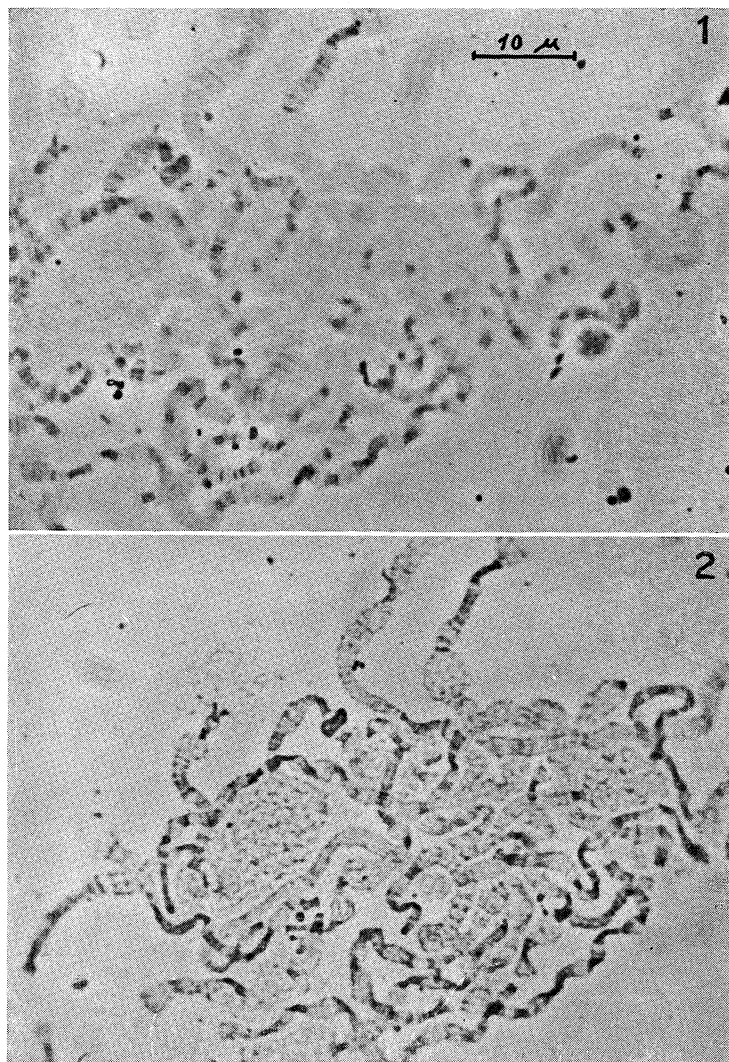
En lo concerniente a las digestiones enzimáticas, la mayor parte de las preparaciones que se extrajeron con RN-asa mostraban menor número de gránulos que los testigos, incluso no era raro encontrar esbozos macronucleares sin radiactividad, especialmente con tiempos cortos de incubación en el isótopo. Con tiempos más largos permanece en los exconjugantes una cantidad considerable de radiactividad, aunque menor que en los testigos. La radiactividad del esbozo macronuclear es bastante resistente a la extracción con DN-asa.

## DISCUSION

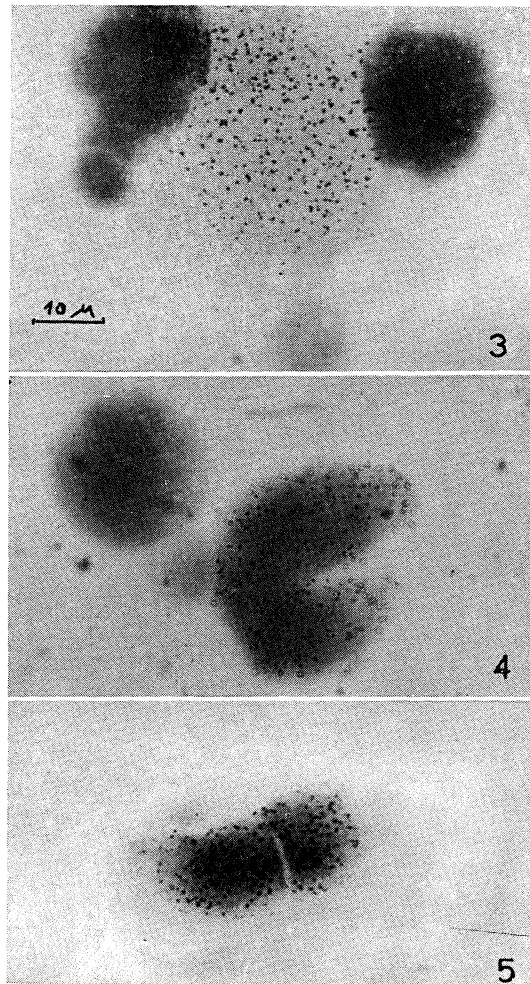
Pelling demostró por primera vez que los "puffs" y los anillos de Balbiani de los cromosomas politénicos de los dípteros eran lugares donde se sintetizaba ARN (10-11).

La presencia de regiones ensanchadas en los cromosomas politénicos de algunos ciliados hipotricos nos indicaba la posible actividad de tales cromosomas gigantes (para citas bibliográficas, véase la Introducción).

En los primeros ensayos autorradiográficos que se realizaron utilizando *Stylonychia mytilus*, Ammermann (3) no detectó síntesis de ARN en el esbozo macronuclear durante el estado de cromosomas politénicos. Por el contrario, Rao (16) y Rao y Ammermann (17) comprobaron que se sintetizaba ARN en el esbozo macronuclear de *Euplotes*, estando la radiactividad uniformemente distribuída. Asimismo, Radzikowski (15) admite que durante todo el desarrollo se sintetiza ARN en el nuevo macronúcleo de *Chilodonella cucullulus*. En una comunicación reciente (7), hemos demostrado la incorporación de uridina tritiada en el esbozo macronuclear de *S. mytilus* cuando los cromosomas politénicos se están desarrollando. Recientemente, Sapro y Ammermann (18), estudiando esta misma especie, admiten la incorporación de uridina marcada en el nuevo macro-



Figuras 1-2. Cromosomas politénicos de un esbozo macronuclear joven de *Styloynchia mytilus*, en los que alternan regiones ensanchadas con otras provistas de bandas conspicuas. Contraste de fases: 1) Preparación en fresco. 2) Aproximadamente el mismo campo que en la figura 1, después de teñir con orceína acética



Figuras 3-4. Autorradiografías de núcleos aislados procedentes de individuos vegetativos y de exconjugantes de *S. mytilus*, después de exponer 90 min a 120  $\mu\text{C}/\text{ml}$  de uridina- $\text{H}^3$  (2,5  $\text{C}/\text{mM}$ ). 3) Mientras que el esbozo macronuclear aparece marcado indicando la síntesis de ARN, no se han encontrado gránulos ni sobre los fragmentos de macronúcleo viejo ni sobre los micronúcleos. 4) Un macronúcleo vegetativo marcado contrasta con un fragmento de viejo macronúcleo y con un micronúcleo, ambos sin marcar. Figura 5. Autorradiografía de una porción de un individuo que está comenzando a dividirse. (Las mismas condiciones autorradiográficas que en las figuras 3-4.) Los gránulos están distribuidos por todo el macronúcleo excepto sobre la banda de replicación. Las tres preparaciones teñidas con verde de metilo-pironina-anaranjado G

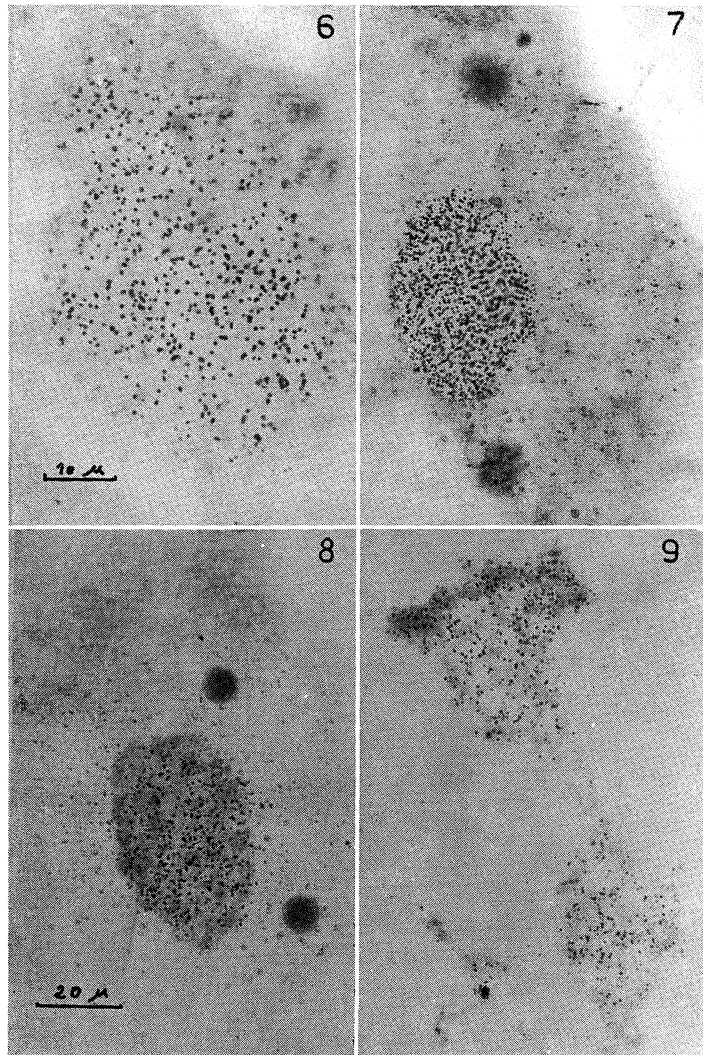


Figura 6. Autorradiografía de un esbozo macronuclear después de 5 h de incubación en 120  $\mu\text{C}/\text{ml}$  de uridina- $\text{H}^3$  (2,5 C/mM). La radiactividad está distribuída por todo el núcleo. Figura 7. Autorradiografía de un exconjugante después de 24 h de incubación en 60  $\mu\text{C}/\text{ml}$  de uridina- $\text{H}^3$  (29 C/mM). Obsérvese la intensa radiactividad sobre el esbozo macronuclear y gránulos dispersos sobre el citoplasma. Figura 8. Autorradiografía de un exconjugante sometido a las mismas condiciones autorradiográficas que en las figuras 6 y 7. Hay abundantes gránulos de plata sobre el esbozo macronuclear y algunos gránulos dispersos por el citoplasma. Figura 9. Los gránulos de plata yacen sobre el material cromosómico que se ha teñido con verde de metilo-pironina-anaranjado.

núcleo en desarrollo, pero solamente a niveles muy bajos y después de una incubación prolongada (20 h).

En el presente trabajo demostramos que el esbozo macronuclear de *Stylonychia mytilus* se marca claramente después de exponer los exconjugantes a la acción de la uridina tritiada durante poco tiempo (60-90 min).

La observación de las figuras 3 y 6-8 indica que la radiactividad está distribuida por todo el esbozo macronuclear. Una explicación a este hecho pudiera ser que hay numerosos *loci* cromosómicos en actividad, puesto que la mayor parte de las regiones de los cromosomas politénicos están ensanchadas, presentando la cromatina muy suelta, al menos cuando los cromosomas gigantes no han alcanzado todavía su máximo desarrollo.

Por otra parte, aunque previamente hemos podido aislar cromosomas politénicos que presentaban grandes "puffs" (9), la técnica utilizada es tan delicada que hasta el momento no la hemos podido adaptar para autorradiografía. Como ya hemos visto (figura 9), en condiciones favorables, el material cromosómico puede obtenerse separado del resto de la célula, pero no pueden distinguirse claramente los cromosomas politénicos aislados ni sus regiones ensanchadas, y en consecuencia no puede apreciarse con claridad la incorporación de la uridina marcada en zonas cromosómicas precisas.

Está generalmente admitido que la uridina- $H^3$  sirve para demostrar la síntesis de ARN, a pesar de algunos indicios tendentes a demostrar la incorporación indirecta de este isótopo al ADN. Nuestros resultados apoyan que la uridina tritiada se incorpora al ARN. En primer lugar, no es necesario mucho tiempo de incubación para que el precursor radiactivo se incorpore al esbozo macronuclear. Este orgánulo aparece ya algo marcado en los exconjugantes incubados durante 30 min, y con pulsos de 60-90 min la radiactividad es más patente. Por otra parte, el que en individuos que están empezando el proceso de división los macronúcleos estén uniformemente marcados, excepto las bandas de replicación que aparecen sin gránulos, está de acuerdo con los resultados obtenidos en *Euplotes eurystomus* (6, 14 y 19) referentes a la síntesis de ARN. En segundo lugar, el tratamiento con RN-asa elimina la mayor parte de los gránulos de plata de las células incubadas con uridina tritiada durante poco tiempo; con tiempos de incubación más largos, la cantidad de radiactividad resis-

tente a la enzima es más apreciable. Se han descrito numerosos casos de ARN resistente a la RN-asa pancreática (entre otros, 4, 5 y 20). Además, aunque la posibilidad de conversión de la uridina marcada a un precursor del ADN no pudiera excluirse completamente, hemos visto que después de digerir con DN-asa permanece una cantidad apreciable de radiactividad en el esbozo macronuclear.

El hecho de que al utilizar uridina-5-H<sup>3</sup> permanezcan las células marcadas aboga, asimismo, en favor de su incorporación al ARN, puesto que si las células hubieran metilado el isótopo a timidina, se hubiera perdido la radiactividad.

Las observaciones comparativas de los exconjugantes, tanto los expuestos como los no expuestos a períodos "fríos" de post-incubación, nos llevan a la conclusión de que una porción del ARN sintetizado pasa al citoplasma, permaneciendo otra porción en el esbozo macronuclear como ARN estable.

Por el momento permanece por resolver si la síntesis de ARN es continua o discontinua. Sin embargo, lo que parece cierto es que la síntesis de ARN no queda restringida a los esbozos macronucleares bastante jóvenes, puesto que a tiempos de incubación más prolongados corresponden esbozos macronucleares más marcados.

## RESUMEN

Se ha realizado un estudio de la incorporación de uridina-H<sup>3</sup> en los exconjugantes de *Stylonychia mytilus*. Después de 30 min de incubación ya hay algunos gránulos de plata sobre el esbozo macronuclear, aumentando la radiactividad al aumentar el tiempo de incubación en el isótopo. Así, a las 5-6 h de incubación los exconjugantes presentan un esbozo macronuclear claramente marcado. Hacia ese momento pueden observarse algunos gránulos sobre el citoplasma, cuyo número aumenta al incrementarse el tiempo de incubación.

Se comparan los resultados obtenidos a partir de los exconjugantes tanto los expuestos como los no expuestos a períodos "fríos" de post-incubación.

Al tratar con RN-asa pancreática se elimina la mayor parte de la radiactividad de los exconjugantes incubados en el isótopo durante poco



tiempo. Después de incubaciones más prolongadas permanece una cantidad apreciable de radiactividad.

Por otra parte, después de 60-90 min de incubación en la uridina marcada, la distribución de la radiactividad en los macronúcleos de los individuos que comienzan a dividirse es completamente diferente de la observada durante la síntesis del ADN, puesto que los gránulos de plata están más o menos uniformemente distribuidos, excepto sobre las bandas de replicación que aparecen sin gránulos.

Nuestros resultados indican que hay síntesis de ARN en el esbozo macronuclear. La distribución de la radiactividad en este orgánulo es casi uniforme, lo cual estaría relacionado con la formación generalizada de "puffs", que temporalmente tiene lugar en sus cromosomas politénicos constitutivos.

#### SUMMARY

##### *Incorporation of uridine- $H^3$ into the macronuclear anlage of *Stylo-nychia mytilus**

The incorporation of tritiated uridine into the exconjugants of *Stylo-nychia mytilus* was studied. After a 30 minute labeling period a few silver grains are already over the macronuclear anlage, the label increasing with time of incubation. Thus, after 5-6 hours of incubation the exconjugants exhibit a clearly labeled macronuclear anlage. By that time, some silver grains are detectable over the cytoplasm, the radioactivity increasing with time.

The results obtained with the exconjugants exposed and non-exposed to postincubation periods in "cold" culture medium are compared.

Pancreatic RN-ase treatment removes most of the label from exconjugants incubated with the isotope during short times. After longer incubation an appreciable amount of label remains.

On the other hand, after 60-90 minute pulses of uridine- $H^3$  the labeling pattern over the macronuclei of individuals starting division is quite different from the well-known pattern of DNA synthesis, since the silver grains appear more or less evenly scattered, except over the replication bands which present no grains.

Our results provides evidence, at least qualitative, of the synthesis of

RNA in the macronuclear anlage. This organelle shows a label nearly uniform in distribution. Such a result would be related to the transient generalized puff formation in its constitutive polytene chromosomes.

### BIBLIOGRAFIA

1. ALONSO, P., y PÉREZ-SILVA, J. 1966. Formación de "puffs" en los cromosomas politénicos de ciliados oxitríquidos. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Natur. Secc. Biol., 64, 397-98.
2. ALONSO, P., y PÉREZ-SILVA, J. 1967. Apareamiento somático y politenización en los cromosomas gigantes de ciliados hipotricos. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Natur. Secc. Biol., 65, 469-75.
3. AMMERMAN, D. 1968. Synthese und Abbau der Nucleinsäuren während der Entwicklung des Macronucleus von *Stylonychia mytilus* (Protozoa, Ciliata). Chromosoma, 25, 107-20.
4. BARNARD, E. A. 1969. Ribonucleases. Annu. Rev. Biochem., 38, 677-732.
5. BEVAN, E. A.; HERRING, A. J., and MITCHELL, D. J. 1973. Preliminary characterization of two species of ds-RNA in yeast and their relationship to the "killer" character. Nature, 245, 81-86.
6. EVENSON, D. P., and PRESCOTT, D. M. 1970. RNA metabolism in the macronucleus of *Euplotes eurystomus* during the cell cycle. Exp. Cell Res., 61, 71-78.
7. JAREÑO, M. A., et ALONSO, P. 1973. Incorporation de l'uridine tritiée par les exconjugants de *Stylonychia mytilus*. Progr. Protozool. Abst. Pap. 4th Int. Congr. Protozool., p. 199.
8. JAREÑO, M. A.; ALONSO, P., and PÉREZ-SILVA, J. 1970. Induced autogamy in 2 species of *Stylonychia*. J. Protozool., 17, 384-88.
9. JAREÑO, M. A.; ALONSO, P., and PÉREZ-SILVA, J. 1972. Identification of some puffed regions in the polytene chromosomes of *Stylonychia mytilus*. Protoplastologia, 8, 237-43.
10. PELLING, C. 1959. Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by the incorporation of uridine labeled with tritium. Nature (London), 184, 655-56.
11. PELLING, C. 1964. Ribonucleinsäure-Synthese der Riesenchromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an *Chironomus tentans*. Chromosoma, 15, 71-122.
12. PÉREZ-SILVA, J.; ALONSO, P.; GIL, R., and JAREÑO, M. A. 1969. Puffing in the polytene chromosomes of *Stylonychia mytilus* Ehrenberg. Progr. Protozool. Abstr. Pap. 3rd Int. Congr. Protozool., p. 36.
13. PRESCOTT, D. M., and BENDER, M. A. 1964. Preparation of mammalian metaphase chromosomes for autoradiography. Methods Cell Physiol., 1, 381-85.
14. PRESCOTT, D. M., and KIMBALL, R. F. 1961. Relation between RNA, DNA and protein syntheses in the replicating nucleus of *Euplotes*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 47, 686-93.

15. RADZIKOWSKI, S. 1973. Die Entwicklung des Kernapparates und die Nukleinsäuresynthese während der Konjugation von *Chilodonella cucullulus* O. F. Müller. Arch. Protistenk., 115, 419-28.
16. RAO, M. V. N. 1968. Macronuclear development in *Euplotes woodruffi* following conjugation. Exp. Cell Res., 49, 411-19.
17. RAO, M. V. N., and AMMERMANN, D. 1970. Polytene chromosomes and nucleic acid metabolism during macronuclear development in *Euplotes*. Chromosoma, 29, 246-54.
18. SAPRA, G. R., and AMMERMANN, D. 1973. RNA synthesis and acquisition of actinomycin D insensitivity during conjugation in *Stylonychia mytilus*. Exp. Cell Res., 78, 168-74.
19. STEVENS, A. R. 1963. Electron microscope autoradiography of DNA and RNA syntheses in *Euplotes eurytomus*. J. Cell Biol., 19, 67 A.
20. VÁZQUEZ-NIN, G., and BERNHARD, W. 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. J. Ultrastruct. Res. 36, 842-60.

INSTITUTO «GREGORIO MARAÑÓN» (C S I C)  
LABORATORIO DE BIOLOGIA DE MICROORGANISMOS FOTOSINTETICOS

## MICROGRAPHIC STUDY OF *CHLORELLA* GROWN IN A CULTURE MEDIUM WITHOUT NITROGEN OR WITH AMMONIUM-N

by

M. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. L. MUÑOZ and M. VILLARROYA

### INTRODUCTION

It is well known that algae that grow with ammonium nitrate as a source of nitrogen preferably assimilate the ammonium ion, not using the nitrate ion until it has become exhausted (6 and 12). Similar results have been obtained with fungi. Morton and Mac-Millan (7), working with the *Scopulariopsis* genus observed that the ammonium completely inhibited the assimilation of nitrogen, this having a slight activity on the assimilation of nitrite. These authors were the first to suggest that the ammonium acts by inhibiting the reduction of nitrate to nitrite. Syrett and Morris (15) proved that in *Chlorella* the ammonium ion repressed the assimilation of the nitrate ion when inhibiting the reductase nitrate of the algae.

We have observed that when *Chlorella* was cultivated, in autotrophic conditions, in the presence of the ammonium ion, either as the only source of nitrogen or in the form of ammonium nitrate, the culture did not grow, the cells discolored, they increased their size and finally disorganized in the medium.

It is known that in nitrogen-deficient *Chlorella* cells the main products of the photosynthesis pass from proteins to carbohydrates and from these

to lipids (2 and 8), and according to Aach (1) and Fogg and Collyer (3) such cells accumulate a considerable amount of fats.

In the present work, applying optic and electronic microscopy techniques, we study on *Chlorella pyrenoidosa* cells, the variations of growth, size and reserves of carbohydrates and lipids, when the algae are grown in a nitrogen-free medium or in the presence of the ammonium ion.

### MATERIALS AND METHODS

The work was carried out with *Chlorella pyrenoidosa* Chick 211/8h Emerson of the Culture Collection of Algae and Protozoa (The Botany School, University of Cambridge, England) acclimatized in our laboratory, cultured in medium A of Rodríguez-López (10), at 24 °C, permanently lighted with Fluora (Osram) light and aerated with air containing 2 % of CO<sub>2</sub>.

The KNO<sub>3</sub> of medium A substituted with 1.321 g/l of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or with 0.8 g/l of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, when it is desired that the source of nitrogen of the medium be, respectively, the ammonium ion or that the ammonium and nitric ions coexist.

The N-deficient cells were obtained by culturing the normal ones in the same medium but nitrogen-free, for 24 or 48 hours. The cells were harvested by centrifugation and washed several times in the corresponding medium. The cellular diameter was measured with a micrometer eye-piece and the average was calculated by several measurements.

For studying under the Philips EM 300 electronic microscope, the cells were collected by centrifugation and respectively washed in Millonig solution, prefixed in glutaraldehyde and posfixed in 2 % osmium tetroxide.

Then the material was dehydrated with acetone, a portion of which contained uranyl acetate as a contrast. Afterwards, the cells were included in araldite following a variation of the Glauert and Glauert (4) method.

### RESULTS

The inorganic source of nitrogen ideal for *Chlorella* was KNO<sub>3</sub>; the responses thereto by the cells were the more physiological ones: it maintai-

ned the growth, the size and the cellular appearance of the algae (table 1).

Table 1. Behaviour of N-deficient Chlorella in culture media with nitrogen-N or ammonium-N

Source of nitrogen	Growth index	Size of cells in $\mu$
KNO <sub>3</sub>	3.4	7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.2	12
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.2	11
Without N	1.2	12

When the ammonium ion was present in the culture medium, either as (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, or as NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, the culture discolored, the growth stopped and, under the microscope, the cells increased their size, they became giant (table 1).

The pH of the medium decreased with any nitrogen salt of those used. This decrease was very small (0.2-0.3) in the medium with KNO<sub>3</sub> and it was more obvious (about 0.8) when the medium contained ammonium ions. But more projecting results, the basic objective of this work, were observed under the electron microscope.

The control cells, cultured in a medium with only nitric-N as the source of nitrogen, showed a sui generis structure and organization and posed normal amounts of reserve substances (figure 1); in turn, the cells cultured in the total absence of nitrogen presented, 24 hours later, a great amount of starch (figure 2). There also appeared in these cells big drops of lipids (fats). The algae kept for 48 hours in a nitrogen-free growth medium substantially increased their lipid contents (figure 3).

The Chlorella cells N-starved cultured in a ammonium-ion containing medium, under the electron microscope showed in their cytoplasm, as an unequivocal feature, dense bodies in the vacuoles, figures 4-5, at the same time that the amounts of starch and fats existent in N-deficient cells out had decreased.

But these effects are reversible. If the N-deficient *Chlorella* cells, kept for 48 hours in a medium with ammonium-N, were cultured later in a nutritive solution complete with  $\text{KNO}_3$  as the only source of nitrogen, after 10 days they would recuperate, returning to their normal size and appearance; the growth rate is again peculiar to the specie and they showed, under the electron microscope, their typical structure, the masses of starch and lipids peculiar to N-deficient cells and the dense bodies of those cells cultured in media with N-ammonium having disappeared (*figure 6*).

### DISCUSSION

There is not doubt that the  $\text{KNO}_3$ , as the only source of N, is the most adequate for the *Chlorella* in order to develop its physiologism in a normal way and its peculiar size, appearance, growth and ultrastructure (*table 1*, and *figure 1*).

It is know that when culture conditions stop being ideal for the *Chlorella* the primary products of the photosynthesis may be directed towards the synthesis of products of reserve: carbohydrates and/or lipids.

This the case of the N-deficient cells. Several authors (1-3 and 8), in culturing *Chlorella* in media deprived of N, arrived, through chemical methods, to similar results, though they did not detect the effects of this lacking until after keeping the algae in such media for a least 6 days.

The decoloration of the *Chlorella* cells is due to the accumulation of great amounts of starch and lipids into them (*figures 2-3*) as Soeder (13) had assumed. The store of such reserve products determined the increase in volume of the cells. Likewise, it is obvious that the C/N rate increased in such a way that cellular division is inhibited (11).

When N-starved *Chlorella* cells, utterly full of starch and lipids, were cultured in the presence of the ammonium ion, they progressively lost these reserve substances, and in this manner produced the dense bodies contained in the vacuoles (*figures 4-5*). These processes seem to confirm the hypothesis of Ludwig (5), according to which the assimilation of ammonium by N-deficient *Chlorella* takes place at the expenses of the reserve endogene carbohydrate (we would add "and also of the lipids") without being affected at all by light or the addition to the media of assimilable sugars.

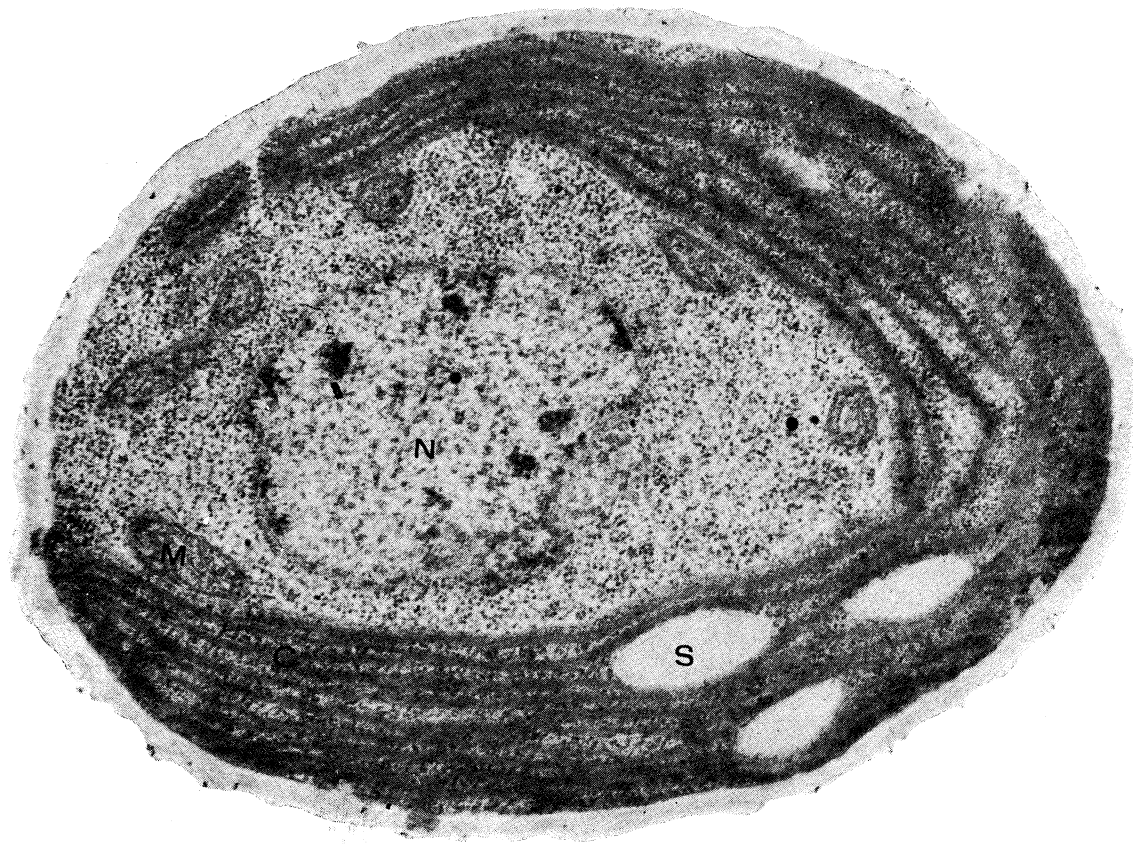


Figure 1. Chlorella cell grown in a nutritive medium with  $KNO_3$  as a source of nitrogen. N, nucleus; C, chloroplast; M, mitochondria; S, starch.  $\times 32,780$



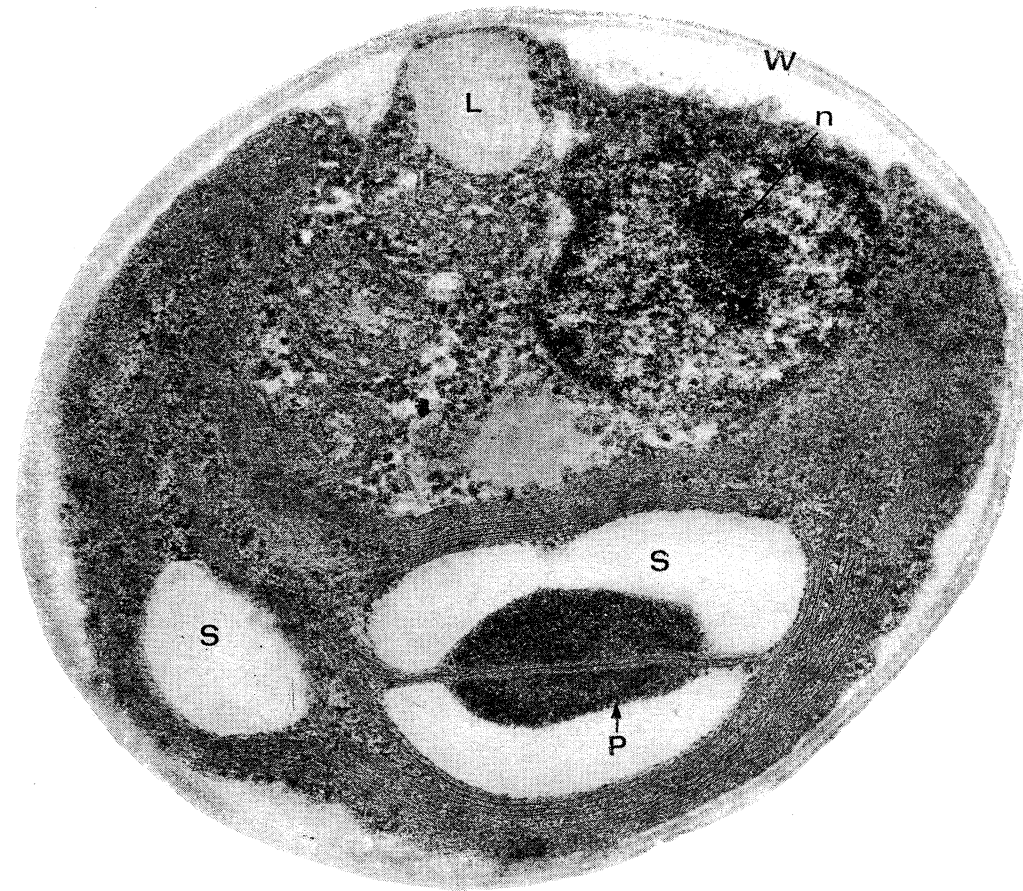


Figure 2. Chlorella cell cultured for 24 hours in a medium with no nitrogen. P, pyrenoid; L, lipids; W, cell wall; n, nucleolus.  $\times 80,000$

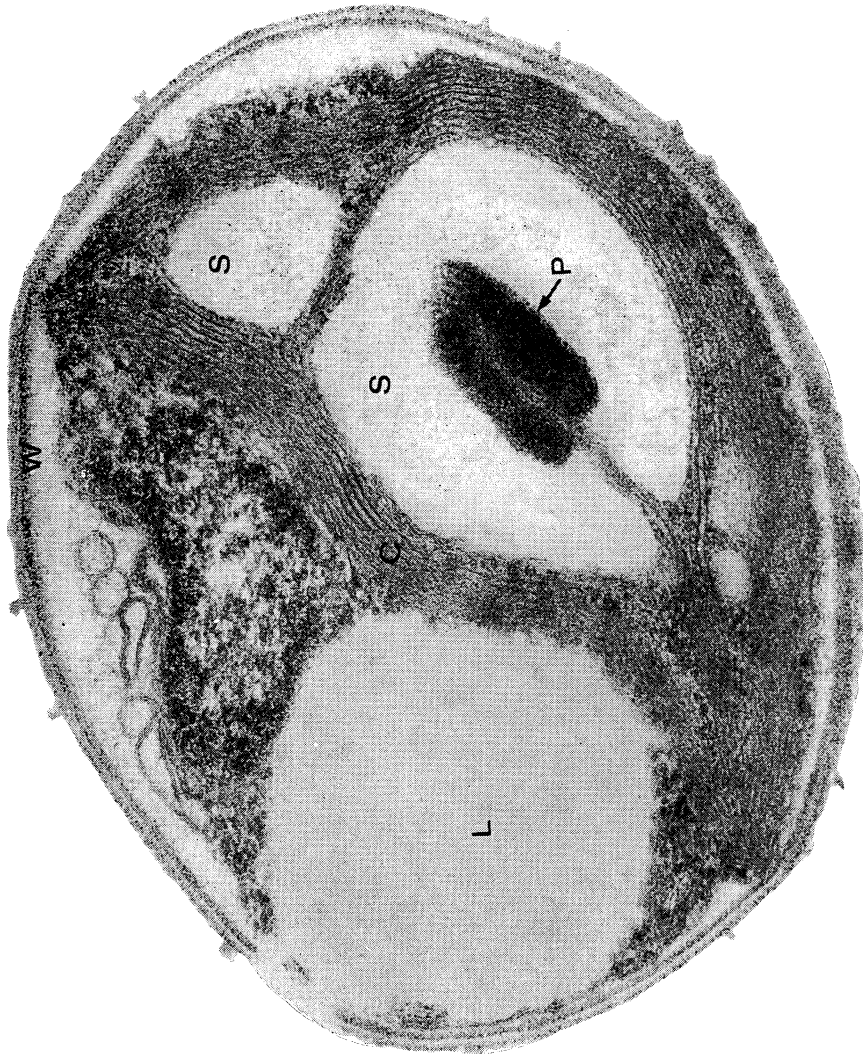


Figure 3. Chlorella cell kept for 48 hours in a medium with no nitrogen.  $\times 93,500$

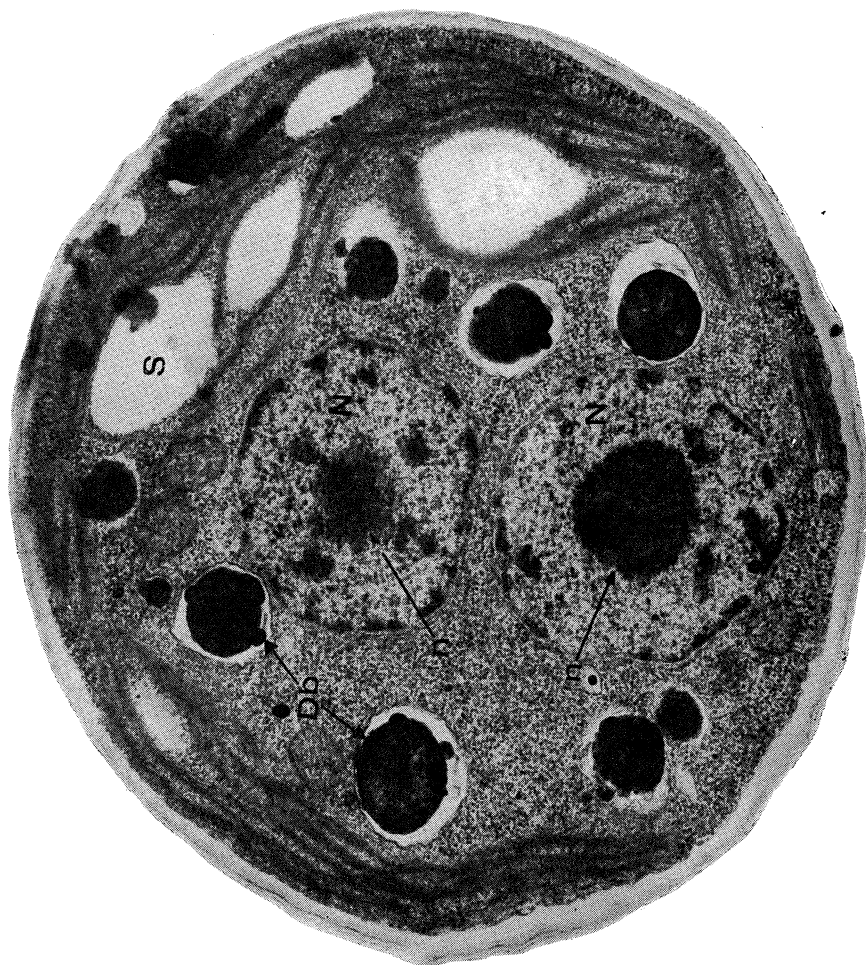


Figure 4. Chlorella cell coming from a culture with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as a source of nitrogen. Db, dense bodies.  $\times 29,080$

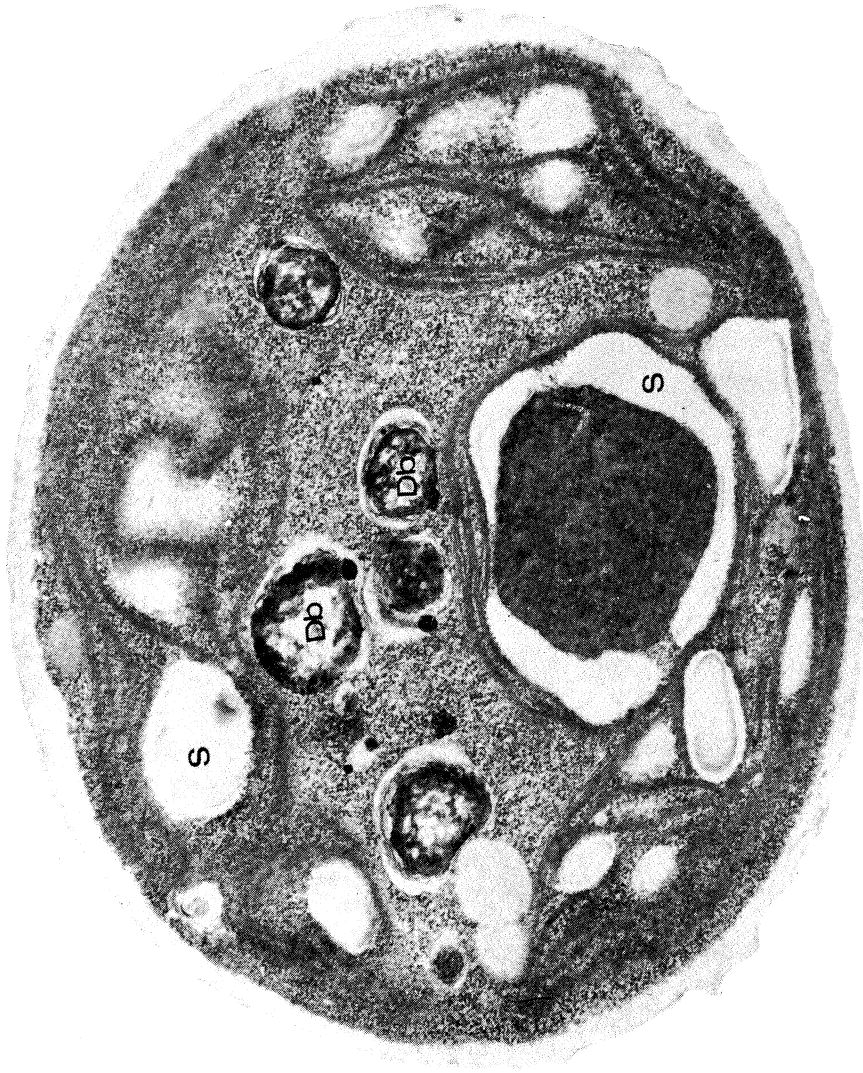


Figure 5. Chlorella cell cultured in a medium with  $NH_4NO_3$  as a source of nitrogen.  $\times 23,520$



Figure 6. Chlorococcoid cells previously cultured for 96 hours in culture medium with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  or  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and resown in a medium with  $\text{KNO}_3$ .  $\times 61,052$

The phenomena observed in N-starved *Chlorella* and in the growth, in the presence of ammonium-N, are reversible. When N-deficient cells were cultured, for even 72 hours, in a medium in the presence of ammonium-N and were passed onto a culture medium with  $\text{KNO}_3$  after 10 days, they would completely recover their ultrastructure (*figure 6*), the growth rate having been reinstated therein, as also showed in *Chlamydomonas* (6).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Miss V. Azorín for her technical assistance.

#### SUMMARY

The effects on nitrogen-starved *Chlorella* cells and the presence of the ammonium-N in the culture medium were studied. The lack of N inhibits the growth of the alga and determines gigantism and abundant accumulation of starch and lipids in its cells; therefore, this is an efficient process for introducing the massive production of these substances. The N-deficient *Chlorella* cells cultivated in an ammonium-N containing growth medium consume the starch and lipids accumulated therein and originate dense bodies in the vacuoles. The effects originated by the lack of N or by the presence of ammonium-N are reversible and these cells return to their normal appearance, structure and characteristics when cultivated again in a culture medium with  $\text{KNO}_3$  as the only source of nitrogen.

#### RESUMEN

*Estudio micrográfico de la acción del ion amonio y de la carencia de nitrógeno en Chlorella*

Se estudian por microscopia los efectos de la carencia de nitrógeno y del ion amonio sobre *Chlorella*. La carencia de N inhibe el crecimiento del alga y determina gigantismo y abundante acumulación en sus células de almidón y lípidos, siendo, por lo tanto, un procedimiento eficaz para inducir la producción masiva de estas sustancias. Células de *Chlorella* deficientes en nitrógeno cultivadas en un medio conteniendo el ion amonio, consumen el almidón y lípidos en ellas acumulados y originan unos cuerpos densos al microscopio electrónico. Los efectos antes señalados, origi-

nados por la carencia de N o por el ion amonio, son reversibles y estas células vuelven a su aspecto, estructuras y características normales cuando se las cultiva de nuevo, en un medio con KNO<sub>3</sub> como única fuente de nitrógeno.

#### BIBLIOGRAPHY

1. AACH, H. G. 1952. Über Wachstum und Zusammensetzung von *Chlorella pyrenoidosa* bei Unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratmengen. Arch. Mikrobiol., 17, 213-46.
2. BONGERS, L. H. J. 1956. Aspects of nitrogen assimilation by cultures of green algae. Meded. Landbouwhoges. Wageningen, 56, 1-52.
3. FOGG, G. E., and COLLYER, D. M. 1953. En J. S. BURLEW (ed.). Algal Culture 177. E Carnegie Inst., Washington, D.C.
4. GLAUERT, A. M., and GLAUERT, R. H. 1958. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 191-94.
5. LOSADA, M.; HERRERA, J.; MALDONADO, J. M., and PANEQUE, A. 1972. Mechanism of nitrate reductase reversible inactivation by ammonia in *Chlamydomonas*. Plant Sci. Lett., 1, 31-37.
6. LUDWIG, C. A. 1938. The availability of different forms of nitrogen to a green alga (*Chlorella*). Amer. J. Bot., 25, 448-58.
7. MORTON, A. G., and MACMILLAN, A. 1954. Changes in enzyme activity of fungi during nitrogen starvation. J. Exp. Bot., 11, 116-28.
8. OORSCHOT, J. L. P. VAN. 1955. Conversion of light energy in algal culture. Meded. Landbouwhoges. Wageningen, 55, 255-76.
9. PRATT, R., and FONG, J. 1940. Studies on *Chlorella vulgaris*. III. Growth of *Chlorella* and changes in the hydrogen-ion and ammonium-ion concentrations in solutions containing nitrate and ammonium nitrogen. Amer. J. Bot., 27, 735-43.
10. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. 1964. Formas gigantes de *Chlorella pyrenoidosa*, su inducción por azúcares y su utilidad para el crecimiento de cultivos. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Natur. Secc. Biol., 62, 49-57.
11. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. 1965. Morphological and structural changes produced in *Chlorella pyrenoidosa* by assimilable sugars. Arch. Mikrobiol., 53, 319-24.
12. SCHULER, J. F.; DILLER, W. M., and KERSLEN, H. J. 1953. Preferential assimilation of ammonium ion by *Chlorella vulgaris*. Plant Physiol., 28, 299-303.
13. SOEDER, J. C. 1960. Studien zur Entwicklungsphysiologie von *Chlorella pyrenoidosa* Chick unter besonderer Berücksichtigung der Salzkonzentration in Medium. Flora, 148, 489-516.
14. SYRETT, P. J. 1962. Nitrogen assimilation, R. A. LEWIN (ed.). Physiology and Biochemistry of Algae, 171. Academic Press, New York and London.
15. SYRETT, P. J., and MORRIS, J. 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. Biochim. Biophys. Acta, 67, 566-75.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL  
SECCION DE MICROBIOLOGIA TECNICA

## COLIFORMES Y *ESCHERICHIA COLI* EN FRUTAS Y VERDURAS DE MERCADO

por

M. RODRÍGUEZ-REBOLLO

### INTRODUCCION

La frecuencia de presentación de microorganismos del grupo *coli-aerogenes* sobre diferentes vegetales se ha estudiado con el fin de conocer las posibles fuentes de contaminación (4-5) o de valorar su significación sanitaria, investigando *Escherichia coli* enteropatógenos (6).

Con análogos fines se ha realizado el presente trabajo en frutas y verduras españolas, a la vez que para establecer comparaciones sobre la cuantía de coliformes en vegetales obtenidos en diferentes habitats.

### MATERIAL Y METODOS

La mayoría de las muestras fueron recogidas durante los meses de agosto a noviembre en el Mercado Central de Frutas y Verduras, de Madrid (capital). Las piezas se adquirían completas, al estado fresco, y se analizaban el mismo día de su adquisición; se envolvían en papel para su transporte y las operaciones siguientes se realizaban en condiciones estériles.

Según las muestras, 3- 60 g de vegetales se mantenían en un matraz con 250 ml de solución salina estéril, que permanecía en agitación du-



rante 30 min, al final de cuyo período se realizaban las diluciones convenientes para cada determinación.

Los recuentos de aerobios se efectuaron en placas de agar común; los de anaerobios esporulados, tipo *Clostridium welchii*, por la lectura de colonias negras, de más de 3 mm de diámetro, sobre el medio de Wilson (7), con las modificaciones de Manzanete (8) para el análisis bacteriológico del agua; el número más probable (NMP) de coliformes, por las combinaciones de resultados positivos en cada muestra de una triple serie de 5 tubos cada una, con caldo lactosa al 1 % y campana de fermentación, sembrados con 10, 1 y 0,1 ml de solución problema y en tres fases: presunción (caldo lactosa al 1 %), confirmación parcial (agar-eosina-azul de metileno de Levine) y confirmación definitiva (IMVIC y lactosa y glucosa al 1 % en agua de peptona), aplicando posteriormente las tablas de probabilidades (2).

La tipificación serológica de *Escherichia coli* se ha efectuado frente a la serie de antisueros OK. Las estirpes OK positivas se comprobaban con el correspondiente suero anti-O, en estado vivo, o bien, después de someterlas a ebullición durante 30 min, en el caso de que la aglutinación, sin calentar las bacterias, resultase negativa. La estirpe tipificada como O55:K59(B) fue estudiada en su comportamiento bioquímico frente a los substratos que se indican en el cuadro 3, preparados conforme a Sedlak y Rische (11).

En las pruebas de supervivencia de *Escherichia coli*, 25-80 g de vegetales (*Apium graveolens* L., *Cichorium endivia* L. y *Lactuca saliva* L.), se sumergieron tres veces sucesivas, durante 30 min en volúmenes de 500-800 ml de solución salina estéril, realizando finalmente los recuentos de aerobios, NMP de coliformes y su identificación bioquímica (IMVIC). Luego, se adicionaba a cada muestra 0,1 ml de cultivo de *E. coli* var. 1, en agua de peptona con 5.000 millones/ml de bacterias y seguidamente, con agitación, las proporciones de cloruro sódico, vinagre (ácido acético) y agua, normalmente utilizadas en la preparación española de ensaladas. La temperatura durante el transcurso de la experiencia fue de 18°-20 °C.

Los recuentos de aerobios y NMP de coliformes, en la forma señalada previamente, a las 1, 7, 24 y 48 h, después de la adición de *Escherichia coli*, se hicieron en cada muestra, tras inmersión en solución salina estéril durante 10 min, con agitación.

Los valores de pH con potenciómetro y cloruros, por el método de Volhard (3), se calcularon en la parte líquida del preparado.

## RESULTADOS

En el *cuadro 1* se expresan los porcentajes de muestras con coliformes, así como la cuantía de las poblaciones de estos últimos, *Escherichia coli* var. 1, aerobios y anaerobios y en el *cuadro 2* se diferencian las proporciones de *E. coli*, *E. freundii*, *Aerobacter aerogenes* y coliformes con fermentación irregular, por cada 100 muestras.

En *Cichorium endivia* L, las hojas internas estaban más contaminadas por coliformes que las externas, en tanto que para los recuentos de aerobios lo contrario parecía cierto. *Escherichia coli* var. 1 apareció con la mayor frecuencia en hojas de *Apium*, *Nasturtium* y *Cichorium*, mientras que *Lycopersicum* y frutas carecían de él.

Un 33 % de las muestras de *Apium*, 7 % de *Nasturtium*, 25 % de *Prunus*, 59 % de *Lactuca* y 25 % de *Vitis* fermentaron los tubos de caldo-lactosa, sin que las pruebas de confirmación parcial y total demostrasen que esta acción se debía a bacterias del grupo *Escherichia*, *Aerobacter* e intermedio.

Por otra parte, el estudio serológico de las estirpes de *Escherichia coli* aisladas ha mostrado la existencia de una del grupo de las gastroenteritis infantiles, clasificada como 055:K59(B), que aglutinaba al estado vivo el correspondiente suero OK, aunque no daba un título significativo frente al suero 055; tiene el antígeno flagelar H4. Las características bioquímicas aparecen en el *cuadro 3*. La estirpe 055:K59(B):H4 ha sido hallada en una muestra de *Nasturtium officinale* R. Br., con 91 millones, 55.000 y 3.830 aerobios, anaerobios y coliformes/g, respectivamente.

En otra muestra de *Cichorium* fue hallada una estirpe 026:K60(B) que tenía 87 millones y más de 112.500 coliformes/g y ningún clostridio esporógeno. Otra estirpe de 026:K60(B) apareció en tallos de *Apium* con 1,5 millones, 30 y 1.000/g de aerobios, anaerobios y coliformes, respectivamente.

Finalmente, la viabilidad de *Escherichia coli* var. 1, en las condiciones señaladas en el *cuadro 4*, muestra una considerable disminución numérica de bacterias a la hora y a las 24 h; no existe *E. coli* var. 1 a las

**Cuadro 1. Coliformes, Escherichia coli var. 1, aerobios y anaerobios tipo Clostridium welchii, en frutas y verduras de mercado**

Plantas	Número	Coliformes			Escherichia coli var. 1		Media de recuentos	
		%	NMP/g	Media g	NMP/g	Media g	Aerobios (× 10 <sup>3</sup> )g	Anaerobios g
<i>Apium graveolens</i> L.	15	40,0	1.000-174.000	18.510	0	0	19.000,00	12,0
<i>Cichoriun endivia</i> L.	21	80,9	1.430-235.800	66.870	4.000-177.500	21.670	17.000,00	1.690,0
<i>Lactuca sativa</i> L.	22	27,2	17- 2.200	325	2.220	200	5.600,00	35,0
<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.	14	85,7	1.160- 45.160	12.500	1.080- 29.000	4.980	30.600,00	32.680,0
<i>Prunus domestica</i> L.	8	12,5	5	5	0	0	1,24	0,6
<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill	3	0,0	0	0	0	0	0,29	0,2
<i>Vitis vinifera</i> L.	8	12,5	13	13	0	0	4,29	0,4

Cuadro 2. Coliformes/100 muestras de frutas y verduras de mercado

Plantas	Número	<i>Escherichia coli</i>		<i>E. freundii</i>		<i>Aerobacter aerogenes</i>		Irregulares
		Var. 1	Var. 2	Var. 1	Var. 2	Var. 1	Var. 2	
		+ + - -	- + - -	- + - +	+ + - +	- - + +	+ - + +	
<i>Apium graveolens</i> L. (tallos)	15	0	6,6	6,6	6,6	20,0	6,6	13,0
<i>A. graveolens</i> L. (hojas)	6	50,0	16,6	0	0	0	0	50,0
<i>Cichorium endivia</i> L.	21	42,8	19,0	14,2	9,5	4,7	19,0	42,8
<i>Lactuca sativa</i> L.	22	9,1	4,5	4,5	4,5	4,5	0	4,5
<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.	14	50,0	28,5	0	28,5	0	14,2	28,5
<i>Prunus domestica</i> L.	8	0	0	0	0	0	12,5	0
<i>Lycopersicum</i> <i>esculentum</i> Mill	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vitis vinifera</i> L.	8	0	0	0	0	12,5	0	0

Cuadro 3. Características bioquímicas del *E. coli* 055:K59:  
H4

Pruebas bioquímicas	Resultados (días)
Glucosa	+ (ácido y gas)
Adonita	— (30)
Dulcita	+ (2)
Sorbita	+ (1)
Arabinosa	+ (1)
Xilosa	+ (1)
Ramnosa	+ (1)
Salicina	+ (3)
Inosita	— (30)
Lactosa	+ (1)
Sacarosa	— (30)
Sorbosa	— (30)
Manita	+ (1)
Almidón	+ (1)
Trehalosa	+ (1)
Indol	+
Hidrógeno sulfurado	— (30)
Gelatina	— (30)
Glucosa amónica	+ (1)
Citrato amónico	— (10)
Nitrato potásico	+
Voges-Proskauer	—
Rojo de metilo	+
Cianuro potásico	— (30)
D- tartrato	— (14)
L- tartrato	+
i- tartrato	— (14)
Citrato sódico	— (30)
Mucato	+
Glicerina (Stern)	+ (lila-púrpura)
Prueba de la ninhidrina	+
Lisina descarboxilasa	+
Fenilalanina-desaminasa	—
Ureasa	—

*Cuadro 4. Supervivencia de Escherichia coli var. 1*

Horas	<i>Cichorium endivia L.</i>				<i>Lactuca sativa L.</i>				<i>Nasturtium officinale R. Br.</i>			
	pH	ClNa/ 100 ml	Aer./g	NMP/g <i>E. coli</i>	pH	ClNa/ 100 ml	Aer./g	NMP/g <i>E. coli</i>	pH	ClNa/ 100 ml	Aer./g	NMP/g <i>E. coli</i>
0	—	—	22.580	$8 \times 10^6$	—	—	583.000	$5,7 \times 10^6$	—	—	26.250	$22,5 \times 10^6$
1	3,05	5,61	220	73	3,35	2,80	2.080	30	3,35	3,79	1.330	30
7	3,15	5,67	100	14	3,50	2,70	1.060	4	3,40	4,25	120	13
24	3,25	—	92	0	3,60	3,09	225	25	3,50	5,20	500	0
48	3,35	5,73	625	0	3,70	4,85	9.440	14	3,60	5,66	12.500	0

24 h, con excepción de *Lactuca sativa* L., en la que persiste más de 48 h, aunque en mínima proporción en relación con el aporte inicial.

### DISCUSION

Los porcentajes de coliformes en las muestras son inferiores a los señalados por Papavassiliou y colaboradores (10) en vegetales y frutas vendidos en el mercado central de Atenas (86,8 y 65,8 %, respectivamente).

Los valores de coliformes obtenidos para las verduras están dentro de los límites indicados por Norman y Kabler (9) para vegetales regados con aguas residuales (NMP/g, 0,30-460.000), pero nuestro valor medio, con la excepción del obtenido con muestras de *Lactuca sativa* L., resulta más elevado que el proporcionado por los citados autores (200, media general, y 390 para vegetales foliáceos). La media de frutas y tomates es similar al valor aportado por Norman y Kabler (9) (NMP/g, 10). La proporción de *Escherichia coli* var. 1, en *Nasturtium officinale* R. Br., es muy superior a la proporcionada por Tee (12) (NMP/g, 295).

Los recuentos de aerobios y anaerobios esporulados, tipo *welchii*, guardan, en general, relación con los de coliformes.

Los resultados de viabilidad de *Escherichia coli* están de acuerdo con los estudios de Allen y Fabian (1), si admitimos que se puedan establecer comparaciones con alimentos diferentes, tales como jugo de naranja de pH = 3,5, col ácida (pH = 3,8), mayonesa (pH = 3,7) y salsa de arándano (pH = 2,8). Nuestros preparados se pueden incluir en el grupo III de alimentos de los citados autores, con pH comprendidos entre 2,8 y 3,8 y en los cuales los organismos del grupo *E. coli* mostraban poca formación de gas a las 16 h y producían reacciones positivas de gas solamente 1 día o, a lo más, 2 días, tal como ha ocurrido en los preparados de *Cichorium* y *Nasturtium*.

### RESUMEN

Los recuentos de aerobios, anaerobios esporulados tipo *Clostridium welchii*, coliformes y *Escherichia coli* fueron menores en frutas que en verduras de mercado y entre éstas *Apium graveolens* L. (tallos), *Cichorium endivia* L. y *Nasturtium officinale* R. Br. las más contaminadas con coliformes.

*Escherichia coli* var. 1 no apareció en *Apium graveolens* L. (tallos), *Lycopersicum esculentum* Mill. y frutas.

*Escherichia coli* enteropatógeno, clasificado como 055:K59(B) se ha hallado en una ocasión en *Nasturtium officinale* R. Br. y el identificado como 026:K60(B) una vez en *Apium graveolens* L. y otra, en *Cichorium endivia* L.

La supervivencia de *Escherichia coli* var. 1 fue de 1 día en las ensaladas de *Nasturtium officinale* R. Br. y *Cichorium endivia* L. con pH = 3,05-3,60 y cloruros, 3,79-5,73 %.

### SUMMARY

#### *Coliforms and Escherichia coli on market fruits and vegetables*

The aerobic, spore-forming anaerobe (*Clostridium welchii*), coliforms and *Escherichia coli* contents were higher in vegetables than in fruits. *Cichorium endivia* L. and *Nasturtium officinale* R. Br. had the greater grade of contamination with coliforms.

*Escherichia coli* var. 1 was not isolated on *Apium graveolens* L. (stems), *Lycopersicum esculentum* Mill. and fruits.

Enteropathogenic *Escherichia coli* 055 : K599(B) has been found one time in *Nasturtium officinale* R. Br. and 026 : K60(B) in *Apium graveolens* L. and *Cichorium endivia* L.

The ability of *Escherichia coli* var. 1 to survive was 24 hours on prepared salads of *Nasturtium officinale* R. Br. and *Cichorium endivia* L. within pH 3.05-3.60 and sodium chloride, 3.79-5.73 %.

### BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, C. H., and FABIAN, F. W. 1954. Comparison of *E. coli* and *St. faecalis*, as a test organism to determine the sanitation quality of food. *J. Milk Food Technol.*, 17, 204-7 and 237-42.
2. American Public Health Association. 1963. Métodos Estandar para el Examen de Aguas y Aguas de Desecho, 467. Interamericana, México.
3. CASARES, R. 1956. Tratado de Análisis Químico, vol. 2, 370. Casares, Madrid.
4. FRAZER, M. H.; REID, W. B., and MALCOLM, J. F. 1956. The occurrence of *coli-aerogenes* organisms on plants. *J. Appl. Bacteriol.*, 19, 301-9.



5. GELDREICH, E. E.; KENNER, B. A., and KABLER, P. W. 1964. Occurrence of coliforms, fecal coliforms and streptococci on vegetation and insects. *Appl. Microbiol.*, 12, 63-69.
6. HALL, H.; BROWN, D. F., and LEWIS, K. H. 1967. Examination of market foods for coliforms organisms. *Appl. Microbiol.*, 15, 1062-69.
7. LYONS, C., and OWEN, C. R. 1942. Wilson Blair medium in the rapid diagnosis of the clostridia of gas gangrene. *J. Bacteriol.*, 43, 685-87.
8. MANZANETE, J. 1967. Manual práctico de técnicas para análisis de aguas. *Alimentaria*, 14, 49-55.
9. NORMAN, N. N., and KABLER, P. W. 1963. Bacteriological study of irrigated vegetables. *Sewage Ind. Wastes*, 25, 605-9.
10. PAPAVALASSILOU, J.; TZANNETIS, S.; LEKA, H., and MICHOPoulos, G. 1967. *Coli-aerogenes* bacteria on plants. *J. Appl. Bacteriol.*, 30, 219-23.
11. SEDLAK, J., und RISCHE, H. 1961. *Enterobacteriaceae-Infektionen*, 23-53. Thieme, Leipzig.
12. TEE, G. H. 1962. Bacteriological examination of watercress. *Mon. Bull. Min. Health Pub. Health Lab. Serv.*, 21, 73-78.

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

## ESTUDIO MICROBIOLOGICO DE ESFEROPLASTOS DE *PSEUDOMONAS* PATOGENOS PRODUCIDOS POR ANTIBIOSIS A NIVEL DE PARED Y MEMBRANA

por

M.<sup>a</sup> TERESA PÉREZ-UREÑA, M. ESPINOSA, I. BARASOAIN y A. PORTOLÉS

### INTRODUCCION

La mayoría de las especies patógenas de *Pseudomonas* presentan una elevada antibiótico-resistencia polivalente que se produce a distintos niveles, siendo posible encontrar enzimas extracelulares capaces de oponerse a la acción de moléculas beta-lactámicas, oligosacáridos o cloranfenicol, entre otros (4, 13 y 17). Sin embargo, por sus diversas posibilidades de inducir a una variable resistencia de estas especies frente a medios hostiles, quizá tenga más importancia estudiar las condiciones que afectan a la impenetrabilidad de sus envolturas celulares. McGregor y Elliker (12) encontraron que el EDTA eliminaba la resistencia adquirida por el *Ps. aeruginosa* frente a compuestos de amonio cuaternario y, asimismo, ha sido observado por otros autores que aumentando inespecíficamente la permeabilidad celular de *Pseudomonas* se disminuye su resistencia a distintos agentes antibacterianos (2, 7-8, 10 y 15). Así se ha comprobado que el EDTA puede actuar sinérgicamente con la penicilina, ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol (19-20).

El hecho de que además de la antibiótico-resistencia, sean también las envolturas celulares responsables del mecanismo de patogénesis del *Pseudomonas*, convierte a los esferoplastos en elementos microbianos de gran interés para el estudio de las relaciones huésped-parásito en presencia de sustancias antimicrobianas.

En el presente trabajo se estudia la formación de esferoplastos de *Pseudomonas* en función de la naturaleza del antibiótico y de la modalidad del tratamiento, buscando situaciones que pudieran tener lugar durante el proceso de infección *in vivo* y realizando, además, algunos ensayos comparativos de infectividad en ratón.

## MATERIAL Y METODOS

### *Microorganismos*

Se han utilizado una veintena de estirpes patógenas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de diversos materiales clínicos. Todas ellas presentaron marcada capacidad hemolítica y de licuar la gelatina, así como una débil actividad proteolítica, según se comprobó por métodos habituales en nuestro laboratorio (15). En cuanto a su capacidad cromogénica, todas ellas pertenecían al grupo C<sub>3</sub> previamente establecido, capaz de producir cinco diferentes metabolitos cromógenos (5).

### *Antibióticos (\*)*

Se usaron siete antibióticos distintos capaces de actuar a nivel de membrana (colimicina y polimixina B) y de pared celular (fosfomicina, bacitracina, novobiocina, penicilina y cefalosporina). Con todos ellos se prepararon las soluciones de trabajo correspondiente y se esterilizaron, filtrando por filtros Millipore de 0,22  $\mu$ .

---

(\*) Estas sustancias fueron amablemente suministradas por distintos laboratorios: colimicina, por el Farmacológico Latino; polimixina, Pfizer, S. A.; fosfomicina, CEPA; bacitracina, Jorba, S. A.; novobiocina, Upjhon; penicilina, Antibióticos, S. A., y cefalosporina, Lilly.

*Medios de cultivo (\*\*)*

Para el aislamiento y caracterización previos, se utilizaron placas de agar-sangre, EMB y agar común. En las pruebas bioquímicas se utilizaron los medios y reactivos según los autores que se citan (6, 9, 11 y 18). La cromogénesis y antibiótico-sensibilidad fueron estudiadas sobre medio penassay líquido (Difco).

Para la obtención de esferoplastos se usó caldo nutritivo Oxoid hipertónico con sacarosa. Como solución estabilizadora de los protoplastos obtenidos se emplea una mezcla 0,75 M de sacarosa con 0,005 M de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , 0,01 M de  $\text{ClNa}$  y 0,05 M de glucosamina.

*Determinaciones de antibiótico-sensibilidad*

Estas se realizaron mediante valoración de la concentración mínima inhibidora (CMI) sobre medio líquido, con resazurina como indicador, y según una técnica ya descrita (14). Estas determinaciones se efectuaron sobre el medio isotónico normal y también sobre el mismo medio hipertónico con sacarosa a distintas molaridades, según se indica en los resultados.

*Producción de esferoplastos*

Se siguieron distintos métodos de acuerdo con el propósito experimental correspondiente; así, en principio se hicieron algunos ensayos en presencia de lisozima empleando el método de Cheng y colaboradores (3), mientras que para asociaciones de EDTA-lisozima utilizamos el método de Asbell y Eagon (1).

Después, a partir de las concentraciones que juzgamos más idóneas para estas estirpes, ensayamos nuestras propias condiciones experimentales normalizadas con el fin de poder realizar un estudio comparativo: En matraces de Monod, con 15 ml de caldo nutritivo Oxoid, a pH 7,8 y conteniendo 0,5 M de sacarosa, inoculamos hasta una  $\text{DO}_{600}$  de  $\approx 0,1$ , con un cultivo procedente de agar-sangre, e incubamos en un baño metabólico NBC a 37 °C y con una agitación de 250 r/m. Cuando el cultivo alcanza una densidad de 0,4, se le añaden 100  $\mu\text{g}$  de lisozima y 20

---

(\*\*) Todos los reactivos químicos utilizados son de Merck & Co., excepto la lisozima, que es de Sigma.

$\mu\text{g}$  de EDTA; se sigue incubando, pero a más baja temperatura y con una agitación más suave (30 °C y 50 r/m).

Después, a tiempos variables, se va controlando la producción de esferoplastos por microscopia de fase y cuando el tratamiento lítico se ha completado, se centrifuga el cultivo suavemente y se sustituye el sobrenadante por la solución estabilizadora previamente indicada.

Para la obtención de esferoplastos en presencia de antibióticos empleamos dos métodos de inducción, uno, *rápido*, con concentraciones altamente inhibitorias de antibiótico, que nos permitiera comprobar las diferencias de actividad entre las distintas moléculas inductoras y otro, *lento*, con concentraciones subinhibidoras. En el primer caso empleamos concentraciones de 2.000  $\mu\text{g}$  de antibiótico en medio hipertónico, con sacarosa 0,5 M y 0,25 M de EDTA. El antibiótico era añadido, como en el caso de la lisozima, cuando la  $\text{DO}_{600}$  era  $\approx 0,4$ ; es decir, cuando el cultivo está en la fase exponencial de su crecimiento. Para la inducción lenta utilizamos distintas series de matraces de Monod, con dosis subinhibidoras frente a inóculos más pequeños de  $\approx 10^4$  bacterias/ml. El contenido de cada matraz se examinó por contraste de fase al cabo de 16-18 h de cultivo. Las variaciones cuantitativas de las diferentes formas originadas, en cualquiera de los casos, se estimaron mediante recuento en cámara de Thomas.

#### *Ensayos de patogenicidad*

Se efectuaron sobre ratones de  $\approx 20$  g de peso inoculando intraperitonealmente distintas dosis de esferoplastos suspendidos en la solución estabilizadora.

## RESULTADOS

En primer lugar se estudian las condiciones normales para la producción de esferoplastos con lisozima y EDTA, y después comprobamos la actividad de los distintos antibióticos a nivel de las envolturas celulares así como su capacidad para inducir a la formación de esferoplastos.

### *1. Obtención de esferoplastos sin antibióticos*

Comparando el método de Cheng y colaboradores (3) con lisozima sola y el de Asbell y Eagon (1) con esta enzima + EDTA, comprobamos

que nuestras estirpes eran sensibles únicamente a esta última combinación y que incluso algunas de ellas se volvían resistentes a la acción del agente quelante. El *cuadro 1* da idea de los distintos ensayos, sobre 20 cepas patógenas variando las concentraciones de lisozima y EDTA, para dos molaridades distintas de sacarosa.

*Cuadro 1. Variaciones en la producción de esferoplastos de Ps. aeruginosa patógenos, en función de las concentraciones de sacarosa, lisozima y EDTA*

Variaciones en la composición del medio			Producción de esferoplastos	
Sacarosa	EDTA	Lisozima $\mu\text{g/ml}$	Cepas ensayadas positivas/totales	Formación de esferoplastos %
0,5 M	0,025 M	5	13/20	45
		50	14/20	40
	0,05 M	100	16/20	62
		250	18/20	65
2 M	0,025 M	5	13/20	47
		50	15/20	45
	0,05 M	100	16/20	70
		250	18/20	72

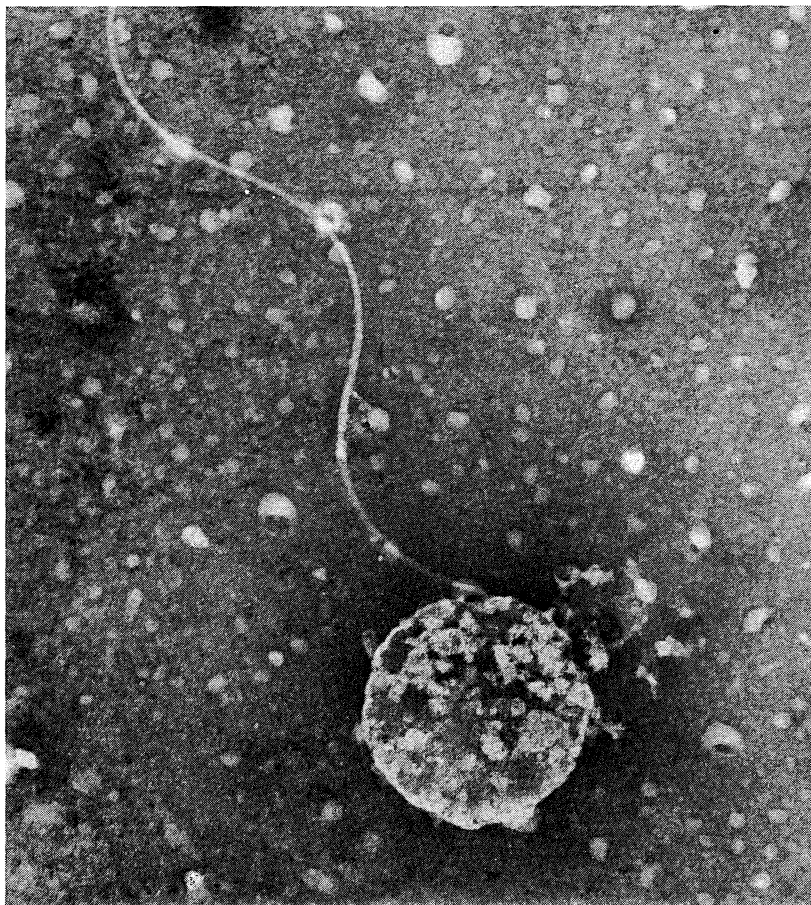
Seguidamente establecimos una experiencia comparativa entre el método de Asbell y Eagon (1) con nuestra técnica, según la cual estudiamos las concentraciones relativas de enzima tensiactiva para tiempos variables. En primer lugar (*cuadro 2*), comprobamos que la mayor proporción de esferoplastos (68-65 %) se consigue a los 45 min para concentraciones entre 4-8 M de EDTA con 100  $\mu\text{g/ml}$  de lisozima y después, en otra serie de ensayos, intentamos fijar más exactamente el óptimo entre las proporciones relativas de lisozima y EDTA; según parece, en estas bacterias debe mantenerse una relación 1 : 10 (*cuadro 3*).

**Cuadro 2.** *Variaciones en la producción de esferoplastos de Ps. aeruginosa patógenos en función del tratamiento con EDTA y con 100 µg/ml de lisozima (DO<sub>600</sub>/‰ de esferoplastos)*

Concentración de EDTA en el medio	Tiempo del tratamiento, min		
	45	60	180
0,075 M	0,186/15	0,175/8	0,158/6
0,2 M	0,208/3	0,180/2	0,170/2
0,4 M	0,658/68	0,620/53	0,620/48
0,8 M	0,638/65	0,620/47	0,602/38
1,6 M	0,585/36	0,553/30	0,538/27
2,4 M	0,553/33	0,553/29	0,536/25

**Cuadro 3.** *Variaciones en la producción de esferoplastos de Ps. aeruginosa patógenos en función del tiempo, dependiente de la relación entre las concentraciones de enzima y agente tensiactivo (DO<sub>600</sub>/‰ de esferoplastos)*

Concentraciones de EDTA	Concentraciones de lisozima			Tiempo de observación min
	25	50	100	
2,5 M	0,400/0	0,330/0	0,580/0	0
	0,180/18	0,100/37	0,440/67	45
	0,244/12	0,150/35	0,340/58	180
1,25 M	0,380/0	0,330/0	0,440/0	0
	0,280/32	0,210/61	0,320/25	45
	0,330/27	0,212/60	0,370/25	180
0,62 M	0,380/0	0,380/0	0,350/0	0
	0,350/48	0,340/22	0,320/50	45
	0,432/40	0,410/20	0,440/45	180



*Figura 1. Aspecto de un esferoplasto normal procedente de Pseudomonas aeruginosa tratado con lisozima y EDTA.  $\times 40.000$*

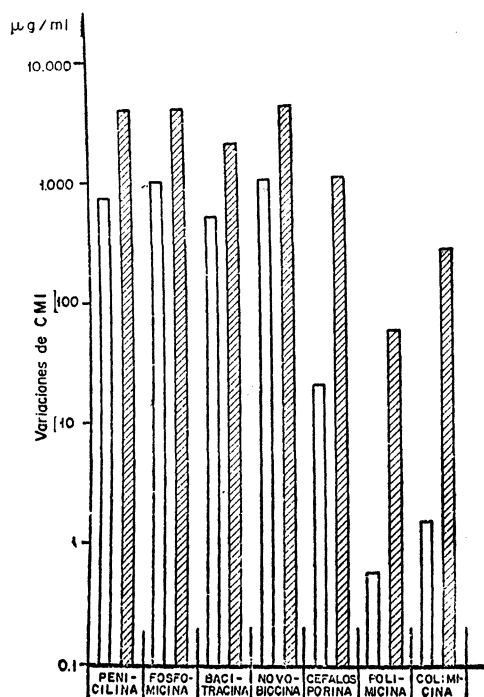


Los esferoplastos así obtenidos, son bastante más resistentes que los conseguidos por los otros dos métodos. En la *figura 1* puede observarse su aspecto morfológico, en el que se distingue claramente la conservación del flagelo.

2. *Obtención de esferoplastos en presencia de antibióticos*

Una vez conocidas las condiciones de obtención y características morfológicas de los esferoplastos normales, quisimos estudiar las relaciones entre acción antibiótica a nivel de envolturas celulares e inducción de estas formas esferoidales.

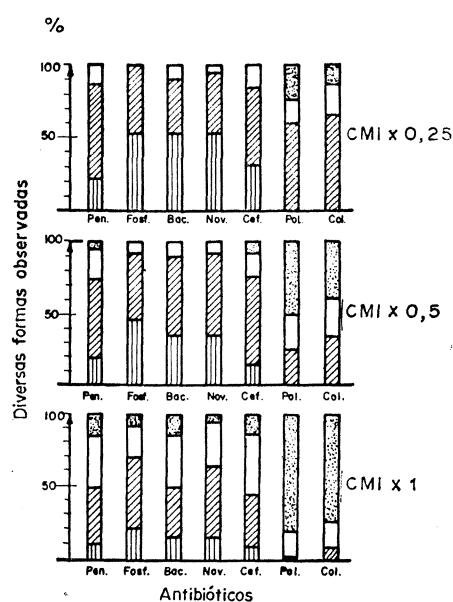
Para ello, en primer lugar, determinamos la CMI de cada antibiótico sobre medio líquido, en condiciones normales e hipertónicas. Los re-



*Figura 2. Variaciones en la CMI de Ps. aeruginosa patógenos, frente a distintos antibióticos, sobre medio isotónico □ e hipertónico ▨*

sultados se ven en el gráfico de la *figura 2* y se comprueba que la protección osmótica es mucho menos efectiva cuando se altera la membrana (polimixina, colimicina) que cuando la antibiosis tan sólo afecta a la pared por el empleo de los otros antibióticos.

Una estimulación semi-cuantitativa ( $\pm 2\%$ ) de estas acciones se puede ver en el gráfico de la *figura 3*, en la que distinguimos entre formas



*Figura 3. Ps. aeruginosa. Relaciones entre la dosis antibiótica y la inducción lenta a esferoplastos □, formas anormales ▨ y de lisis ▩, en un medio hipertónico donde existen bacterias normales ■ en fase exponencial*

normales (bacilos), anormales (filamentosas y aberrantes), esferoplastos (redondas) y formas de lisis (refringentes y rotas) para tres niveles de concentración antibiótica. Una vez más se comprueban claras diferencias entre antibiosis a nivel de pared y de membrana.

Por otra parte, se estudió comparativamente la inducción de esfero-

plastos en función del tiempo para una dosis equivalente determinada ( $\text{CMI} \times 0,5$ ) de cada antibiótico (cuadro 4).

Cuadro 4. Variaciones en la inducción a esferoplastos, según la naturaleza del antibiótico, indicada en función de la  $\text{DO}_{600}/\%$  esferoplastos

Antibiótico	Tiempo de tratamiento min			
	30	60	90	180
Penicilina	0,410/18	0,370/33	0,296/47	0,298/48
Fosfomicina	0,408/8	0,388/16	0,351/23	0,356/28
Bacitracina	0,382/15	0,327/27	0,312/29	0,308/33
Novobiocina	0,426/10	0,356/20	0,339/26	0,338/30
Cefalosporina	0,399/22	0,319/38	0,286/41	0,280/42
Polimixina	0,402/28	0,296/45	0,208/39	0,158/25
Colimicina	0,412/25	0,325/41	0,217/25	0,186/30

Los esferoplastos obtenidos mediante inducción rápida con antibióticos nos permitieron hacer observaciones morfológicas entre la actividad de las distintas sustancias, según se ve en las figuras 4-8, inclusive.

En los ensayos de patogenicidad con 0,1 ml intraperitonealmente con  $\approx 10^2$  células/dosis, se observaron escasas diferencias entre los distintos lotes, aunque pareció apreciarse un ligero aumento de infectividad en los esferoplastos obtenidos con bacitracina y novobiocina.

## DISCUSION

Por los resultados que anteceden hemos comprobado que la lisozima aislada no sirve como inductor de esferoplastos en las cepas patógenas de *Pseudomonas aeruginosa* ensayada, sino que, de acuerdo con Repaske (16), necesita un agente quelante que permita el acceso de la enzima hasta el mucopéptido de Park. Con asociación de lisozima y EDTA existen ciertas concentraciones límites de inducción en que se forman esferoplastos, pero al cabo de 6 h, o antes, revierten a la forma normal, convirtién-

dose en bacterias EDTA-resistentes. Las relaciones de concentración lisozima/EDTA son definitivas para conseguir una buena proporción de esferoplastos, quizá porque el mecanismo de quelación a concentraciones muy superiores o más bajas (distintas de la proporción 1:10) no detienen la actividad enzimática en un momento adecuado.

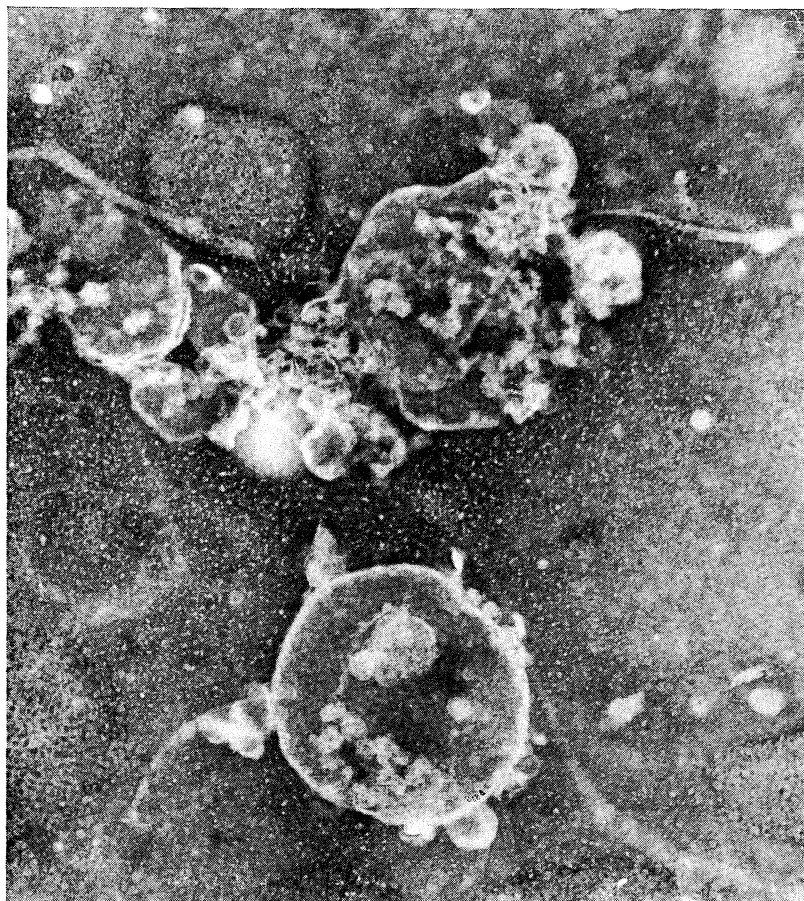
Como puede verse en los procesos de inducción lenta, al cabo de las 18 h, los antibióticos que actúan a nivel de membrana constituyen agentes líticos muy activos y para obtener esferoplastos se precisa disminuir la dosis inhibidora al 25 %. De los antibióticos que actúan a nivel de pared, el grado de actividad sigue el orden decreciente: cefalosporina, penicilina, bacitracina, novobiocina y fosfomicina; ello parece indicar que la inducción de esferoplastos está más favorecida por los antibióticos que actúan en las últimas fases de la polimerización del mucopéptido que por los que intervienen en las fases anteriores de la síntesis de pared.

En general, podemos decir que en todos los casos hubo inducción de esferoplastos, con una frecuencia que depende de la dosis y naturaleza del antibiótico; excepto con antibióticos polipeptídicos, en todos los casos, la aparición de estas formas esferoidales comienza a las 3 h aproximadamente (para dosis iguales a la CMI), y después de las 6 h en los correspondientes a  $CMI \times 0,25$ .

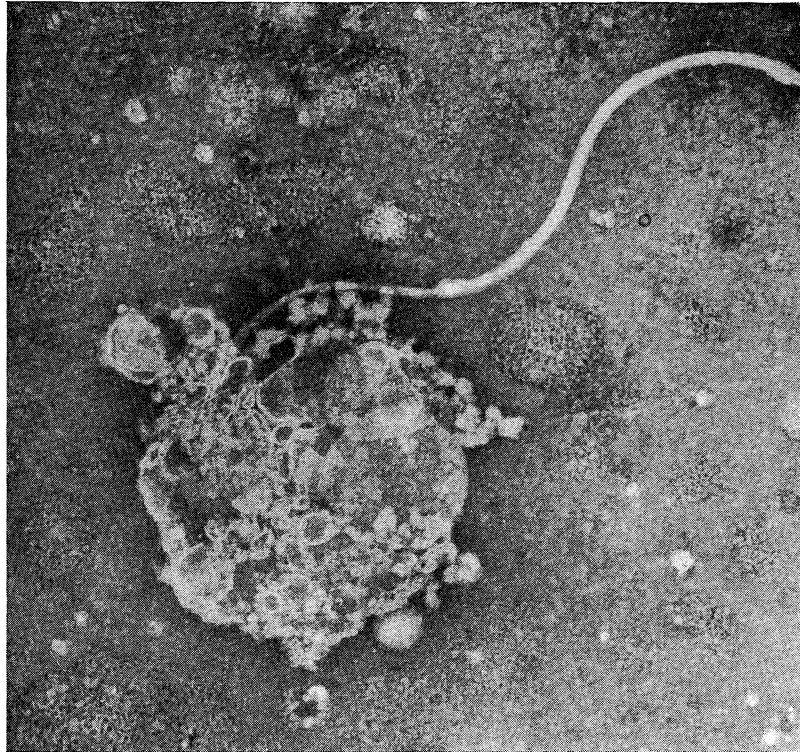
Las formas consideradas como anormales —que aparecen en tratamientos débiles— son filamentosas, alargadas y anchas, o alargadas con ensanchamientos globosos; mientras que en tratamientos intensivos aparece un mayor número de formas refringentes, sobre todo en el caso de polimixina y colimicina, que representan las formas de lisis.

Los antibióticos más activos, por su rapidez de inducción, fueron la polimixina B y colimicina, pero después de los 60 min se empezaron a lisar también los esferoplastos, que, en su mayoría, se convierten en unas formas globosas aberrantes. De los otros antibióticos, produjeron mayor proporción de esferoplastos perfectamente conservables, la cefalosporina y penicilina; en estos casos se puede decir que se alcanza la inducción máxima a los 90 min, en tanto que en los otros —inductores menos activos—, el máximo tanto por ciento de producción apareció algo más tarde.

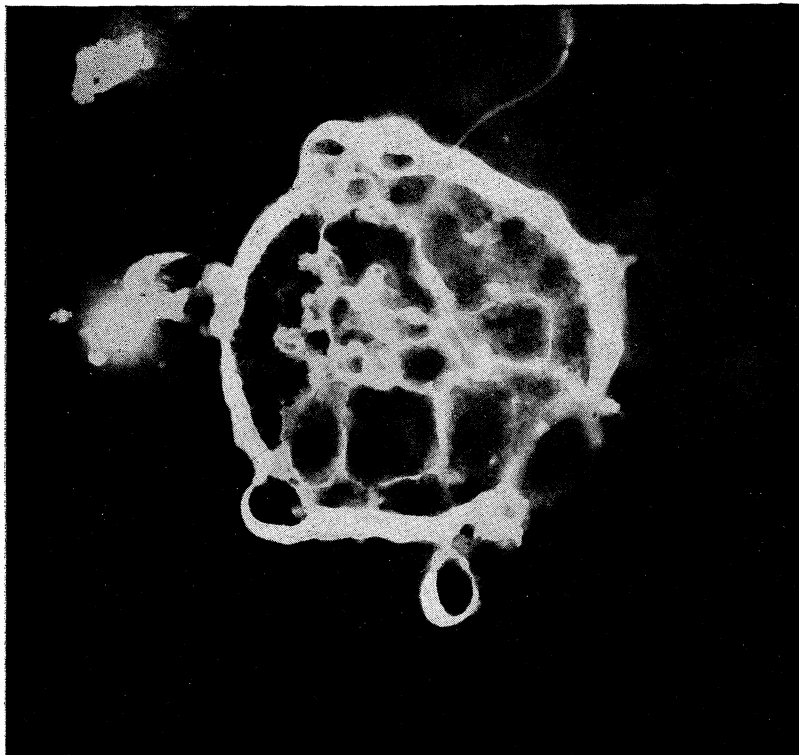
En cuanto a las diferentes actividades observadas por inducción rápida, se aprecia que la *penicilina* deja restos de pared engrosados e incluso con la base del flagelo deformada, mientras que la acción más enérgica de la *cefalosporina* hace prácticamente desaparecer toda la pared y parte



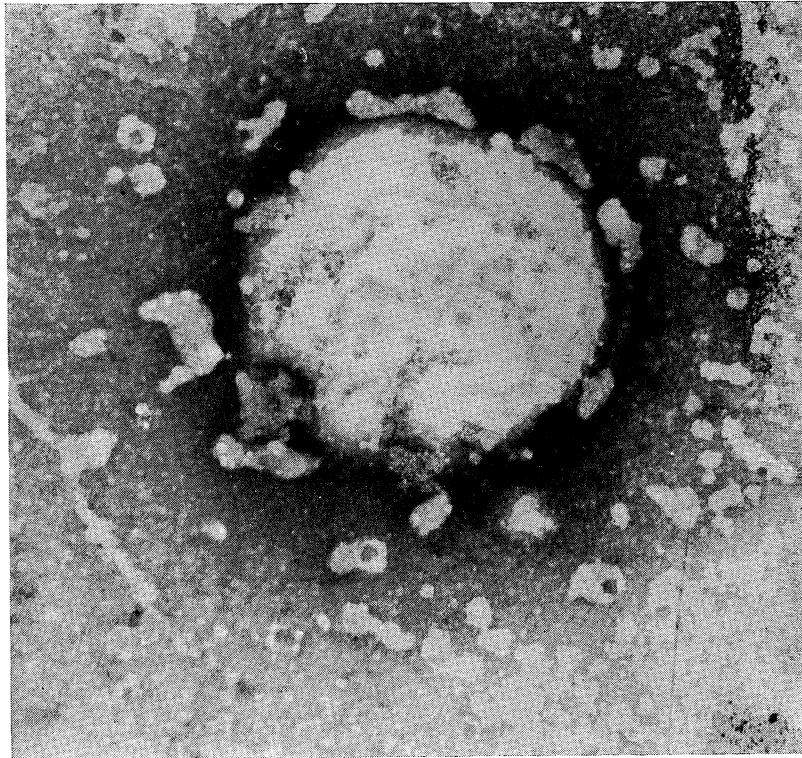
*Figura 4. Esferoplastos de Ps. aeruginosa obtenidos en presencia de penicilina.  
× 40.000*



*Figura 5. Esferoplastos de Ps. aeruginosa obtenidos en presencia de cefalosporina.  $\times 40.000$*

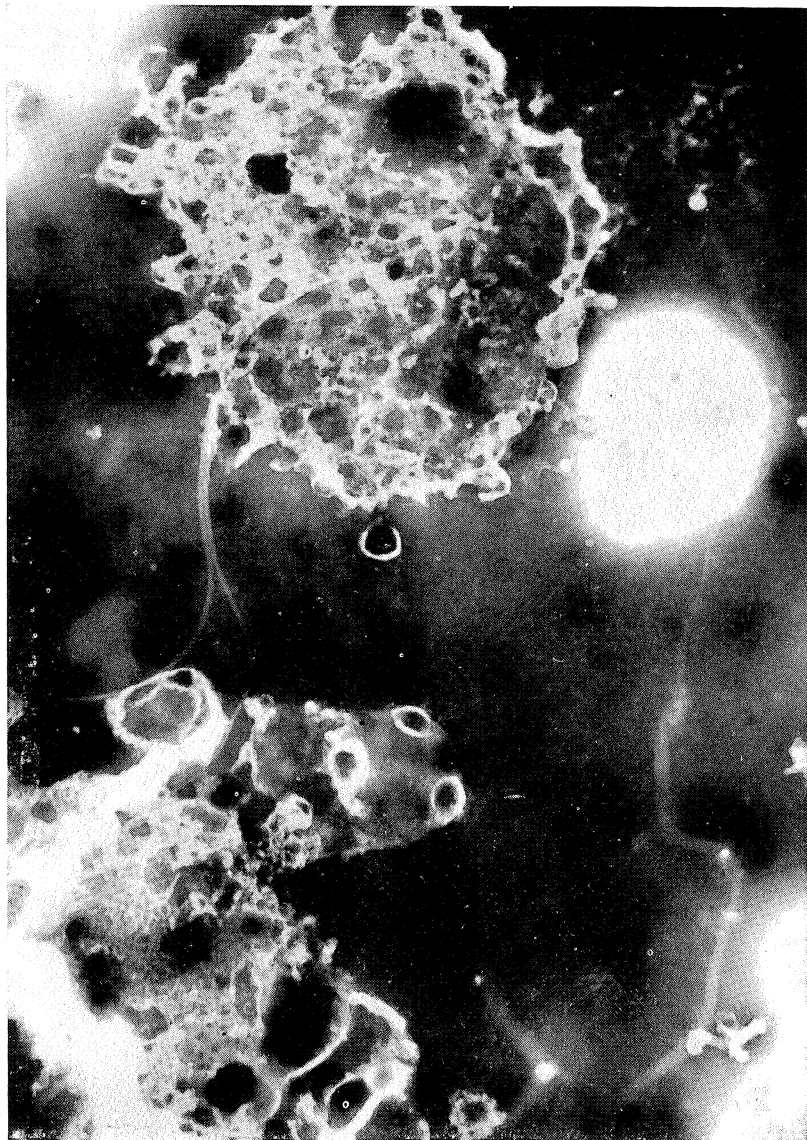


*Figura 6. Esferoplastos de Ps. aeruginosa obtenidos en presencia de bacitracina; su aspecto es muy semejante a los conseguidos con novobiocina.  $\times 40.000$*



*Figura 7. Esferoplastos de Ps. aeruginosa obtenidos en presencia de colimicina.  
× 40.000*





*Figura 8. Esferoplastos de Ps. aeruginosa obtenidos en presencia de polimixina B.  $\times 40.000$*

de la vaina de la base del flagelo; por su parte, la *bacitracina* y *novobiocina*, inhibiendo la síntesis de pared, la desorganizan hasta perder la rigidez bacteriana, pero en el esferoplasto se observa todavía una gran proporción de pared, que aparece engrosada. Entre los que actúan a nivel de membrana, la colimicina se ha mostrado como un enérgico agente inductor que produce esferoplastos muy lábiles y lo mismo podemos decir de la *polimixina*, cuyo tratamiento ha de controlarse cuidadosamente porque induce rápidamente a la lisis de las formas esféricas originadas.

En cuanto a las experiencias de infectividad, no resultaron totalmente concluyentes por la dificultad de disponer de suspensiones de esferoplastos totalmente exentas de bacterias; por tanto, resulta dudoso atribuir las diferencias encontradas a variaciones del tratamiento antibiótico inductor. Ello no obstante, la mayor infectividad observada con los esferoplastos obtenidos con bacitracina y novobiocina podría deberse a que tenían mayor proporción de pared (y por tanto de endotoxina) o a que *in vivo* revertían más fácilmente a la forma bacilar.

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la inducción de esferoplastos de *Pseudomonas*, ocasionada por distintos antibióticos que actúan a nivel de pared y membrana bacterianas, y se comparan con los producidos mediante lisozima.

Se comprueba que esta enzima no produce esferoplastos en ausencia de EDTA y que la relación óptima, entre ambos, es de 1:10 para las estirpes patógenas ensayadas.

En cuanto a los antibióticos, se utilizaron dos procedimientos de inducción, uno, rápido, con dosis altamente inhibitoras y otro, lento, con distintas dosis subinhibidoras. Fueron los más activos aquellos que actuaron a nivel de membrana como la polimixina y colimicina, aunque su acción debe controlarse cuidadosamente porque es más fácil que se lisen los esferoplastos obtenidos. El grado de actividad inductora, entre los que actúan a nivel de pared, en orden decreciente fue: cefalosporina, penicilina, bacitracina, novobiocina y fosfomicina.

En cuanto a la virulencia de los esferoplastos obtenidos con los diferentes antibióticos, mostraron una mayor patogenicidad los inducidos por

bacitracina y novobiocina; se supone que por contener más restos de pared o por una más fácil reversión *in vivo* a la forma bacilar.

#### AGRADECIMIENTO

Los autores desean hacer constar su sincero agradecimiento al Dr. Rubio Huertos y a los técnicos del Servicio de Microscopia Electrónica, por su amable colaboración.

#### SUMMARY

*Microbiological study of spheroplasts from pathogenic Pseudomonas strains produced by antibiotics acting to the cell wall and membrane levels*

*Pseudomonas* spheroplasts induced by the presence of antibiotics acting on the bacterial envelopes were comparatively studied. For this purpose, according to the antibiotic concentrations and treatment periods, two different induction methods were used and the results were compared with those produced by lysozyme and lysozyme + EDTA.

The bacterial pathogenic strains used show a high resistance against the action of the isolated enzyme while normal spheroplasts were obtained with 100  $\mu$ g of lysozyme + 1 mg of EDTA during 45 min. In relation with the antibiotic action, drugs acting on the bacterial membrane (polymyxin B and colistine) were the most active. With the antibiotics acting on the cell wall, the intensity of their variable inductive actions appeared decreasingly from cephalosporine, penicillin, bacitracin, novobiocin to phosphomicin.

Spheroplasts obtained with bacitracin and novobiocin show a stronger pathogenicity, possibly it might be due to a greater proportion of cell wall in these spheroplasts.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ASBELL, M. A., and EAGON, R. G. 1966. Role of multivalent cations in the organization, structure and assembly of the cell-wall of *Ps. aeruginosa*. J. Bacteriol., 92, 380-87.
2. BROWN, M. R. W., and RICHARDS, R. M. E. 1965. Effect of ethylenediamine tetraacetate on the resistance of *Ps. aeruginosa* to antibacterial agents. Nature, 207, 1391-93.

3. CHENG, K. J.; INGRAM, J. M., and COSTERTON, J. W. 1970. Alkaline phosphatase localization and spheroplast formation of *Ps. aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, 16, 1319-24.
4. DOI, O.; OGURA, M.; TANAKA, N., and UMEZAWA, H. 1968. Inactivation of kanamycin, neomycin, and streptomycin by enzymes obtained in cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.*, 16, 1276-81.
5. ESPINOSA, M.; HIDALGO, A., y PORTOLÉS, A. 1970. Variabilidad de los metabolitos cromógenos sintetizados por estirpes patógenas de *Ps. aeruginosa*. *Rev. Clin. Españ.*, 116, 123-30.
6. GASTON DE IRIARTE, A. 1960. *Microbiología. Prácticas de Laboratorio*. D.C.P., Gerona.
7. GRAY, G. W., and WILKINSON, S. G. 1965. The action of ethylenediamine tetraacetic acid on *Ps. aeruginosa*. *J. Appl. Bacteriol.*, 28, 153-64.
8. HAMILTON-MILLER, J. M. T. 1965. Effect of EDTA upon bacterial permeability to benzylpenicillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20, 688-91.
9. KLINGE, K. 1960. Differential techniques and method of isolation of *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 442-62.
10. LEIVE, L. 1965. A nonspecific increase in permeability in *E. coli* produced by EDTA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 53, 745-50.
11. LYSENKO, O. 1961. *Pseudomonas*: An attempt at general classification. *J. Gen. Microbiol.*, 25, 379-408.
12. MCGREGOR, D. R., and ELLIKER, P. R. 1958. A comparison of some properties of strains of *Ps. aeruginosa* sensitive and resistant to quaternary ammonium compounds. *Can. J. Microbiol.*, 4, 499-503.
13. OKAMOTO, S., and SUZUKI, Y. 1965. Chloranphenicol-dihydrostreptomycin, and kanamycin-inactivating enzymes from multiple drug resistant *E. coli* carrying episom "R". *Nature*, 208, 1301-3.
14. PORTOLÉS, A. 1960. La terapia antibiótica desde el laboratorio clínico. I. Determinación de niveles antibióticos en líquidos orgánicos y valoración de su poder antimicrobiano efectivo. *Laboratorio*, 29, 21-30.
15. PORTOLÉS, A., y PÉREZ-UREÑA, M. T. 1964. Características de cultivo y antibiograma de cepas de *Ps. aeruginosa* aisladas de productos patológicos. *Rev. Clin. Españ.*, 93, 373-77.
16. REPASKE, R. 1958. Lysis of Gram-negative organisms and the role of versene. *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 225-32.
17. SABATH, L. D.; JAGO, M., and ABRAHAM, E. P. 1965. Cephalosporinase and penicillinase activities of alpha-lactamase from *Pseudomonas pyocyaneus*. *Biochem. J.*, 96, 739.
18. STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J., and DOUDOROFF, M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43, 159-271.
19. WEISER, R.; ASSCHER, A. W., and WIMPENNY, J. 1968. *In vitro* reversal of antibiotic resistance by ethylenediamine tetraacetic acid. *Nature* 219, 1365-66.
20. WEISER, R.; WIMPENNY, J., and ASSCHER, A. W. 1969. Synergistic effect of edetic acid/antibiotic combinations on *Ps. aeruginosa*. *Lancet II*, 619-20.

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

## ULTRAESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DEL LIPOPOLISACARIDO DE LA *ERWINIA CAROTOVORA*

por

M. SANTAOLALLA y M.<sup>a</sup> DOLORES ESPLÁ

### INTRODUCCION

Continuando el estudio de la pared celular de distintos microorganismos gram-negativos y patógenos de plantas, estudiamos ahora la estructura y composición química del lipopolisacárido de *Erwinia carotovora*.

Las primeras sospechas sobre la localización del lipopolisacárido de los microorganismos gram-negativos en la pared celular de éstos, podemos relacionarlos con los trabajos de Salton (24) y Weidel (35), quienes, estudiando la composición química de la pared, identifican entre los componentes monosacáridos de la misma algunos de los encontrados como componente lipopolisacárido de su pared se encuentra formando una capa importancia inmunológica de la pared celular.

Posteriormente, Weidel y colaboradores (36), estudiando la estructura sub-microscópica de la pared de *Escherichia coli* estirpe B, señalan que el componente lipopolisacárido de su pared, se encuentra formando una capa propia sobre el mucopéptido responsable de la rigidez del microorganismo, del cual se elimina con dificultad.

En 1967, De Petris (4), en un extenso estudio sobre la ultraestructura y composición química de la pared celular del *Escherichia coli*, sugie-

re la constitución química de las tres capas fundamentales de la pared del microorganismo, de la siguiente forma: la capa más externa está constituida por lípidos (fosfolípidos, casi en su totalidad), lipopolisacáridos y gránulos de proteína; la intermedia está formada por proteína globular, y la interna corresponde al mucopéptido.

Santaolalla y Rubio-Huertos (28), en 1969, estudiando la ultraestructura y composición química de la pared celular de un microorganismo gram-negativo y patógeno de plantas, el *Agrobacterium tumefaciens* y su forma L fija obtenida por inducción con glicocola, llegaron a conclusiones semejantes.

Por todo lo expuesto, vemos que tanto estructural como químicamente, la capa más compleja de la pared de los microorganismos gram-negativos es la más externa, precisamente en la que se encuentra localizado el lipopolisacárido que constituye su parte principal.

El lipopolisacárido es un componente integral de la endotoxina de los microorganismos gram-negativos. La endotoxina es un complejo orgánico constituido por proteína-lípido-lipopolisacárido, responsable de los efectos fisiológicos producidos por la inyección en animales de bacterias muertas por el calor; es, además, portador del antígeno somático O.

El presente trabajo tiene por objeto el estudio del lipopolisacárido de *Erwinia carotovora* y su posible semejanza a otros lipopolisacáridos de microorganismos, principalmente comparado con aquellos lipopolisacáridos obtenidos del microorganismos patógenos de plantas, los cuales han sido poco estudiados hasta la fecha.

## MATERIALES Y METODOS

### *Microorganismo*

Empleamos la *Erwinia carotovora*, estirpe b. 312 E. Ellmers 904 (1952) procedente de Dinamarca, cultivada en matraces de Erlenmeyer de 6 l de capacidad, con 1,5 l de caldo común, a una temperatura de 28 °C, en agitación, durante 48 h. Al cabo de este tiempo separamos las células por centrifugación a 8.000 r/m, durante 10 min, las lavamos con agua destilada estéril tres veces y liofilizamos.

### *Extracción del lipopolisacárido*

Extraemos el lipopolisacárido de la *Erwisia carotovora* por el método fenol-agua (37). Después de una parcial purificación por ultracentrifugación, disolvemos el lipopolisacárido en una solución de  $\text{ClNa}$  0,1 M que contenga  $\text{PO}_4\text{Na}_3$  0,01 M,  $\text{pH}=7$ , a una concentración de 20 ó 30  $\text{mg}/\text{cm}^3$  y le añadimos 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de ribonucleasa, dializando esta solución a 25 °C contra el mismo tampón (14). Este lipopolisacárido purificado, lo liofilizamos.

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

### *Microscopia electrónica*

Para la observación del lipopolisacárido, lo suspendemos en agua destilada a una concentración aproximada de 1  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . De esta suspensión hacemos tinciones negativas con ácido fosfotúngstico al 2%, siguiendo el método general. Las tinciones positivas se efectuaron sobre rejillas porta-objetos preparadas con carbón, usando para la tinción una solución acuosa de acetato de uranilo al 2%, recientemente preparada y filtrada; colocamos una pequeña gota de la suspensión del lipopolisacárido sobre la rejilla, y añadimos otra gota de la solución de acetato de uranilo, manteniendo así la rejilla durante 30 min; lavamos con agua destilada, secamos y ponemos la rejilla en contacto con otra solución de citrato de plomo (21), y a continuación volvemos a lavar.

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

### *Separación del lípido A*

Separamos la parte lipídica, denominada lípido A, por hidrólisis del lipopolisacárido con ácido acético al 1%, a reflujo, durante 75 min, posterior centrifugación, extracción con cloroformo-metanol (2:1), y lavado con agua.

El supernadante de la centrifugación está formado por la fracción polisacárida del lipopolisacárido.

### *Hidrólisis suave del polisacárido y obtención de los oligosacáridos correspondientes*

El polisacárido separado del lípido A, lo hidrolizamos con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,5N en tubo cerrado, a 100 °C durante 2 h.

Neutralizamos el exceso de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  con  $(\text{HO})_2\text{Ba}$ , separamos el precipitado de  $\text{SO}_4\text{Ba}$  por centrifugación, evaporamos el líquido en vacío, disolvemos en una pequeña cantidad de agua y hacemos cromatografía de los oligosacáridos.

### *Hidrólisis de los oligosacáridos*

Los oligosacáridos separados por cromatografía sobre papel, los hidrolizamos previa elución del sitio del papel correspondiente a la mancha, determinado por revelado con el reactivo apropiado de una parte lateral del cromatograma. Una parte, con  $\text{ClH}$  2N, en tubo cerrado, durante 2 h, a 100 °C para monosacáridos neutros, y otra con  $\text{ClH}$  4N, 12 h, a 100 °C, también en tubo cerrado para aminoazúcares; eliminamos el exceso de  $\text{ClH}$  en vacío, diluimos con agua y hacemos dos evaporaciones consecutivas, también en vacío; finalmente, disolvemos el residuo en pequeña cantidad de agua y hacemos cromatografía.

### *Análisis químico*

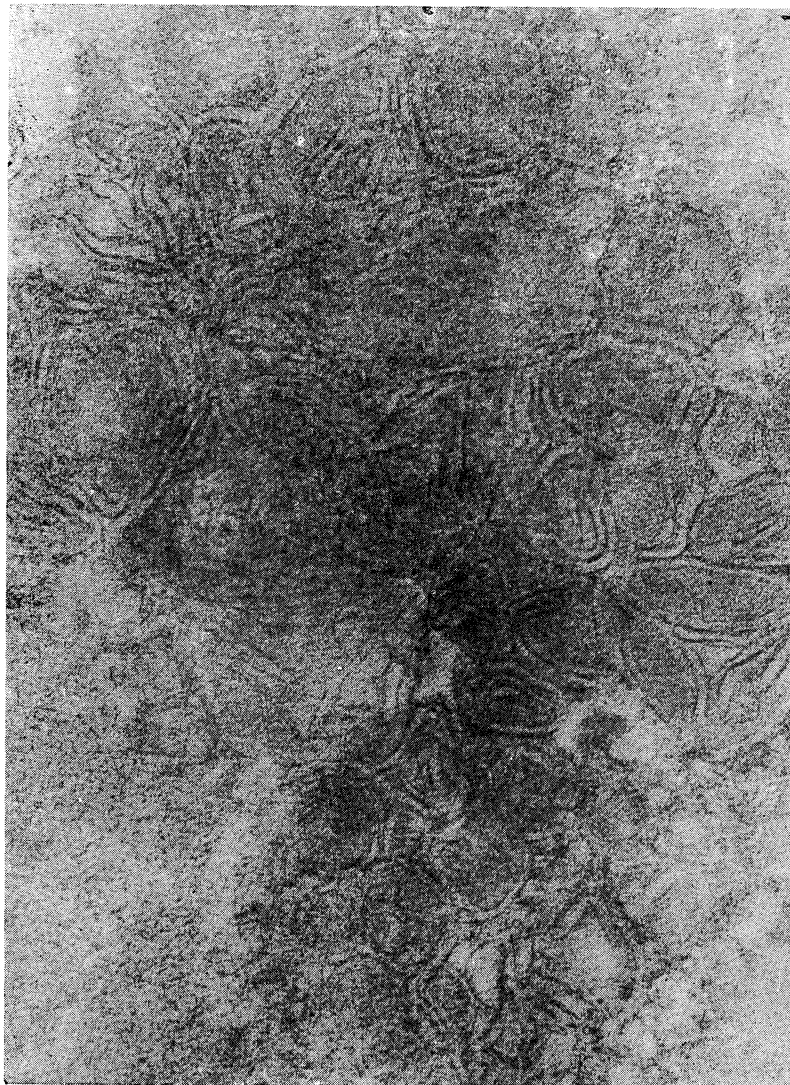
- a) Determinación del nitrógeno: usamos el micrométodo de Kjeldahl.
- b) Determinación de fósforo: usamos el método de Fiske y Subarow (7).
- c) Determinación de carbohidratos totales: seguimos el método de la antrona de Morris (16), modificado por Trevelyan y Harrison (31).

Para la determinación cuantitativa de los principales monosacáridos encontrados en los distintos oligosacáridos separados, seguimos el método del sulfúrico-cisteína (5).

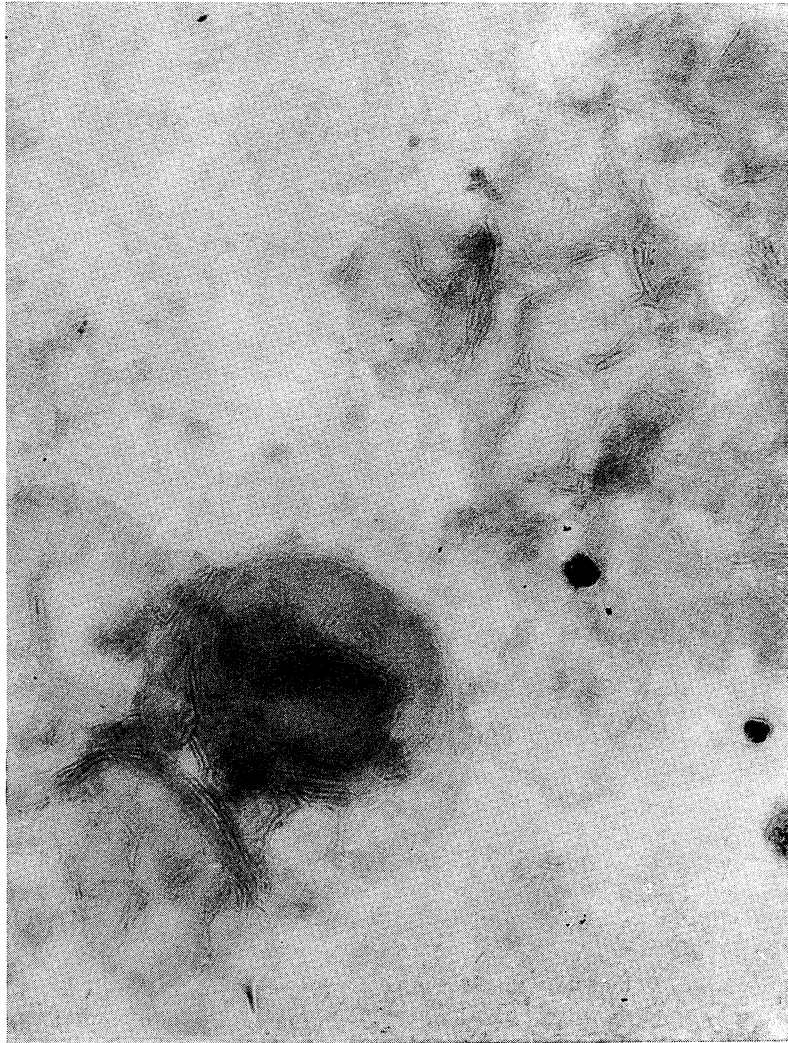
### *Cromatografía sobre papel*

Empleamos papel whatman núm. 1. Disolventes: a) butanol-ácido acético-agua (40 : 10 : 50, v/v); b) butanol-piridina-agua (60 : 40 : 30, v/v). Reveladores: solución de nitrato de plata (32); ftalato de anilina (18); reactivo de Anderson (2) para el ácido 3-dexosi-d-mano-octulosónico. Para azúcares aaminados empleamos el reactivo de Elson y Morgan (6).





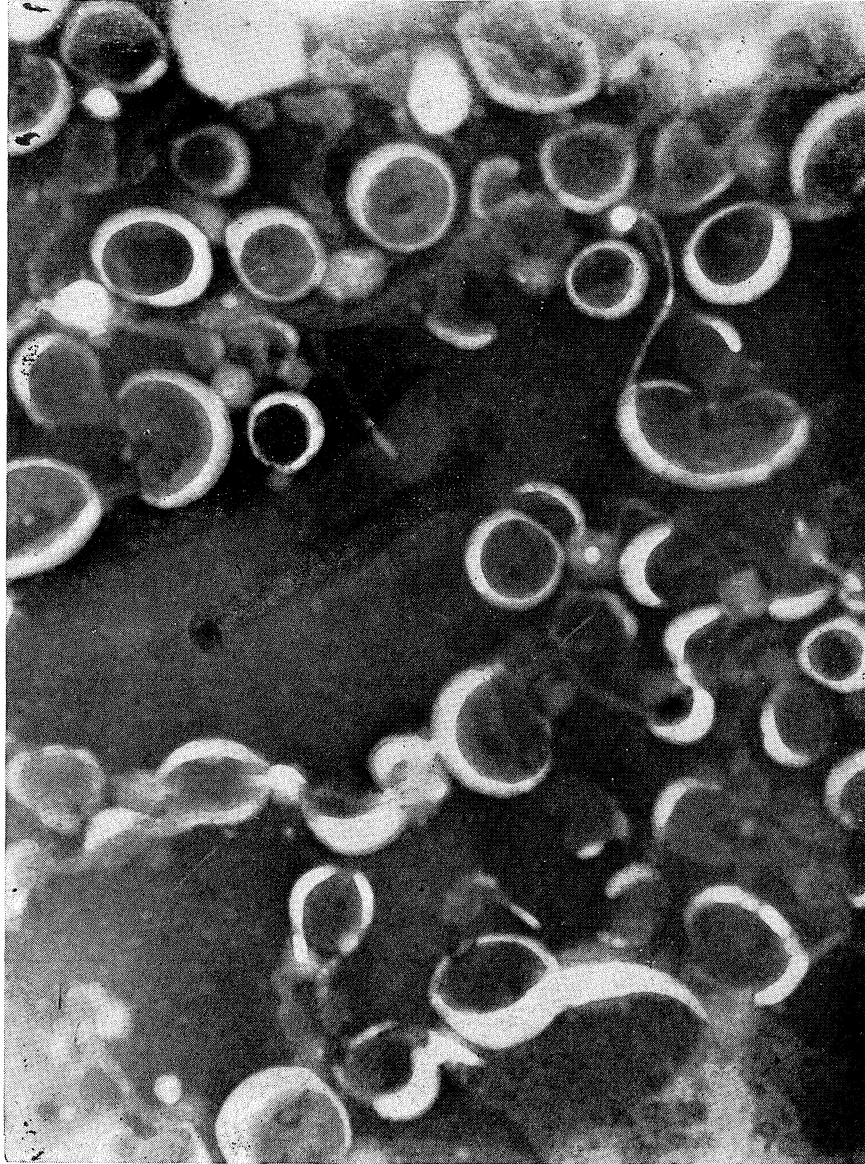
*Figura 1. Lipopolisacárido de la Erwinia carotovora obtenido por el método de Westphal y Jann, tinción positiva. Se aprecia perfectamente la estructura trilaminar.  $\times 184.000$*



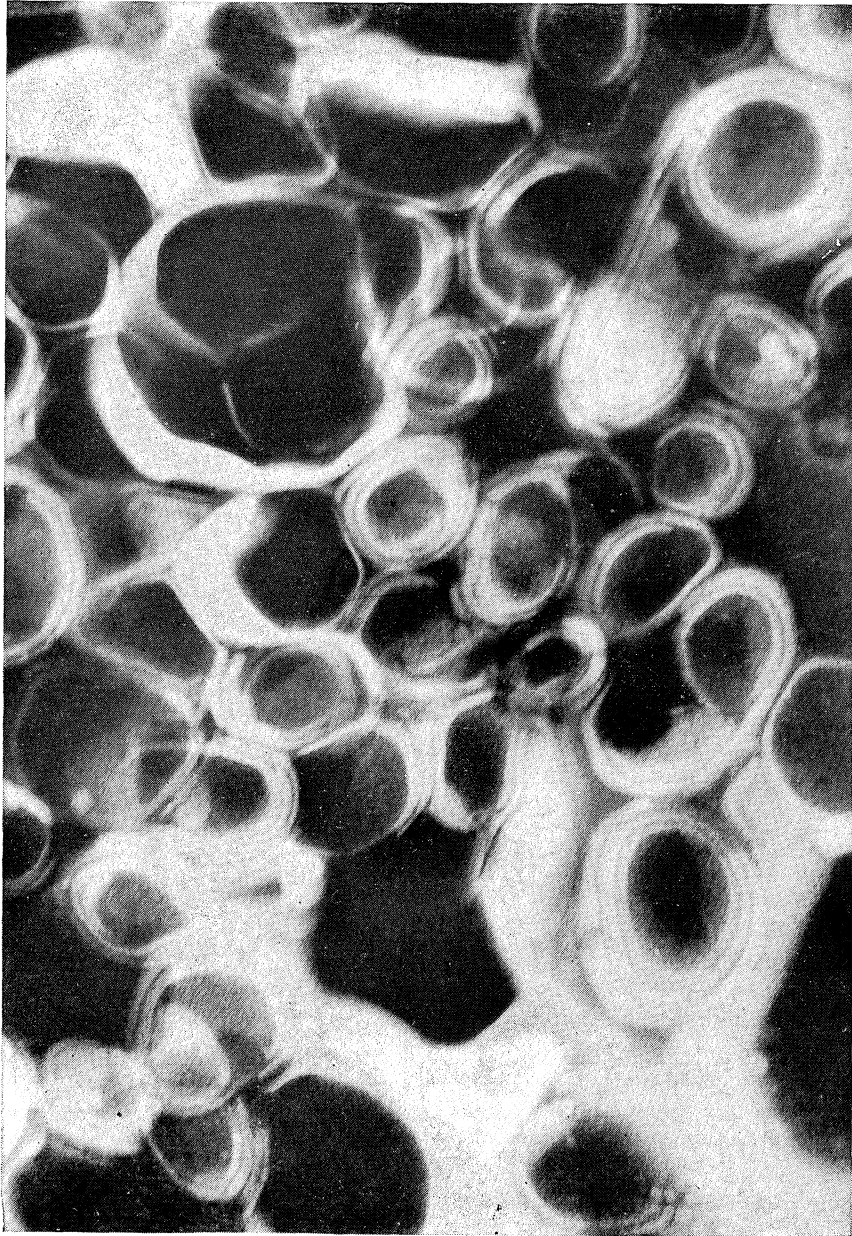
*Figura 2. El mismo lipopolisacárido de la figura anterior, también observado en forma de tinción positiva. × 92.000*



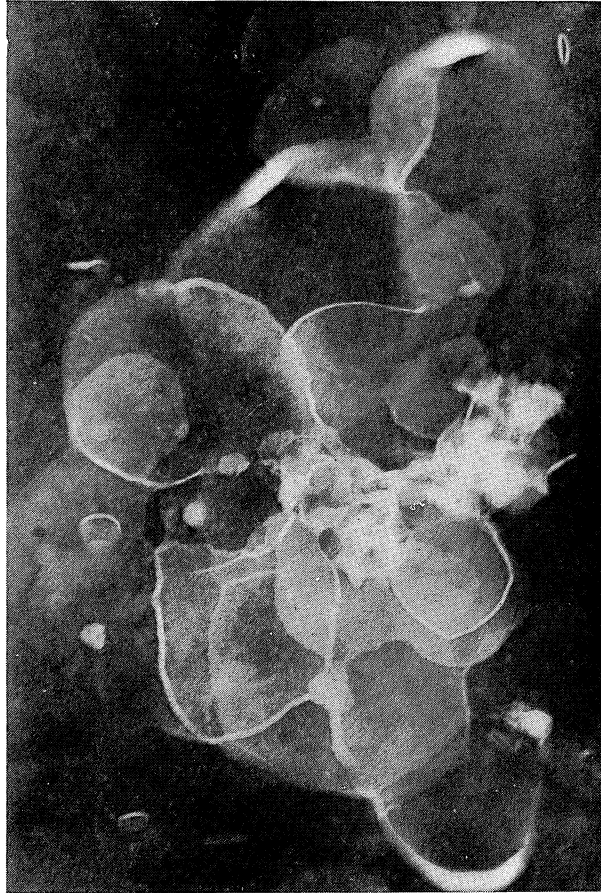
*Figura 3. Corresponde a otra muestra de lipopolisacárido de la E. carotovora, observado en forma de tinción positiva. × 160.000*



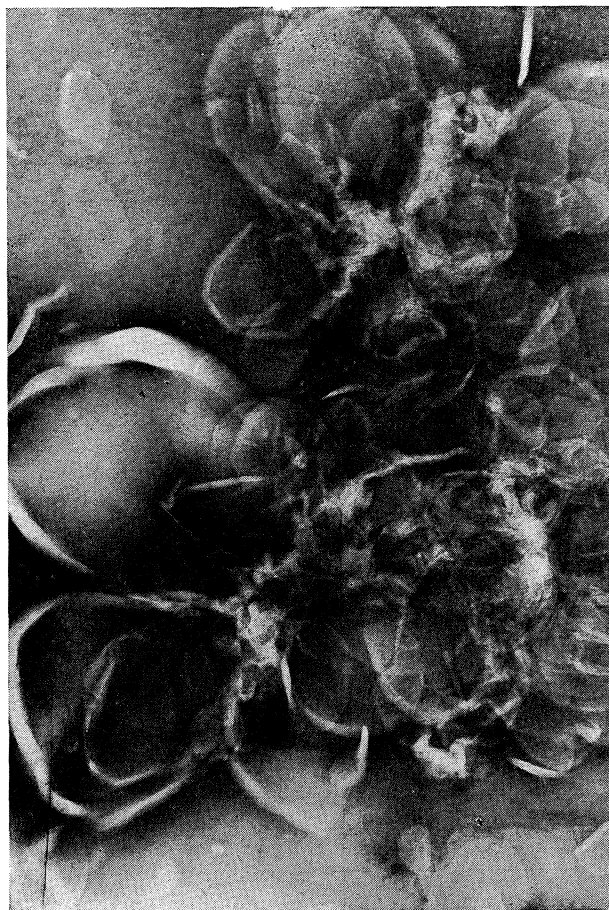
*Figura 4. Representa el lipopolisacárido de la E. carotovora observado en forma de tinción negativa. Las estructuras en forma de cuerda se aprecian perfectamente.  
× 168.000*



*Figura 5. Tinción negativa del lipopolisacárido de la E. carotovora. Estructuras elipsoideas concéntricas.  $\times 176.000$*



*Figura 6. Representa el lípido A separado del lipopolisacárido de la E. carotovora, tinción negativa. Estructuras en forma de hojitas,  $\times 73.800$*



*Figura 7. Imagen de otro campo del mismo lípido A de la figura anterior.  $\times 73.800$*

### *Cromatografía en capa fina*

Empleamos placas preparadas con silicagel G, según Stahl, de unas 300  $m\mu$  de espesor; empleando distintos disolventes y reveladores para la identificación de los correspondientes monosacáridos (8 y 20).

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

### *Investigación de heptosas*

La realizamos por cromatografía sobre papel whatman núm. 1 (1), hidrolizando con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N, durante 8 h, a 100 °C, en tubo cerrado y precipitando el exceso de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  como  $(\text{HO})_2\text{Ba}$ ; con la solución concentrada a presión reducida, hacemos la cromatografía, empleando como disolventes acetona-agua (95:5, v/v). Revelando con el reactivo de Greene y Morris (11) las aldoheptosas originan una mancha color rosa. También determinamos heptosas en el polisacárido sin hidrolizar, muy diluido (17), usando el espectrofotómetro Unicam S.P. 500.

## RESULTADOS

### *Estructura submicroscópica*

El lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, extraído por el método de Westphal y Jann (37), purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa, según el procedimiento que indicamos en la parte correspondiente a materiales y métodos, cuando se observa al microscopio electrónico en tinción positiva aparece con una estructura en forma de cintas planas; a veces formando anillos imperfectos de distintos tamaños, la cinta tiene una estructura trilaminar y su grosor está comprendido entre los 80 y 100 Å. Las microfotografías electrónicas de las *figuras 1-2* y, sobre todo, la de la *figura 3*, tomada directamente a 80.000 aumentos, muestran claramente estas estructuras.

Si observamos el mismo lipopolisacárido en tinción negativa con ácido fosfotúngstico, aparece en forma de cuerpos ovales de diámetro variable y, ocasionalmente, como esferoides (véase *figura 4*); algunas veces se pueden apreciar estructuras en forma de cuerda. También es frecuente la observación de cuerpos ovales formados por anillos concéntricos, como se aprecia en la *figura 5*. Bajo esta forma de tinción negativa, la estructura trilaminar no es fácil de apreciar.



El lípido A, separado del lipopolisacárido por hidrólisis ácida débil, aparece, cuando se observa al microscopio electrónico, con una estructura totalmente distinta a la observada con el lipopolisacárido. Las estructuras más frecuentemente observadas bajo la forma de tinción negativa aparecen en forma de hojitas (véanse *figuras 6-7*), comparables a las primeras estructuras del lípido A del lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* G-30, señaladas por Rothfield y Horne (22), y también a la estructura encontrada por uno de nosotros (25-26) para el lípido A del *Agrobacterium tumefaciens*, formas normal y L fija, estos últimos, microorganismos patógenos de plantas.

#### Análisis químico

Los porcentajes de lipopolisacáridos de la *Erwinia carotovora* (37), correspondieron a un 12,6 % de lipopolisacárido bruto, que, después de purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa para eliminar los últimos restos de ácidos nucleicos, quedó reducido al 0,92 % referido a peso seco del microorganismo de que partimos. (Los resultados se refieren a la media de tres ensayos.) Comprobamos la ausencia de ácidos nucleicos por espectrofotometría: las curvas de máxima absorción de la *figura 8* nos demuestran la ausencia de ácidos nucleicos en el lipopolisacárido purificado.

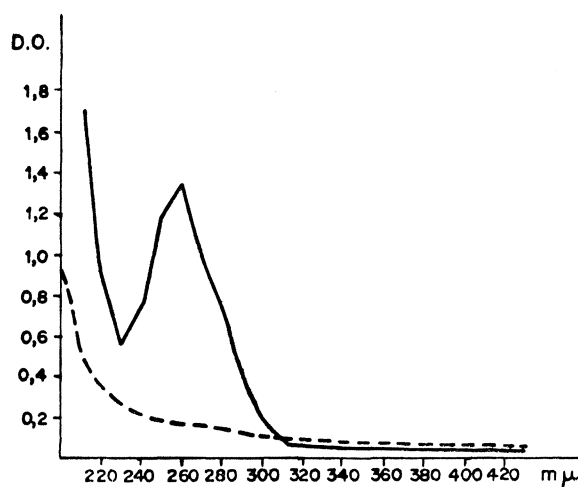


Figura 8. — Solución acuosa al 1‰, aproximadamente, del lipopolisacárido bruto. — — Solución acuosa al 1‰, aproximadamente, del lipopolisacárido purificado por centrifugación y ribonucleasa

Las cantidades de nitrógeno y fósforo correspondientes al lípido A y polisacárido, así como los carbohidratos totales de este último componente, se expresan en el *cuadro 1*.

*Cuadro 1*

	Lípido A	Polisacárido
Nitrógeno	1,61	1,10
Fósforo	2,09	0,23
Carbohidratos		47,70

De la parte correspondiente al lípido A del lipopolisacárido, por tratamiento con agua y cloroformo, separamos dos fracciones, una acuosa y otra clorofórmica. En la parte acuosa, por cromatografía sobre papel en el disolvente A, identificamos glucosamina, revelando el cromatograma con el reactivo de Elson y Morgan (6), con un Rf de 0,13; también se identificaron indicios de etanolamina. Estos resultados fueron comprobados por cromatografía sobre placas, usando como reveladores el reactivo de Elson y Morgan y también la ninhidrina. En algunos ensayos logramos identificar restos de ácido 3-desoxi-octulosónico. La capa clorofórmica después de disuelta en una mezcla de cloroformo-metanol (2 : 1, v/v), la sometimos al análisis cromatográfico sobre placa fina (13), identificando perfectamente ácidos grasos.

En la parte polisacárida separada del lipopolisacárido por hidrólisis ácida con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,5N, durante 2,5 h, a 100 °C, en tubo cerrado, sometida a análisis cromatográfico sobre papel empleando el disolvente A y revelando con el reactivo de Trevelyan (32), identificamos 7 oligosacáridos, cuyos Rfg aproximados (media de varios ensayos) fueron: 0,33; 0,56; 0,75; 1,05; 1,23; 1,38, y 2,36. Por cromatografía sobre placa fina (20), también identificamos 7 oligosacáridos como componentes de este polisacárido complejo. El *cuadro 2* resume los Rfg obtenidos sobre papel y placa fina de los distintos oligosacáridos.

El oligosacárido que aparece en mayor proporción es el que señalamos con el número 4, seguido por los números 2 y 3, encontrándose en menor proporción el número 5.

Cuadro 2. Oligosacáridos

Número	Rfg sobre papel	Rfg sobre placa fina
1	0,33	0,26
2	0,56	0,38
3	0,75	0,60
4	1,05	0,79
5	1,23	1,00
6	1,38	1,40
7	2,36	1,70

Hidrolizando estos oligosacáridos conforme señalamos en la parte de materiales y métodos, identificamos por análisis cromatográfico, principalmente, glucosa y xilosa; en menor proporción, ramnosa, galactosa, glucosamina, ácido 3-desoxi-octulosónico y heptosas. Estas últimas fueron identificadas en el polisacárido por cromatografía sobre papel (1), y por espectrofotometría (17).

Todos los oligosacáridos separados contenían glucosa y xilosa, aunque en distinta proporción. A partir del oligosacárido que hemos señalado con el número 4, al que le corresponde un Rfg de 1,05, aparece la ramnosa. La glucosamina se encuentra principalmente en los oligosacáridos con menor Rfg. La proporción cuantitativa molar de los principales monosacáridos encontrados en los distintos oligosacáridos fue realizada por el método del sulfúrico-cisteína (5).

El *cuadro 3* resume cada uno de los monosacáridos componentes de los oligosacáridos separados del polisacárido y la relación cuantitativa de los que se encuentran en mayor proporción.

En los oligosacáridos designados con los números 5 y 7, no pudimos hacer determinaciones cuantitativas debido a las pequeñas cantidades en que fueron aislados. En el conjunto, los monosacáridos que se encuentran en mayor proporción en el polisacárido de este lipopolisacárido son la glucosa y xilosa.

Cuadro 3

Número	Oligosacáridos		Monosacáridos Relación molar
	Rfg		
	Papel	Placa	
1	0,33	0,26	Glucosamina Galactosamina (indicios) Acido 3-desoxi-octulosónico Glucosa 2 Xilosa 1
2	0,56	0,38	Glucosamina Acido 3-desoxi-octulosónico Glucosa 2 Xilosa 3
3	0,75	0,60	Galactosamina Glucosa 3 Xilosa 1 Galactosa 3
4	1,05	0,79	Galactosamina Glucosa 4 Xilosa 1 Galactosa 3 Ramnosa
5	1,23	1	Glucosa Xilosa Galactosa Ramnosa
6	1,38	1,4	Glucosa 9 Xilosa 3 Ramnosa 2 Glucosamina
7	2,36	1,7	Glucosa Xilosa Galactosa Ramnosa

## DISCUSION

La estructura submicroscópica del lipopolisacárido extraído de la *Erwinia carotovora* (37), según indicábamos en el capítulo correspondiente a materiales y métodos, aparece cuando se observa en tinción positiva en forma de cinta con una estructura trilaminar. Schramm y colaboradores (29), en 1952, habían observado en el lipopolisacárido extraído del *Escherichia coli* una estructura en forma de cintas largas cuando su pH era 10, y eran sombreadas para su observación al microscopio electrónico. Shands y colaboradores (30), estudian más tarde la estructura morfológica del lipopolisacárido de distintas estirpes de *Salmonella typhimurium* y la describen en forma de cinta trilaminar cuando se observa en tinción positiva. Nosotros (27), estudiando comparativamente el lipopolisacárido de distintos microorganismos gram-negativos y patógenos de plantas, también encontramos, siempre que se observa el lipopolisacárido bajo la forma de tinción positiva, una estructura trilaminar. En el lipopolisacárido que estudiamos, el grosor de esta cinta con estructura trilaminar está comprendido entre 80 y 100 Å (véanse *figuras 1-3*).

El mismo lipopolisacárido, observado en tinción negativa con ácido fosfotúngstico, aparece en forma de cuerpos ovales de diámetro variable y ocasionalmente como esferoides, pudiéndose apreciar a menudo estructuras en forma de cuerdas; bajo esta forma de tinción, la estructura trilaminar no es fácilmente observable (véase *figura 4*). Estructuras elipsoides concéntricas semejantes a las que aparecen en la *figura 5* han sido encontradas por Pollock y colaboradores (19) en el lipopolisacárido de un mutante de *Escherichia coli* K 12.

Estos resultados confirman que la estructura submicroscópica del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, microorganismo gram-negativo y patógeno de plantas, es semejante a la de otros microorganismos patógenos de plantas estudiados por uno de nosotros (25-26) y también a la de otros lipopolisacáridos estudiados por distintos investigadores, principalmente aquellos correspondientes a *Escherichia coli* y *Salmonella*.

La parte correspondiente al lípido A, separado del lipopolisacárido por hidrólisis ácida débil, aparece, cuando se observa al microscopio electrónico, con una estructura totalmente distinta a la observada en el lipopolisacárido. Las *figuras 6-7* nos muestran el lípido A de la *Erwinia carotovora*

observado en forma de tinción negativa; una estructura en forma de hojitas (véanse microfotografías) es fácilmente distinguible y comparable a la primeramente señalada por Rothfield y Horne (22) en el lípido A del lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* G-30, y también a la encontrada por nosotros (27) en el lípido A del *Agrobacterium tumefaciens*, formas normal y L fija, microorganismos estos últimos, como la *E. carotovora*, patógenos de plantas.

El lipopolisacárido extraído de la *Erwinia carotovora* (37), purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa, como indicábamos en la parte correspondiente a materiales y métodos, después de liofilizado presenta el aspecto de una sustancia blanquecina, que al tratar de disolverlo con agua origina una suspensión de aspecto lechoso. Químicamente es una macromolécula compleja, compuesta de una parte lipídica y un heteropolisacárido, semejante a otros lipopolisacáridos de microorganismos patógenos del hombre y animales superiores. Su contenido en fósforo, nitrógeno, lípido A y carbohidratos totales (véanse resultados) también corresponden en general con los de otros lipopolisacáridos de estirpes silvestres de distintas enterobacteriáceas.

El lípido A, separado del lipopolisacárido por hidrólisis ácida suave, equivale a un porcentaje del 32,5; es una sustancia sólida a la temperatura ordinaria, blanquecina, de aspecto céreo, soluble en los disolventes lipídicos. Su composición química revela estar compuesto principalmente de ácidos grasos, fósforo, etanolamina, glucosamina e indicios de 2-ceto-3-desoxi-d-mano-octulosonato.

Gmeiner y colaboradores (9), en estudios sobre el lípido A de un mutante de *Salmonella minnesota*, encuentran en su composición química glucosamina, fósforo al estado de éter fosfórico y ácidos grasos en una proporción del 60 %. Otros investigadores encuentran los mismos componentes en distintos lípidos A separados del lipopolisacárido de otros microorganismos gram-negativos. Burton y Carter (3) separan el lípido A del lipopolisacárido de *Escherichia coli* y encuentran que, químicamente, está compuesto de glucosamina, ion fosfato, grupos metilo y 5 ácidos grasos diferentes, de los cuales algunos son hidroxilados; los autores indican que la unión tal vez sea a través de estos ácidos hidroxilados y el grupo amino de la glucosamina.

No conocemos ningún trabajo específico sobre el lípido A del lipopolisacárido de microorganismos gram-negativos y patógenos de plantas,

por lo que no podemos hacer comparables nuestros resultados de una manera formal con aquéllos. Únicamente, Santaolalla, en estudios sobre el lipopolisacárido de dos microorganismos patógenos de plantas, el *Agrobacterium tumefaciens* y su forma L fija (25-26) identifica en el lípido A de la forma normal, ácidos grasos, etanolamina, glucosamina, ion fosfórico e indicios de ramnosa, y en el de la forma L fija, ácidos grasos, 2-ceto-3-desoxi-d-mano-octulosonato, glucosa, glucosamina y una heptosa.

Con lo anteriormente expuesto creemos poder afirmar que el lípido A separado del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, presenta en general una estructura química comparable a aquellos otros pertenecientes a lipopolisacáridos de distintas enterobacteriaceas.

Del heteropolisacárido separado del lipopolisacárido, conseguimos por hidrólisis con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,5N, 7 oligosacáridos, que separamos mediante cromatografía sobre papel y placa fina (véanse resultados); el que se encuentra en mayor proporción, da un Rfg sobre papel y placa fina de 1,05 y 0,79, respectivamente, en las condiciones y disolventes que mencionamos; este oligosacárido está a su vez formado por 5 monosacáridos que resultaron ser: galactosamina, glucosa, xilosa, galactosa y ramnosa, en las proporciones equimocelulares que se mencionan. Le siguen en mayor proporción otros dos oligosacáridos con Rfg de 0,56 y 0,75, sobre papel, y 0,38 y 0,60 sobre placa fina (véanse resultados).

En términos generales, vemos que todos los oligosacáridos contienen glucosa y xilosa, aunque en distinta proporción equimolecular.

Las heptosas se investigaron con resultado positivo en el polisacárido hidrolizado. En el año 1960, el grupo de Lüderitz y Westphal (15) estudiando comparativamente la estructura química del lipopolisacárido de la *Salmonella* (estirpe silvestre) y otros de mutantes rugosos del mismo género, encontraron que mientras los lipopolisacáridos correspondientes a los mutantes rugosos contenían solamente 5 monosacáridos, que eran glucosa, galactosa, N-acetil-glucosamina, heptosas y 2-ceto-3-desoxi-mano-octulosonatos; aquéllos procedentes de la estirpe silvestre, generalmente más conocidos, contenían además otros azúcares. En vista de lo cual, los autores propusieron la hipótesis, de que el lipopolisacárido de las estirpes silvestres está formado de dos partes principales: una denominada "corazón", fundamental y que contienen el lípido A y 5 monosacáridos, entre los que se encuentran en general, y siempre en el género *Salmonella*, ácido 3-desoxi-octulosónico, heptosas, glucosa, galactosa y glucosamina; y otra

parte, denominada periférica, compuesta por "cadenas laterales" portadoras del antígeno O específico, que frecuentemente contiene además otros monosacáridos.

En el caso estudiado por nosotros, el heteropolisacárido de la *Erwinia carotovora*, estirpe patógena de plantas, vemos que contiene los azúcares propios de la parte correspondiente al "corazón" del lipopolisacárido, juntamente con otros propios de las "cadenas laterales" tales como la xilosa, ramnosa y galactosamina; de lo que se deduce que nuestro lipopolisacárido no presenta diferencias fundamentales en cuanto a la composición de monosacáridos con otros lipopolisacáridos más estudiados, como son los del género *Salmonella*.

Volk (33) estudia el lipopolisacárido de la pared celular de 20 especies de *Xanthomonas*, microorganismos patógenos de plantas. Este investigador demuestra que los lipopolisacáridos por él obtenidos de estas especies, son análogos a los de otras enterobacteriáceas en cuanto a su acción letal para el ratón y su capacidad para provocar la reacción de Shwartzman local en conejos; estudia la composición química del polisacárido y encuentra que todos contenían ácido urónico, glucosa, manosa y un compuesto que identifica como 2-ceto-3-desoxioctuloseonato típico del lipopolisacárido, también señala que todos los polisacáridos contenían fósforo, al estado de fosfato, y en algunos polisacáridos ciertos carbohidratos adicionales, tales como ramnosa, xilosa, fucosa y galactosa; lo único diferencial que encuentra en el polisacárido de estos lipopolisacáridos de *Xanthomonas* es la ausencia de heptosas.

Posteriormente, el mismo Volk (34) aísla del lipopolisacárido de *Xanthomonas campestris* un ácido D-galacturónico-1-fosfato, pero tampoco logra identificar heptosas entre los productos de hidrólisis del lipopolisacárido.

Humphrey y Vincent (12) estudian el antígeno somático de dos estirpes de *Rhizobium trifolii*; extraen el lipopolisacárido por el método del fenol-agua, y lo inyectan en conejo usando el coadyuvante de Freund, encontrando un gran poder antigénico; también hallan en él una alta actividad en difusión sobre gel. Químicamente, este lipopolisacárido es semejante al de las enterobacteriáceas, contiene una parte lipídica, 2-ceto-3-desoxioctuloseonato, glucosa y manosa; además, en una de las estirpes encuentran heptosas, pero, en general, las proporciones de fósforo fueron menores a las señaladas por otros autores para distintos lipopolisacáridos.



Graham y O'Brien (10) estudian los lipopolisacáridos de dos distintas especies de microorganismos infectivos de plantas pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*. Extraen el lipopolisacárido por el método del fenol-agua; después de su hidrólisis, encuentran en todos ellos, entre los monosacáridos, glucosa y ramnosa y uno o dos aminoazúcares, en general glucosamina; en muchos manosa, seguida por galactosa, fucosa y xilosa; en el correspondiente a una estirpe identifican arabinosa. Un ácido glucurónico metilado fue encontrado por estos autores en el lipopolisacárido de algunas estirpes de *Rhizobium* y *Agrobacterium*. Diferentemente a nosotros, no identifican heptosas ni 2-ceto-3-desoxioctuloseonato.

Finalmente, Santaolalla (25-26), en el año 1971, estudia el lipopolisacárido extraído por el método del fenol-agua, de dos microorganismos patógenos de plantas, el *Agrobacterium tumefaciens* estirpe núm. 13 de la colección del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, y su forma L fija obtenida por inducción con glicocola (23). En el lipopolisacárido de la forma normal, extraído por el método del fenol-agua (37), purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa, después de separar el lípido A por hidrólisis ácida suave, identifica también 7 oligosacáridos, en los que se encuentran como monosacáridos predominantes la ramnosa y fucosa. También se señala la presencia de una heptosa y 2-ceto-3-desoxioctuloseonato. En el correspondiente a la forma L fija del *A. tumefaciens* extraído por el mismo método y purificado idénticamente, se encuentran 6 oligosacáridos como componentes del heteropolisacárido, cuyos monosacáridos principales resultaron ser glucosamina y glucosa; también se identificaron heptosas, 2-ceto-3-desoxioctuloseonato y xilosa.

De lo anteriormente expuesto, creemos poder afirmar que el lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, extraído por el método del fenol-agua y purificado según indicábamos en la parte correspondiente a materiales y métodos, es análogo, aunque no idéntico, al de otras enterobacteriaceas más estudiadas, como son los correspondientes a distintas especies de *Salmonella* y *Escherichia coli*, microorganismos gram-negativos y patógenos del hombre y animales superiores.

#### RESUMEN

El lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora* extraído por el método de Westphal y Jann (37), observado al microscopio electrónico en tinción positiva, aparece con una estructura en forma de cintas planas; estas cin-

tas tienen una estructura trilaminar y su grosor está comprendido entre los 80 y 100 Å.

El mismo lipopolisacárido observado al microscopio electrónico en forma de tinción negativa, con ácido fosfotúngstico, aparece en forma de cuerpos ovales de diámetro variable y, ocasionalmente, como esferoides; también son frecuentes las estructuras en forma de cuerda y elipsoideas concéntricas. La estructura trilaminar no es fácilmente apreciable cuando se observa bajo esta forma de tinción.

Químicamente, este lipopolisacárido está formado por un lípido A y un polisacárido. En el primero identificamos glucosamina, etanolamina y ácidos grasos. De la parte polisacárida logramos separar 7 oligosacáridos; identificando en todos ellos la glucosa y xilosa, y en algunos glucosamina, galactosamina, galactosa, ramnosa y ácido 3-desoxi-octulosónico, cuya proporción molecular correspondiente a los oligosacáridos predominantes se señala en la parte correspondiente a resultados. Las heptosas fueron identificadas en el polisacárido sin hidrolizar.

#### SUMMARY

*Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide from Erwinia carotovora*

The lipopolysaccharide (LPS) extracted by the method of Westphal and Jann (37) from *Erwinia carotovora* observed at the electron microscope by positive staining showed ribbons with a trilaminar 80 to 100 Å wide, ultrastructure. Whereas the same LPS by negative staining (phosphotungstic acid) appeared as oval bodies or some times, concentric spheroides in which the trilaminar structures was difficult to observe.

The LPS of *Erwinia carotovora* was composed by lipid A, containing glucosamine, ethanolamine, and fatty acids; and a polysaccharide formed by 7 oligosaccharides all of them with glucose and xilose and some y them also with glucosamine, galactose, rhamnose and KDO, the molecular proportions of the monosaccharides are given at the text.

Heptoses were identified in the non-hidrolized polysaccharide.

## BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, G. A.; QUADLING, C., and PERRY, M. B. 1976. D-glycero-mano-heptose as a component of lipopolysaccharide from Gram negative bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 13, 1605-13.
2. ANDERSON, P. J. 1966. A sensitive reagent for detecting 2-deoxysugars and 3-deoxypolyols. *J. Chromatogr.*, 21, 163-64.
3. BURTON, A. J., and CARTER, H. E. 1963. Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 3, 411-18.
4. DE PETRIS, S. 1967. Ultrastructure of the cell wall of *Escherichia coli* and chemical nature of its constituent layers. *J. Ultrastruct. Res.*, 19, 45-83.
5. DISCHE, Z. 1949. New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. *Methods Biochem. Anal.*, II, 313-58.
6. ELSON, L. A., and MORGAN, W. T. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and condrosamine. *Biochem. J.*, 27, 1824-28.
7. FISKE, C. H., and SUBBAROW, I. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
8. GAL, A. E. 1968. Separation and identification of monosaccharides from biological materials by thin layer chromatography. *Anal. Biochem.*, 24, 452-61.
9. GMEINER, J.; LUDERITZ, O., and WESTPHAL, O. 1969. Biochemical studies on lipopolysaccharides of *Salmonella* R mutants. 6. Investigations on the structure of lipid A components. *Eur. J. Biochem.*, 7, 370-79.
10. GRAHAM, P. H., and O'BRIEN, M. A. 1968. Composition of lipopolysaccharide from *Rhizobium* and *Agrobacterium*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 34, 326-30.
11. GREENE, F. L., and MORRIS, P. 1958. Urea phosphate reagent as a specific test for heptoses on paper chromatograms. *Anal. Chem.*, 30, 1164.
12. HUMPHREY, B., and VICENT, J. M. 1969. The somatic antigens of two strains of *Rhizobium trifolii*. *J. Gen. Microbiol.*, 59, 411-25.
13. KELLEY, T. F. 1966. Separation with unidimensional TLC of all neutral lipid classes. *J. Chromatogr.*, 22, 456-57.
14. LEIVE, M. L.; V. K. SHOVLII, and MERGENHAGEN, L. E. 1968. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharide released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate. *J. Biol. Chem.*, 243, 6384-91.
15. LUDERITZ, O.; KAUFFMANN, F.; STIERLIN, H., und WESTPHAL, O. 1960. Zur immunchemie der O-antigene von Enterobacteriaceae II. Vergleich der Zuckerbausteine von *Salmonella* S-T. und R formen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1. Orig.*, 179, 180-86.
16. MORRIS, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science*, 107, 254-55.
17. OSBORN, M. J. 1963. Studies on the Gram negative cell wall. I. Evidence for the role of 3 keto-3-deoxyoctanate in the lipopolysaccharide of *Salimonella typhimurium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 50, 499-506.

18. PARTRIDGE, S. M. 1949. Aniline hydrogen phtalate as a spraying reagent for chromatography of sugar. *Nature*, 164, 443.
19. POLLOCK, J. J.; NGUYEN-DISTECHE, M.; GHUGSEN, G. M.; COYETE, J.; LINDER, R.; SALTON, M. R. J.; KIN, K. S.; PERKINS, H. R., and REYNOLDS, P. 1974. Fractionation of the DD-carboxipeptidase-transpeptidase activities solubilized from membranes of *Escherichia coli* K 12. strain 44. *Eur. J. Biochem.*, 41, 439-46.
20. RAADSVELD, C. W., and KLOMP, H. 1971. Thin layer chromatographic analysis of sugar mixtures. *J. Chromatogr.*, 57, 99-106.
21. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high put as an electron opaque in electron microscope. *J. Cell Biol.*, 17, 208-12.
22. ROTHFIELD, L., and HORNE, R. W. 1967. Reassociation of purified lipopolysaccharide and phospholipid of the bacterial cell envelope: electron microscopic and monolayer studies. *J. Bacteriol.*, 93, 1705-21.
23. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1969. Fixed pathogenic L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 195, 4836.
24. SALTON, M. R. J. 1953. Studies of the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some Gram positive and Gram negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 10, 512-21.
25. SANTAOLALLA, M. 1971. Estructura y composición química del lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, 24, 243-56.
26. SANTAOLALLA, M. 1972. Estructura y composición química de lipopolisacárido de la forma L fija del *A. tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, 25, 179-94.
27. SANTAOLALLA, M., and ESPLA, M. D. 1972. Electron microscopy of lipopolysaccharides from *Erwinia carotovora* and bacillary and L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, 25, 91-104.
28. SANTAOLALLA, M., y RUBIO-HUERTOS, M. 1969. Ultraestructura y análisis químico de las paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas L fijas. Libro-homenaje al Prof. D. Obdulio Fernández y Rodríguez con motivo del cincuentenario de su ingreso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 403-18. Madrid.
29. SCHRAMM, J.; WESTPHAL, O., und LUDERITZ, O. 1952. Uber bakterielle Reizstoffe. III. Mitt. Physikalsch-chemisches Verhalten eines hochercinigten colipyrogens. *Z. Naturforsch.*, 76, 594-98.
30. SHANDS (jr), J. W.; GRAHAN, J. A., and NATH, K. 1967. The morphologie structure of isolated bacterial lipopolysaccharide. *J. Mol. Biol.*, 25, 15-21.
31. TREVELYAN, W. E., and HARRISON, J. S. 1952. Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.*, 50, 298-303.
32. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P., and HARRISON, J. S. 1950. Detection of sugar on paper chromatograms. *Nature*, 166, 444.
33. VOLK, W. A. 1966. Cell wall lipopolysaccharide from *Xanthomonas* species. *J. Bacteriol.*, 91, 39-42.

- 
34. VOLK, W. A. 1968. Isolation of D-galacturonic acid-1-phosphate from hydrolysates of cell wall lipopolysaccharide extracted from *Xanthomonas campestris*. J. Bacteriol., 95, 782-86.
  35. WEIDEL, W. 1955. L-gala-D-mano-heptose als Baustein von Bakterien, Zellwänden. Z. Physiol. Chem., 289, 253-57.
  36. WEIDEL, W.; FRANK, H., and MARTIN, H. H. 1960. The rigid layer of the cell wall of *Escherichia coli* strain. J. Gen. Microbiol., 22, 158-66.
  37. WESTPHAL, O., and JANN, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharide, extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods Carbohydr. Chem., 5, 83-91.

INSTITUTO DE BIOLOGIA CELULAR (C S I C)  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES. MERIDA (VENEZUELA)

ISOLATION OF MUREIN-FREE  
SPHEROPLAST «GHOSTS» FROM A STRAIN OF  
*ESCHERICHIA COLI* K 12 (\*)

by

MARIANELLA DE CORAO (\*\*), J. A. SERRANO (\*\*\*), J. A. LEAL (\*\*\*\*)  
J. PUIG (\*\*) and E. MUÑOZ (\*\*\*\*)

INTRODUCTION

The isolation of membrane preparations which preserve their structural integrity appears to be a prerequisite to study their molecular organization. This requirement has been strengthened by the recent emphasis on the mosaic organization of biological membranes (23, 25 and 27). The situation is particularly complicated in the case of gram-negative bacteria as it has been repeatedly pointed out by Salton (22-23). Envelope or membrane fractions from these organisms have been isolated by sonication (9) or other mechanical disruption methods (for a reference see 24). Membrane vesicles have been prepared by the combined action of EDTA and lysozyme (7 and 10). EDTA was introduced in these procedures as a consequence of the studies by Leive and col. (12-13) who showed that

---

(\*) A preliminary account of this work has been presented in the XXII Convención Anual AsoVAC (Acta Cient. Venez. Supl., 1, 21, 1972).

(\*\*) Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes.

(\*\*\*) Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de los Andes.

(\*\*\*\*) Instituto de Biología Celular (CSIC).

EDTA released part of the outer membrane components of gram-negative bacteria. In all cases, those preparations revealed predominance of small fragments and vesicles and absence of envelope or membrane sheets.

In the course of our study on the membrane properties of  $\text{ClO}_3^-$  resistant mutants of *Escherichia coli* K 12 (19) we attempted a procedure for the membrane isolation of this organism.

This procedure was aiming the preservation of the gross structure of the membrane. Since the dissociating and/or solubilizing effect of EDTA in bacterial membrane components has been substantiated in several reports (6 and 16-17) we thus decided to use EDTA and lysozyme treatments in a sequential manner. First, cells were treated with EDTA in tris buffer to remove outer layer components and then, their peptidoglycan (= murein) was weakened or completely hydrolysed by lysozyme action. The present report describes the isolation by this procedure of a spheroplast "ghost" or "membrane" preparation and its partial characterization.

## MATERIAL AND METHODS

### *Bacterial culture and growth conditions*

The bacterial strain used throughout these studies was *Escherichia coli* K 12 number 414 (hfr, thr) which was selected because its wild type character with respect to the chlorate resistant mutants isolated by Puig (see ref. 18). Cultures were grown aerobically at 37 °C on a rotary shaker in a medium containing 5 g of bacto-peptone (Difco), 3 g of beef extract/l. The medium was supplemented with 0.5 g of glucose/l.

Mid log-phase cultures were obtained by inoculating 1 l flasks containing 500 ml of medium with 2.5 ml of an overnight culture in the same medium and allowed to grow for 2 1/2-3 h to reach optical absorbances at 500 nm of 0.500.

### *Isolation of the "membrane" fraction*

Cells were harvested by centrifugation at  $3,300 \times g$  for 15 min at 4 °C in a Sorvall RC2-B centrifuge. After sedimentation they were washed twice by resuspension with half the original volume of culture of 0.01 M tris-(hydroxymethyl) aminomethane (tris-HCl) buffer (pH 7.5). After the

washing, cells were suspended in 1/50 or 1/25 or the original volume of culture with 0.03 M tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 20 mM EDTA (the pH was readjusted to 8.0 after EDTA additions) and incubated for 30 min at room temperature. These conditions were selected as the optimum after a systematic study of the effect of increasing EDTA concentrations from 5 to 20 mM and incubation time from 0 to 30 min. Increase in temperature was avoided in order to prevent metabolic and structural alterations. The ratio cell content/volume of buffer was not further modified during these studies to minimize the number of variables. The EDTA-treated cells were recovered by spinning down at  $3,300 \times g$  at  $0^\circ\text{C}$  for 15 min. The resulting pellet was resuspended in the same volume of 0.03 M tris-HCl buffer (pH 8.0) but containing 20 % sucrose (w/v) and 0.5 mg/ml lysozyme (Calbiochem,  $3 \times$  cryst.). It was placed at room temperature under a magnetic stirrer and allowed to stand until more than 90 % of the bacterial cells were rendered sensitive to osmotic shock as judged by phase contrast microscopy after sampling every 5 min. After 10 min of incubation, the cells became to be sensitive to the hypotonic treatment. It is noteworthy that even cells which were not converted to spherical bodies were exploded by the osmotic shock. This is a confirmation of results previously reported by Kaback (11). The completion of this process took usually 30-60 min. The osmotically sensitive bodies were recovered by centrifugation at  $14,000 \times g$  at  $0^\circ\text{C}$  for 20 min. The pellet was washed by resuspension in the same volume of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) added of 20 % sucrose (w/v) and centrifuged ( $14,000 \times g$  for 20 min). Alternatively, the pellet was washed with 0.03 M tris-HCl buffer (pH 8.0) added of 20 % sucrose.

The sediment, containing mostly spheroplasts, was suspended in 0.02 M tris-HCl buffer (pH 7.5) with  $200 \mu\text{g}$  DN-ase (EC 3.1.4.5) (Calbiochem, bovine pancreas, grade B)/ml (same volume). To facilitate the osmotic lysis, the mixture was incubated for 10-15 min at room temperature under a magnetic stirrer.

The "membranes" were recovered by centrifugation at  $27,000 \times g$  for 20 min at  $0^\circ\text{C}$  and washed twice with the same volume of 0.02 M tris-HCl buffer (pH 7.5) made 1 mM for  $\text{Mg}^{++}$  with concentrated  $\text{MgCl}_2$ . For purposes of comparison, in some cases membranous structures were isolated according to the technique of Kaback (10) as modified by Evans (7).



*Analytical procedures*

Dry weight estimations were carried out on aliquots of the "membrane" preparations which had been dialyzed against several changes of distilled water, and dried at 100 °C in the oven until constant weight was reached. Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (15) with bovine serum albumin (Sigma Chemical Company) as standard. Carbohydrate content was determined by the hexose reaction of anthrone (4). The amounts of RNA and DNA were respectively estimated by the orcinol (18) and the diphenylamine (2) reactions, after the membranes have been extracted with 1 N perchloric acid at 85 °C for 1 h. Orcinol was obtained from BDH Chemicals and diphenylamine from Merck. Total phosphorus was measured by a modification of the method of Lowry *et al.* (14) in samples that had been previously digested with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : HClO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O (4.8 : 1 : 10, by vol). The bound lipids were determined gravimetrically by extracting three times, 15 ml of the "membrane" suspension (25-30 mg) with 5 ml of chloroform-methanol (2 : 1, by vol.) for 30 min at room temperature. After each extraction and removal of the chloroform-methanol, 2 ml of that mixture were added to wash up the extracted sample. The extracts and washing fluids were pooled, evaporated to dryness, washed, dried and finally weighed in a tared weighing bottle. Total hexosamines were estimated by the Elson-Morgan reaction as described by Ghuysen *et al.* (8). The content of diaminopimelic acid was estimated by submitting hydrolysates (constant-boiling HCl for 24 h at 120 °C) to a Biocal BC 200 autoanalyser.

*Electron microscopy*

The preparation of samples for thin sectioning was essentially carried out as described by Schnaitman (24). When the sample was in a compact pellet, 6 % glutaraldehyde (Polyscience, in 10 ml vials) in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) containing minimal amounts of CaCl<sub>2</sub> was added. If the sample was a suspension, equal volumes of the suspension and 12 % glutaraldehyde were mixed. After thoroughly washing at 0 °C with the same phosphate buffer, the samples were postfixed overnight with 1 % osmium tetroxide and then treated with 2 % uranyl acetate. The specimens were dehydrated with acetone, embedded in araldite and sectioned with a MT-2 Porter Blum Ultramicrotome by using a diamond knife.

Sections were poststained with lead citrate according to the technique of Reynolds (20) and examined in a Jeol Jem 7A used at 80 Kv with direct magnifications from 25,000 to 50,000.

Samples for negative staining were examined in a Philips EM 300 electron microscope after staining with ammonium molybdate as described by Muñoz *et al.* (16).

## RESULTS

### *Chemical compositions of the isolated "ghosts"*

The chemical composition of *Escherichia coli* "ghost" preparation is illustrated in *table 1*. As these data show, the preparation is essentially of lipoprotein nature. The high values for hexose, and the relatively high percentage of organic phosphorus can be accounted for by the presence of lipopolysaccharide from the outer membrane and/or by a plasma membrane preparation with a high content of glycolipids and glycoproteins. However, it is interesting to note that the amount of hexosamines is exceedingly low; hexosamines are components of the O-antigens of *E. coli* strains (5) and of the peptidoglycan layer. Hence, this low content would indicate a very poor contamination by constituents of the peptidoglycan

*Table 1. Chemical composition of the isolated spheroplast "ghost" or "membrane" fraction from Escherichia coli K 12-414*

	Dry weight (*) %
Protein	51.5
Lipid	24.0
Hexase	6.8
Hexosamines (**)	0.4 (0.2-0.5) (***)
RNA	1.5 (1.1-2.0) (***)
DNA	
Total phosphorus	3
Diaminopimelic acid	0.024-0.030

(\*) Results are the mean values of three determinations. (\*\*) The amount of hexosamines is expressed in equivalents of glucosamine HCl. (\*\*\*) Numbers between parentheses indicate the extreme values obtained with different preparations.

polymer. Further confirmation of the low content of peptidoglycan in this "membrane" preparation has been obtained by the dosage of diaminopimelic acid as it is shown in *table 1*. The presence of diaminopimelic acid has been confirmed by identification of its derivative bis-dinitrophenyl diaminopimelic acid, by thin layer chromatography (26) after collecting the peak from the autoanalyser.

It is worth to compare the low percentage of diaminopimelic acid measured by us with those reported by Salton (21) for the cell walls (envelopes) of *Vibrio metchnikovi* and *Salmonella gallinarum*, other gram-negative bacteria.

Protein yield of the "membrane" fraction expressed in terms of the percentage of protein associated with that fraction is illustrated in *table 2*. As it is shown, the yield amounts to 18 % which is then consistent with those reported by Kaback (11) for the membranes or envelopes isolated from several other gram-negative strains. It is interesting to note the

*Table 2. Protein distribution in the fraction obtained during the isolation of the "membrane" fraction from E. coli K 12*

Total protein %		
Periplasmic Fluid (*)	Cytoplasm (**)	"Membrane" fraction (***)
$38 \pm 5$	$38.5 \pm 5$	18.0

(\*) Comprises the sum of protein content of the supernatant fluids before osmotic lysis (see Material and Methods). (\*\*) Protein content of the supernatant fluids after osmotic lysis and subsequent washing (see Material and Methods). (\*\*\*) Protein content of the washed membrane suspension.

almost equivalent percentages of protein found in both fractions, the periplasmic space and the cytoplasm. This result is rather striking since a high percentage of protein ought to be expected for the cytoplasmic fraction. It probably reflects a partial instability and/or the changes in permeability of EDTA treated cells. These results and their interpretation require further substantiation.

*Ultrastructural observation*

The anatomical features of the preparation has been examined by two methods: thin sectioning and negative staining.

The characteristic profile of the cell envelope of *Escherichia coli* K-12-414 composed of cell wall with its multilayered structure is shown (*figura 1a*); the overall thickness of the surface is  $15.0 \pm 2.5$  nm and the "double track" of the cytoplasmic membrane measures  $5.2 \pm 0.3$  nm. *Figure 2b* exhibits the morphological appearance in thin sections of the "ghosts" isolated by the procedure herein described. They essentially consist of large membrane sheets of collapsed appearance and empty bags.

An interesting feature of this preparation is that the individualized bags approach the cell size (1  $\mu$ m diameter) and show a single membranous profile (see *figure 2b*). On the other hand, most of the membranous sheets show a double membrane profile (see *figure 1b*). It must be noted that the double membrane might result of the fusion of single membrane units from different cells. Some small vesicles are also observed.

Note the absence in the preparation on any structure which resembles the peptidoglycan or murein layer of the intact cells. In any case, from these structural observations it seems reasonable to conclude that the "ghosts" isolated by us have a large size than those isolated by the procedure of Kaback (11) or by mechanical desintegration (24). They may also contain the two, outer and inner, membranes although this is not a general characteristic of the membranous structure observed.

The negative staining aspect of the preparation is illustrated in *figure 3b* and compared with the morphological appearance of the membrane fraction obtained by lysozyme and EDTA mixed action (*figure 3a*). Note the marked difference in size although both preparations show a similar "double membrane" aspect. It is interesting to observe that the "membranes" isolated according to our procedure appear completely spherical and without rigidity. Their smooth, folded appearance remembers in some way that of some membranes isolated from gram-positives species. Some circular disks and membranous structures are also observed on them but nevertheless their morphology is far less complicated than that noticed by Salton (23) for isolated envelopes of *Escherichia coli*.

## DISCUSSION

By the sequential treatment with EDTA and lysozyme of an *Escherichia coli* K 12 strain we have succeeded in the isolation of a membrane fraction which is mainly composed of membranous structures whose average size is close to that of the original cells. The experimental evidences reported in this work indicate the absence of peptidoglycan components. By all these properties the isolated structures resemble the "ghosts" obtained from gram-positive species.

However, we can not ascertain at the present time if our preparation still possessed the two membranes of the complex surface of gram-negative bacteria. Our results of negative staining agree with this possibility. The biochemical data can be reconciled with both possibilities. Nevertheless, the results of thin sections do not completely support the presence of outer and inner membranes. On the contrary, they indicate that some membranous structures consist of single, probably pure plasma membranes. If this was true, our method would be a valuable approach for the resolution of the complex envelope of *Escherichia coli*. However, we do not yet know whether it is of general use or whether it is dependant upon strain characteristics. Preliminary experiments support the first alternative. In any case, we think our method will be useful for studying the structural organization of cell surface of gram-negative organisms.

We are aware that the term structural integrity is somewhat ambiguous and may be used only in comparative terms. In this regard the sequential treatment with EDTA and lysozyme seems less drastic, as expected, than that simultaneous with both agents. The membranes isolated by the first procedure preserve their gross structure. They might be less effected by shearing and resealing processes because they are composed of membrane sheets and "bags" with approx. the cell size. Each membrane preparation should be defined by comparison of its biochemical properties. A recent study in one of our laboratories has demonstrated the almost identical behaviour of the ATP-ase associated to two morphologically distinct membrane preparations (3). These comparative studies should be extended to membranes obtained by physical methods.

It is interesting to raise up the possibility that EDTA is not a necessary step for lysozyme action in all gram-negative strains, as early suggested by

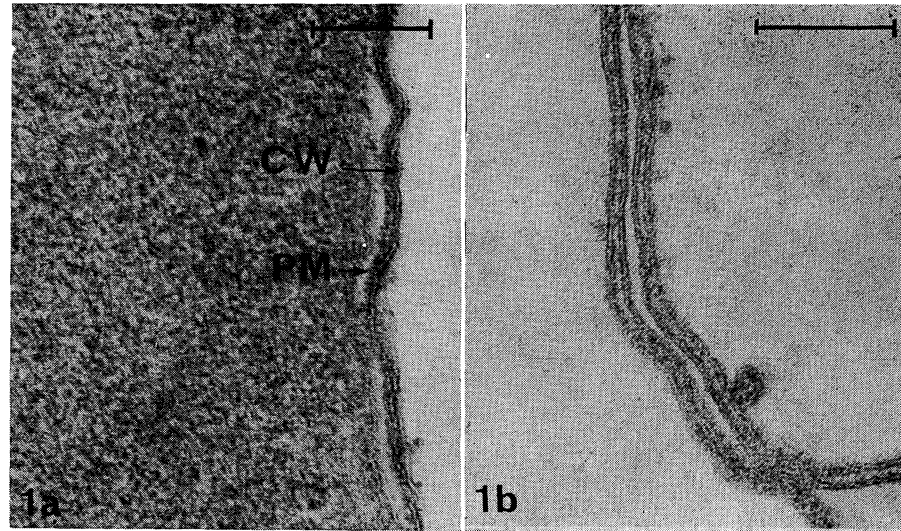


Figure 1. Electron micrographs of ultrathin sections of *Escherichia coli* K 12-414 and its "membranes". a) Section of intact cell showing the multilayered cell wall (CW) and the plasma membrane (PM). 138,000  $\times$ . b) Detail of an isolated "membrane". Note the presence of the double membrane and the absence of peptidoglycan (= murein) layer. 160,000  $\times$ . Markers correspond to 0.3  $\mu\text{m}$



Figure 2. Electron micrographs of ultrathin sections of *E. coli* K 12-414 and its "membranes". a) Isolation membrane preparation at low magnification. Note the presence of membrane "sheets empty bags and some vesicles (arrows). 57,000  $\times$ . b) Detail of isolated "bags". Observe the presence of single membrane (arrows). 102,400  $\times$ . Markers correspond to a) 0.1  $\mu\text{m}$ , b) 0.2  $\mu\text{m}$

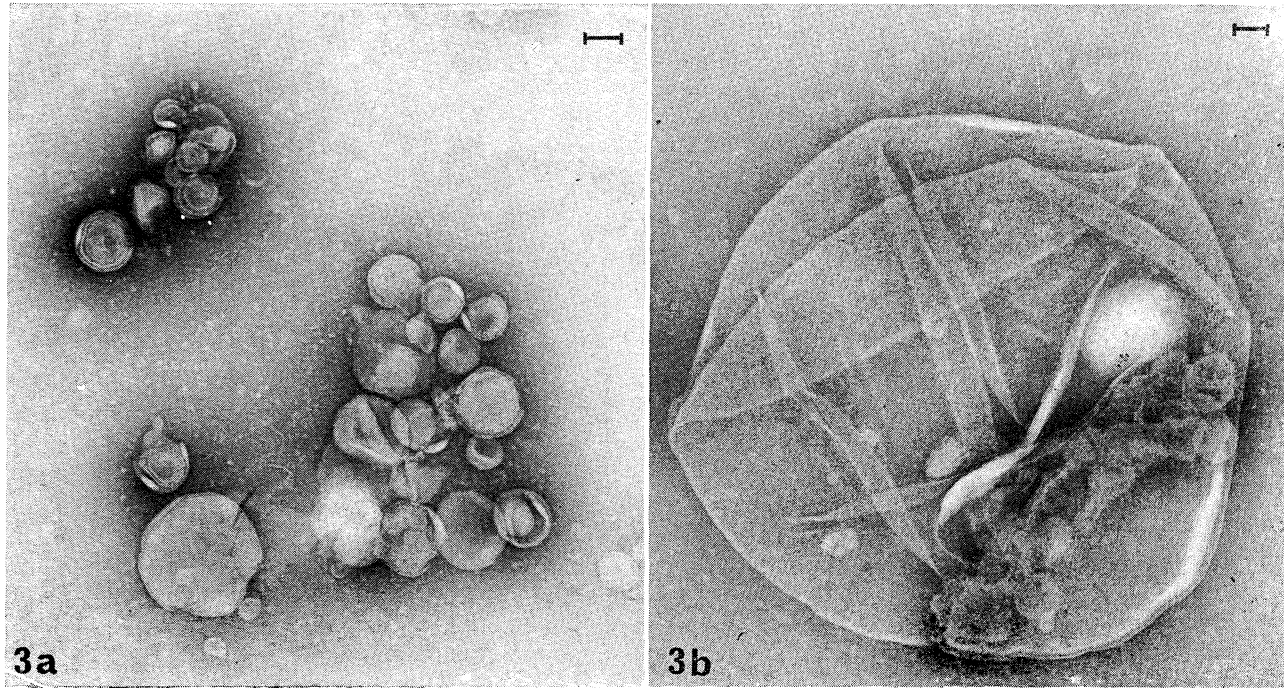


Figure 3. Negative staining of membrane preparations from *E. coli* K 12-414. a) Vesicles obtained by EDTA and lysozyme mixed action, b) "Ghosts" obtained by the procedure hereby reported. 45,000  $\times$ . Markers correspond to 0.1  $\mu\text{m}$



Birdsell and Cota-Robles (1). This possibility opens a new and interesting perspective for these studies.

Our procedure has been applied to only one strain of *Escherichia coli* and its biochemical definition has been scanty. Its extension to different membrane mutants and the comparison of biochemical parameters with those of different preparations should be helpful in understanding the molecular organization of the cell membrane components of gram-negative organisms.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been aided in part by a grant (DF-S1-007) of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) to J. P. and by a U. S. Public Health Service Grant (AI 08598-04) to the Instituto de Biología Celular. We are indebted to Mrs. Anna de Serrano for valuable technical assistance. We wish to thank Dr. P. Pinto de Silva for his valuable suggestions which have been incorporated in the text.

#### ABSTRACT

An envelope fraction has been isolated from a strain of *Escherichia coli* K 12 by sequential treatment, EDTA first and lysozyme after. The isolated fraction is essentially composed of membranous structures whose sizes are in marked contrast with those of the vesicular fraction isolated by the combined action of EDTA and lysozyme. Ultrastructural and chemical evidences indicate the absence of the peptidoglycan (= murein) layer. The membrane fractions is of lipoprotein nature (51.5 % of its dry weight is protein, 24 % is lipid) and yields approximately 18 % of the total cellular protein. The negative staining procedure reveals its spherical smooth, flexible and partially folded appearance. There is some indication by the thin sections that some of the isolated structures are composed of a single membrane unit. By all these properties, the isolated envelope fraction resembles the "ghosts" obtained from gram-positive species. Hence we have designated the isolated structures with the terms spheroplast "ghosts" or "membranes".

## RESUMEN

### *Aislamiento de membranas de Escherichia coli K 12, con tamaño de células y sin mureína*

El tratamiento secuencial con EDTA, primero, y lisozima, después, ha permitido aislar una fracción de la cubierta celular de una cepa de *Escherichia coli* K 12. La fracción aislada está compuesta fundamentalmente por estructuras membranosas cuyo tamaño contrasta fuertemente con el diámetro medio de la fracción vesicular que se obtiene por la acción conjunta del EDTA y lisozima. Pruebas ultraestructurales y químicas muestran la ausencia de la capa de peptidoglicano (= mureína) en dicha fracción. La fracción es de naturaleza lipoproteica (51,5 % del peso seco es proteína y el 24 % es lípido) y su rendimiento corresponde aproximadamente al 18 % de la proteína celular total. El procedimiento de tinción negativa revela su morfología esférica, suave, flexible y parcialmente plegada. La observación de la preparación en cortes finos indica que algunas de las membranas aisladas están constituidas por una sola unidad de membrana. En virtud de todas estas propiedades, la fracción de la cubierta celular así aislada se asemeja a los "fantasmas" obtenidos de bacterias gram-positivas. Por todo esto, hemos designado a las estructuras aisladas con los nombres de "fantasmas" de esferoplastos o "membranas".

## BIBLIOGRAPHY

1. BIRDSSELL, D. C., and COTA-ROBLES, E. H. 1967. Production and ultrastructure of lysozyme and ethylenediaminetetraacetate lysozyme spheroplasts of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 93, 427-37.
2. BURTON, K. 1956. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J., 62, 315-23.
3. CARREIRA, J.; LEAL, J. A.; ROJAS, M., and MUÑOZ, E. 1973. Membrane ATP-ase of *Escherichia coli* K 12. Selective solubilization of the enzyme and its stimulation by trypsin in the soluble and membrane-bound states. Biochim. Biophys. Acta, 307, 541-56.
4. CHUNG, C. W., and NICKERSON, W. J. 1954. Polysaccharide syntheses in growing yeasts. J. Biol. Chem., 208, 395-407.

5. EDSTROM, R. D., and HEATH, E. C. 1964. Sugar nucleotide transferases in *Escherichia coli* lipopolysaccharide biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 576-81.
6. ELLAR, D. J.; MUÑOZ, E., and SALTON, M. R. J. 1971. The effect of low concentrations of glutaraldehyde on *Micrococcus lysodeikticus* membranes: changes in the release of membrane associated enzymes and membrane-structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 225, 140-50.
7. EVANS, D. J. 1969. Membrane adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*: activation by calcium ion and inhibition by monovalent cations. *J. Bacteriol.*, 100, 914-22.
8. GHUYSEN, J. M.; TIPPER, D. J., and STROMINGER, J. L. 1966. Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods Enzymol.*, VIII, 685-99.
9. GRAY, G. W., and THURMAN, P. F. 1967. A membrane fraction obtained by desintegration of *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 947-58.
10. KABACK, H. R. 1968. The role of the phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system in the transport of sugars by isolated membrane preparations of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 243, 3711-24.
11. KABACK, H. R. 1971. Bacterial membranes. *Methods Enzymol.*, XXII, 99-120.
12. LEIVE, L. 1965. A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 53, 745-50.
13. LEIVE, L.; SHOVLIN, V. K., and MERGENHAGEN, S. E. 1968. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharide released from *Escherichia coli* by ethylenediamine tetraacetate. *J. Biol. Chem.*, 243, 6384-91.
14. LOWRY, O. H.; ROBERTS, N. R.; LEYNER, K. Y.; WU, M. L., and FARR, A. L. 1954. The quantitative histochemistry of brain. I. Chemical methods. *J. Biol. Chem.*, 207, 1-17.
15. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, H. J.; FARR, A. L., and RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-75.
16. MUÑOZ, E.; SALTON, M. R. J., and ELLAR, D. J. 1970. The resolution and properties of some major components of *Micrococcus lysodeikticus* cell membranes. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Symp.*, 20, 51-58.
17. NACHBAR, M. S., and SALTON, M. R. J. 1970. Dissociation of functional markers in bacterial membranes. *Surface Chem. Biol. Systems*, 175-90.
18. OGUR, M., and ROSEN, G. 1950. The nucleic acid of plant tissues. I. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 25, 262-76.
19. PUIG, J. E.; AZOULAY, F.; PICHINOTY, F., and GENDRE, J. 1969. Genetic mapping of the *Chl C* gene of the nitrate reductase A system in *Escherichia coli* K 12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 659-62.
20. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-12.
21. SALTON, M. R. J. 1964. *The Bacterial Cell Wall*. Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York.

22. SALTON, M. R. J. 1967. Structure and function of bacterial cell membranes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21, 417-22.
23. SALTON, M. R. J. 1971. The bacterial membrane. *Biomembranes*, 1, 1-65.
24. SCHNAITMAN, C. A. 1970. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 104, 890-901.
25. SINGER, S. J., and NICOLSON, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Sciences*, 175, 720-31.
26. VAN HEIJENOORT, J.; ELBAZ, L.; DEZELEE, P.; PETIT, J. F.; BRICAS, E., and GHYSEN, J. M. 1969. Structure of the mesodiaminopimelic acid containing peptidoglycans in *Escherichia coli* B and *Bacillus megaterium* KM. *Biochemistry*, 8, 207-13.
27. WALLACH, D. H. F., and GORDON, A. S. 1968. Lipid-protein interactions in cellular membranes. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 27, 1263-67.

NATIONAL RESEARCH CENTRE (EGYPT)  
MICROBIOLOGICAL CHEMISTRY RESEARCH LABORATORY  
BOTANY DEPARTMENT, FACULTY OF SCIENCE, ASSUIT (EGYPT)

## SOME CULTURE CONDITIONS INFLUENCING THE $17\alpha$ - HYDROXYLATION OF PROGESTERONE WITH *TRICOTHECIUM ROSEUM*

by

L. A. R. SALLAM, I. A. EL-KADY and A. H. EL-REFAI

### INTRODUCTION

In 1952, Peterson & Murray (10) and Fried and his collaborators (5) reported independently the microbiological oxygenation of steroids at the 11-position. This dramatic discovery opened a new field for the use of microorganisms in the preparation of a variety of adrenocortical hormones. The  $11\alpha$ - and  $17\alpha$ -hydroxy groups are two important constituents of all antiinflammatory steroid molecules.

Mystre *et al.* (8) described the  $17\alpha$ -hydroxylation of deoxycorticosterone by *Tricothecium roseum*. At about the same time, a strain of *Cephalothecium roseum* was reported to possess similar properties (7). However,  $11\alpha$ -hydroxylation was successfully achieved also. Peterson (9), reported that the microorganisms used by both group of workers (7-8) are most likely different strains of the same fungus (*T. roseum*). The ability of *T. roseum* to perform  $6\beta$ ,  $11\alpha$ -dihydroxylation reaction of progesterone had also been observed (13).

In spite of the accumulating literature of the  $11\alpha$ -hydroxylation of steroids, studies on the physiological and biochemical aspects of the  $17\alpha$ -hydroxylation are comparatively few.

In this paper, we should like to report our studies on the role of some factors that influence the  $17\alpha$ -hydroxylation of progesterone with a locally isolated strain of *Tricothecium roseum*. This organism was found to be the most active  $17\alpha$ -hydroxylator among a variety of microorganisms. The different transformation products obtained when this organism was acted on progesterone were also characterized by the authors (4).

## MATERIALS AND METHODS

### Cultivation

The local strain of *Tricothecium roseum* was kindly provided by Dr. M. A. El-Naghy, Botany Dept., Assuit University. The medium formulated by Capek *et al.* (1) as well as some other media are used during this work. The composition of these media is given in the text (table 1).

Table 1. Transformation of progesterone with *T. roseum* grown on different fermentation media

Media	Residual progesterone	Transformation mixture (mg/culture)			
		$17\alpha$ -hydroxy-progesterone	$11\alpha$ -hydroxy-progesterone	$11\gamma$ , $17\alpha$ -dihydroxy-progesterone	$6\beta$ , $11\alpha$ -dihydroxy-progesterone
I	2.7	3.0	2.0	1.1	0.7
II	3.7	2.3	1.8	1.3	traces
III	1.8	4.3	2.2	0.6	0.6
IV	5.2	1.3	0.8	traces	2.2

Media (g/l; w/v): I = Glucose, 40.0; peptone, 5.0; yeast extract, 1.0; asparagine, 0.7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.7;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0. (ref. 1). II = Glucose, 40.0; peptone, 7.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.7;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.7. III = Glucose, 40.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 2.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0. IV = Molasses, 100 (equivalent to 44.5% sugars); corn steep liquor (solid) 7.0.

The cultivation was made in 250 ml Erlenmeyer flasks, each containing 60 ml medium. The flasks were sterilized at 1 atmosphere for 20 min and inoculated with 2 ml of inoculum suspension of 14 days old cultures of

the pure organism. The culture flasks were agitated on a reciprocal shaker (110 strokes/min, amplitude 7 cm) at  $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 48 h. Thereafter, 10 mg of progesterone dissolved in 1 ml 96 % ethanol was added to each flask and fermentation was continued for another 48 h.

### EXTRACTION

At the end of the fermentation period, the contents of each flask were homogenized in a blender (16,000 r/m) with 2 volumes of chloroform. The extraction was repeated three times to ensure that all the transformation products were extracted. The combined chloroform extracts were washed with half its volume 5 % sodium bicarbonate solution followed by an equal volume distilled water, then dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and then distilled.

### *Analysis*

Quantitative analysis of the different transformation products encountered during this work was carried out by the thin-layer chromatographic technique as previously described by the authors (11). The preparative thin-layer chromatographic analysis using standard equipments was used and the different transformation products were estimated by the UV spectrophotometric analysis (3).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *1. Suitability of the fermentation medium*

The present investigation was started by studying of the effect of the medium composition on the convertibility of progesterone with *Tricothecium roseum*. It is evident from the results given in *table 1* that under the experimental conditions employed, the composition of the fermentation medium influences the rate of transformation, but not the type of the resulting metabolite. With medium I (Capek's medium), about 73 % of the progesterone was acted upon by the fungus enzyme systems with the formation of 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone as well as 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ - and 11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -

dihydroxy derivatives.  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone contributed 41 % of the changed progesterone. The transformation process was however stimulated when a relatively simple medium was used. Thus, with medium III, only about 18 % of the original progesterone concentration remained unchanged. Moreover, maximal yields of  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone (52 % of the changed progesterone) was obtained in this respect.

On the other hand, molasses-corn steep liquor medium did not favour the microbial reactions. In this case, comparatively lower amount of progesterone was changed and poor yields of the different transformation products, except with  $6\beta$ ,  $11\alpha$ -dihydroxyprogesterone, were recorded. The formation of  $6\beta$ ,  $11\alpha$ -dihydroxyprogesterone in a relatively high yield (50 % of the changed progesterone) may be correlated with the presence of zinc as a constituent of the metal employed (6). In some other microbial systems (2 and 12) the formation of  $6\beta$ ,  $11\alpha$ -dihydroxyprogesterone was markedly accelerated in the presence of  $Zn^{+2}$  or  $Cd^{+2}$  in the fermentation medium.

## 2. Carbon source

Having shown that the experimental medium no. III is the most suitable formulation for the production of  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone, it was intended to study the role of the carbon source on the transformation process.

The results of these studies (table 2) showed that the transformation

Table 2. Transformation of progesterone with *T. roseum* as influenced with the nature of the carbon source

Carbon source	Residual progesterone	Transformation mixture (mg/culture)			
		$17\alpha$ -hydroxy-progesterone	$11\alpha$ -hydroxy-progesterone	$11\alpha$ , $17\alpha$ -dihydroxy-progesterone	$6\beta$ , $11\alpha$ -dihydroxy-progesterone
Glucose	1.8	4.3	2.2	0.6	0.6
Sucrose	1.1	3.6	3.6	1.3	0.6
Maltose	traces	4.0	2.5	1.5	0.9
Mannose	traces	4.3	2.8	1.0	1.1
Lactose	4.7	2.0	2.2	traces	traces

Medium used: medium III (see table 1); glucose (40 g/l) was replaced by carbon equivalent weights of the different sugars tested.



process is affected by the nature of the carbon source of the fermentation medium. The transformation rate is increased with sucrose, maltose and mannose. However, the formation of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone is slightly affected with these sugars. On the other hand, 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone is formed in relatively higher yield with sucrose as the sole carbon source. Similarly, the simultaneous introduction of 11 $\alpha$ - and 17 $\alpha$ -hydroxy groups was induced in case of sucrose and maltose. In contrast, lactose proved to be a bad carbon source for the fermentation process.

As far as the carbon level of the medium is concerned, the rate of progesterone conversion was decreased either with low or high levels (figure 1). Better transformation yields were obtained with moderate glucose concentrations (4 and 5 g %). Progesterone was preferably transformed to its 17 $\alpha$ -hydroxy derivative with 3.0 to 5.0 g % glucose.

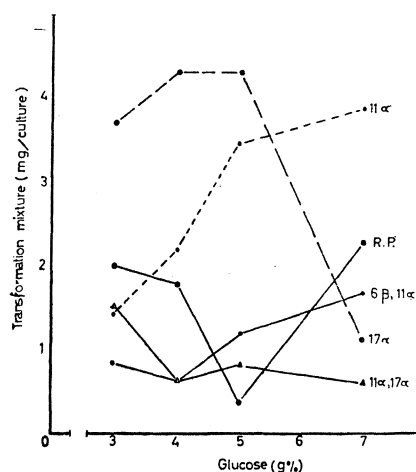


Figure 1. Transformation of progesterone (10 mg/culture) by *Tricothecium roseum* as influenced by varying the glucose level of the medium. 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. R. P., residual progesterone. 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone. 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. 11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone

The hydroxylation of progesterone at C-11 position was markedly improved with glucose concentrations ranging from 3.0 to 5.0 g %. However, a slight increase of 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone yield was recorded with

the highest glucose level used (7.0 g %). In contrast, 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone was formed in comparatively higher amounts with high levels of glucose; namely 5.0 and 7.0 g %.

### 3. Nitrogen source

The results of the transformation of progesterone when the experimental organism was grown on medium III containing nitrate, ammonium salt or urea were recorded in *table 3*. It was evident that ammonium-nitrogen was the most favourable form for the formation of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. However, the 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone as well as the formation of 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone were increased with urea as the sole nitrogen source.

*Table 3. Transformation of progesterone with T. roseum as influenced by the nature of the nitrogen source*

Nitrogen source	Residual progesterone	Transformation mixture (mg/culture)			
		17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone	11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone	11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone	6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone
Ammonium phosphate	1.8	4.2	2.2	0.6	0.6
Sodium nitrate	4.6	2.0	1.7	traces	traces
Urea	traces	3.1	3.6	0.6	1.0

Medium used = medium III (see *table 1*). This medium is supplemented with nitrogen equivalent weights of NaNO<sub>3</sub> & urea and in both cases 0.7 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was added to the medium, pH was always adjusted to 6.5.

The variation of the nitrogen level of the medium within the experimental range tested, exerted no noticeable effect on the transformation process (*figure 2*). Thus, similar yields of each of the different products were obtained under the different experimental modifications tested.

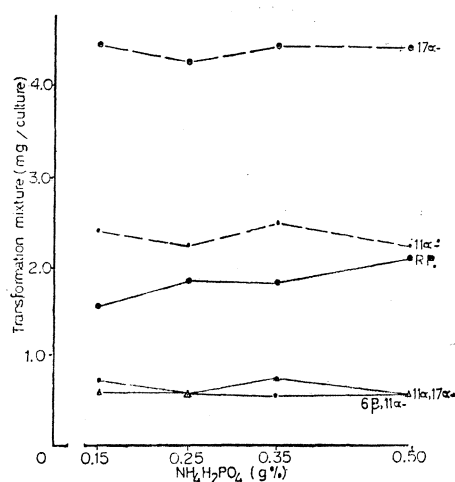


Figure 2. Transformation of progesterone (10 mg/culture) by *T. roseum* as influenced by varying the level of the nitrogen source of the medium

#### 4. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

As can be seen from figure 3, the addition of 0.15 and 0.20 g % of the magnesium salt to the medium increased the rate of progesterone bio-conversion. In contrast, the lowest level of the same salt (0.05 g %) maintained poor progesterone conversion. In this respect about 1 : 4 of the added progesterone concentration remained unchanged.

The variation of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  concentration exerted no noticeable effect on the transformation of progesterone to its 17 $\alpha$ -hydroxy derivative. Furthermore, with 0.3 g %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , the yield of the latter product was considerably decreased. Under these conditions, the formation of 11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone was greatly restricted.

On the other hand, the enzymatic 11 $\alpha$ -hydroxylation reaction was markedly activated on increasing the level of the added magnesium salt. Maximal yield of 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone was obtained with 0.2 g %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Similarly, the addition of the different levels of this salt

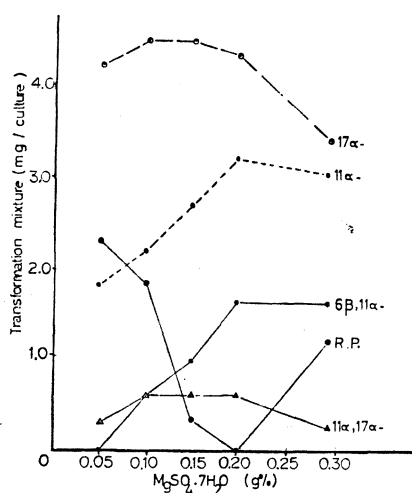


Figure 3. Transformation of progesterone (10 mg/culture) by *T. roseum* as influenced by adding different levels of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  to the medium

to the medium induced the formation of  $6\beta$ ,  $11\alpha$ -dihydroxyprogesterone. The highest yield of this product was recorded with 0.2 and 0.3 g %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .

##### 5. The hydrogen ion concentration

Study of the role of the pH value of the fermentation medium on the bioconversion of progesterone was carried out by adjusting aliquots of the fermentation medium with phosphate buffer (14) to pH values ranging from 5.29 to 8.04.

The results of this study (table 4) revealed that adjustment of the medium around neutrality favoured the transformation of progesterone to its different derivatives. The pH value 6.24 appeared to be optima for the production of both  $11\alpha$ - and  $17\alpha$ - hydroxyprogesterone. Furthermore, the formation of the dihydroxy products; namely  $6\beta$ ,  $11\alpha$ - and  $11\alpha$ ,  $17\alpha$ -dihydroxyprogesterone reached maximum at pH 7.17.

Table 4. Transformation of progesterone with *T. roseum* as influenced with variation of the pH value of the fermentation medium

pH value	Residual progesterone	Transformation mixture (mg/culture)			
		17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone	11 $\alpha$ -hydroxy-progesterone	11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -dihydroxy-progesterone	6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-progesterone
5.29	3.5	2.0	2.2	1.0	traces
6.24	0.0	4.0	3.2	2.0	0.6
7.17	0.0	3.1	2.9	2.4	1.2
8.04	2.4	2.2	2.5	1.8	traces

Medium used = medium III (see table 1).

#### SUMMARY

Progesterone was successfully transformed to 17 $\alpha$ -; 11 $\alpha$ -; & 11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ - and 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -hydroxy derivatives with a local strain of *Tricothecium roseum*. The biconversion process is markedly affected by the hydrogen ion as well as the composition of the fermentation medium.

The effect of the pH value of the medium, carbon, nitrogen and magnesium sulphate on the transformation pattern was studied. The present work elucidated the optimal conditions for the formation of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone.

#### RESUMEN

*Algunas condiciones de cultivo que influyen en la 17 $\alpha$ -hidroxilación de la progesterona con Tricothecium roseum*

Se ha logrado la transformación sucesiva de 17 $\alpha$ -; 11 $\alpha$ -; 11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -; y 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -hidroxiderivados con una estirpe local de *Tricothecium roseum*. El proceso de conversión se ve muy afectado por el ion hidrógeno así como por la composición del medio de fermentación.

Se ha estudiado el efecto que causan en la transformación el pH, carbono, nitrógeno y sulfato magnésico. Quedan fijadas las condiciones óptimas para la formación de la 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona.

## BIBLIOGRAPHY

1. CAPEK, A.; HANC, O.; TADRA, M., and TUMA, J. 1964. Microbial transformation of steroids. XXIV. Separation of androsta -17-hydroxy epimers. *Folia Microbiol.*, 9, 380-82.
2. DULANEY, E. L. 1960. Production from *Aspergillus ochraceus* of oxidases for the selective oxidation of progesterone at position 11. U.S. patent, 2, 905, 593 (C.A., 54, 1959, 1960).
3. EL-KADY, I. A. 1970. Microbiological transformation of steroids. Ph. D. Thesis. Faculty of Science, Cairo University, Cairo, Egypt.
4. EL-KADY, I. A.; SALLAM, L. A. R., and EL-REFAI, A. H. 1972. 17 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone by microorganism. *Pak. J. Biochem.*, V, 39-43.
5. FRIED, J.; THOMA, R. W.; GERKE, J. R.; HERZ, J. E.; DONIN, M. N., and PERLMAN, D. 1952. Oxidation of steroids by microorganisms. *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 3962-63.
6. HAMISSA, F. A. 1970. Microbiological production of citric acid. Ph. D. Thesis, Faculty of Science, Cairo University, Cairo, Egypt.
7. MEISTER, P. D.; REINEKE, L. M.; MEEKS, R. C.; MURRAY, H. C.; EPPSTEIN, S. H.; OSBORN, H. M.; WEINTRAUB, A., and PETERSON, D. H. 1954. Microbiological transformations of steroids. XII. 17 $\alpha$ -hydroxylation. *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 4050-51.
8. MEYSTRE, C.; VISCHER, E., and WETTSTEIN, A. 1954. Mikrobiologische Hydroxylierung von Steroiden in der 17 $\alpha$ - und 21-stellung. *Helv. Chim. Acta*, 37, 1548-53.
9. PETERSON, D. H. 1963. In C. RAINBOW and A. ROSE (eds.). *Biochemistry of Industrial Microorganisms*, 537. Acad. Press, New York and London.
10. PETERSON, D. H., and MURRAY, H. C. 1952. Microbial oxygenation of steroids at C-11. *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 1871-72.
11. SALLAM, L. A. R.; EL-REFAI, A. H., and EL-KADY, I. A. 1969. Thin layer chromatography of some C-18, C-19 and C-21 steroids. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, 309-15.
12. SALLAM, L. A. R.; EL-REFAI, A. H., and EL-KADY, I. A. 1970. Effect of some redox agents and trace elements on the hydroxylation of progesterone with *Rhizopus nigricans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 16, 409-17.
13. TIMOFEEVA, A. G.; BARMENKOV, A. S., and FEDOTOVA, M. V. 1957. *Med. Prom. SSSR*, 7,23. Cited by W. CHARNEY and H. HERZOG. *Microbial Transformation of Steroids*, 673. Acad. Press, New York and London.
14. WALPOL, 1914. Cited by A. J. VOGEL. 1953. *Text Book of Quantitative Inorganic Analysis*. Longmans, Green and Coy (L. & N.Y., T.).

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CAMBIOS EN LA COMPOSICION ANTIGENICA  
DEL *BACILLUS SPHAERICUS* ATCC 7055 EN  
PRESENCIA DE LA SUSTANCIA S DE REICHSTEIN

por

R. M. MARTIN y A. CHORDI

INTRODUCCION

En nuestros estudios sobre la transformación de esteroides por microorganismos (5), estamos siguiendo un camino paralelo en la investigación, por un lado, desde el punto de vista químico, siguiendo las transformaciones e identificando y separando los productos obtenidos y, por otro, aplicando las técnicas inmunoquímicas para el revelado de la dinámica de las enzimas implicadas en estos procesos.

Precisamente, el motivo principal de este trabajo es presentar una metódica de estudios de la represión e inducción enzimática en presencia de un sustrato determinado.

Para no introducir elementos extraños desde el punto de vista químico, hemos elegido un sistema bacteria-sustrato, plenamente conocido desde el punto de vista químico, como es el *Bacillus sphaericus* ATCC 7055, frente a la sustancia S de Reichstein, de que nos dan una revisión muy completa Charney y Herzog (1) e Iizuka y Naito (4), en sus exhaustivas obras, siguiendo muy de cerca a otros investigadores (9-10 y 12).

## MATERIAL Y METODOS

### *Bacteria elegida*

*Bacillus sphaericus* ATCC 7055

### *Medios y condiciones de cultivo*

A partir de la muestra bacteriana liofilizada, tal como la recibimos de la colección de cultivos, procedimos a su reconstitución, siguiendo a Stefanovic (8), en medio de cultivo sólido, compuesto por 0,3 % de yeast extract Difco, 0,5 % de N-Z case peptone Difco, 1,5 % de agar, y agua, c.s.p. 100 ml, manteniendo la incubación durante 24 h a 30 °C. De aquí recogemos un asa, que consideramos inóculo estandar, que pasamos a medio de cultivo líquido de similar composición, eliminando, por supuesto, el agar. Medio que habíamos colocado en erlenmeyer de 250 ml, con un volumen de medio de 100 ml/matraz. Incubamos 24 h a 30 °C y de aquí partimos para la obtención de los extractos antigénicos, sin esteroides. Para la obtención de los extractos en presencia del sustrato, a partir de los erlenmeyeres, con crecimiento en estas condiciones, añadíamos 50 mg del sustrato/100 ml, disueltos en 2 ml de metanol, manteniendo la reacción 72 h, en las mismas condiciones de cultivo, en agitador orbital, a unas 150 r/m.

### *Preparación de los extractos antigénicos*

En este apartado debemos distinguir los extractos destinados a la inmunización de los conejos, de los que destinaremos a su análisis.

Para los primeros, los destinados a la inmunización, utilizamos conejos machos de 5-7 kg de peso; los obtendremos a partir del sedimento bacteriano, obtenido por centrifugación, tanto del cultivo en ausencia como en presencia del sustrato, que hemos de lavar con acetona a —20 °C, repitiendo por tres veces el lavado, manteniendo el contacto con la acetona a —20 °C, tras el último lavado, durante un mínimo de 8 h en congelador. Luego volvemos a centrifugar y el sedimento obtenido lo desecamos a presión reducida en desecador de ácido sulfúrico y el polvo seco lo reconstituimos con solución salina fisiológica, determinando la concentración proteica por el método de Lowry u otro adecuado, procu-



rando ajustar la concentración a 20 mg/ml de proteínas totales, mediante la reconstitución de un mínimo de volumen de la solución salina y dilución posterior. A este extracto añadimos coadyuvante incompleto de Freund, a partes iguales, con lo que la concentración proteica nos quedará a 10 mg/ml. De aquí se parte para la inoculación de los animales.

Los extractos antigénicos destinados a su análisis difieren en su preparación en que, tras la reconstitución, hemos de ultrasonar para la rotura de estructuras celulares, dializando en membrana de acetato de celulosa para la eliminación de sales, que nos interferirán en las inmuno-electroforesis posteriores, determinando la concentración proteica como anteriormente y ajustando su concentración, en proteínas totales, mediante la concentración en estas membranas de diálisis o por dilución con solución salina fisiológica, hasta una concentración de 10 mg/ml.

#### *Pauta de inoculación a los conejos*

A los conejos elegidos se les practica una primera sangría, cero, que nos servirá de control, mediante incisión en la vena marginal de la oreja. Luego se procede a una primera tanda de inoculaciones, mediante la inyección de 1 ml cada vez, en el lomo y alternando ambas partes, de atrás adelante, hasta un total de 15 inoculaciones, en días alternos. Durante este período se van tomando sangrías parciales y comprobando los títulos de anticuerpos, según el método de inmunodifusión de Ouchterlony, hasta la obtención de un título de 1/32, que es el que consideramos idóneo para nuestros fines. Dejamos descansar al animal durante una semana y procedemos a la realización de una segunda tanda de inoculaciones, forzando un poco la dosis, mediante la inoculación de 2 ml cada vez, hasta que alcancemos el título requerido, que suele alcanzarse antes de la finalización de esta segunda tanda de 15 inoculaciones, procediendo a la realización de una sangría a muerte en este momento.

#### *Técnicas analíticas de esteroides*

Para comprobar la positividad de la transformación del substrato, iremos recogiendo partes alícuotas de los medios de cultivo y ensayando, por cromatografía en capa fina sobre silicagel, con la mezcla de benceno-acetato de etilo (60:40) y revelado con oleum si aparecen manchas de esteroides diferentes al substrato de partida. Una vez obtenida una trans-

formación efectiva, procederemos a la extracción del medio de cultivo con acetato de etilo en ampollas de decantación, concentrando los extractos en rotavapor y pasando por una columna de silicagel, con benceno-acetato de etilo de la misma polaridad, como eluyente. Recogemos las distintas fracciones y ensayamos en ellas, por capa fina, si en alguna de ellas se encuentran los productos de transformación. Para identificar estos productos, los concentramos, llevamos a sequedad, cristalizamos en metanol y realizamos su estudio químico, mediante la determinación de los puntos de fusión y sus espectros, infrarrojo, ultravioleta y resonancia magnética nuclear, con lo que quedan identificados.

#### *Técnicas inmunológicas*

Se utilizaron la inmunodifusión, según Ouchterlony, inmunoelectroforesis, según Scheidegger (7), modificada por Martínez Reja y colaboradores (6), expresando las bandas de precipitación según su movilidad relativa a la albúmina (2-3 y 11).

Para la eliminación de algunos componentes antigénicos, según veremos más adelante, procederemos a la absorción de los inmunosueros según las técnicas conocidas de adición a 0,8 ml del inmunosuero de 0,2 ml del antígeno absorbente, incubación en estufa a 37 °C, durante 30 min, centrifugación y eliminación del sedimento, utilizando como suero absorbido el sobrenadante.

## RESULTADOS

Puesto que el objeto de nuestro trabajo es la determinación de los componentes antigénicos que experimentan alguna variación, por fenómenos de inducción y represión en presencia de un determinado sustrato, hemos de proceder a la determinación de la composición antigénica directa del *Bacillus sphaericus* ATCC 7055, antes de añadir el sustrato, los cambios que experimenta esta composición antigénica total, después de su adición, y qué componentes son los que se han visto afectados por su presencia.

#### *Composición antigénica directa*

Esta composición la determinamos por el enfrentamiento directo inmunoelectroforético del inmunosuero anti-BSE (*Bacillus sphaericus* sin

esteroides), frente al antígeno homólogo, BSE, tal como vemos en el esquema A de la *figura 1*, expresándola en su movilidad relativa a la albúmina, encontrándonos con un total de 16 bandas de precipitación de movilidades: 10 una, 3 una, 3 dos, 6 dos, 50 una, 53 una, 73 una, 90 una, 93 una, 96 una, 106 una, 113 una, 116,5 una y 126,6 una banda de precipitación.

*Composición antigénica directa tras la adición del sustrato*

Al introducir el sustrato esteroide se habrán producido cambios en la composición antigénica de la bacteria, para detectarlos procederemos al enfrentamiento del sistema inmuosuero anti-BCE (*Bacillus sphaericus* con esteroides) frente al antígeno homólogo, BCE. Los resultados obtenidos los expresamos en el esquema B de la *figura 1*, que corresponden a 8 bandas de precipitación de movilidades, 50 dos, 56 una, 100 una, 109 tres y 109,5 una.

*Estudio de los componentes antigénicos inducidos y reprimidos*

Para la realización de este estudio hemos utilizado un sistema basado en la absorción de los inmuosueros con el antígeno heterólogo, considerando los componentes que cada sistema lleva, enfrentándolo luego con su antagonista homólogo. Exponiendo en esquema los componentes que lleva cada uno podemos ver:

<i>Inmuosuero anti-BSE</i>	<i>Antígeno BSE</i>
Componentes constitutivos	Componentes constitutivos
Componentes reprimidos	Componentes reprimidos
<i>Inmuosuero anti-BCE</i>	<i>Antígeno BCE</i>
Componentes constitutivos	Componentes constitutivos
Componentes inducidos	Componentes inducidos

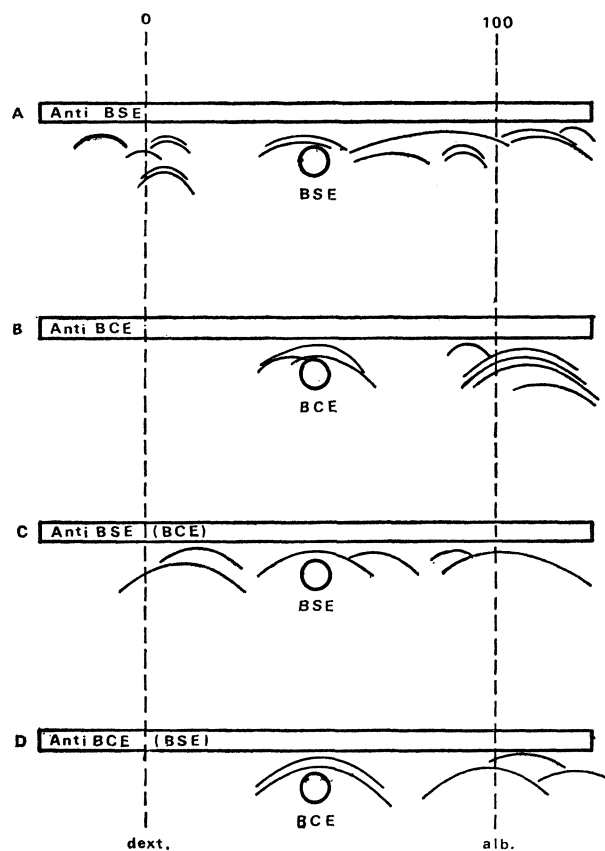
De esta forma, si absorbemos el inmuosuero anti-BSE con el antígeno BCE, eliminamos los componentes constitutivos, quedándonos sin reaccionar los reprimidos y los inducidos, que al enfrentar este inmuosuero absorbido con el antígeno homólogo, precipitarán los componentes comunes a ambos sistemas, que, en este caso, son los reprimidos.

De la misma manera, si absorbemos el inmuosuero anti-BCE con el

antígeno BSE, eliminamos los componentes constitutivos, comunes a ambos, quedándonos, por un lado, los componentes inducidos y, por otro, los reprimidos. Si enfrentamos este inmunosuero absorbido con el antígeno homólogo, BCE, se nos revelarán los componentes inducidos por el substrato, comunes a ambos sistemas.

Así, tal como vemos en el esquema C de la *figura 1*, obtenemos en este enfrentamiento los componentes reprimidos por el substrato, con un total de 6 bandas de precipitación.

En el enfrentamiento del esquema D de la *figura 1*, obtendremos los componentes inducidos por el substrato, obteniendo en este caso un total de 5 componentes de este tipo.



*Figura 1*

Dado que podría darse el caso de enmascaramiento de algún componente antigénico y, también, como comprobación de los resultados anteriores, procedimos al enfrentamiento cruzado de ambos sistemas, de tal forma que al inmunosuero anti-BSE lo enfrentamos con el antígeno BCE y viceversa. Estos enfrentamientos los representamos en los esquemas A y B de la figura 2.

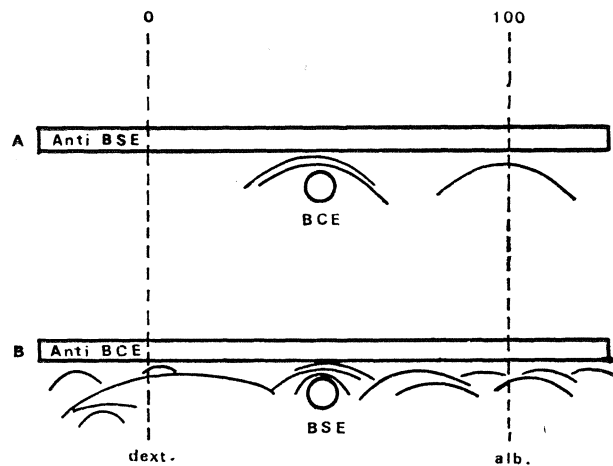


Figura 2

En el primero de ellos, inmunosuero anti-BSE frente al antígeno BCE, obtuvimos un resultado muy pobre, con un total de 3 bandas de precipitación. En el otro enfrentamiento, inmunosuero anti-BCE frente al antígeno BSE, encontramos un total de 14 bandas de precipitación, que, al no coincidir exactamente con las anteriormente detectadas, enriquecen la composición antigénica de esta bacteria, resultados que resumimos en el cuadro 1, con un total de 27 bandas de precipitación para los componentes constitutivos, 5 para los inducidos y 6 para los reprimidos.

## DISCUSION

Creemos que el aspecto más importante de nuestro trabajo es la aportación de un método de estudio de la inducción y represión enzimáticas, sumamente específico, como específicas son todas las reacciones antígen-

Cuadro 1. Resumen de la composición antigénica total del *Bacillus sphaericus*

Movilidad	Constitutivas	Reprimidas	Inducidas
— 23	×		
— 15	×		
— 15	×		
— 15	×		
— 10	×		
— 3	×		
3	×		
3	×		
6	×		
6	×		
7		×	
14		×	
16	×		
50	×		
50	×		
53	×		
55		×	
56	×		
70		×	
73	×		
77			×
77			×
80	×		
83	×		
90	×		
92		×	
93	×		
96			×
100		×	
106	×		
107			×
110	×		
110	×		
110	×		
113	×		
115			×
116,5	×		
126,6	×		
núm.	27	6	5

no-anticuerpo, relativamente sencillo de realizar y con unos medios al alcance de cualquier laboratorio medianamente dotado.

Por otro lado, aportamos la composición antigénica directa, total, del *Bacillus sphaericus* ATCC 7055, así como los cambios que en esta composición produce la presencia de un substrato esteroide al que transforma, determinando, a su vez, qué componentes pueden tener la consideración de constitutivos (27), qué componentes la de reprimidos por este substrato (6) y cuáles son inducidos por él (5).

Tenemos la intención de continuar nuestro estudio sobre esta especie bacteriana, determinando qué cambios producen en ella otros substratos y ver qué componentes continúan teniendo la consideración de constitutivos y cuáles aparecen nuevos en presencia de un substrato diferente.

#### RESUMEN

Hemos procedido a la realización del estudio de los componentes antigénicos del *Bacillus sphaericus* ATCC 7055, así como las modificaciones que produce en dicha composición antigénica la presencia de un substrato esteroide al que transforma, con la evidencia de 27 componentes constitutivos, 6 reprimidos y 5 inducidos.

#### SUMMARY

*Modifications about antigenic composition of Bacillus sphaericus ATCC 7055, in presence of Reichstein's S substance*

We have proceeded to realization of study about antigenic constituents *Bacillus sphaericus*, as well as the changes produced on the antigenic composition of this bacteria in the presence of steroid substratum, which is transformed. We described 27 constitutives components, 6 repressed and 5 induced.

## BIBLIOGRAFIA

1. CHARNEY, W., and HERZOG, H. L. 1967. Microbial Transformation of Steroids. Academic Press, N.Y.
2. CHORDI, A.; GONZÁLEZ-CASTRO, J.; TORMO, J., y DÍAZ, R. 1962. Hemaglutinación indirecta con células formoladas en el diagnóstico de la hidatidosis. Rev. Med. Estud. Gen. Navarra, 6, 27-39.
3. CHORDI, A., and KAGAN, I. G. 1964. Analysis of normal sheep serum by immunoelectrophoresis. J. Immunol., 93, 439-45.
4. IIZUKA, I., and NAITO, A. 1967. Microbial Transformation of Steroids and Alkaloids. University of Tokio Press, Tokio, and University Park Press, State College, Penn.
5. MARTIN, R. M. 1967. Transformación de esteroides por vía microbiológica: análisis de la comunidad antigénica entre las proteínas constitutivas e inducidas en la transformación de esteroides del *Bacillus sphaericus* ATCC 7055 y del *Arthrobacter simplex* ATCC 6946. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Madrid.
6. MARTÍNEZ-REJA, P.; ALVAREZ-MORENO, C.; HERMIDA, F., and CHORDI, A. 1969. Identification by immunoelectrophoresis of bovine proteins. J. Dairy Sci., 52, 1.
7. SCHEIDEGGER, J. J. 1955. Une micromethode de l'immunoelectrophorèse. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7, 103.
8. STEFANOVIC, V.; HAYANO, M., and DORFMAN, R. I. 1963. Some observations on the D<sup>1</sup>-dehydrogenation of steroids by *Bacillus sphaericus*. Biochim. Biophys. Acta, 71, 429.
9. STOUT, T. H. 1960. The microbial transformation of steroids Advan. Appl. Microbiol., 2, 183, 222.
10. STOUT, T. H.; MCALEER, N. J.; CHEMERDA, J. M., and KOZLOWSKI, M. A. 1955. The microbial 1-dehydrogenation of some D<sup>4</sup>-3 ketosteroids. Arch. Biochem. Biophys., 59, 304.
11. TORMO, J., and CHORDI, A. 1965. Immunoelectrophoretic analysis of *Ascaris suum* antigens. Nature, 205, 983.
12. VISCHER, E., and WETTSTEIN, A. 1958. Enzymic transformation of steroids by microorganisms. Advan. Enzymol., 20, 237.



## CONGRESO DE MICROBIOLOGIA

El V Congreso Nacional de Microbiología (Sociedad Española de Microbiología), que preside el Prof. José Angel García Rodríguez y organizan la Cátedra de Microbiología e Higiene de la Facultad de Medicina y la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias (Sección Biológicas), de Salamanca, se celebrará en el Edificio Antiguo de la Universidad de esta capital, durante los días 2, 3 y 4 de octubre de 1975.

Toda la correspondencia debe dirigirse al Secretario General del Congreso, Dr. F. Martín Luengo, Departamento de Microbiología e Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca.

## BIBLIOGRAFIA

*EL LIPOPOLISACÁRIDO DE LOS MICROORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS*, por M. Santaolalla. Monografías de Ciencia Moderna, núm. 83 (Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, núm. 4). 1973. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. XII + 114 páginas y 36 figuras.

En la presente monografía se estudian los lipopolisacáridos de las bacterias gram-negativas. Tras una revisión completa de los conocimientos sobre el tema, el autor aporta los resultados de su propia investigación. Su experiencia científica, unida al dominio del tema, hacen que esta monografía sea una aportación valiosa al conocimiento de los lipopolisacáridos. La exposición es aceptable, fácil de comprensión y de lectura agradable. En algún momento echamos de menos una mayor precisión en la terminología. Usa términos cuya significación científica no es clara e, incluso, nos parece que en algún caso puede ser inadecuada.

En conjunto, creemos que la obra será atractiva y útil para los interesados en el conocimiento de las paredes bacterianas.

J. R. VILLANUEVA

*GRUNDZÜGE EINES NATÜRLICHEN SYSTEMS DER MIKROORGANISMEN*, por S. Jost Casper. 1974. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 232 páginas, 42 figuras y 2 cuadros separados.

La Taxonomía es una ciencia marcada con el claro sello de la inestabilidad. Los avances del conocimiento científico de los seres vivos ponen en revisión los fundamentos taxonómicos y nadie quiere emplear su tiempo en elaborar un esquema que es inseguro por naturaleza. El ideal es descubrir el sistema natural de los seres vivos, conociendo su parentesco

evolutivo y contemplar el conjunto desde tan privilegiado punto de vista. Los intentos de aproximación son difíciles y muy trabajosos, por lo que, lógicamente, son escasos.

Uno de éstos, limitado al mundo de los microorganismos, es el tema del libro del Dr. Casper, perteneciente a la Sección de Limnología, del Instituto Central de Microbiología, de Jena (R.D.A.). El Dr. Casper reconoce que todavía no es posible plantear un sistema natural, por falta del conocimiento adecuado, por lo que presenta un sistema mixto, con gran avance de la parte natural, apoyándose, principalmente, en la naturaleza de los pigmentos y en la estructura de los flagelos, dedicando 86 páginas a estos últimos.

Es un trabajo meritorio, que reavivará las discusiones taxonómicas y esperamos que mejorará la situación científica de este campo, tan necesitado de aportaciones modernas, de las que sólo algunas veces (Taxonomía bioquímica, taxonomía numérica, ...) vemos muestras apreciables.

L. VILAS

*EVOLUTION IN THE MICROBIAL WORLD.* Directores: M. J. Carlile y J. J. Skehel. 1974. Cambridge University Press.

“... con las bacterias, constantes cambios evolutivos ocurren bajo nuestros ojos, cambios que pueden ser controlados e imitados en el laboratorio”. Esta frase de M. Stephenson (1949) encabeza el trabajo de Patricia H. Clarke en la obra que comentamos, pero podría servir de justificación a todo el libro. La evolución es hoy uno de los ejes del pensamiento de todo biólogo: este volumen del Simposio 24 de la Society for General Microbiology, que reúne contribuciones de los mejores especialistas mundiales sobre el tema, ha de interesar por tanto a los los microbiólogos que trabajan en cualquier campo. Es por ello por lo que ofrecemos, con cierto detalle, la estructura del contenido del libro, en la seguridad de que el lector hallará temas de su interés inmediato.

El Simposio está formado por 16 trabajos, con una extensión media de 25 páginas por trabajo. Cada uno de ellos se sigue de abundante bibliografía que comprende citas hasta 1973, inclusive. Existen numerosos esquemas en el texto y 7 páginas de fotografías. Los trabajos son éstos:

P.H.A. Sneath: *Filogenia de los microorganismos*. Los temas que trata son, esencialmente, los de la evolución microbiana a corto y largo plazo, el análisis filogenético, la cladística numérica, patrones fenéticos y filogenéticos y la evolución reticulada.

J. W. Drake: *El papel de la mutación en la evolución microbiana*. Adaptación mutacional. Tasas comparadas de mutación en microorganismos y su determinación genética.

M.H. Richmond y B. Wiedeman: *Plásmidos y evolución bacteriana*. Interacción plásmido-cromosoma e interacciones entre plásmidos; plásmidos de resistencia en el hombre; papel de los plásmidos en la evolución.

K. Esser: *Sistemas de compatibilidad (breeding systems) y evolución*. Analiza los factores genéticos que regulan la plasmogamia y cariogamia entre distintas poblaciones biológicas y su significación evolutiva; la incompatibilidad homo y heterogámica; la coexistencia fisiológica, la histoincompatibilidad y los sistemas de restricción-modificación.

J.H. Subak-Sharpe, R.A. Elton y G.J. Russell: *Implicaciones evolutivas del análisis de pares (doublet analysis)*. Aplicando la técnica de Josse, Kaiser y Kornberg de caracterización de ADN en términos del análisis de 16 posibles secuencias de pares de bases, efectúan un análisis de semejanza para procariotas, en especial para especies con CG intermedio, así como para algunos virus, deduciendo implicaciones evolutivas.

B.S. Hartley: *Familias de enzimas*. Se comparan secuencias estructurales de distintas enzimas; se trata el fenómeno de la duplicidad génica y de la evolución de los puentes disulfuro. Se analiza la evolución experimental de una enzima estudiando la ribitoldehidrogenasa en cultivo continuo de *K. aerogenes*. En la misma bacteria, se discute el papel de la duplicidad génica en la evolución de *Klebsiella*. Como ejemplo de evolución enzimática reciente, se evalúa el fenómeno de la resistencia al cloranfenicol.

Patricia H. Clarke: *Evolución enzimática para el aprovechamiento de nuevos sustratos*. Se estudia: Mutaciones en los genes reguladores y en la región promotora; represión catabólica; enzimas con actividades nuevas; sistemas de transporte. Utilización de pentosas y pentitoles por bacterias; evolución de la amidasa alifática en *P. aeruginosa*. Evolución de enzimas con mayor actividad o actividades nuevas.

R.Y. Stanier: *Los orígenes de la fotosíntesis en los eucariotas*. Se analizan las posibles aproximaciones experimentales al tema. Se habla sobre los cloroplastos como estructuras de origen celular polifilético, así como de las

propiedades, distribución e inmunología comparada de las ficobiliproteínas, estableciendo implicaciones filogenéticas. Se discute el modelo de la relación actual entre cianobacterias procarióticas y algas eucarióticas.

H.D. Peck (Jr.): *La significación evolutiva del metabolismo del azufre inorgánico*. Trata de los mecanismos de la reducción del sulfato en relación con la bioenergética y transporte de electrones; efectúa un análisis secuencial de la ferredoxina de desulfovibrio y avanza un árbol filogenético para ferredoxinas.

J.R. Postgate: *La evolución interna de los sistemas fijadores de nitrógeno*. Origen y distribución de los sistemas fijadores de nitrógeno; evolución de los mecanismos enzimáticos sensibles al oxígeno: sistemas de protección respiratoria, formación de mucoides, compartimentalización (nódulos). Evolución de las asociaciones simbióticas.

W.K. Joklik: *Evolución en los virus*. Estructura de los genomas víricos, con especial referencia a los genomas segmentados; economía vírica de información genética usando proteínas de la cápside como reguladoras, o bien utilizando proteínas del huésped o información genética de otros virus. Estructura evolutiva de las cápsides y del tipo de huésped. Problemas teóricos generales de la evolución de los virus.

J.J. Skehel: *El origen de los virus de la gripe pandémica*. Estudia el genoma y las glicoproteínas del virus; la variación del virus de la gripe; las teorías acerca del origen y deriva inmunológica de los virus gripales.

J.R. Baker: *Origen evolutivo y especiación del género Trypanosoma*. Estudia el origen evolutivo del género, en especial de la forma tripomastigoto y de la especiación de tripanosomas en vertebrados no mamíferos, tripanosomas estercolarios y salivarios de mamíferos, y de modo preferente de las especies del subgénero Trypanozoon. En este grupo, trata de las especies y subespecies de desarrollo cíclico en *Glossina*. Por último, trata de otro grupo dentro de *Trypanozoon*, que no poseen desarrollo cíclico en vector. Deduce un árbol filogenético del género *Trypanosoma*, incluyendo géneros afines (*Crithidia*, *Leishmania*, etc.).

D.H. Lewis: *Microorganismos y plantas: la evolución del parasitismo y mutualismo*. Temas: Nutrición simbiótica (auto y heterotrófica); caracteres de la biotrofia; relaciones evolutivas entre categorías nutricionales; origen de la necro y biotrofia; biotrofia y simbiosis mutualística.

C.A. Ponnampertuma y N.W. Gabel: *Evolución precelular y organización molecular*. Analiza la situación de superficies y atmósferas prebióticas;

síntesis de moléculas orgánicas complejas; energética prebiótica y organización precelular.

El libro tiene un total de 430 páginas, e incluye un excelente índice por materias de 15 páginas de extensión. El papel, impresión y encuadernación son excelentes igualmente. El precio en librería es de 1.500 pesetas.

F. BAQUERO

*BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY*,  
8.<sup>a</sup> edición. 1974. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.  
XXVI + 1246 páginas.

Al cerrar el presente número de la Revista, llega a nuestras manos este libro, que mercede una reseña, aunque sea breve por exigencias de la composición.

La edición anterior, aparecida en 1957, estaba notoriamente desfasada por los avances taxonómicos realizados desde entonces y publicados, en su mayor parte, en el Boletín que a esta cuestión dedica la Sociedad Internacional de Sociedades de Microbiología. El propio Manual de Bergey iba siendo comentado y completado con otras publicaciones, como el "Index Bergeyana" (The Williams & Wilkins Co., 2.<sup>a</sup> edición, 1966) y "The Genera of Bacteria" (Skerman, The Williams & Wilkins Co., 2.<sup>a</sup> edición, 1967), aparte de las publicaciones que, basadas en otros principios sistemáticos, como las de Prévot y Krassilnikof, ampliaban el horizonte de la taxonomía bacteriana. El Manual de Bergey se había hecho imprescindible en el laboratorio de bacteriología, pero había que completarlo con otras publicaciones, por lo que era recomendable su actualización, que había llegado a ser acuciante, aunque la complejidad de la tarea y la naturaleza polémica de su contenido, creemos que habrán sido las causas del retraso en su aparición. Por fortuna, ya tenemos sobre la mesa la octava edición.

La clasificación de las bacterias ha sido completamente alterada respecto a la edición anterior, partiendo de la poca seguridad que ofrecían las agrupaciones superiores al género. Por este motivo, se ha establecido el Reino de los Procariotas, con dos Divisiones, las Cianobacterias y las Bacterias, ocupándose el libro, solamente, de la División de las Bacterias.

Esta División se distribuye en 19 partes, designadas con nombres vulgares, no latinos, ni de pretensiones taxonómicas, aunque dentro de cada parte se respeta, a veces, la agrupación en Ordenes y Familias, porque la Comisión oportuna ha confirmado la validez de estas clasificaciones. La presentación, como se ve, es revolucionaria y se basa en la desconfianza en las agrupaciones superiores.

Damos los nombres de las 19 partes: 1, bacterias fotótrofas; 2, bacterias deslizantes; 3, bacterias invaginadas; 4, bacterias gemadas y apendiculadas; 5, espiroquetas; 6, bacterias espirales y curvas; 7, bacilos y cocos gram-negativos, aerobios; 8, bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos; 9, bacterias gram-negativas, anaerobias; 10, cocos y cocobacilos gram-negativos; 11, cocos gram-negativos, anaerobios; 12, bacterias gram-negativas, quimiolitótrofas; 13, bacterias metanígenas; 14, cocos gram-positivos; 15, bacilos y cocos esporulados; 16, bacilos gram-positivos, no esporulados; 17, actinomicetos y organismos próximos; 18, rickettsias; 19, micoplasmas.

El libro se completa con una lista de las principales colecciones de cultivos existentes, un glosario de términos bacteriológicos para facilidad del lector, una enorme lista de referencias bibliográficas (142 páginas, impresas en cuerpo 8, ocupan estas citas), una valiosísima clave dicótoma para la identificación de bacterias (preparada por el Dr. Skerman), más los índices habituales.

El comentario técnico de esta obra será motivo de un más detenido examen, que aparecerá en su día. Por el momento, al felicitarnos por su aparición, debemos de agradecer la labor de los responsables de la edición, el difunto R. E. Buchanan y N. E. Gibbons, de los que formaron su consejo, Cowan, Holt, Liston, Murray, Niven, Ravin y Stanier, y de los 128 colaboradores que han intervenido en la obra. Este libro estará en la mesa de trabajo de todos los laboratorios de Microbiología con inquietud científica.

L. VILAS