Microbiologia Española

Revista del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología



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 cualquier 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 2,5 cm 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 x 11,5 cm.

En la cabecera de la primera página se indicará: Centro en que se ha realizado el trabajo, título de éste (conciso), nombre (o inicial) y apellido del autor; 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, Título y Resumen en la otra lengua, y Bibliografía. Las notas y trabajos doctrinales se redactarán con arreglo a su naturaleza.

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.

Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización, para los textos en español.

Los resúmenes, de un máximo de doscientas palabras cada uno, deberán contenta un esquema del trabajo y, en su caso, las conclusiones, abreviadas.

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 quince días para los residentes en España, y en el de treinta, 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
Acción de suspensiones lavadas de diferentes microorganismos sobre el ácido cafeico, por F. Santamaría y J. Pérez-Silva Propiedades y microscopia electrónica de un virus de Vigna perteneciente	1
al grupo de los cucumovirus, por J. R. Díaz-Ruiz	9
C. Sáiz-Jiménez	19
sensible del fago pf16h2, por R. Díaz, G. de Torrontegui y J. L. Cánovas. Criterios de patogenicidad en Staphylococcus epidermidis, por M. V. Bo-	33
robio, R. Martín y E. J. Perea	47
tón y J. Sancho	59
mos por factores solubles excretados al medio, por M. Lloret y R. Clotet. Estudio de los bacilos gram-negativos no fermentantes, por M. C. Ponte,	75
F. Soriano y J. M. Alés	91
ciens, por J. A. González, M. A. Falcón y A. Chordi Actividad sulfooxidante y sulfatorreductora en diversos tipos de suelos. Res-	103
puesta a la adición de azufre y materia orgánica, por C. Lluch y J. Olivares	113
sario Gil	125
Vives-Rego, S. Hernández y J. Guinea	135 141
Cursos en la Universidad de Salamanca	141
Primera Reunión Nacional sobre Brucelosis	141
Congreso de Quimioterapia	$\overline{142}$
Congreso de Enfermedades Infecciosas	142
Bibliografía, por L. Vilas, M. Rubio-Huertos, G. Sierra, F. Ruiz-Falcó, A. Portolés, E. Ronda, M. Rodríguez-Rebollo y C. González	143

CONTENTS

·	Page
Action of washed cell suspensions of different microorganisms on caffeic acid, by F. Santamaría and J. Pérez-Silva	1

(Continua en 2 a de cubierta

- Director: Dr. Miguel Rubio, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.
- Vicedirector: Dr. Angel G. Gancedo, Jefe de Sección, del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.
- Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Difusión y Publicaciones, del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

(Continuación de 4.ª de cubierta)

	Página
Studies on pathogenicity in Staphylococcus epidermidis, by M. V. Borobio, R. Martin and E. J. Perea	47
ton and J. Sancho	59
by soluble agents excreted to the culture media, by M. Lloret and R. Clotet	75
Soriano and J. M. Alés	91
J. A. González, M. A. Falcón and A. Chordi	103
Effect of sulfur and organic matter addition, by C. Lluch and J. Olivares. Possible nuclear-cytoplasmic transfers in the exconjugants of Stylowchia	113
mytilus: ultrastructural observations, by Rosario Gil	125
S. Hernández and J. Guinea	$\begin{array}{c} 135 \\ 141 \end{array}$
Courses at Salamanca University	141
First National Meeting on Brucellosis	$\begin{array}{c} 141 \\ 142 \end{array}$
Congress of Infectious Diseases	142
Portolés, E. Ronda, M. Rodríguez-Kebollo and C. González	143

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 VOLUMEN 29. 1976

Microbiologia Española

Revista del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología



- Director: Dr. Miguel Rubio, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.
- Vicedirector: Dr. Angel G. Gancedo, Jefe de Sección, del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.
- 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

INDICE

	Página
Alés, J. M.: véase Ponte, M. C	91
Borobio, M. V.; Martín, R., y Perea, E. J.: Criterios de patogenicidad en Staphylococcus epidermidis	47
Cánovas, J. L.: véase Díaz, R	33
Cantón, Emilia, y Sancho, J.: Análisis numérico de un grupo de Pseudomonas aeróbicos	59
Clotet, R.: véase Lloret, M	75
Congreso de Enfermedades Infecciosas	142
Congreso Nacional de Microbiología	141
Congreso de Quimioterapia	142
Cursos en la Universidad de Salamanca	141
Chordi, A.: véase González, J. A	103
Díaz, R.; Torrontegui, G. de, y Cánovas, J. L.: Transducción generalizada en Pseudomonas putida con un mutante termosensible del fago pf16h2	33
Díaz-Ruiz, J. R.: Propiedades y microscopia electrónica de	
un virus de Vigna perteneciente al grupo de los cucumovirus	9
Falcón, M. A.: véase González, J. A	103
Gil, Rosario: Posible transporte de material entre el núcleo y el citoplasma en exconjugantes de Stylonychia mytilus: observaciones ultraestructurales	125
González, C.: véase Vilas, L	143
González, J. A.; Falcón, M. A. y Chordi, A.: Influencia del pH en la composición antigénica del Bacillus amyloli-	110
quefaciens	103
Guinea, J.: véase Vives-Rego, J	135
Hernández, S.: véase Vives-Rego, J	135
Lloret, M., y Clotet, R.: Inhibición en el crecimiento de C. intermedium C ₃ y otros microorganismos por factores solubles excretados al medio	7 ≅
Lluch, C., y Olivares, J.: Actividad sulfooxidante y sulfatorreductora en diversos tipos de suelos. Respuesta a la	75
adición de azufre y materia orgánica	113
Martín, R.: véase Borobio, M. V	47
Olivares, J.: véase Lluch, C	113

Perea, E. J.: véase Borobio, M. V	47
Pérez-Silva, J.: véase Santamaría, F	1
Ponte, M. C.; Soriano, F., y Alés, J. M.: Estudio de los	
bacilos gram-negativos no fermentantes	91
Portolés, A.: véase Vilas, L	143
Primera Reunión Nacional sobre Brucelosis	141
Rodríguez-Rebollo, M.: véase Vilas, L	143
Ronda, E.: véase Vilas, L	143
Rubio-Huertos, M.: véase Vilas, L	143
Ruiz-Falcó, F.: véase Vilas, L	143
Sáiz-Jiménez, C.: Una estirpe de Eurotium echinulatum	
Delacr. aislada de un vertisuelo	19
Sancho, J.: véase Cantón, Emilia	5 9
Santamaría, F., y Pérez-Silva, J.: Acción de suspensiones	
lavadas de diferentes microorganismos sobre el ácido cafeico	1
Sierra, G.: véase Vilas, L	143
Soriano, F.: véase Ponte, M. C	91
Torrontegui, G. de: véase Díaz, R	33
Vilas, L.; Rubio-Huertos, M.; Sierra, G.; Ruiz-Falcó, F.;	00
Portolés, A.; Ronda, E.; Rodríguez-Rebollo, M., y Gon-	
zález, C.: Bibliografía	143
Vives-Rego, J.; Hernández, S., y Guinea, J.: Formas de-	
fectivas de pared celular en Citrobacter intermedius C ₃	135
CONTENTS	
	Page
-	
Alés, J. M.: see Ponte, M. C	91
Borobio, M. V.; Martín, R., and Perea, E. J.: Studies on	
pathogenicity in Staphylococcus epidermidis	47
Cánovas, J. L.: see Díaz, R	33
Cantón, Emilia, and Sancho, J.: Numerical taxonomy of a	P ^
group of aerobic Pseudomonas	59
Clotet, R.: see Lloret, M	75

Página

_	Page
Congress of Chemotherapy	142
Congress of Infectious Diseases	142
Courses at Salamanca University	141
Chordi, A.: see González, J. A	103
Díaz, R.; Torrontegui, G. de, and Cánovas, J. L.: Generalized transduction in Pseudomonas putida with a thermosensitive mutant of phage pf16h2	33
Diaz-Ruiz, J. R.: Properties and electron microscopy of a Vigna-virus belonging to the cucumovirus group	9
Falcón, M. A.: see González, J. A	103
First National Meeting on Brucellosis	141
Gil, Rosario: Possible nuclear-cytoplasmic transfers in the exconjugants of Stylonychia mytilus: ultrastructural observations	125
González, C.: see Vilas, L	143
González, J. A.; Falcón, M. A., and Chordi, A.: pH influence on antigens composition from Bacillus amyloli-	103
quefaciens	
Guinea, J.: see Vives-Rego, J	135
Hernández, S.: see Vives-Rego, J	135
agents excreted to the culture media	75
Lluch, C., and Olivares, J.: Sulfur-oxidizing and sulphate- reducing activities in different types of soils. Effect of sulfur and organic matter addition	113
Martin, R.: see Borobio, M. V	47
National Congress of Microbiology	141
Olivares, J.: see Lluch, C	113
Perea, E. J.: see Borobio, M. V	47
Pérez-Silva, J.: see Santamaría, F	1
Ponte, M. C.; Soriano, F., and Alés, J. M.: A study about non fermentative Gram-negative bacilli	91
Portolés, A.: see Vilas, L	143
Rodríguez-Rebollo, M.: see Vilas, L	143
Ronda, E.: see Vilas, L	143
Rubio-Huertos, M.: see Vilas, L	143
Ruiz-Falcó F : see Vilas I	1/12

	Page
Sáiz-Jiménez, C.: A strain of Eurotium echinulatum Delacr. isolated from a vertisol	19
Sancho, J.: see Cantón, Emilia	5 9
Santamaría, F., and Péres-Silva, J.: Action of washed cell suspensions of different microorganisms on caffeic acid	1
Sierra, G.: see Vilas, L	143
Soriano, F.: see Ponte, M. C	91
Torrontegui, G. de: see Díaz, R	33
Vilas, L.; Rubio-Huertos, M.; Sierra, G.; Ruiz-Falcó, F.; Portolés, A.; Ronda, E.; Rodríguez-Rebollo, M., and González, C.: Bibliography	143
Vives-Rego, J.; Hernández, S., and Guinea, J.: Cell wall deficient forms in Citrobacter intermedius C ₃	135

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (CSIC) DEPARTAMENTO DE PROTOZOOLOGIA

ACCION DE SUSPENSIONES LAVADAS DE DIFE-RENTES MICROORGANISMOS SOBRE EL ACIDO CAFEICO

por

F. SANTAMARIA (*) y J. PEREZ-SILVA (**)

INTRODUCCION

En la dieta normal de los animales entran compuestos polifenólicos tóxicos que son posteriormente destoxicados mediante diversos mecanismos. Así, algunos microorganismos del tracto intestinal son capaces de destoxicar compuestos polifenólicos mediante reacciones de deshidroxilación.

Norman y Sjövall (8-9) han demostrado que el grupo -OH del carbono 7 del ácido cólico, es eliminado por microorganismos intestina'es de rata. Gustafsson y colaboradores (5) demuestran que esa deshidroxilación no se lleva a cabo en ratas libres de gérmenes.

Hill y Drassar (6), sugieren que para la deshidroxilación del grupo OH del carbono 7 del ácido cólico se requieren condiciones anaerobias. Booth y colaboradores (1), observaron que cuando se administra ácido 3-4-dihidroxifenilacético a ratas y conejos aparece en la orina ácido m-hidroxifenilacético. Dacre y colaboradores (3) confirman estos resultados administrando a los animales de experimentación ácido 3-4-dihidroxifenilacético marcado con ¹⁴C, encontrando en la orina m-hidroxifenilacético y una pequeña proporción de p-hidroxifenilacético. La participación de los microorganismos

^(*) Dirección actual: Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

^(**) Dirección actual: Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Sevilla.

intestinales en las reacciones de deshidroxilación ha sido confirmada por varios autores. Shaw y colaboradores (11), observaron que cuando se administraba neomicina a los animales de experimentación, los compuestos polifenólicos ingeridos no eran deshidroxilados. Resultados análogos encontraron Booth y Williams (2) administrando antisépticos intestinales, como dimol, Kaihara y Price (7) y otros autores (3-4). Booth y Williams (2), consiguen realizar procesos de deshidroxilación *in vitro*, empleando para ello cultivos mixtos procedentes del tracto intestinal.

Pérez-Silva y colaboradores (10) aislaron, a partir de heces de rata, una estirpe de *Pseudomonas* capaz de deshidroxilar el ácido cafeico.

En el presente trabajo damos cuenta de los procesos de transformación llevados a cabo por un conjunto de microorganismos pertenecientes a diferentes géneros, algunos de los cuales no son componentes normales del tracto intestinal.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo fueron los siguientes:

Erwinia nimipressuralis, E. carotovora, E. flavida, Xanthomonas panici I y II, Pseudomonas viburni, Ps. calendulae, Ps. chlororaphis, Phytobacterium saliciperda y Phy. ringiberi, procedentes del Instituto de Biología del Tabaco, de Sevilla.

Bacillus subtilis, Corynebacterium renale, Azotobacter chroococcum, Aerobacter aerogenes, Spirillum sp., Sarcina lutea, Saccharomyces pasteurianum y Debaryomyces kloeckerii, procedentes del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología (CSIC).

Escherichia coli I y II, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus I y II, y Micrococcus flavus, procedentes de la Colección Española de Cepas Tipo, Salamanca.

Se utilizaron también los siguientes microorganismos aislados en nuestro laboratorio: 16 bacterias aerobias, 5 anaerobias y 5 bacteriodes.

Medios de cultivo

El cultivo de los diferentes microorganismos se hacía, por lo general, en caldo común o glucosado, a excepción de *Azotobacter chroococcum*, que se cultivaba en medio de Burk; *Spirillum* sp., en el medio Z; las bacterias anaerobias, en el medio B. H. I. (Difco); las levaduras, en extracto de malta (Difco), y los bacteroides, en medio B. H. I., al que se añade azida de sodio (0,009 %), desoxicolato sódico (0,07 %) y violeta de etilo (0,0007 %).

Preparación de suspensiones de células lavadas

Los distintos microorganismos se cultivan en sus respectivos medios y se recogen las células por centrifugación a temperatura ambiente, se lavan dos veces con amortiguador de fosfatos 0,1 M a pH 7, y se suspenden en el mismo amortiguador, de modo que se alcance una concentración de aproximadamente 15-20 mg de células (peso seco)/ml.

Incubación de las células lavadas con ácido cafeico

Las suspensiones de células se colocaban en tubos de ensayo y se les añadía el ácido cafeico en la proporción de 0,04 %. Las células de microorganismos anaerchios se colocaban en tubos provistos de tapón a rosca, quedando prácticamente llenos. Se incubaban a 37 °C durante diferentes períodos de tiempo (72-120 h).

Extracción y análisis de compuestos fenólicos

A diferentes intervalos (2 a 5 días) se tomaban muestras de las suspensiones, se acidificaban con CH 2N, y se eliminaban las células por centrifugación. Los cumpuestos fenólicos se extraían con éter sulfúrico; los extractos etéreos se llavaban a sequedad, a presión reducida, y el residuo se recogía en un pequeño volumen de acetona.

Las soluciones acetónicas se sometían a cromatografía en papel whatman num. 1 para la separación de los compuestos fenólicos. Se utilizaba cromatografía ascendente, empleando como disolvente una solución acuosa de ácido acético glacial al 2 %. Como reveladores se empleaban el ácido sulfaní ico diazotado y el descrito por Coulson-Evans (12).

RESULTADOS

Tras incubar diferentes suspensiones bacterianas en ácido cafeicoy extraer los compuestos fenólicos formados, en ningún caso sedetectó la presencia de compuestos monofenólicos; sin embargo, gram número de las bacterias ensayadas transformaban el ácido cafeicoen otros compuestos difenólicos con Rf característico.

Cuadro 1. Compuestos difenólicos, detectados por cromatografía sobre papel, procedentes de la degradación del ácido cafeico por diferentes bacterias (*)

Bacteria	Acido cafeico residual	Difenol no identificado
Pseudomonas chlororaphis	+ (24)	++ (45,62
Phytobacterium ringiberi	+ (24)	++ (58)
Phy. saliciperda	+ (24)	++ (45.62)
Erwinia nimipressuralis	+ (24)	++ (45,62)
E. flavida		++ (45.62)
Sarcina lutea	+ (24)	++ (45,62)

^{(*) () =} Rf del compuesto. + y ++ = menor y mayor abundancia del compuesto.

Las 6 bacterias del cuadro 1 metabolizan casi todo el substrato dejando poco ácido cafeico residual, que es transformado en dos compuestos difenólicos diferentes, con Rf respectivo de 45 y 62, a excepción de *Phytobacterium ringiberi*, que produce sólo un compuesto difenólico diferente a los anteriores, con Rf 58.

Las bacterias del cuadro 2 transforman el ácido cafeico en difenoles con Rf de 45 y 58, principalmente, a excepción de Xanthomonas panici I, que da lugar al difenol de Rf 62.

Cuadro 2. Compuestos difenólicos, detectados por cromatografía sobre papel, procedentes de la degradación parcial del ácido cafeico por diferentes bacterias

Bacteria	Acido cafeico residual	Difenol no identificado	
Xanthomonas panici I	++ (24)	++ (62)	
Pseudomonas viburni	++ (24)	++ (58)	
Spirillum sp.	++ (24)	+ (45)	
Erwinia carotovora	++ (24)	+ (58)	
Aerobacter aerogenes	++ (24)	++ (45)	
Escherichia coli	++ (24)	+ (58)	
Bacillus subtilis	++ (24)	++ (45).	
Corynebacterium renale	++ (24)	++ (45)	
Azotobacter chroococcum	++ (24)	++ (45)	

El resto de los microorganismos identificados que ensayamos no transforman el ácido cafeico en ningún otro difenol.

Las 10 bacterias aisladas de heces de conejo (C-1 a C-10), 6 de heces de rata (R-1 a R-6), 5 anaerobios procedentes de heces de rata (Ra-1 a Ra-5) y 5 bacteroides (B-1 a B-5) procedentes de heces de rata, mostraron un comportamiento también desigual frente al ácido cafeico.

Sólo los anaerobios Ra-1, Ra-3 y Ra-4 metabolizan por completo el ácido cafeico, dando en todos los casos cantidades aprecables (++) del difenol Rf 58.

No metabolizan el substrato las bacterias C-1, C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, R-2, R-3, R-4 y los bacteroides B-1. B-3, B-4 y B-5. El comportamiento del resto de los microorganismos aislados en nuestro laboratorio se expone en el *cuadro 3*.

Cuadro 3. Compuestos difenólicos, detectados por cromatografía sobre papel, procedentes de la degradación parciai del ácido cafeico por diferentes microorganismos ais:ados de heces de conejo y de rata

Microorganismos	Acido cafeico D residual no id	
C-4	++ (24)	++ (62)
C-8	++ (24)	++ (45)
C-9	++ (24)	++ (45)
C-10	++ (24)	++ (45)
R-1	++ (24)	++ (58)
R-5	++ (24)	+ (58)
R-6	++ (24)	++ (58)
Ra_2	++ (24)	+ (45)
Ra-5	++ (24)	+ (45)
B-2	++ (24)	+ (58)

DISCUSION

El ácido cafeico es transformado por suspensiones de células avadas de diferentes cultivos puros, dando lugar a la formación de tres compuestos difenólicos con Rf de 62, 58 y 45. En ningún caso se observan procesos de deshidroxilación que transformen el ácido cafeico en derivados monofenólicos. Es posible que los derivados difenólicos procedentes del ácido cafeico sean los precursores de procesos de deshidroxilación posteriores.

Sin embargo, en las condiciones de nuestros experimentos, es decir, con cultivos puros, no se consiguen procesos de deshidroxilación. Parece probable que las reacciones de deshidroxilación in vitro necesiten de algún factor o factores que están ausentes en las condiciones hasta ahora ensayadas.

RESUMEN

Suspensiones lavadas de diferentes bacterias aerobias y anaerobias, así como algunos bacteroides, degradan el ácido cafeico, dando derivados difenólicos. En ningún caso se observan procesos de deshidroxilación.

SUMMARY

Action of washed cell suspensions of different microorganisms on caffeic acid

Washed cell suspensions of different aerobic and anaerobic bacteria and some bacteroides are able to degrade caffeic acid to diphenolic derivatives and no dehydroxylation reactions were observed.

BIBLIOGRAFIA

- BOOTH, A. N.; MURRAY, C. W.; DE EDS, F., and JONES, F. T, 1955, Metabolic fate of rutin and quercetin. Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol,, 14, 321
- 2. BOOTH, A. N., and WILLIAMS, R. T. 1963. Dehydroxylation of catechol acids by intestinal contents. Biochem. J., 88, 66-67.
- DACRE, J. C.; SCHELINE, R. R., and WILLIAMS, R. T. 1968. The role of the tissues and gut flora in the metabolism of (14C) homoprotocatechic acid in the rat and rabbit. J. Pharm. Pharmacol., 20, 619-25.
- DACRE, J. C., and WILLIAMS, R. T. 1968. The role of the tissues and gut micro-organisms in the metabolism of (14C) protocatechic acid in the rat. Aromatic dehydroxylation. J. Pharm. Pharmacol., 20, 610-18.
- Gustafsson, B. E.; Bergström, S.; Lindstedt, S., and Norman, A. 1957.
 Turnover and nature of fecal bile acids in germfree and infected rats fed cholic acid-24-14C. Bile acids and steroids 41. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94, 467-71
- HILL, M. J., and DRASAR, B. S. 1967. Bacterial degration of bile salts. Biochem, J., 104, 55.
- Kaihara, M., and Price, J. M. 1963. The effect of feeding neomycin on the dehydroxilation of xanthurenic acid to 8-hydroxyquinaldic acid by the rabbit, J. Biol. Chem., 238, 4082-84.

- NORMAN, A., and SJÖVALL, J. 1958. Microbial transformation products of cholic acid in the rat bile acids and steroids 67. Biochim. Biophys. Acta, 29, 467-68.
- NORMAN, A., and SJÖVALL, J. 1958. On the transformation and enterohepatic circulation of cholic acid in the rat. J. Biol. Chem., 233, 872-85.
- Pérez-Silva, M. G.; Rodríguez, D., and Pérez-Silva, J. 1966. Dehydroxylation of caffeic acid by a bacterium isolated from rat feces. Nature, 212, 303-4.
- Shaw, K. N. F.; Gutenstein, M., and Jepson, J. B. 1963. Intestinal flora and diet in relation to m-hydroxyphenyl acids of human urine. Proc. Fifth Intern. Congr. Biochem. Moscow, 1961, 427.
- 12. Smith, I. 1960. Chromatographic and Electrophoretic Tecniques. Intersciences
 Publishers Inc., New York

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (CSIC) DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA SECCION DE VIRUS VEGETALES

PROPERTIES AND ELECTRON MICROSCOPY OF A VIGNA-VIRUS BELONGING TO THE CUCUMOVIRUS GROUP

bу

J. R. DIAZ-RUIZ

INTRODUCTION

From several cultivated plants of an unidentified *Vigna* sp. found in Villaviciosa de Odón, Madrid, and showing mosaic and leaf deformation, a sap-transmissible virus was isolated.

It was soon found to have some features in common with cucumber mosaic virus (CMV) also known to occur in cowpea crops (1, 6).

This paper reports on the host range, purification and mainly on the intracellular localization of the virus, in the naturally infected original host and in some test plants.

MATERIAL AND METHODS

Greenhouse tests

Sap inoculations were made with 0.01 M phosphate buffer pH 7 using carborundum as abrasive. The plants were maintained at 18-25 °C in a greenhouse.

The thermal inactivation point was determined in sap from infected tobacco plants as described by (3) and *Chenopodium amaranti-color* was used as the assay host.

Microbiol. Españ., 29 (1976), 9.

Virus purification

The virus was propagated in tobacco, pea and bean plants. About 2 weeks after inoculation it was partially purified by 2 cycles of differential centrifugation using the Steere's n-butanol-chloroform method (14).

The sedimentation coefficient was determined over a range of virus concentration in 0.001 M phosphate buffer pH 7. The Spinco Model E analytical ultracentrifuge was run at 40,000 r/m and 20 °C using schlieren optics.

Electron microscopy

For shape and size determination the purified suspensions were first fixed in 4 % formalin during some minutes and them stained with 2 % phosphotungstic acid (PTA), pH 6.9.

Ultrathin sections were made from systematically infected leaves of tobacco, pea and bean, and from naturally infected cowpea plants. The material was prepared as described (4). From inoculated plants, samples were taken several times between 5 and 20 days after inoculation.

RESULTS

Host range

The following symptoms were observed:

Chenopodium amaranticoior. Necrotic local lesions 4-5 days after inoculation (figure 1).

Chenopodium quinoa. Chlorotic local lesions.

Nicotiana clevelandii. Systemic mosaic and dwarfing.

Nicotiana tabacum White Burley. Severe systemic mosaic, leaf narrowing and plant dwarfing.

Phaseolus vulgaris Pinto. Severe systemic mosaic and leaf malformation (figure 2).



Figure 1. Symptoms induced on Chenopodium amaranticolor



Figure 2. Symptoms produced on Phaseolus vulgaris Pinto

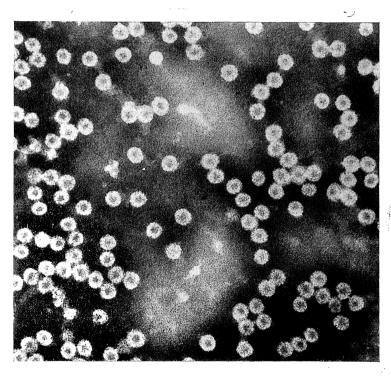


Figure 3. Electron micrograph of purified virus stained with PTA. \times 176,000

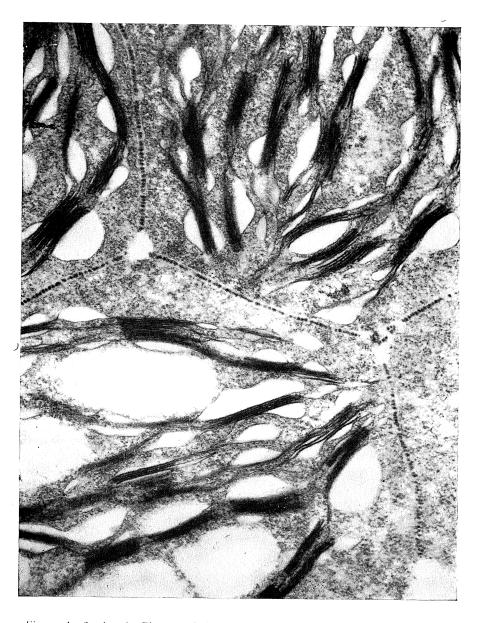


Figure 4. Section in Pisum sativum Koroza showing chloropasts with lamellar disorganization and surrounded by linear arrangament of virus particles \times 44,000



Figure 5. Particles aggregates surrounded by a membrane and virus crystals in Pisum sativum Koroza. \times 88,000

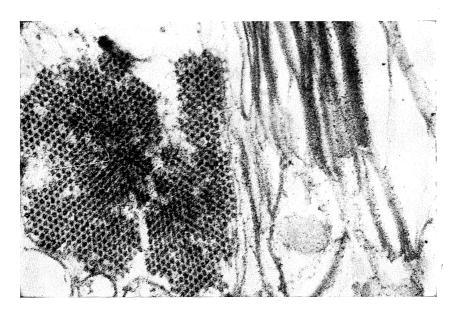


Figure 6. Virus crystals and chloropiasts residues observed in Pisum sativum Koroza, \times 80,000

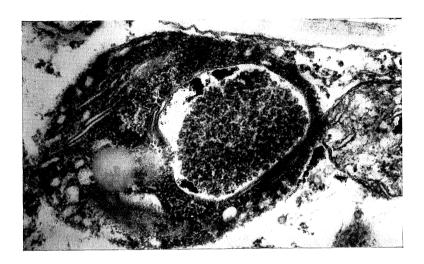


Figure 7. Clusters of virus-like particles inside the chloroplasts of naturally infected cowpea plants. \times 48,000



Figure 8, Enlarged portion of a similar cluster of virus-like particles inside the chloroplast, \times 110.000

Pisum sativum Koroza. Severe withering of plant tops 5-6 days after inoculation and plant death after 4-6 more days.

Vigna sinensis Black Eye. Necrotic local lesions on primary leaves or lesions absent.

No symptoms were observed in Capsicum frutescens, Cucumis melo, C. sativus and Lycopersicon esculentum.

Thermal inactivation point

In expressed sap, the virus was inactivated between 45 and 50 °C.

Properties in purified sap

The virus was purified from tobacco, pea and bean plants but yie'd was highest from pea. Inoculations from the purified preparations were positive.

The value of the sedimentation coefficient extrapolated to zero concentration was $S_{20, w} = 92.7$.

In the electrom microscope the purified preparations showed isometric particles with a dark centre and a diameter of about 27 nm (figure 3). The particles were disintegrated when mounted in 2 % PTA, pH 6.9 if they were not previously fixed in formalin.

Electron microscopy of ultrathin sections

In experimentally infected tobacco, pea and bean plants, virus particles of 20-22 nm with a hollow centre were found in cytoplasm (figures 4-6). Early after inoculation, the virus was only found in linear arrangement around the chloroplasts. These then showed some disorganization of the lamellar system (figure 4). Later, particle aggregates surrounded by a membrane, virus crystals and deteriorated chloroplasts were observed (figures 5-6). Sometimes, in samples from plants, particularly tobacco with clear symptoms, no virus particles could be found.

In naturally infected cowpea plants, masses of particles with size and aspect similar to that described febore, were frequently found in the chloroplasts only and no virus particles were observed elsewhere in the cells. These masses of particles were not observed surrounded by any membrane (figures 7-8) suggesting that they are not chloroplasts invaginations.

DISCUSSION

The group of viruses more or less closely related to CMV has a confusing variation in host range and serological relationship (2, 11-12). However, they all have isometric particles of 25-30 nm in diameter with a hollow centre (7) and these particles easily disintegrate in PTA.

Most of the characteristics of the virus studied here (symptoms, particle size, hollow centre, sedimentation coefficient, disintegration in PTA and low thermal inactivation point) resemble those of the cucumovirus group.

Like tomato aspermy virus (TAV) (9, 11), the new cowpea isolatedid not infect cucumber plants. However it differed from TAV in not infecting tomato plants and producing severe systemic symptoms on bean plants. Bos and Maat (4) isolated in Spain a CMV strain producing severe systemic symptoms on bean plants as well.

Many CMV strains are not visible in ultrathin sections but someof them (8, 10, 13) have been observed and related to the chloroplasts of infected cells.

The cowpea virus, also has an evident association with the chloroplasts and, in inoculated plants, shows particle aggregation very similar to that reported (8) for the Y strain of CMV (figures 5-6).

Moreover, masses of isometric particles of 20-22 nm wide not sourrounded by any membrane were prominent inside chloroplasts in naturally infected cowpea plants. Here no virus particles were observed in the cytoplasm although the virus was easily transmitted mechanically to other plants.

In conclusion, the virus isolated from cowpea seems to be a CMV strain showing a special association with the chloroplasts of infected plants.

SUMMARY

An isometric virus isolated in Spain from cowpea has many features in common with cucumber mosaic virus (symptoms, particle size, hollow centre, sedimentation coefficient, disintegration in PTA and low thermal inactivation point) but it does not infect cucumber plants and produce severe systemic symptoms on bean plants.

In ultrathin sections it shows a linear arrangement around chloroplasts, may form crystalline arrays or appear as dense clusters in vacuoles inside the chloroplasts.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author thank to Dr. M. Rubio-Huertos and Dr. L. Bos for their critical remarks on this paper.

RESUMEN

Propiedades y microscopia electrónica de un virus de Vigna perteneciente al grupo de los cucumovirus

Un virus isométrico aislado en España de plantas de Vigna tiene muchas semejanzas con el virus mosaico del pepino, aunque no infecta plantas de pepino, y produce síntomas generalizados muy intensos en plantas de judía.

En secciones ultrafinas se dispone alrededor de los cloroplastos; puede formar ordenaciones cristalinas o aparecer como densas masas en vacuolas dentro de los cloroplastos.

REFERENCES

- 1. Anderson, C. V. 1955. Vigna and Crotalaria viruses in Florida. I. Preliminary report on a strain of cucumber mosaic virus obtained from cowpea plant. Plant Dis. Rep., 39, 346.
- 12 Bhargava, K. S. 1951. Some properties of four strains of cucumber mosaic virus. Ann Appl. Biol., 38, 377.

- Bos, L.; Hagedorn, D. J., and Quants, L. 1960. Suggested procedures for international identification of legume viruses. Tijdschr. Plantenziekten. 66, 328-43.
- Bos, L., and Maat, D. Z. 1974. A strain of cucumber mosaic virus, seedtransmitted in beans. Neth. J. Plant Pathol., 80, 113.
- Díaz-Ruiz, J. R., y Moreno, R. 1972. Características sintomatológicas, morfológicas y ultraestructurales de una raza del virus mosaico de la alfalía encontrada en España. Microbiol. Españ., 25, 125.
- Finch, J. T.; Klug, A., and Van Regenmortel, M. H. V. 1967. The structure of cucumber mosaic virus. J. Mol. Biol., 24, 303.
- 7. Gerola, F. M.; Bassi, M., and Belli, G. 1965. Some observations on the shape and localization of different viruses in experimentally infected plants, and on the fine structure of the host cells. II. Nicotiana glutinosa systemically infected with cucumber mosaic virus, strain Y. Caryologia, 18, 567.
- 8. Govier, D. A. 1957. The properties of tomato aspermy virus and its relatioship-with cucumber mosaic virus. Ann. Appl. Biol., 45, 62.
- Honda, Y., and Matsui, C. 1974. Electron microscopy of cucumber mosaic virus-infected tobacco leaves showing mosaic symptoms. Phytopathology, 64, 534.
- Lawson, R. H. 1967. Relationship among tomato aspermy, aspermyrelated viruses from chrysanthemum, and two strains of cucumber mosaic virus. Virology, 32, 357.
- MINK, G. I. 1969. Serological relationships among cucumber mosaic virus, tomato aspermy type viruses and peanut stunt virus. Phytopathology, 59, 1889.
- MISAWA, T., and EHARA, Y. 1966. Electron microscopy observation of host cells infected with cucumber mosaic virus. Tohoku J. Agr. Res., 16, 159.
- 13. Steere, R. L. 1959. The purification of plant viruses. Advan. Virus Res., 6, 1.

CENTRO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA APLICADA DEL CUARTO (CSIC). SEVILLA

UNA ESTIRPE DE *EUROTIUM ECHINULATUM*DELACR. AISLADA DE UN VERTISUELO

por

C. SAIZ-JIMENEZ

INTRODUCCION

Durante un estudio micológico de vertisuelos (tierras negras andaluzas) se aisló, entre otras, una especie de Eurotium, identificada en el C. B. S., Baarn (Holanda), como Eurotium umbrosum (Bain. y Sart.) Malloch y Cain. Posteriormente, dado que los tamaños de las ascosporas no coincidían plenamente con los de nuestra especie, se reconsideró tal identificación, incluyéndose dentro de E. echinulatum Delacr.

Eurotium echinulatum fue descrito por Delacroix en 1893, y en 1926 este nombre fue considerado como sinónimo por Thom y Church, quienes propusieron el de Aspergillus echinulatus (Delacr.) Thom y Chuch. En los manuales del género Aspergillus (16 y 27) se conserva este último. Sin embargo, en 1972 ya se recoge, en la clave para estados perfectos de Aspergillus, la especie E. echinulatum (26).

Aspergillus echinulatus (*) estado conidial, es un hongo perteneciente al grupo A. glaucus, caracterizado por sus propiedades osmófilas. Muy pocos trabajos se han efectuado sobre los metabolitos de esta especie, poniéndose de manifiesto la existencia de diversos pigmentos en los micelios, tales como flavoglaucina, fisción y eritroglaucina (1 y 6). Posteriormente se encontró, también, equinulina y auroglaucina (15).

^(*) En el presente trabajo nos referimos a A. echinulatus cuando se cita algún texto de la bibliografía en que los autores lo utilizan.

Los metabolitos producidos por Eurotium echinulatum se han estudiado recientemente, identificándose 13 antraquinonas, 20 derivados fenólicos, además de flavoglaucina y equinulina (21-23), así como un pigmento de tipo húmico, que se ha caracterizado físico-químicamente (17-20 y 24).

Dado el evidente interés de esta especie, en función de la elevada cantidad de metabolitos que sintetiza, y lo raramente que ha sido aislada del suelo, se describen a continuación sus características morfológicas y parte de las fisiológicas, no publicadas anteriormente.

MATERIAL Y METODOS

La especie se aisló en 1970 de una tierra negra de El Sorbito, Utrera (Sevilla), soportando una vegetación natural de gramíneas. Para ello se utilizó el método de las suspensiones-diluciones (14), sembrado en placas de Czapek-agar. Las características morfológicas y culturales se examinaron en los medios de Czapek-agar, Czapek-sacarosa 20 %-agar, Czapek-sacarosa 70 %-agar, malta-agar y malta-sacarosa 40 %-agar.

Las características fisiológicas se estudiaron en los medios líquidos de Czapek-glucosa, Czapek-glucosa 20 %, glucosa-asparagina, además de uno empleado por nosotros, que proporcionó buenos resultados, consistente en glucosa, 30 g; NO₃Na, 2 g; asparagina, 1,7 g; PO₄HK₂, 1 g; ClK, 0,5 g; SO₄Mg, 0,5 g; CO₃Ca, 1 g; extracto de suelo (preparado utilizando 1 kg del mismo suelo donde se aisló la especie, del que se obtuvieron 500 cm³, siguiendo el método de Pochon y Tardieux (14)), 250 cm³ y agua destilada c. s. p. 1.000 cm³. El pH se ajustó a 6, lo mismo que los anteriores.

La determinación del peso de micelios se efectuó secando a peso constante a 105 °C durante 24 h. Para la obtención del pigmento de tipo húmico, el medio de cultivo filtrado se acidificó con ClH hasta pH 1. El precipitado se trató como los ácidos húmicos de sue'os, para su purificación (18).

RESULTADOS

La descripción de la especie es la siguiente:

«Las colonias crecen en medio de Czapek-agar muy restringidamente y alcanzan un diámetro de 1,5 cm en dos semanas, a 25 °C, en relieve, algo flocosas, amarillo-naranjas a pardas, producen ascomas abortivos en número limitado y con abundantes estructuras conidiales, especialmente en los márgenes de la colonia. Reverso naranjo-pardo.

Las colonias, en ma ta-agar, alcanzan un diámetro de 1,5 cm en 2 semanas, a 25 °C, flocosas, rojo-marrón, producen pocos ascomas abortivos y estructuras conidiales. Reverso rojo oscuro a marrón.

Las colonias alcanzan un diámetro de 3 cm en 2 semanas, a 25 °C, en un medio Czapek-sacarosa 20 %-agar, consistentes en un micelio basal amarillo a naranja, algo flocoso, en el cual están inc'uidos numerosos ascomas amarillos. Las estructuras conidiales se producen abundantemente, proyectando hacia arriba la capa ascomática y dando al cultivo una apariencia verdosa. Reverso, amarillo a rojizo marrón. Las hifas vegetativas son hialinas, profusamente incrustadas de gránulos amarillos y rojo-naranja, de 2-4 µ de diámetro. Los ascomas son amarillos, globosos a subglobosos, de 100-160 µ de diámetro, madurando a las 3-4 semanas. El peridio consiste en una capa de células poligonales, amarillas, de paredes relativamente finas. Asco globoso a subgloboso, octoesporado, de 16-18 por 15-17 μ (figura 1c). Las ascosporas varían de hialinas a verdosas, lenticulares, cuyo tamaño global es de 7,5-9,2 por 5-7 μ de diámetro, provistas de 2 surcos ecuatoriales, bien separados, irregulares, de cerca de 0,5-1 µ de ancho, rugoso en el área ecuatorial, surcos poco profundos a pronunciados, con las partes convexas lisas o casi lisas (figura 1d). Las cabezas conidiales son radiadas, de cerca de 200-300 µ de diámetro; los conidióforos, lisos, incoloros al principio, después pardos, especialmente en las partes apicales, de 300-600 μ de longitud, por 8-10 μ de diámetro, con el ápice ensanchándose gradualmente hacia las vesículas, vesículas apicales de 20-55 µ de diámetro (figura 1a). Las fiálides, en una serie simple, de 10-12,5 por 4,5-6 μ. Los conidios, verdosos, equinulados, elipsoides a subglobosos, a menudo muestran una pequeña base truncada, a causa del conectivo adherido, variable en tamaño, usualmente de 7-8 µ de diámetro, a veces mayor o menor (figura 1b).

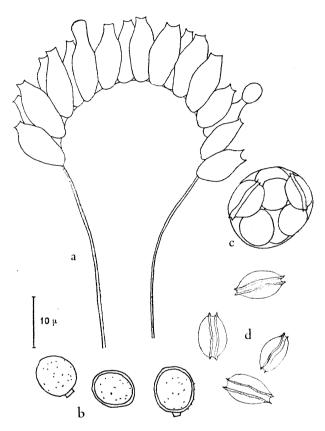


Figura 1. E. echinulatum Delacr. a) cabeza coindial;
b) conidios; c) asco; d) ascosporas

Las colonias se difunden ampliamente en malta-sacarosa 40 %-agar, alcanzando un diámetro de 8 cm en 8 días; consisten en un micelio basal flocoso, rojizo-marrón, que sostiene pocas estructuras conidiales y ascomas esparcidos, cubiertos por una trama hifal de textura muy suelta, produciendo, a menudo, hifas aéreas muy largas y radiadas, con numerosas estructuras conidiales y de color verdoso. Reverso amarillo-naranja a pardo

Las colonias alcanzan un diámetro de 5,5 cm en 2 semanas, a 25 °C, en Czapek-sacarosa 70 %-agar, y consisten en un mice-clio muy suelto, flocoso, que produce muchas estructuras conidiales verdes. Los ascomas son escasos o fa tan. Reverso incoloro, verdoso o amarillento 25)».

Un cultivo de la especie descrita se depositó en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (Holanda), con el número 886.71.

Los medios de cu'tivo elegidos para la producción del pigmento de tipo húmico se distribuyeron, según la fuente de nitrógeno, en dos grupos: uno formado por el medio de Czapek-glucosa y Czapek-glucosa 20 %, cuya fuente de nitrógeno es inorgánica (NO₃Na), y otro formado por el medio glucosa-asparagina y glucosa-nitrógeno mixto, cuyo nitrógeno es orgánico (asparagina). Este último medio está justificab'emente incluido en el segundo grupo, puesto que el pigmento de tipo húmico ais ado de él posee las mismas características que el obtenido del medio glucosa-asparagina, estimándose que esta última influye más en las condiciones del medio que el NO₃Na.

En el cuadro 1 se muestra el pH final de los medios de Czapek-glucosa 20 %-asparagina, el peso seco de micelios, el peso de pigmento de tipo húmico y la razón $\rm E_4/\rm E_6$ de cada medio, elegidos ambos como representativos de cada grupo, ya que no se encontraron diferencias entre los componentes de cada uno, respecto al pigmento. Los pesos se expresan en $\rm g/l$.

Cuadro 1. Características de dos medios de cultivo de E. echinulatum

	pН	Peso del micelio	Peso del pigmento	E4/F6
Czapek-glucosa 20 %	4,2	9,1	3,0	2,9
Glucosa-asparagina	7,8	5,4	3,0	2,3

Se ha controlado a lo largo del período de incubación la evolución del pH y la producción del pigmento de tipo húmico. En la figura 2 se muestra la referente al medio glucosa-asparagina, en la que se observa cómo poco después del comienzo de la incubación,

a los 7 días, el pH baja desde su valor inicial hasta 5,5 y luego a 5,4, acidez que permanece constante hasta las 70 días, en que se produce una subida a valores cercanos a sa neutralidad y, posteriormente, hasta valores débilmente alcalinos.

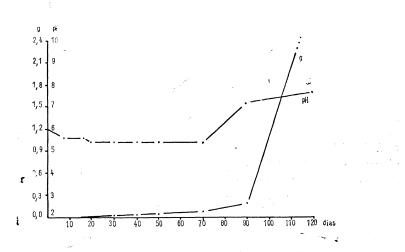


Figura 2. Evolución del pH y de la producción de pigmento de tipo húmico en un cultivo de E. echinulatum

Respecto a la síntesis del pigmento, durante los primeros 17 días no existe producción, apareciendo trazas a los 18 días, a partir de los cuales va aumentando la cantidad progresivamente hasta los 90 días, en que se aprecia una brusca subida, coincidente con la del pH.

El pigmento de tipo húmico presenta las siguientes características (media de los valores de los cuatro medios de cultivo): composición elemental, 61,5 % de C, 4,2 % de H, 31,8 % de O, y 2,5 % de N. Grupos funcionales, expresados en meq/g: 8,6 de acidez total; 2,0 de carboxilos; 6,5 de hidroxilos fenólicos; 0,7 de hidroxilos alcohólicos; 3,5 de carbonilos; 0,4 de metoxilos. Los espectros visible y ultravioleta muestran inflexiones a 500, 380, 300, 275, 255 y 230 nm, en medio alcalino. El espectro infrarrojo muestra bandas a 3.390 (hidroxilos), 2.900 (C-H alifáticos), 2.600 (OH de carboxilos), 1.700 (C = O carboxílico), 1.600 (C = C aromático), 1.450 (CH₂), 1.380 (C-CH₃), 1.210 y 1.160 (C-O y OH de

fenoles), 1.050 (C-O y OH de alcoholes), 1.005 y 850 cm⁻¹ (C-H y núcleos bencénicos sustituidos). El espectro del pigmento acetilado presenta, además, bandas a 1.770 y 1.190 (acetatos fenólicos) y a 1.670 cm⁻¹ (C = O quinónicos). El peso molecular medio, determinado por sephadex, fue de 33.600.

La degradación química del pigmento liberó entre un 45 y 60 % de sustancias solubles en éter, de las cuales un 20 a 30 % pertenecían a compuestos fenólicos, y el resto a antraquinonas, antronas, derivados antracénicos y otros compuestos no identificados. Estos fenoles y antraquinonas fueron los mismos que se identificaron en el medio de cultivo durante las primeras etapas del período de incubación (17, 21 y 23).

Entre un 5 y 10 % en peso del polímero corresponde a antraquinonas adsorbidas, pudiendo ser liberadas mediante filtración por sephadex, tratamiento con hidróxido bárico o ditionito sódico. Además, entre un 8 y 20 % de la molécula está formada por proteínas o péptidos, que se liberan como aminoácidos por hidrólisis ácida con ClH 6 H (8 y 13). También un pequeño porcentaje, no determinado, de polisacáridos está presente en el pigmento, como muestran los estudios de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (5).

En el medio de cultivo tienen lugar reacciones de oxidación enzimática y no enzimática, que originan el polímero a partir de los fenoles y proteínas existentes. El tipo de uniones entre las distintas unidades aromáticas del pigmento sería por adiciones nucleofílicas y establecimiento de enlaces C-C y C-O-C. Es posible que parte de las antraquinonas se encuentren unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, aunque se ha demostrado la posibilidad de enlaces C-C entre las posiciones C-4 y C-5 de antraquinonas con el resto de las unidades aromáticas (17).

Las proteínas se unen al pigmento mediante adición nucleofílica del aminoácido N-terminal a fenoles, durante la oxidación de estos últimos y por desaminación oxidante (7 y 17). Los polisacáridos parecen estar adsorbidos o co-precipitan durante la extracción y acidificación del pigmento. La existencia de éstos es común a todos lospigmentos fúngicos, de tipo húmico, estudiados (5).

DISCUSION

Los tamaños de las ascosporas de la especie aislada concuerdan bien con los de la C. B. S. 117.46, considerada por Thom y Raper (27) como representativa de Aspergillus umbrosus, aunque son ligeramente mayores que los tamaños dados por Raper y Fennell (16) para esta última. Sin embargo, los prominentes e irregulares surcos ecuatoriales de las ascosporas son típicos de A. echinulatus.

Según Fennell (2), que examinó la estirpe, ésta podía incluirse dentro de *Eurotium echinulatum*, siendo de la misma opinión Stolk (25), quien la considera como *E. echinulatum*, a causa de los surcos ecuatoriales que ornamentan las ascosporas. Los tamaños de éstas están en el límite inferior de la especie, pero concuerdan razonablemente con la descripción de Raper y Fennell (16).

La elevada producción de compuestos aromáticos por hongos está, sin duda, relacionada con su crecimiento en medios ricos en glucosa o, al menos, en condiciones ambientales anormales.

Según Packter (12), la excesiva producción de fenoles por hongos pudiera reflejar una falta de control de la entrada de glucosa en el micelio, incrementándose la formación de acetil- y malonil-CoA, que aumenta la síntesis de lípidos y fenoles.

Packter y Collins (13) observaron que Aspergillus fumigatus, que produce derivados fenólicos, consume todo el nitrógeno del medio en 24 h, período durante el cual no existe producción apreciable de fenoles: A partir de entonces disminuye el contenido en proteínas del micelio y se incrementa la producción de fenoles. Es muy posible qua algo similar suceda en Eurotium echinulatum, donde la producción de elevadas cantidades de fenoles y antraquinonas es un hecho constante. Gatenbeck y Sjoland (4) relacionaron, también, la síntesis de antraquinonas por Penicillium islandicum con el agotamiento del nitrógeno del medio.

El cuadro 1 muestra el bajo pH final del medio de Czapek, mientras que el de glucosa-asparagina presenta un pH débilmente alca ino. Según Lilly (10), el descenso de pH en el medio puede deberse a dos tipos de metabolismo: producción de ácidos orgánicos y desigual intilización o excreción de cationes y aniones.

El pH ácido del medio de Czapek puede atribuirse a una serie de

factores, tales como la elevada concentración de glucosa, bajo contenido en nitrógeno, medio mineral, los cuales favorecen la producción de acetil-CoA y producción de compuestos aromáticos de carácter ácido (fenoles y antraquinonas), y/o también a la casi completa utilización de elementos minerales con el consiguiente anulamiento del efecto tampón en el medio. No se ha demostrado en este caso la producción de ácidos orgánicos.

El pH débilmente alcalino del medio glucosa-asparagina se debe a la autólisis de los micelios. Aquélla se caracteriza por una pérdida de peso y solubilización del nitrógeno celular, además de, entre otros factores, pérdida elevada del porcentaje inicial de grasas, manitol, xilosa (8), compuestos fosforados (9), elementos minerales (3), etc. Durante la autólisis de Aspergillus sydowi, más del 60 % del nitrógeno orgánico soluble liberado parece estar constituido por peptonas y polipéptidos, mientras que el 30 % del nitrógeno micelial se convirtió en amoníaco (3). Este contribuye a la alcalinización del medio.

Parte importante en la autólisis es la presencia de enzimas proteolíticas, las cuales, con excepción de la pepsina, tienen un pH óptimo en condiciones neutras o ligeramente alcalinas, por lo cual los procesos autolíticos se acentúan grandemente en estos pH. Esto explicaría la diferencia de peso de micelio obtenido en cada medio, puesto que, mientras en uno predominan las condiciones ácidas y, por tanto, hay inhibición de las enzimas proteolíticas, en el otro progresa la autólisis a medida que se neutraliza el medio. A esta diferencia también puede contribuir el que el medio de Czapek es más adecuado, por su elevada presión osmótica, para el crecimiento del hongo.

El incremento del pH observado en la figura 2 se debe, por tanto, a la autólisis.

La producción del pigmento ocurre tanto en condiciones ácidas (como se deduce del porcentaje obtenido, cuadro 1), hecho que concuerda con la existencia de una fenolasa (prueba de Bavendam, positiva) con un óptimo de actividad a pH inferiores a 5, como en condiciones neutras o ligeramente a calinas, ya que si a estos pH se inactiva la fenolasa, se encuentra el rango más idóneo para la auto-oxidación de los fenoles, parte de los cuales son altamente reactivos en estas condiciones (7), y ambos procesos, autooxidación y oxida-

ción enzimática, conducen a la formación de idénticos radicales fenólicos (17).

La razón E_4/E_6 , o cociente de las densidades ópticas a 465 y 665 nm, ha sido utilizada para determinar la formación de compuestos húmicos y su aromaticidad en medios de cultivo de Aspergillus flavus (29). Una razón baja, como en este caso, indica un elevado contenido en compuestos aromáticos o de tipo húmico, mientras que valores altos (superiores a 5) señalan la poca aromaticidad de los compuestos existentes o presencia de compuestos de tipo fúlvico. Otros datos analíticos (18-19) confirman tal afirmación y el carácter aromático del pigmento.

Respecto a las especies de Eurotium y Aspergillus citadas en España, sólo se han encontrado en la bibliografía Eurotium herbariorum (28), mientras que en los ficheros de micología del herbario del Jardín Botánico aparecen E. herbariorum, Aspergillus candidus y A. glaucus, por lo que E. echinulatum es una nueva cita para España.

CONCLUSIONES

El aislamiento de un hongo del suelo, Eurotium echinulatum Delacr., que presenta algunas diferencias respecto a la especie tipo y sintetiza una gran diversidad de compuestos en los medios de cultivo, pone de manifiesto dos importantes cuestiones. Por una parte, el interés y la necesidad de efectuar un más profundo estudio micológico de los suelos españoles, sobre todo en lo que respecta a Hyphomycetes y Ascomycetes. Por otra, la importancia de la microflora fúngica en los procesos de biosíntesis y biodegradación en el suelo, produciendo en el primer caso, entre otros, compuestos de tipo húmico, de gran importancia para la fertilidad y estabilidad de los suelos, así como para el control de los procesos geoquímicos.

El examen de la bibliografía a nuestro alcance nos lleva a la conclusión de que la especie de Eurotium echinulatum es una nueva cita para España.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a las Dras. A. C. Stok y D. I. Fennell el examen y comentarios sobre la especie estudiada, y al Dr. F. D. Calonge su colaboración al examinar la bibliografía existente en el Jardín Botánico.

RESUMEN

Se ha aislado de un vertisuelo una estirpe de Eurotium echiqulatum Delacr., cuyas características morfológicas son algo atípicas. Es una nueva cita para España. Se estudian también algunas de sus características fisiológicas en distintos medios de cultivo y su influencia en la formación de un pigmento de tipo húmico.

SUMMARY

A strain of Eurotium echinulatum Delacr. isolated from a vertisol

A strain of Eurotium echinulatum De'acr. has been isolated from a vertisol. It is a new record for Spain. Its morphological characteristics, as well as it physiology in several culture media with regard to the humic acid-like pigment formation are discussed.

BIBLIOGRAFIA

- Ashley, J. N.; Raistrick, H., and Richards, I. 1939. The crystalline colouring matters of species in the Aspergillus glaucus series. II. Biochem. J., 33, 1291-303.
- 2. Fennell, D. I. 1974. Comunicación personal.
- 3. Foster, J. W. 1949. Chemical Activities of Fungi. Academic Press, New York.
- 4. Gatenbeck, S., and Sjoland, S. 1964. Biochim. Biophys. Acta, 93, 246, citado en (12).
- González-Vila, F.; Saiz-Jiménez, C.; Lentz, H., and Ludemann, H. D. C-13 Nuclear magnetic resonance spectra of fungal melanins, en preparación.

- 6. GOULD, B. S., and RAISTRICK. H. 1934. The crystalline pigments of species in the Aspergillus glaucus series. Biochem. J., 28, 1640-56.
- HAIDER, K., and MARTIN, J. P. 1967. Synthesis and transformation of phenolic compounds by Epicoccum nigrum in relation to humic acid formation. Soil Sci. Amer. Proc., 31, 766-72.
- LAHOZ, R 1967. Quantitative changes in the content of non nitrogenous compounds during autolysis of Aspergillus terreus. J. Gen. Microbiol., 46, 451-56.
- LAHOZ, R.; REYES, F., and BALLESTEROS, A. M. 1969. Chemical and physiological changes in fungi during autolysis. V. Mycopathol. Mycol. Appl., 38, 367-72.
- 10. LILLY, V. G. 1965. The chemical environment for fungal growth. Media macro and micronutrients. En G. C. Ainsworth, and A. S. Sussman (eds.). The Fungi, 1, 465-78. Academic Press, New York.
- 11. Malloch, D., and Cain, R. F. 1972. New species and combinations of cleistothecial ascomycetes. Can. J. Bot., 50, 61-72.
- 12. PACKTER, N. M. 1973. Biosynthesis of Acetate-derived Compounds. John Willey & Sons Ltd., London.
- 13. PACKTER, N. M., and COLLINS, J. S. 1974. Effect of inhibitors of protein synthesis on the formation of phenols derived from acetate and shikimic acid in Aspergillus funigatus. Eur. J. Biochem., 42, 291-302.
- 14. Росном, J., et Tardieux, P. 1962. Tecniques d'Analyse en Microbiologie du Sol. Ed. de la Tourelle., St. Mandé.
- 15. Quilico, A., and Panizzi, L. 1943. Chemische Untersuchungen über Aspērgillus echinulatus. I. Mitteilung. Chem. Ber., 6, 348-58.
- 16. RAPER, K. B., and FENNELL, D I. 1965. The Genus Aspergillus. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 17. Saiz-Jiménez. C. 1974. Síntesis de compuestos aromáticos por Eurotium echinulatum Delacr. en relación con la formación de un pigmento de tipohúmico. Tesis doctoral. Universidad de Madrid.
- Saiz-Jiménez, C. 1975. Caracterización del pigmento de Eurotium echinulatum Delacr. I. Datos analíticos. An. Edafol. Agrobiol., 34, 829-39.
- SAIZ-JIMÉNEZ, C. 1975. Caracterización del pigmento de Eurotium echinulatum Delacr. II. Métodos físicos. An. Edafol. Agrobiol., 34, 943-57
- SAIZ-JIMÉNEZ, C., y HAIDER, K. 1975. Caracterización del pigmento de Eurotium echinulatum Delacr. III. Métodos degradativos. An. Edafol. Agrobiol., 34, 959-69.
- 21. SAIZ-JIMÉNEZ, C., y HAIDER, K. 1975. Síntesis de compuestos aromáticos por Eurotium echinulatum Delacr. An. Edafol. Agrobiol., 34, 931-41.
- SAIZ-JIMÉNEZ, C.; HAIDER, K.; MARTÍN, F., y MARTÍN, J. P. 1975. Biosíntesis de antraquinonas por un hongo del suelo. Programa Resúmenes VI Congr. Soc. Españ. Bioquim.
- 23. Saiz-Jiménez, C.; Haider, K., and Martín, J. P. 1975. Anthraquinones and phenols as intermediates in the formation of dark colored, humic acid-like pigments by Eurotium echinulatum. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 39, 649-53.

- 24. Saiz-Jiménez, C., and Martín, F. 1975. Pyrolisis-gas-chromatography of the pigment of *Eurotium echinulatum* Delacr. Trans. VI Symp. Humus Planta, 11-16.
- 25. STOLK, A. C. 1974. Comunicación personal.
- Subramanian, C. V. 1972. The perfect states of Aspergillus. Curr. Sci., 21,. 755-61.
- 27. Тном, С., and RAPER, K. B. 1945. A Manual of the Aspergilli. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 28. Unamuno, L. M. 1941. Enumeración y distribución geográfica de los ascomicetos de la Península Ibérica y de las Islas Baleares. Mem. Real Soc. Españ. Cienc. Exactas Fís. Natur., VIII, 1-403.
- VISSER, S. A. 1970. Investigations into the optimum conditions for the formation of humic compounds in Aspergillus flavus cultures and some properties of the products formed. West Afr. J. Biol. Appl. Chem., 18, 3-13.

TRANSDUCCION GENERALIZADA EN *PSEUDO-MONAS PUTIDA* CON UN MUTANTE TERMOSEN-SIBLE DEL FAGO PF16H2

por

R. DIAZ, G. DE TORRONTEGUI y J. L. CANOVAS

INTRODUCCION

Gran parte de los estudios sobre genética bacteriana han sido realizados en enterobacterias, y más concretamente, en Escherichia .coli. Para poder genera izar nuestro conocimiento en este campo sería conveniente intensificar estos estudios en otros grupos bacterianos. El género Pseudomonas es interesante a este respecto, ya que, al parecer, las fuerzas selectivas que han orientado la evolución de sus especies difieren mucho de las que han dirigido los procesos evolutivos de las enterobacterias (8): para las primeras fue fundamental el poder utilizar cualquier compuesto como fuente de carbono y energía, y para las otras, la rápida asimilación de un número limitado de sustancias, en condiciones variab'es de pH y temperatura. En consecuencia, las pseudomonadáceas poseen comparativamente una gran versatilidad nutricional (9). Asimismo, los sistemas de control genético que operan en las mismas presentan, a! parecer, manifiestas peculiaridades. En una serie de estudios realizados en Pseudomonas se ha observado que genes que codifican enzimas catabólicas re acionadas funcionalmente, muestran un grado de agrupación que excede en mucho al que podría predecirse si se considerasen sus sistemas de regulación de acuerdo con el modelo de Jacob y Monod (4): 21 genes estructurales correspondientes, al menos, a 14 operones distintos están agrupados en una pequeña región genética (equivalente a un 10-15 % del cromosoma) (5-7, 10 y 12).

Microbiol Bspañ., 29 (1976), 32.

La especie de Pseudomonas putida, que pertenece al grupo fluorescente de Pseudomonas, ha sido ampliamente estudiada desde puntos de vista microbiológicos y bioquímicos. El conocimiento genético de esta especie es considerablemente menor, pese a los trabajos ralizados al respecto en los últimos años, utilizando el único sistema de análisis genético de que se dispone, es decir, la transducción generalizada con el fago pf16h2 (2). La virulencia de este fago, incluso tras atemperación previa por radiación ultravioleta, impide el aislamiento de transductantes si no es en presencia de suero anti-pf16h2 ($K \simeq 10$) (2). La preparación de tales sueros es, de todos sabido, tediosa, larga y relativamente costosa. En este artículo se describe una modificación de la técnica de transducción generalizada para P. putida, que la simplifica considerablemente, ya que evita el uso del suero antifago, utilizando para la transmisión genética un mutante termosensible del fago transductor pf16h2.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico

Se ha utilizado la estirpe *Pseudomonas putida* PRS1 [ATCC 12633; estirpe 90 de Stanier y colaboradores (9)] y el mutante MAP1, anteriormente denominado 412-5 (11). Este mutante deriva de PRS1 y carece de actividad gluconato-6-fosfato dehidrasa, siendo por tanto incapaz de crecer en glucosa, gluconato y 2-cetogluconato. Los fagos empleados fueron el pf16h2 (2) y una serie de mutantes termosensibles derivados de éste

Métodos de cultivo

Los cultivos de reserva se mantenían a 4 °C, en tubos de agar inclinado que contenían extracto de levadura Difco (1 %, p/v) e ionagar núm. 2 Oxoid (1,5 %, p/v). Los cultivos de MAPI utilizados en los experimentos de transducción (bacterias receptoras) se desarrollaron en medio VB (2) con succinato 10 mM como fuente de carbono y energía. El medio mínimo usado para el aislamiento

de transductantes contenía la base mineral de Stanier y colaboradores (9), glucosa 10 mM e ionagar al 1,5 % (p/v). Los cultivos de reserva y los de bacterias receptoras fueron crecidos a 30 °C (los cultivos líquidos, con agitación).

Para la obtención de suspensiones fágicas (lisados) se empleó la técnica de la «capa de agar blando» (1). Se mezclaban 0,1 ml de un cu tivo de PRS1 desarrollado a 30 °C hasta la fase estacionaria en medio LB (conteniendo 10 g de triptona Difco, 5 g de extracto de levadura Difco, 1 g de ClNa y 1 g de glucosa/l de agua desionizada), 0.1 ml de suspensión de fago que tenía 5 × 10⁵ unidades formadoras de placas de lisis (U. F. P.) y 2,5 ml de agar blando (ionagar núm. 2 Oxoid, 0,75 %, p/v). Estas mezclas se vertían sobre cajas de Petri con medio LB (solidificadas con agar, tal como se ha indicado anteriormente) y se incubaban a 30 °C. Una vez desarrolladas placas de lisis confluyentes, la capa de agar blando se trituraba en 3 ml de medio PM (3), se agitaba con cloroformo y se centrifugaba, descartando el sedimento.

Recuento de bacterias viables y titulación del fago

El número de cé ulas viables se medía a partir de muestras convenientemente diluidas con tampón fosfato 0,1 M, pH 6,8, que se extendían sobre cajas de Petri con medio LB sólido y se incubaban a 30 °C para el desarrollo de colonias aisladas, que posteriormente se contaban. Las suspensiones de fago se titulaban por la técnica ya referida de la «capa de agar blando» (1), a partir de apropiadas diluciones de los lisados en medio PM (0,1 ml de estas diluciones daban 50-100 p'acas de lisis).

Aislamiento de mutantes termosensibles del fago pf16h2

Se mezclaron 10 ml de un cultivo de PRS1 en medio VB-succinato (con 3 × 10⁸ células viables/m¹) y 0,2 ml de una suspensión de pf16h2 diluida de tal modo que la multiplicidad de infección (m. i.) en la mezc¹a era 0,5. Esta mezcla se incubó a 30 °C durante 20 min (para que tuviera lugar la infección) y seguidamente se centrifugó a fin de seperar las células bacterianas. Estas células se lavaron dos veces

con tampón tris-maleato 0,1 M, pH 5,5 y se suspendieron en 10 ml de una solución de N-metil-N'-nitrosoguanidina (50 µg/ml) en el tampón indicado. Tras incubarlas a 30 °C durante 30 min se procedió a separar las células y a lavarlas tal como se acaba de describir, e inmediatamente se suspendieron en tris-maleato. Mediante la repetida técnica de la «capa de agar blando», sustituyendo la suspensión de fagos por esta de bacterias infectadas y mutagenizadas (0,1 ml de diluciones apropiadas), se procedió al desarrollo del fago a 30 °C, obteniéndose placas de iisis aisladas (no más de 100 por cada caja de Petri). La detección de colonias de fagos termosensibles se llevó a cabo transfiriendo, con asa y por estría, muestras de cada placa de lisis a cajas de Petri que contenían LB solidificado y una «capa de agar blando» con células de la estirpe PRS1 sin infectar. Estas cajas de Petri se incubaron a 35 °C y se seleccionaron las estirpes fágicas incapaces de formar zonas de lisis a esta temperatura.

Transducción

Se mezclaban 1 ml de suspensión de bacterias receptoras (MAP1) suspendidas en medio VB desprovisto de succinato (3 × 10° células/ml) y 0,1 ml de un lisado de la estirpe PRS1 convenientemente di'uido para dar la m. i. deseada. Esta mezcla se incubaba a 35 °C o 30 °C, según se señala, durante 10 min (salvo indicación expresa), al cabo de las cuales se tomaban muestras de 0,1-0,2 ml, que se extendían en cajas de Petri conteniendo el medio ya descrito para aislar tranductantes. Las cajas de Petri se incubaban a 35 °C. La frecuencia de transducción se calculaba dividiendo el número de transductantes por el número de bacterias receptoras.

Tratamientos con luz uitravioleta

Se irradiaban muestras de 2 ml de suspensiones de fagos (conteniendo aproximadamente 10¹⁰ U. F. P./ml), dispuestas en cajas de Petri de 7 cm de diámetro, con dos lámparas Sylvania (15 W), situadas a 44 cm de distancia. Las suspensiones se agitaban manualmente, con suavidad, durante el tratamiento, cuya duración se varió según se indica en los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Selección del fago transductor termosensible

A partir del fago pf16h2 se aislaron, mutantes termosensib'es, capaces de desarrollarse a 30 °C pero no a 35 °C. Después se estudió en estos mutantes su capacidad de crecimiento a la temperatura permisiva y la estabilidad de la mutación; es decir, si su frecuencia de reversión espontánea con readquisición de la capacidad de multiplicarse a 35 °C era suficientemente baja. El cuadro 1 muestra que los fagos pf16h2ts-22, pf16h2ts-26 y pf16h2ts-33 eran los más idóneos entre los estudiados, ya que se multiplicaban ópticamente a 30 °C, dando títulos del orden de 1010 U. F. P./ml, teniendo los tres una frecuencia de reversión muy baja (menor de 1×10^{-9}). Los tres fagos conservaban la capacidad transductora, como se deriva de los resultados expuestos en el cuadro 2. Las tres estirpes permiten el aislamiento de transductantes con una frecuencia parecida (del orden de 10⁻⁷). Dicha frecuencia era, por otra parte, mayor si la m. i. se reducia, lo cual sugiere que ninguno está atemperado totalmente a la temperatura restrictiva, pese a su incapacidad de multiplicarse en estas condiciones. La estirpe pf16h2ts-22 daba mayor frecuencia de transducción que otras estirpes cuando la m. i. empleada era 1 y 5, lo cual indica que era menos virulenta que las otras, y por ello fue escogida como la más conveniente para ser utilizada en transducción. Debe advertirse que en las condiciones empleadas en este experimento, es decir, sin tratar previamente el fago con luz ultravioleta y sin emplear suero antifago (2), la estirpe original pf16h2 no permitía en absoluto el aislamiento de transductantes.

Condiciones óptimas para la transducción con el fago pf16h2ts-22

Las frecuencias máximas de transducción obtenidas en el experimento reseñado en el cuadro 2 (semejantes a 2×10^{-7}) eran considerablemente inferiores a las obtenidas por Chackrabarty y colaboradores (2) utilizando la estirpe fágica salvaje en las especiales condiciones descritas por estos autores. Consecuentemente, se realizaron

Cuadro 1. Análisis de la capacidad de crecimiento a 30 °C y de la frecuencia de reversión espontánea de una serie de mutantes termosensibles derivados del tago pf16h2

Mutante	U.F.P./ml de	U.F.P./ml de lisado (*)		
	30 °C	35 °C	reversión (**)	
pf16 h2ts-13	6.0×10^{9}	0	$< 1.6 \times 10^{-9}$	
pf 16 h2ts-14	8.0×10^{9}	0	$< 1.2 \times 10^{-9}$	
pf 16 h2ts_22	$5.0 imes10^{10}$	0	$< 2.0 \times 10^{-10}$	
pf 16 h2 <u>ts</u> -24	1.0×10^{8}	22	2.2×10^{-7}	
pf 16 h 2ts -25	2.0×10^{6}	105	5.2×10^{-5}	
pf16 h2ts-26	1.5×10^{10}	0	$< 6.7 \times 10^{-10}$	
pf 16 h 2ts-3 2	1.5×10^7	51	3.4×10^{-6}	
pf16 h2ts-33	2.0×10^{10}	0	$< 5.0 \times 10^{-10}$	
pf 16 h2ts-34	5.0×10^{9}	0	$< 2.0 \times 10^{-9}$	

^(*) Los fagos se desarrollaron a 30 °C y los lisados se titularon a esta temperatura para ver la capacidad de crecimiento de los mutantes. Se midió también en los lisados el número de unidades capaces de formar placas de lisis a 35 °C (revertientes), utilizando 1 ml de suspensión fágica.

Cuadro 2. Comparación de las frecuencias de transcucción, a distintas multiplicidades de infección, de tres mutantes termosensibles derivados de la estirpe pf16h2

Mutante	Multiplícidad de infección (*)		
	0.5	1,0	5,0
		$(\times 10^{7})$	
pf16 h2 <u>ts</u> -22	1.9	1,8	0,9
pf 16 h 2 ts-26	1,7	0,3	0,3
pf16 h2ts-33	1,7	0.7	0.1

^(*) La infección se llevó a cabo a 35 °C, durante 20 min.

^(**) El cálculo de la frecuencia de reversión en aquellos casos en que no se detectó ninguna placa de lisis a 35 °C se hizo sobre la base de que el número de revertientes/ml era inferior a 10.

auna serie de experiencias destinadas a encontrar las condiciones óptimas en qué llevar a cabo la transducción con el mutante pf16h2ts-22. En primer lugar, se investigaron cuáles eran las condiciones más adecuadas para la infección de la bacteria receptora por el fago: tiempo, temperatura y efecto de varias sustancias señaladas como beneficiosas para la absorción de bacteriófagos. El cuadro 3 muestra la cinética de absorción por PRS1, a 35 °C, del fago pf16h2ts-22 y de la estirpe parental. Bastaban, al parecer, 10 min de infección para conseguir una absorción máxima, al menos del mutante. Cuantitativamente dicha absorción no excedía del 30 %, tanto en el mutante como en la estirpe pf16h2. Puede también observarse en este cuadro que la liberación del fago o final del ciclo lítico de la estirpe salvaje, ocurría entre 30 y 60 min a partir del momento de infección, y que dicha liberación no tenía lugar si se utilizaba pf16h2ts-22, lo cual es lógico dada su incapacidad de

Cuadro 3. Cinética de absorción por P. putida PRS1, a 35°C, dei fago pf16h2ts-22 y de la estirpe original pf16h2

Tiempo de	Número relativ no absorb	· · · · · · ·
min	pf16h2ts-22	pf16h2
0	100	100
10	70	76
20	68	71
30	70	70
60	66	1.400

(*) 1 m! de la suspensión bacteriana (3 × 10° células/ml) en VB desprovisto de succinato, se mezcló con 0.1 ml de lisado (m. i. = 0.5) y la mezcla se incubé a 35°C. A los tiempos indicados se tomaron muestras de 0.05 ml que, añadidas sobre 5 ml de medio PM a 0°C, se agitaron con 0.5 ml de cloroformo y se centrifugaron a 5.000 r/m, durante 5 min, a 2°C. El número de U. F. P. se tituló en los sobrenadantes, siendo la cantidad relativa 100 igual a 1 × 10° U.F.P.

multiplicación a 35 °C. Para averiguar si era posible incrementar la proporción de fagos absorbidos, se varió la naturaleza del medio empleando LB o PM en lugar de VB (medio utilizado en el experimento indicado en el cuadro 3), y se estudió el efecto que tenía en la absorción la adición de iones Ca⁺⁺ (2,5 mM) y Mg⁺⁺ (2,5 mM), y de L-triptófano (10 µg/ml). Ni la variación del medio ni la presencia: de estas sustancias produjeron un efecto positivo en la absorción del fago pf16h2ts-22 por la bacteria PRS1. Por otra parte, dado que la bacteria receptora había sido crecida a 30 °C, se pensó que quizás. podría mejorarse la absorción y, consecuentemente, la frecuencia de transducción, realizando la infección a esta temperatura en lugar de a 35 °C. Aunque era poco probab e que la incubación conjunta de fago y bacteria a la temperatura permisiva condujese a un incremento excesivo y perjudicial de la m. i. por desarrollo de un ciclolítico, ya que el tiempo de absorción empleado era 10 min, y el de la liberación del fago superior a 30 min (cuadro 3), este experimento se realizó estudiando el efecto que tenía la temperatura de infección en la frecuencia de transducción, en lugar de analizar la cinética de absorción a 30 °C. Como puede observarse en el cuadro 4 la frecuencia de transducción mejora un poco (especialmente a m. i, igual a 1) cuando la temperatura de infección era 30 °C.

Cuadro 4. Efecto de la temperatura de infección en la frecuencia de transducción del fago pf16h2ts-22

Temperatur a	Mult	iplicidad de infec	ción
•C	0,5	1,0	5,0
·		(×10 ⁷)	
30	2,0	1,0	0.9
35	1,7	1.2	1,1

Visto que el fago pf16'h2ts-22 segía siendo virulento (cuadro 2), era importante estudiar con detalle el efecto de la m. i. en la frecuencia de transducción. Previsib'emente dicha frecuencia debería mostrar un máximo al irse incrementando la m. i., y una ulterior reducción a m. i. altas al aumentar la posibilidad de que la misma célula absor-

biese a la par partículas transductantes y líticas, impidiendo estasúltimas el desarrollo del transductante. En la figura 1 se representans los resultados de este experimento: puede observarse que la frecuencia máxima de transducción aparece a m. i. entre 0,5 y 3.

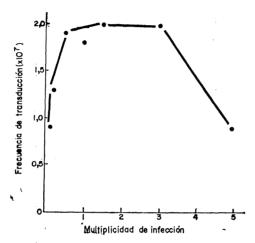


Figura 1. Efecto de la multiplicidad de infección en la frecuencia de transducción del fago pf16hts-22. La infección de las bacterias receptoras se realizó a 30° C

Se estudió también el efecto que tenía en la frecuencia de transducción la irradiación previa del fago con la luz ultravioleta (figura 2). Este experimento se llevó a cabo utilizando tres diferentes, m. i., 0,5, 1,5 y 3, todas ellas adecuadas para dar máximas frecuencias de transducción. Los tratamientos con luz ultravioleta fueron de intensidad variable (distinta duración) produciendo descensos de U. F. P. en los lisados de hasta 10³-10⁴ veces. Los resultados indican que estos tratamientos producían una gran mejora en las frecuencias de transducción, incrementándose en un orden de magnitud (convalores entre 10⁻⁵-10⁻⁶). La intensidad de tratamiento que se requería para conseguir estas frecuencias óptimas variaba según la m. i. empleada. Para m. i. igual a 1,5, el óptimo se alcanzaba con tratamientos entre 30 s y 40 s, que producían un descenso de U. F. P. de 10 a 100 veces. Si se empleaba una m. i. 0,5, la dosis para dar

la máxima frecuencia de transducción era de 50-60 s (descenso de U. F. P. entre 10²-10³ veces). Con la m. i. más alta, 3, se requerían tratamientos a'go superiores (65-80 s), que producían descensos de U. F. P. equivalentes o superiores a 10³ veces.

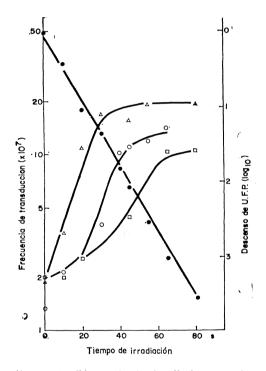


Figura 2. Efecto de la irradiación con luz ultravioleta en la frecuencia de transducción del fago pf16h2ts-22. utilizando distintos m. i. (o:m. i. = 0,5; ∆:m. i. = 1,5; □:m. i. = 3,0). El descenso de U.F.P. producido en los lisados por los tratamientos con luz ultravioleta aparece asimismo (♠). La infección de las bacterias receptoras se realizó a 30°C

De acuerdo con los resultados que se han expuesto, el análisis genético por transducción de *Pseudomonas putida* puede realizarse con mutantes termosensibles del fago pf16h2 con una técnica mucho

más simple que la que requiere la estirpe original, ya que evita el empleo del suero anti-fago. Además, la frecuencia de transducción que se obtiene con el nuevo método es, en general, igual, o incluso superior, a lo que permite el fago pf16h2 [1 × 10⁻⁶: véase (2)]. Estas frecuencias son variables y oscilan generalmente alrededor de 2×10^{-6} , aunque en algunos experimentos se alcanzaron cifras próximas a 10⁻⁵. Las condiciones específicas que permiten las máximas frecuencias de transducción son, de acuerdo con los resultados descritos, las siguientes: irradiación con luz ultravioleta de los lisados del fago termosensible pf16h2ts-22 hasta producir un descenso de U. F. P. entre 10 y 100 veces; infección de la bacteria receptora con estos lisados a una m. i. aproximadamente igual a 1,5 (referida a las U. F. P. del lisado antes de la irradiación), durante 10 min a 30 °C; incubación a 35 °C de las cajas de Petri para aislar los transductantes. Las demás condiciones son inespecíficas y se describen en «Material y Métodos». Debe hacerse notar, finalmente, que aunque en este trabajo sólo se dan datos para la transferencia del alelo edd+ al mutante MAP1, a partir de PRS1, el método ha sido utilizado en este laboratorio (resultados no publicados) para realizar transferencias de diversos genes de distintas rutas metabólicas de P. putida (glucólisis, ruta del β-cetoadipato, rutas degradativas de quinato, nicotinato, etc.). En todos los casos, la eficacia transductora era análoga.

.AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo se ha contado con una ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, III Plan de Desarrollo. Se agradece la colaboración técnica de la Srta. M.ª Dolores Alcaín.

RESUMEN

El análisis genético de *Pseudomonas putida* por transducción, utilizando el fago virulento pf16h2, es laborioso, ya que requiere la preparación previa de suero antifago, sin cuya presencia en el medio ede cultivo es imposible el desarrollo de los transductantes. Se ha

aislado un mutante termosensible de dicho fago, la estirpe pf16h2ts 122, que conserva la capacidad transductora de la estirpe parental y permite el crecimiento de transductantes en ausencia de suero anti-fago, mediante la incubación de los mismos a la temperatura restrictiva para el fago (35 °C). La técnica de transducción con este mutante es, por tanto, bastante más sencilla y en las condiciones óptimas, establecidas asimismo en este trabajo, permite obtener frecuencias de transducción aproximadamente iguales a 2×10^{-6} , alcanzando en casos aislados valores cercanos a 10^{-5} .

SUMMARY

Generalized transduction in Pseudomonas putida with a thermosensitive mutant of phage pf16h2

Genetic analysis of *Pseudomonas putida* by transduction with the virulent phage pf16h2 is rather tedious. It requires previous preparation of serum anti-pf16h2 which has to be added to the culture medium to protect transductants growth. A thermosensitive mutant has been isolated from this phage, strain pf16h2ts-22, with preserved ability to transduce, which allows transductants growth at the phage restrictive temperature (35 °C) in the absence of serum. Under optimal conditions, which have been also stablished in this work, the transduction frequency obtained with this simplified technique was normally about 2×10^{-6} , though in some cases values close to 10^{-5} had been attained.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M. H. 1966. Bacteriophages, 454. John Wiley and Sons Inc., New York.
- 2. CHACKRABARTY, A. M.; GUNSALUS, C. F., and GUNSALUS, I. C. 1968. Transduction and clustering of genes in the fluorescent pseudomonads. Proc. Nat.. Acad. Sci. U. S. A., 60, 168-75.
- 3. Gunsalus, I. C.; Gunsalus, C. F.; Chakrabarty, A. M., and Sikes, S. 1968. Fine structure mapping of the tryptophan genes in *Pseudomonas putida*. Genetics, 60, 419-35.
- 4. Jacob, F., and Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol., 3, 318-56

- 5. Kemp, M. B., and Hegeman, G. D. 1968. Genetic control of the β-ke:oadipate pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 96, 1488-99.
- Leidigh, B. J., and Wheelis, M. L. 1973. Genetic control of histidine in Pseudomonas putida, Mol. Gen. Genet., 120, 201-10.
 Leidigh, B. J., and Wheelis, M. L. 1973. The clustering on the Pseudomonas
- Leidigh, B. J., and Wheelis, M. L. 1973. The clustering on the *Pseudomonas putida* chromosome of genes specifying dissimilatory functions. J. Mol. Evol., 2, 235-42.
- 8. Rovira, A. D., and Sands, D. C., 1971. Fluorescent pseudomonads: a residual component in the soil microflora. J. Appl. Bacteriol., 34, 253-59.
- 9. STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J., and DOUDOROFF, M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol., 43, 159-271.
- TORRONTEGUI, G. DE; Díaz, R.; Wheelis, M. L., and Cánovas. J. L. 1976.
 Supraoperonic clustering of genes specifying glucose dissimilation in *Pseudomonas putida*. Mol. Gen. Genet., 144, 307-11.
- 11. VICENTE, M., and CÁNOVAS, J. L. 1973. Glucolysis in *Pseudomonas putida*: physiological role alternative routes from the analysis of defective mutants. J. Bacteriol., 116, 908-14.
- 12. Wheelis, M. L., and Stainer, R. Y. 1970. The genetic control of dissimilatory pathways in *Pseudomonas putida* Genetics, 66, 245-66.

CRITERIOS DE PATOGENICIDAD EN STAPHY-LOCOCCUS EPIDERMIDIS

por

M. V. BOROBIO (*), R. MARTIN y E. J. PEREA

INTRODUCCION

Desde los trabajos de Fisk, en 1940, se ha adoptado la producción de coagulasa como criterio de patogenicidad del estafilococo. Sin embargo, en ciertas circunstancias, el *Staphylococcus epidermidis* manifiesta un poder patógeno real. Actualmente no se conoce ningún carácter ligado al poder patógeno de estas cepas, por lo que intentamos, en el presente trabajo, obtener una prueba, *in vitro*, relacionada con dicho poder. Para ello hemos realizado un estudio en paralelo de los caracteres bioquímicos, antigénicos, sensibilidad a los antibióticos y a los bacteriófagos de dos grupos de *S. epidermidis*: uno de cepas aisladas como responsables de procesos infecciosos, y otro, testigo, de cepas procedentes de portadores nasales.

MATERIAL Y METODOS

Se han estudiado 93 cepas de *Staphylococcus epidermidis*. 32 de ellas provenían de portadores nasales y, de las 61 restantes, 31 produjeron infecciones en heridas quirúrgicas, 4 procesos respiratorios, 6 endocarditis y 20 infecciones urinarias.

Las cepas fueron aisladas sobre placas de agar-sangre. Su identificación se llevó a cabo siguiendo la metódica de Bergey (3). Se comprobó la ausencia de las dos fracciones de la coagulasa (4).

Microbiol. Españ., 29 (1976), 47.

^(*) Dirección actual: Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla.

Reacciones bioquímicas

Se ha determinado la existencia de una fosfatasa (4), una gelatinasa (9), una ADN-asa (4), capacidad de fermentar el manitol, reducción de nitratos a nitritos, reacción del rojo de metilo (9) y crecimiento en un medio con 4 mg/100 ml de mercurio.

Para establecer la posible relación de estas reacciones se utilizó un computador que clasificó los *Staphylococcus epidermidis* en patrones bioquímicos.

Biotipos de Baird-Parker

Se ha seguido la técnica de dicho autor, basada en: producción de fosfatasa, cuagulasa, acetoína y la fermentación con gas de arabinosa, lactosa, ma'tosa y manitol (1).

Clasificación antigénica

Se utilizaron los sueros 186 y 260 de Pillet y Orta (16) y el 51 de Torres-Pereira (19), siguiendo técnicas de los mencionados autores.

Lisotipia

Se realizó con los 23 fagos del «set» internacional a concentración de 1.000 RTD (14).

Sensibilidad a la novobiocina

Se ha utilizado el método disco-placa con discos de 5 y 10 μg de carga (Difco) (10).

Sensibilidad a otros antibióticos y quimioterápicos

Se comprobó la sensibilidad de las 93 cepas frente a penicilina, cefalotina, cloxacilina, fosfomicina, eritromicina, oleandomicina, estreptomicina, kanamicina, gentamicina, rifampicina, cloranfenicol,

tetraciclina, sulfametoxipiridazina, trimetroprim-sulfametoxazol y furantoína. Se utilizó el método disco-placa con discos de concentración media (11).

RESULTADOS

Correlación de las pruebas bioquímicas

Se expresan en el *cuadro 1*. Observamos que en el grupo testigo, 2 de las 32 cepas recobraron en pases sucesivos la capacidad de producir coagulasa extracelular. Lo mismo sucedió con 9 de las 61 cepas que integran el grupo de infecciones.

Cuadro 1

Origen	Coagulasa	Manitol	ADN-asa	Fosfatasa	Gelatinasa	Nitratos	R-M	Hg 4 0/0	Total
Portadores	$\frac{2}{6,2} \frac{0}{0}$		$\frac{2}{6,2}$ $^{0}/_{0}$						
Infecciones			$^{\circ}$ 14 $^{\circ}$ 23,8 $^{\circ}$ / $_{0}$						

Se obtuvieron diferencias valorables de un grupo a otro en: fermentación del manitol, producción de ADN-asa y licuación de la gelatina, con porcentajes de positividades mayores en el grupo productor de infecciones. Estas propiedades no tienen relación alguna entre sí. Sin embargo, todas las cepas que recobraron la coaguiasa fermentaban el manitol y poseían una fosfatasa y una ADN-asa.

Biotipos de Baird-Parker

Expresamos los resultados obtenidos en el cuadro 2. El biotipo II, habitual saprofito de la piel, es el más frecuente en ambos grupos: 21 en portadores (65 %) y 29 en infecciones (49 %), seguido del V con 7 en portadores (22 %) y 20 en infecciones (34 %).

Infecciones

Hay 4 cepas productoras de endocarditis que corresponden al biotipo IV, siendo éstas las únicas cepas que integran dicho grupo.

Biotipos B-P Origen Ш I П ١V V VI Total 7 21 1 **3**2 Portadores $6,2^{0}/_{0}$ $65^{\,0}/_{0}$ $3,1^{0}/_{0}$ $21,7^{\circ}/_{0}$ 100 º/o

29

49,3 0/0

3

 $5,1^{0}/_{0}$ $6,8^{0}/_{0}$

20

 $34,2^{\circ}/_{0}$ $1,7^{\circ}/_{0}$

61

100 º/o

Cuadro 2

Clasificación antigénica

Utilizando los sueros de Pillet y Orta obtenemos los resultados expresados en el *cuadro 3*. El porcentaje de cepas serotipificables fue del 22 % para el primer grupo, y del 24 % para el segundo.

Con el suero 51 de Torres-Pereira (19) se obtiene ag'utinación en el 12 % de cepas del grupo testigo y 40 % del grupo de infecciones.

Dentro del grupo de infecciones urinarias obtenemos un 56 % decepas serotipificables.

Cuadro 3

			Serotipos		
Origen	P. 186	P. 260	P. $\frac{186}{260}$	T. P. 51	Total
Portadores	2 6,2 °/ ₀	5 15,5 º/ ₀		4 12,4 º/ ₀	32 100 °/ ₀
Infecciones	5 8,5 ⁰ / ₀	4 6,8 º/ ₀	6 10,2 °/ ₀	24 40,8 °/ ₀	61 100 º/o

Los dos sistemas antigénicos no tienen relación alguna entre sí, ni con la clasificación de Baird-Parker.

Lisotipia

Solamente 4 cepas del grupo de portadores fueron lisotipificables. Dos lo fueron simultáneamente por fagos de los grupos I, II y III, y otras dos por fagos de los grupos I y III.

De los *Staphylococcus spidermitis* productores de infecciones, 5 son lisotipificables, 4 de ellos lo son por fagos del grupo III, y 1 por fagos del grupo II.

Resistencia a la novobiocina

Encontramos el 50 % de las cepas del grupo testigo resistentes a dicho antibiótico. En el grupo productor de infecciones hay un 28 %, y, dentro del grupo productor de infecciones urinarias, un 61 % de resistencias (14). Este carácter no tiene relación alguna con las demás propiedades estudiadas.

Resistencia a otros antibióticos

No se observaron Staphylococcus epidermidis resistentes a cefalotina, fosfomicina, cloxacilina, rifampicina y gentamicina. Los resultados en ambos grupos fueron equiparables frente a estreptomicina, eritromicina, sulfametoxipiridazina, trimetroprim-sulfametoxazol y furantoína.

En el cuadro 4 expresamos las diferencias de resistencia obtenidas frente a penicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol, lincomicina y oleandomicina. Hay una mayor resistencia entre las cepas productoras de infecciones. Esta diferencia es más significativa si tenemos en cuenta que las cepas integrantes del grupo de portadores fueron aisladas en personal hospitalario, siendo gérmenes sometidos a una intensa presión de antibióticos.

Cuadro 4

Origen	Penicilina	Tetraciclina	Cloranfenicol	Kanamicina	Lincomicina	Oleandomicina	Total
Portadores	19 59 º/ ₀	12 37 º/ ₀	$\frac{4}{12} {}^{0}/_{0}$	5 16 º/ ₀	0 0 °/ ₀	0 0 º/ ₀	32 100 %
Infecciones	44 71 º/ ₀	43 69 º/ ₀	$13^{\circ}23^{\circ}/_{0}$	33 $53 ^{0}/_{0}$	4 7 º/o	6 10 º/ ₀	62 100 º/ ₀

DISCUSION

Es evidente que, en ciertos procesos el Staphylococcus epidermidis desarrolla un poder patógeno real, aunque en la mayoría de los casos desempeñe un papel saprofito. Estos hechos dificultan la interpretación correcta cuando se aisla una cepa de S. epidermidis, ya que actualmente no se conoce un marcador capaz de diferenciar las cepas potencialmente patógenas de las no patógenas. Esto, siempre que nos basemos en la hipótesis de que la infección se debe más al poder patógeno de la cepa que a un fallo en el mecanismo defensivo del individuo.

El Manual de Bergey (3) establece que los caracteres distintivos de *Staphylococcus aureus* sen la producción de coagu¹asa y la fermentación de glucosa y manitol en anaerobiosis.

Evans (5) encuentra que un 4 % de *Staphylococcus epidermidis* fermenta el manitol. Mossel (13) obtiene un 5 % de esas cepas. Nosotros hemos obtenido una sola cepa de las 93 estudiadas.

La producción de ADN-asa la posee un determinado número de Staphylococcus epidermidis (12). Encontramos esta enzima en un 6 % de las cepas procedentes de portadores y en un 24 % de las del grupo productor de infecciones. Diferencia que es casi significativa.

En el grupo de portadores hay un 77 % de cepas productoras de fosfatasa ácida, mientras que en el otro grupo son el 63 %. Estos resultados concuerdan con diversos autores (2).

Patrones bioquímicos

Basán donos en el resultado de las pruebas bioquímicas y utilizando un computador se han obtenido 34 patrones diferentes de los 256 posibles, ya que se trata de variaciones con repetición de 8 elementos. En el grupo de *Staphylococcus epidermidis* productores de infección hay 29 patrones diferentes, 11 de los cuales se repiten en el grupo de portadores. Considerando que a 63 cepas corresponden 29 patrones diferentes, debemos concluir que la gran heterogeneidad de las reacciones bioquímicas de las cepas de *S. epidermidis* impide establecer ninguna relación entre éstas y el poder patógeno del germen estudiado.

El grupo de portadores, integrado por 32 cepas, se clasifica en 15 patrones diferentes, siendo, por lo tanto, tan heterogéneo como el anterior.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Quinn y colaboradores (18) al estudiar *Staphylococcus epidermidis* de tres orígenes diferentes: portadores nasales, heridas quirúrgicas y bacterihemias

Clasificación de Baird-Parker

Tampoco aporta resultados diferentes de un grupo a otro, ya que el biotipo II es el más frecuente en ambos, seguido del V.

Antigenos de superficie

Pillet y Orta (16) obtienen hasta un 45 % de cepas serotipificables. Nuestros resultados son de un 21 % para el grupo de portadores, y un 24 % para el productor de infecciones.

Torres-Pereira (19) encuentra que todos los Staphylococcus epidermidis productores de infección urinaria poseen el antígeno 51. Observó asimismo que estas cepas eran resistentes a la novobiocina, sin excepción. Nosotros obtenemos un 12 % de serotipificables

en el grupo testigo, y un 39 % en el de infecciones, porcentaje que se eleva a 56 en el grupo de infecciones urinarias (15). En dicho grupo hubo un 61 % de cepas resistentes a la novobiocina, carácter que no coincide con las serotipificables.

Lisotipia

Obtuvimos un 12 % de positividades en el grupo testigo, y un 8 % en el de infecciones. Estos resultados concuerdan con los de Pulverer (17), del 7 % de lisotipificables.

Resistencia a la novobiocina

Àparte de lo anteriormente expuesto, hay un porcentaje mayor de *Staphylococcus epidermidis* resistente a dicho antibiótico en el grupo testigo, 50 %, que en el productor de infecciones.

Resistencia a otros antibióticos

La diferencia de sensibilidad en ambos grupos, como muestra el cuadro 4, es notable frente a penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, lincomicina y oleandomicina, pues las cepas productoras de infección mostraron una mayor resistencia que las de portadores, a pesar de estar éstas sometidas a la presión selectiva de antibióticos del ambiente hospitalario. Es, pues, este marcador posiblemente el más constante, aunque poco válido, para diferenciar ambos grupos (6).

Finalmente, podemos concluir que no encontramos diferencia significativa en los resultados obtenidos en ambos grupos. Posiblemente se encuentre una prueba capaz de ser un marcador de patogenicidad dentro de los Staphylococus epidermidis, aunque hoy, y ante los resultados obtenidos, opinemos que debemos cambiar la hipótesis de la que partimos, y sea debido a un fallo en el mecanismo defensivo del individuo y no a una especial patogenicidad de la cepa, el proceso infeccioso en el que participa un S. epidermidis.

RESUMEN

Se describe un estudio comparativo de los caracteres bioquímicos, antigénicos, de sensibilidad a los bacteriófagos y de resistencia a antibióticos entre un grupo de Staphylococcus epidermidis aislados en diversas infecciones y un grupo testigo de S. epidermidis procedentes de portadores nasales. Se determinan en ambos grupos como caracteres de patrogenicidad, junto con la fracción exocelular de la coagulasa, una desoxirribonucleasa, fosfatasa, hidrólisis de la gelatina, fermentación del manitol y crecimiento en un medio con una concentración en sa es de mercurio de 4 mg/100 ml. Para establecer la posible relación de estas reacciones reacciones se utilizó un computador que clasificó a los S. epidermidis en patrones bioquímicos.

En ambos grupos, siguiendo la clasificación de Baird-Parker, el biotipo más frecuente es el II, seguido del V.

El estudio de los antígenos de superficie no mostró diferencias significativas de un grupo a otro.

La sensibilidad a los bacteriófagos fue similar en ambos grupos. Hay una mayor resistencia a la novobiocina en el grupo testigo que en el productor de infecciones.

Existe una mayor resistencia a los siguientes antibióticos: penicilina, cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, lincomicina y oleandomicina en las cepas productoras de infecciones.

SUMMARY

Studies on pathogenicity in Staphylococcus epidermidis

This is a comparative study between various strains of Staphyjococcus epidermidis isolated in different infections and a control
group made up of staphylococci from nasal secretions. Both groups
were studied with respect to their pathogenicity, the exocellular fraction of coagulase, deoxyribonuclease, phosphatase, gelatin hydrolysis, mannitol fermentation and growth in a medium having a mercury salt concentration of 4 mg/100 ml. A computer was used to

relate these reactions. The S. epidermidis were classified into biochemical groups: in the infection producing group there were 29 differents groups while in the control group there were 15.

The classification was according to Baird-Parker biotypes. The most frequent biotype in both group was II, followed by V.

We didn't find a significant difference between eather group with Pillet and Orta serum 186 and 260, and Torres-Pereira 51 serum.

With the 23 phages from the international set for Staphylococcus aureus we obtained a 12 % and 8 % of lysotipes respectively.

There was a greater resistence to novobiocin in the control group (50 %) than in the infection producing group (28 %).

There was a greater resistance to penicillin, tetraciclyne, kanamycin, chloramphenicol, lincomycin and oleandomycin in the infection producing strains.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Baird-Parker, A. C. 1963. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. J. Gen. Microbiol., 30, 409-27.
- Bal, A.; Skula, B. R. and Nema, H. U. 1965. Phosphatase reaction of staphylococci isolated from ocular lesions. Indian J. Med. Sci. ,45, 409.
- 3. Breed, R.; Murray, E. G. D., and Smith, N. R. 1973. Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Company.
- 4. Buttiaux, R.; Beerens, H., and Tacquet, A. 1968. Manuel de Techniques-Bacteriologiques. Ed. M. Flammarion, París.
- Evans, J. B. 1968. Anaerobic fermentation of mannitol by staphlococci. J. Bacteriol, 88, 793-800.
- 6 FLEURETTE, J., and BRUN, Y. 1972. Caracteres biochimiques et antigeniques des Staphylococcus epidermidis. Ann. Inst. Pasteur, 123, 783-98.
- Green, S. M. 1962. Staphylococci and their classification. J. Clin. Pathol., 15, 249-53.
- HOLT, R. J. 1971. The colonisation of ventriculo-atrial shunts by coagulase negative Staphylococcus. Bayer Symposium III. Springer-Verlag, Berlin.
- Le Minor, L. 1972. Le Diagnostic de Laboratoire des Bacilles à Gram negatif.
 Ed. La Tourelle, Paris.
- MITCHELL, R. G., and BAIRD-PARKER, A. C. 1967. Novobiocin resistance and the classification of sptaphylococci and micrococci. J. Appl. Bacteriol., 30, 251-54.
- 11. Moreno-López, M.; Coracho, A.; Dámaso, D.; Perea, E. J., and Santos, M.
 1969. Uso y abuso de los antibióticos. Epidemiología en la Clínica «Puerta

- de Hierro». I Simposio Internacional de Antibióticos y Medicina Hospitalaria. Monografías Beecham, núm. 1, Madrid.
- Мокток Н. Е., and Сонок, J. 1972. Coagulase and deoxyribonuclease activities of Staphylococcus isolated from clinical sources. Appl. Microbiol., 23, 725-33.
- Mossel, D. A.: 1962. Attempt in classification of catalase positive staphylococci and micrococci. J. Bacteriol., 84, 1140-47.
- Perea, E. J. 1971. Epidemiología de las infecciones por estafilococo. Rev. Sanid. Hig. Pub., 45, 701-23.
- Perea, E. J.; Borobio, M. V.; Martín, R.; Dámaso, D., y Moreno-López, M. 1974. Infecciones del aparato urinario por Staphylococcus epidermidis. Simposio sobre Infecciones del Aparato Urinario. Ed. Salvat, Barcelona.
- PILLET, J., and ORTA, B. 1970. Recherche sur l'analyse sèrologique des staphylocoques coagulase négatifs. Etude de deux sérotypes. Ann. Inst. Pasteur., 119, 193-205.
- 17. Pulverer, G., and Pillich, J. 1971. Pathogenic significance of coagulase negative staphylococci. Bayer Symposium III. Springer-Verlag, Berlin.
- Quinn, E. L.; Cox, F., and Fisher, M. 1965. The problem of associating coagulase-negative staphylococci with disease. Ann. N. Y. Acad. Sci., 128, 428-31.
- TORRES-PEREIRA, A. 1962. Coagulase-negative strains of Staphylococcus possesing antigen 51 as agents of urinary infection. J. Clin. Pathol., 15, 252-53.

FACULTAD DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELÔNA DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ANALISIS NUMERICO DE UN GRUPO DE *PSEU- DOMONAS* AEROBICOS

por

EMILIA CANTON y J. SANCHO

I) INTRODUCCION

En los últimos tiempos ha existido una marcada tendencia a reagrupar las múltiples especies descritas de *Pseudomonas* en grupos más compactos y significativos (3-4, 9 y 11). Dentro de los *Pseudomonas* aeróbicos, uno de los intentos de agrupación más coherentes, ha sido el de Stanier y colaboradores (1, 14, 16 y 23), que ha sido la base para la descripción del género en la 8.ª edición del Bergey's Manual.

El objetivo del presente trabajo es someter a uno de los grupos de esta clasificación (Bergey's Manual, género *Pseudomonas*, sección I) a los métodos de la taxonomía numérica y comprobar la consistencia del grupo frente a los distintos sistemas de análisis.

Se han utilizado biotipos de este grupo, en principio, por su facilidad de obtención, pero sobre todo, porque este conjunto presenta una mayor diversificación interna. El único criterio restrictivo que se ha aplicado ha sido que su origen fuera distinto al hospitalario.

II) MATERIAL Y METODOS

II.1) Cepas

Las cepas utilizadas en el presente trabajo, así como su origen, se presentan en el cuadro 1, en el que, además, se ofrece la clasificación convencional cuando ello es posible, es decir, cuando difieren

Microbiol, Españ., 29 (1976), 59.

Cuadro 1. Designación y origen de las cepas empleadas en el estudio

Numeración en el e studio	Designación original	Origen del aislamiento	Clasificación convencional
1	A	Champú	Pseudomonas fluorescens
2	В	Emulsión dermato!ógica	Ps. putida
3	C	Champú	Ps. fluorescens
4	D	Champú	Ps. fluorescens
5	E	Champú	Ps. putida
6	F	Emulsión dermatológica	Ps. fluorescens
7	G	Contaminante en sorbitol	Ps. fluorescens
8	I	Champú	Ps. aeruginosa
9	K	Cuero cabelludo	Ps. stutzeri
10	Q	Estuches de cartón	
11	≅ R	Envases plástico	•
12	Hc	Champú	Ps. aeruginosa
13	110	Embutido curado	Ps. fluorescens
14	PS-1	Embutido curado	
15	PS-2	Embutido curado	Ps. putida
16	PS-3	Embutido curado	
17	PS-4	Embutido curado	
18	PS-5	Embutido curado	
19	PS-6	Manipulados farmacéuticos	Ps. aeruginosa
20	PS-7	Embutido curado	Ps. putida
21	PS-8	Contaminante colorante	Ps. aeruginosa
22	PS-9	Contaminante colorante	Ps. aeruginosa
23	PS-10	Contaminante colorante	Ps. aeruginosa
24	PS-11	Manipulados farmacéuticos	
25	PS-12	Manipulados farmacéuticos	Ps. aeruginosa
26	PS-13	Manipulados farmacéuticos	Ps. aeruginosa
27	PS-14	Manipulados farmacéuticos	Ps. aeruginosa
28	PS-16	Manipulados farmacéuticos	J
29	PS-17	Manipulados farmacéuticos	
30	PS-19	Manipulados farmacéuticos	Ps. aeruginosa
31	PS-20	Manipulados farmacéuticos	G
32	PS-21	Manipulados farmacéuticos	
33	PS-23	Manipulados farmacéuticos	Ps. aeruginosa
34	PS-25	Agua de pozo	Ps. aeruginosa
35	PS-26	Agua de pozo	7
36	PS-27	Champú Champú	Ps. fluorescens
37	PS-28	Champú	Ps. fluorescens
38	PS-29	Champú	Ps. fluorescens
56	F 55-28	Champu	1 3. 1. 1. 10. 10. 10. 10. 10. 10. 10. 10.

39	PS-33	Agua desionizada	Ps. fluorescens
40	PS-34	Manipulados farmacéuticos	Ps. aeruginosa
41	PS-36	Manipulados farmacéuticos	Ps. aeruginosa
42	PS-43	Suelo de viñedo	Ps. aureofaciens
43	PS-44	Suelo de viñedo	Ps. aureofaciens
44	PS-45	Champú	
45	PS-47	Champú	Aeromonas sp
46	PS-48	Desconocido	Ps. fluorescens
-47	PS-49	Desconocido	Ps. fluorescens
48	PS-50	Desconocido	Ps. fluorescens
49	Ps. azot	Suelo de jardín	Ps. azotogensis
50	Alc. fec.	Desconocido	Alcaligenes faecalis
51	Alc. fec. A	ATCC	Alc. faecalis
52	núm. 1	Manipulado farmacéutico	Ps. aeruginosa
53	2G	Manipulado farmacéutico	
54	$\mathrm{MP} ext{-}22$	Champú	
55	MP-32	Champú	
56	MP-82	Champú	
57	B-21	Emulsión dermatológica	
		-	

poco de las descripciones válidas. Cuando no se da clasificación, se sobreentiende que pertenecen al género *Pseudomonas*, sin especificar. Las cepas se han mantenido por reproducción vegetativa subcuttivándose cada 15 días sobre agar nutritivo (Oxoid) y se han conservado a 4 °C.

II.2) Métodos de ensayo

Todas las pruebas se han realizado a 30 °C, inoculándose a partir de un cultivo de 24 h en agar inclinado. La inoculación en medios líquidos se ha hecho a partir de una suspensión de células jóvenes, de forma que cada medio ensayado recibiera 10⁵-10⁶ células viables. Para el estudio de los substratos oxidables se ha utilizado el medio mineral M, con la siguiente composición: ClNH₄, 7 g/l; SO₄Mg. 7 H₂O, 0,5 g/l; PO₄H₂K, 1 g/l; pH final, 7,0. El substrato oxidable se añade, esterilizado por filtración, a una concentración final del 1 % (p/v). La pigmentación se ha puesto de manifiesto con los medios de King. El método de Haynes (6) se ha aplicado para la producción del ácido 2-ceto-glutárico. Para la reducción de nitra-

tos se ha utilizado el medio de Merck, detectando NO₂⁻ y NO₃⁻ residual a las 24 h, 3 y 7 días. La desnitrificación se ha comprobado según la metodología de Stanier y colaboradores (23), a los que se ha seguido también para los estudios de factores de crecimiento e hidrólisis, excepto para la arginina, para la cual se ha utilizado la técnica de Thorn'ey (24).

En el cuadro 2 se adjunta la lista completa de los caracteres estudiados.

Cuadro 2. Características estudiadas para llevar a cabo el análisis discriminante

Fue	ntes de C y E	Inhibidores del crecimiento	
1. 2.	Glucosa Manitol	24. Cetrimide 1 por 100 25. Cetrimide 0,1 por 100	
3. 4. 5.	Xilosa Rafinosa Celobiosa	26. Cetrimide 0,03 por 100 27. Sulfato de cadmio 2 por 100 28. Sales biliares	
6. 7. 8.	Leucina Malonato Succinato		
9.	Triptófano	Factores de crecimiento	
10. 11.	Alanina Etanol	29. Metionina	
12. 13.			
14. 15.	Geraniol Etilenglicol	Otras pruebas	
16.	Arginina	30. Producción de 2-cetoglutarato 31. Reducción de nitratos	,
Hid	rolasas	32. Desnitrificación	
17.	Almidón	33. Motilidad	
18.	•	34. Producción de indol	
19.		35. Voges-Proskauer	
20.	0	 Sensibilidad a la penicilina (5 l disco) 	J. [./*
Ten	nperaturas de crecimiento	37. Oxidasa	
21.	45 °C	38. Producción de piocianina	
22.	4 °C	39. Producción de fluoresceína	
23.	37 ℃		

II.3) Codificación de resultados para el cómputo

Todos los resultados obtenidos en las distintas pruebas se han codificado en forma binaria 1 ó 0, para presencia o ausencia, respectivamente. Dado que no existen características cuantitativas en el estudio, no se ha realizado ningún escalado. Los caracteres no comparables, por ser mutuamente excluyentes, se han codificado para la «no comparación». Antes de proceder al cómputo, se ha realizado un análisis de correlación y se han eliminado todas aquellas características correlacionadas que no aportaban información y producían interferencias en la nitidez de resultados.

II.4) Cómputo

Todos los cálculos realizados se han hecho a partir del programa MINT, de Roh'f (19), convenientemente modificado por Solé y Cuadras para adaptarlo al ordenador IBM 360/30 del Laboratorio de Cálculo de la Universidad.

La estima de similaridades se ha hecho con el coeficiente de Jaccard (20) y a partir de ellas se han llevado a cabo los distintos análisis discriminantes. La agrupación se ha calculado según la técnica UPGMA (22). Siguiendo la teoría de Sokal y Sneath (21), se ha comprobado la agrupación primaria con otras técnicas de ordenación: se ha llevado a cabo un análisis de las coordenadas principales, por el método de Gower (5), y se ha planteado la red de mínima conexión, según las técnicas de Kruskal (10) y Prim (18).

III) RESULTADOS

Los resultados del cómputo de similaridades se exponen en la matriz simétrica de la figura 1. En esta matriz las similaridades se han reordenado con el fin de ofrecer grupos conspicuos, en función de sus semejanzas.

La ordenación de la matriz de similaridades se ha hecho de acuerdo con la secuencia ofrecida por el dendrograma de la figura 2, que

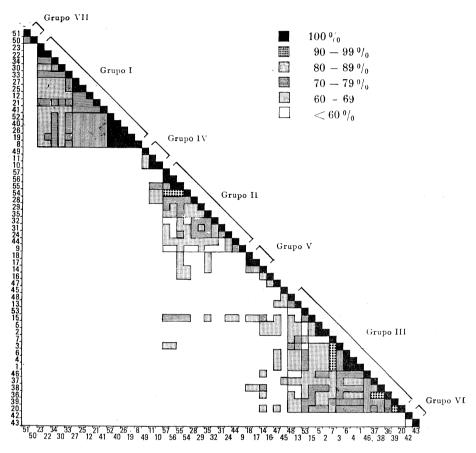


Figura 1. Matriz de similaridades calculadas por el coeficiente de Jaccard

es la representación gráfica de la agrupación obtenida según la técnica de los promedios no equilibrados UPGMA.

En la figura 3 se muestran, de forma aproximada, los resultados que se obtienen al establecer la ordenación de las cepas, según la técnica de Kruskal y Prim, basada en la teoría de grafos. Esta presentación sólo es aproximada, ya que las distancias reales de las conexiones entre las distintas cepas no se han mantenido en el dibujo, dado que para ello es necesario una representación en tres dimen-

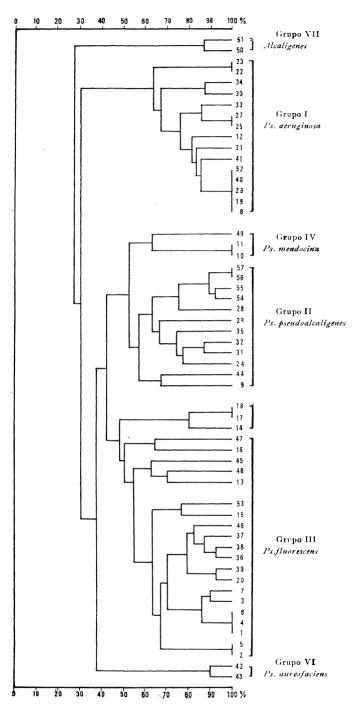


Figura 2. Dendrograma obtenido sobre las similaridades de la figura 1 por la técnica de agrupación UPGMA. Coeficiente de correlación, 0,96

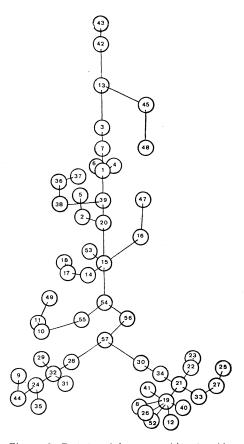


Figura 3. Red de mínima conexión obtenida aplicando los métodos de Kruskal y Prim. Las longitudes de las conexiones no son las reales, pero guardan las proporciones aproximadas

siones. En parte, esta malla tridimensional se reproduce sobre la figura 4, que refleja la distribución espacial que se obtiene con los resultados del aná isis de coordenadas principales, según la técnica de Gower.

En esta representación se ofrecen los grupos sobre los tres primeros ejes, que son los que reflejan mejor la distribución del espacio mu'tidimensional.

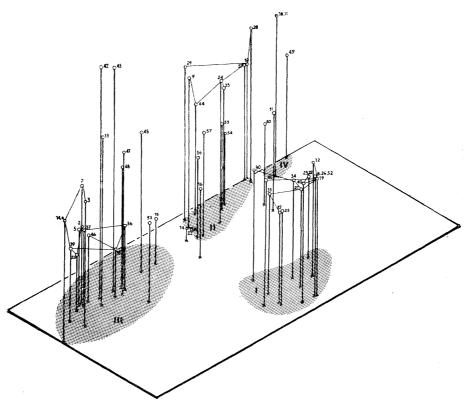


Figura 4. Distribución espacial de las cepas estudiadas según las coordenadas principales de Gower. El sombreado de las bases marca los grupos principales de la figura 1. En ellos, además, se ha representado barte de la red de la figura 3

IV) DISCUSION

Dentro del grupo de *Pseudomonas* estudiado se pueden establecer unas diferencias conspicuas, aunque todos ellos están intimamente relacionados.

Según los resultados de los cuatro tipos de distribuciones que se han realizado se pueden distinguir 3 grupos principales, y otros 4 que representan tipos de transición entre estos tres primeros, o quizás con otros géneros.

Grupo I

Este es el grupo más compacto en cualquiera de los métodos ensayados y, prácticamente, su distribución interna es coincidente en todos ellos. Algunas de las cepas que lo integran coinciden al 100 %, y su semejanza promedio es superior al 80 %. Las diferencias en las características convencionales son mínimas, y en ningún caso permiten una identificación dudosa, auque sí parece que se puedan hacer dos subgrupos dentro de él.

El primero de los subgrupos es muy compacto e incluye las cepas 8, 12, 19, 26, 40, 41 y 52, que prácticamente son idénticas.

El otro subgrupo lo integran las cepas 22. 23, 25, 27, 30 y 34. La conexión entre estos dos subgrupos son las cepas 21 y 33, que parecen participar por igual de los dos tipos. Esto es especialmente aparente en la red de mínima conexión y en la representación de las coordenadas principales. Todas las cepas de este grupo se identifican convencionalmente y de forma unívoca con la especie Pseudomonas aeruginosa.

Grupo II

Este grupo está constituido por un conjunto de cepas de dificil clasificación por métodos convencionales. Las cepas comprendidas en este grupo no se identifican verdaderamente con ninguna de las descripciones convencionales, aunque tienen relaciones muy próximas con otras especies no fluorescentes como Pseudomonas stutzeri (25) e incluso con otras que en estas distribuciones dan la transición a otros grupos, como es el caso de Ps. mendocina (16).

Aunque lo anteriormente expuesto queda especialmente patente en la distribución de similaridades, y la agrupación promedio no equilibrada, en la red de mínima conexión este grupo aparece casi inconexo, o mejor, como dos líneas finales relacionadas con el resto de las cepas estudiadas únicamente a través de los biotipos 54 y 57, respectivamente. En cambio, en la distribución por coordenadas principales, este grupo parece alcanzar su verdadera situación, ya que a pesar de su aparente dispersión y diversificación establece una

transición gradual entre las otras formas mejor agrupadas del conjunto que se ha estudiado.

Grupo III

En este tercer grupo, la homogeneidad de características es casi comparable a la del grupo I, pero, en cambio, el porcentaje de similaridad intragrupal es menor que en aquél, como puede observarse en la figura 1. Es un grupo de interrelaciones muy aparentes, pero no tan compacto como aquél, y esto se hace evidente en el dendrograma o en la red de mínima conexión, donde puede observarse que está constituido por pequeños grupos muy relacionados y próximos entre sí.

Si bien en la matriz de similaridades o en el árbol de conexiones no se manifiesta claramente, es fácil observar que, tanto en el dendrograma, como en la distribución por coordenadas principales, se pueden distinguir dos subgrupos, el constituido por las cepas 20, 37, 38, 39 y 46, que se identifica plenamente con la especie convencional de *Pseudomonas putida* (2), que en la distribución por coordenadas principales viene determinado por su altura, ya que su situación es muy semejante a las otras cepas; éstas constituyen el segundo subgrupo del grupo fluorescens.

Grupos IV, V, VI y VII

Aparte de estos tres grupos mayoritarios que se han discutido, se pueden apreciar otros grupos bien definidos, que aparecen marcados en la matriz de similaridades de la figura 1.

El grupo IV está constituido por 3 cepas que no presentan relaciones claras con ningún otro grupo del estudio y que, siguiendo los métodos convencionales, se pueden atribuir a la especie *Pseudo*monas mendocina.

Las cepas 14, 17 y 18 forman un pequeño grupo muy compacto y no son adjudicables a ninguna de las especies descritas de forma convencional. En el árbol de conexiones aparecen más relacionadas con el grupo III que con el II, al que por su situación en la matriz

de similaridad y en la distribución de Gower deberían incluirse. No obstante, en esta última se separan perfectamente por su escasa altura.

Basándose en estos datos, podría pretenderse hacer una separación específica con estos biotipos, pero esto es quizá prematuro, ya que con un conjunto mayor de cepas se podrían establecer relaciones más claras con cepas de alguna especie definida.

Las cepas 16, 45, 47 y 48 no parecen llegar a formar grupo en ninguna de las cuatro distribuciones ensayadas, y deben interpretarse como verdaderos tipos intermedios, o cepas ais'adas de un grupo no definido por falta de OTO'S, ya que únicamente quedan incluidos dentro del grupo fluorescens en la agrupación UPGMA, mientras que en los demás quedan siempre muy separados de todos los biotipos. Quizá representen el nexo que une a uno de los grupos menos relacionados, el grupo VI, con todos los demás, con los que aparentemente no presenta ninguna conexión.

Este grupo, casi aislado, está constituido por 2 cepas: las 42 y 43, que convencionalmente se identifican como *Pseudomonas aureofaciens* (8).

El grupo VII, que aparece totalmente aislado en todas las distribuciones realizadas, está constituido por 2 únicas cepas que se identifican como pertenecientes al género Aicaligenes, lo cual justifica ya su aislamiento.

V) CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que las cuatro técnicas de análisis discriminante utilizadas son perfectamente concordantes y, no sólo no presentan discrepancias notables, sino que su utilización conjunta permite una mejor comprención del grupo en estudio.

No es posible obtener conclusiones taxonómicas de los resultados, ya que tanto el número de cepas como el de características es insuficientes para ello. No obstante, si se supone que la colección estudiada es una muestra representativa del conjunto comprendido en la sección I del género *Pseudomonas* de la 8.ª edición del Bergey's Manual, la distribución que los métodos numéricos ofrecen de las

cepas está de acuerdo con la separación específica allí ofrecida, corroborando los comentarios específicos relativos a la dificultad de separar algunas especies sin realizar gran cantidad de ensayos.

La distribución taxonómica que se ha encontrado al comparar los resultados de los distintos análisis numéricos, a grandes rasgos, es también concordante con la del porcentaje de G + C de las diferentes especies, consiguiéndose una neta separación entre las dos especies principales, Pseudomonas aeruginosa (67 %) y Ps. fluorescens (59-61 %), pero, en cambio, las diferencias entre las especies con porcentajes comprendidos entre estos dos valores no quedan tan claramente definidas.

VI) RESUMEN

Sobre un conjunto de 57 Pseudomonas no hospitalarios, que, en sentido amplio, pueden considerarse del grupo fluorescente, se ha realizado un análisis taxonómico por cuatro técnicas numéricas diferentes.

La distribución obtenida en cada caso es concordante con las demás, y la comparación de todas permite una mejor comprensión de los resultados y de las posibles relaciones entre los diferentes grupos que se establecen, que además están de acuerdo con la distribución específica que se establece en la sección I del género *Pseudomonas* de la 8.ª edición del Bergey's Manual.

VII) SUMMARY

Numerical taxonomy of a group of aerobic Pseudomonas

An adansonian analysis is performed over a set of 57 strains of *Pseudomonas* from other than hospitalary sources. All these strains belong *sensu lato* to fluorescent group. The results are obtained through four different numerical techniques, and the four distributions are concordants. The comparison of the results furnishes a best knowledge of the internal ordination of the group and its relationships. The grupal distribution of these strains agrees with the specific arrangement of the Section I in the genus *Pseudomonas* of Bergey's Manual, eigth edition (1974).

VIII) BIBLIOGRAFIA

- 1. Ballard, R. W.; Doudoroff, M., and Stanier, R. Y. 1970. Taxonomy of the aerobic pseudomonads. J. Gen. Micrebiol., 60, 199-214.
- 2. Blazevic, D. J., and Koepcke M. H. 1973. Incidence and identification of Ps. fluorescens and Ps. putida in the clinical laboratory. Appl. Microbiol., 25, 107-10.
- COLWELL, R. R., and LISTON, J. 1961. Taxonomic relationships among the pseudomonads. J. Bacteriol., 82, 1-23.
- GABY, W. L. 1955. Taxonomic problems relating to the identification of species within the genus *Pseudomonas*. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., 5, 153-60.
- 5. GOWER, J. C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. Biometrika, 53, 325-38.
- HAYNES, W. C. 1951. J. Gen. Microbiol., 5, 939-50. Cit. Abstr. Microbiol., Methods., 1969.
- Hill, I., R. 1966. An index to DNA base composition of bacterial species.
 J. Gen. Microbiol., 44, 419-37.
- 8. KLUYVER, A. S. 1956. Ps. aureofaciens nov. sp. and its pigments, J. Bacteriol,, 72, 406.
- 9. Koontz, F. P., and Faber, J. 1963. A taxonomic study of some Gram negative non fermentative bacteria. Can. J. Microbiol., 9, 499
- KRUSKAL, J. B. 1956. On the shortest spanning subtree of a graph and the travelling salesman problem. Proc. Amer. Math. Soc., 7, 48-50.
- 11. LAY, J. DE. 1964. Pseudomonas and related genera. Ann. Rev. Microbiol., 18, 17-46.
- 12 Mandel, M. 1966. DNA base composition in the genus Pseudomonas. J. Gen. Microbiol., 43, 273.
- 13. Moore, H. B., and Pickett, J. B. 1960. The Pseudomonas-Achromobacter group. Can. J. Microbiol., 6, 35-42.
- 14. Palleroni, N. J.; Doudoroff, M.; Stanier, R. Y., and Solanes, R. E. 1970,
 Taxonomy of the aerobic pseudomonads. J. Gen. Microbiol., 60, 215-31.
- 15. Palleroni, N. J.; Ballard, R. W.; Ralston, E., and Doudorgef, M. 1972.

 DNA homologies among some *Pseudomonas*. J. Bacteriol., 110, 1-11.
- Palleroni, N. J., and Doudoroff, M. 1972. Some properties and taxonomic subdivision of the genus *Pseudomonas*. Ann. Rev. Phytopathol., 10, 73-100.
- 17. Palleroni, N. J.; Kunisawa, R., and Doudoroff, M. 1973. DNA homologies in the genus *Pseudomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 333-39.
- Prim, R. C. 1957. Shortest conection networks and some generalitzations. Bell. Syst. Tech. J., 36, 1389-401.
- 19. ROHLF, F. J.; KISHPAUGH, J., and KIRK, D. 1971. NT-SYS: Numerical Taxonomy System of Multivariate Statistical Program. N. Y. State Univ. Tech. Rep.

- 20. Sneath, P. H. A. 1957. Some thoughts on bacterial classification. J. Gen. Microbiol., 17, 184-200
- 21. Sneath, P. H. A., and Sokal, R. R. 1973. Numerical Taxonomy, Chp., 5, 251. W. H. Freeman Co., San Francisco.
- 22. Sokal, R. R., and Michener, C. D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Kans. State Univ. Sci. Bull., 38, 1409-38.
- 23. STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J. and DOUDOROFF, M. 1966. The aerobic-pseudomonads: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol., 43, 159-271.
- THORNLEY, M. J. 1960. Differentiation of pseudomonads from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bacteriol., 23, 37.
- 25. Van Niel, C. B., and Allen, H. B. 1952. A note on *Ps. stutzeri*. J, Bacteriol., 64, 413

FACULTAD DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

INHIBICION EN EL CRECIMIENTO DE *C. INTER-MEDIUM* C₃ Y OTROS MICROORGANISMOS POR FACTORES SOLUBLES EXCRETADOS AL MEDIO

por

M. LLORET y R. CLOTET

INTRODUCCION

Ha sido descrito previamente (3) que en la cepa C₃ de Citrobacter intermedium, al desarrollarse en medios con nitrógeno inorgánico, un aumento de inóculo lleva consigo una disminución en la velocidad de multiplicación, siguiendo una función definida. El hecho de haber encontrado inhibición del crecimiento al adicionar al cultivo pequeñas cantidades de medio filtrado en el que previamente se incubó un número elevado de células, llevó a formular la hipótesis de que el menor crecimiento era debido a la presencia de un factor inhibidor en el medio, segregado por la propia cepa bacteriana y cuya formación es dependiente del número de células presentes en el medio.

Esta interpretación aporta un dato en favor de la hipótesis, ya sostenida por diversos autores, de considerar la influencia del número de células presentes en un momento dado como un factor importante en la limitación del crecimiento, con independencia de los factores clásicos de agotamiento del substrato y de acumu'ación de productos catabólicos que incrementan la velocidad de muerte. Han sido realizados diversos estudios sobre la acción de sustancias autoinhibidoras en el crecimiento (5 y 13). Su mecanismo puede estar ligado a la inhibición de ciertas vías bioquímicas por metabolitos del propio desarrollo: productos derivados del ciclo de Krebs (6 y 8), dipéptidos (14), aminoácidos (7 y 11).

En el presente trabajo se estudia la problemática del efecto inhi-

'Microbiol. Españ, 29 (1976), 75.

bidor observado en Citrobacter intermedium C₃ dentro del contexto general del metabolismo bacteriano, intentando esclarecer si los hechos descritos en el citado microorganismo son específicos o constituyen aspectos de una problemática general, y profundizar en la identidad química del metabolito o metabolitos responsables de la inhibición.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de medio con efecto inhibidor

De un agar M₁ inclinado se extrae con líquido de Ringer 1/4 (2 ml), después de 24 h de incubación a 30 °C, el crecimiento de Citrobacter intermedium C₃ u otro microorganismo, y se inocula un frasco de Roux previamente preparado con 100 ml de agar M₁. El frasco se incuba a 30 °C durante 96 h. Transcurrido este tiempo se suspende el crecimiento con 100 ml de líquido de Ringer 1/4; 5 ml de esta suspensión bacteriana densa se adicionan a tubos que contienen 5 ml de medio M₁ líquido doble concentrado y se incuban a 30 °C agitando cada 12 h. A las 72 h de incubación se separan las células del medio por centrifugación a 4.500 r/m y filtración a través de filtro de membrana Millipore, de 0,22 μ de diámetro de poro. Este medio es prácticamente M₁ por el escaso crecimiento que se desarrolla debido al gran inóculo (2-3), y contiene todas las posibles sustancias excretadas por la abundante masa celular.

Medios de cultivo

Con nitrógeno inorgánico: medio M₁ (glucosa, 20 g/l; cloruro amónico, 7 g/l; sulfato magnésico, 0,5 g/l; fosfato monopotásico, 1 g/l. Puede solidificarse con 15 g/l de agar); medio de manitol sin nitrógeno (9); Czapek-Dox (Oxoid); medio L (9) y medio para algas (9). Con nitrógeno orgánico: M₁-glutámico (se sustituye a igual dosis de peso el cloruro amónico por glutamato monosódico en el medio inorgánico M₁); caldo nutritivo (Oxoid); lactobacilli Broth AOAC (Difco) y medio de Sabouraud (Difco).

Microorganismos

Las experiencias se han realizado con las cepas que se especifican en los cuadros 1-3.

Crecimiento

El crecimiento como masa total se determina por lectura turbidimétrica a 400 nm, frente al medio de ensayo sin inocular. El dato obtenido se transforma en valor de peso seco celular en g/l de medio, mediante curva de calibrado obtenida previamente (9).

En las experiencias con hongos filamentosos se ha determinado peso seco directamente (centrifugado, lavado y secado a 105 °C hasta peso constante). Las algas se han controlado mediante recuento de cé¹ulas en un volumen determinado de medio utilizando cámara de Thomas.

Determinación de la inhibición

La inhibición se cuantifica por comparación del crecimiento obtenido entre una serie de tubos control (con el medio de ensayo) y otra serie con adición de sustancia inhibidora. Se expresa como índice de inhibición, I_i, calculado a partir de los valores de peso seco:

$$I_t = 1 - C_{It} / C_{Nt}$$

siendo I_t = Indice de inhibición en el tiempo t

C_{1 t} = Crecimiento (g/l) en presencia de sustancia inhibidora en el tiempo t

 $C_{N t}$ = Crecimiento (g/l) normal en el medio estudiado en el tiempo t.

Proteína y ácidos nucleicos

Según el método espectrofotométrico de Warburg y Christian (15).

Fraccionamiento por intercambio iónico

Se ha seguido la técnica de Block (1) utilizando la resina catiónica. Lewatit S 100 (Bayer), previa separación de la proteína soluble por precipitación con etanol y filtrado.

Análisis de la tracción amínica

En analizador de aminoácidos Beckman Unichrom (*) según el método descrito por Stein y Moore (12).

RESULTADOS

Acción de la sustancia inhibidora sobre microorganismos creciendo en distintos medios

Se ha determinado la acción del medio con sustancia inhibidora producida por Citrobacter intermedium C₃, obtenido como se ha descrito anteriormente, sobre el crecimiento de esta cepa y de otros microorganismos, procariotas (cuadro 1) y eucariotas (cuadro 2), en distintos medios, cuya característica diferencial es el carácter inorgánico u orgánico de su nitrógeno. El comportamiento típico de C. intermedium C₃ se representa gráficamente en la figura 1.

En todos los casos se ha utilizado 1 ml de medio con sustancia inhibidora para cada 9 ml de medio. El crecimiento se ha desarrollado a 30 °C agitando cada 24 h. Para cada microorganismo y medio se ha realizado una curva control sustituyendo la sustancia inhibidora por 1 ml de medio.

El inóculo se ha preparado por cultivo del microorganismo en el medio a ensayar (24 h, a 30 °C), y el volumen inoculado es 0,1 ml/ tubo.

^(*) Agradecemos al Patronato «Juan de la Cierva», Instituto de Tecnología Química y Textil, y al Departamento de Química Macromolecular (E.T.S.I.I.B.), ambos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Barcelona, su colaboración y asistencia en las determinaciones e interpretaciones de los resultados.

Cuadro 1. Indice medio de inhibición del crecimiento de microorganismos procariotas en medios con distinta fuente de nitrógeno y en presencia de sustancia inhibidora segregada por C. intermedium C_3

Come	M - 4 : -	Fuente de	Indice	medio de inhi	bición	Número de
Сера	Medio	nitrógeno	24 h 48 h		72 h	experiencias
Citrobacter intermedium C ₃ CCB 362	M_1	Inorgánica (NH ₄ +,	0,45	0,45	0,43	8
Paracolobactrum intermedium ATCC						
11606	$\mathbf{M_1}$	Inorgánica (NH ₄ +)	0.85	0.90	0.92	2
Escherichia coli ATCC 11303	M_1	Inorgánica (NH ₄ +)	0,90	0.95	0.86	4
E. coli CCB 27	M_1	Inorgánica (NH ₄ + ₎	0.32	0.34	0.38	3
Bacillus megatherium CICC 1023	M ₁	Inorgánica (NH ₄ +)	0.89	0.90	0,70	4
1zotobacter chroococcum CCB 2568	M_1	Inorgánica (NH ₄ +)	0.26	0.20	0.17	1
1. chroococcum CCB 2568	Manitol sin N	Inorgánica (N ₂)	0.30	0.20	0.10	1
Pseudomonas azotogensis CCB 1568	Manitol sin N	Inorgánica (N ₂)	0.46	0.20	0.14	2
Ps. azotogensis CCB 1568	M_1	Inorgánica (NH ₄ +)	0.15	0,06	0.08	1
Ps. aeruginosa CCB 442	M_1	Inorgánica (NH ₄ +)	0.20	- 0.39	0.40	3
Ps. fuorescens CCB 129	M_1	Inorgánica (NH ₄ +)	- 0.50	-0.58	-0.42	3
. intermedium C ₃ CCB 362	M, glutámico	Orgánica	0.04	0.01	0.02	2
intermedium C CCB 362	Caldo ordinario	Orgánica	0.03	0,01	0.01	4
E. coli TECC 11303	Caldo ordinario	Orgánica	-0.12	-0.13	0.07	2
6. megatherium CICC 1023	Caldo ordinario	-	0.00	-0.05	0,08	2
Leuconostoc mesenteroides P-60 ATCC		.				
8042.	Lactobacilli					
	Broth AOAC	Orgánica	— 0,10	-0.05	0,07	2

Cuadro 2. Indice medio de inhibición del crecimiento de microorganismos eucariotas creciendo en medios con distinta fuente de nitrógeno y en presencia de sustancia inhibidora segregada por C. intermedium C.

•		Fuente de	Indice	bición	Número de	
Сера	Medio	nitrógeno	24 h	48 h	72 h	experiencias
Sacharomyces cerevisiae TECC 7752	Czapek-Dox	Inorgánica (NO ₂ -)	1,00	0,90	— 1,05	3
Sac. cerevisiae	L	Inorgánica (NH ₄ +)	3,00	1,80	- 2,00	2
Sac, cerevisia e	Sabouraud	Orgánica	0,05	0,03	- 0,01	3
Candida albicans L-65 (IBS)	Czapek-Dox	Inorgánica (NO _s -)	-0.35	0,46	-0.45	2
C. albicans	L	Inorgánica (NH ₄ +)	- 3,10	2,20	— 1,90	2
(`. albicans	Sabouraud	Orgánica	0,00	0,01	0.02	2
Aspergillus flavus (IBS)	L	Inorgánica (NH ₄ +)	0,03	0,04	-0,10	1
A. flavus	Sabouraud	Orgánica	0,40	0,15	0,20	1
Chlamydomonas sp. (I.I.P., CSIC)	M. algas	Inorgánica(NO ₂ -)	— 0,10	0,09	0,07	2
Scenedesmus sp. (I.I.P., CSIC)	M. algas	Inorgánica(NO ₃ -)	0,20	0,19	0,12	2

Cuadro 3. Indices de inhibición de presuntas sustancias inhibidoras por distintas cepas creciendo en diversos medios al actuar sobre microorganismos desarrollándose en los medios indicados

Cepa presunta productora	En el medio	Fuente de nitrógeno	Acción sobre la cepa	Cuando crece en el medio	Fuente de nitrógeno	Indice medio de inhibición
Escherichia coli CCB 27	M ₁	Inorgánica	E. eoli CCB 27	M ₁	Inorgánica	1,00
E. coli CCB 27	M_1	Inorgánica	C. intermed. C3	Μι	Inorgánica	0,40
E. coli CCB 27	$\mathbf{M_{1}}$	Inorgánica	B. megatherium	M_1	Inorgánica	0,96
E. coli CCB 27	Caldo ordinario	Orgánica	E. coli CCB 27	M_1	Inorgánica	- 0,08
E. coli CCB 27	Caldo ordinario	Orgânica	E. coli CCB 27	Caldo ordinario	Orgánica	- 0,07
Bacillus megatherium CICC 1023	$M_{\mathbf{i}}$	Inorgánica	C. intermed. C3	M ₁	Inorgánica	0,60
B. megatherium CICC 1023	M_1	Inorgánica	B, megatherium	M ₁	lnorgánica	0,95
Citrobacter intermedium C ₃	Caldo	Orgánica	C. intermed. C3	M ₁	Inorgánica	-0.75
C. intermedium C ₂	Caldo	Orgánica	C. intermed. C3	Caldo	Orgánica	0,00
C. intermedium C ₃	Caldo	Orgánica	E. coli CCB 27	M ₁	Inorgánica	- 0,94
C. intermedium C ₃	Caldo	Orgánica	B. megatherium	M_1	Inorgánica	- 0,09
C. intermedium C _s	M ₁ -glutámico	Orgánica	C. intermed, C.	M ₁	Inorgánica	- 0,10
C, intermedium C3	M,-glutámico	Orgánica	C. intermed. C.	Caldo	Orgánica	0,00

Capacidad de producción de sustancia inhibidora

A fin de determinar si la producción de sustancia inhibidora es específica de la cepa Citrobacter intermedium C_3 y si el medio constituye un factor crítico sobre la misma, se ha aplicado la técnica de obtención descrita para C. intermedium C_3 a otras cepas, utilizando diversos medios, y las presuntas sustancias inhibidoras obtenidas se ensayaron sobre varias cepas y en distintos medios. El resumen de los resultados obtenidos se indica en el cuadro 3, y se observa gráficamente uno de los casos en la figura 2

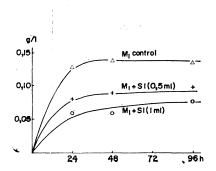


Figura 1. Acción de la sustancia inhibidora (SI) producida por C, intermedium C_3 sobre su crecimiento en medio M,

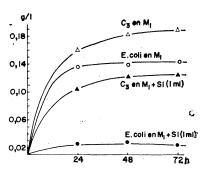


Figura 2. Efecto de la sustancia inhibidora producida por E. coli CCB27 sobre el crecimiento de ésta y de C. intermedium C_3 en medio M_1

Características generales de la sustancia inhibidora en bruto

La sustancia inhibidora producida por Citrobacter intermedium $C_{\rm a}$ se ha comprobado que se mantiene estable durante, al menos, dos años, tanto si se conserva a 4 °C, como a 30 °C, siendo indiferente el hecho de haber sido esterilizada por filtración a través de membrana $(0.22~\mu)$ o bien en autoclave $(121~{}^{\circ}{\rm C}$ durante 15 min.).

Por espectrofotometría (220-370 nm) y ap'icando el método de Warburg y Christian (15) se detecta cierta cantidad de proteína (1,56 mg/ml) y ácidos nucleicos (0,18 mg/m'), debidos probab'emente a la autólisis sufrida por C_3 al desarrollarse en M_1 (4).

Al dializar a través de membrana (24 Å) se observa que el efecto inhibidor se traslada en su mayor parte (80 %) al líquido dializado. Los procesos de extracción con éter etílico y etanol (9) indican muy ligera solubilidad en etanol y totalmente nula en éter.

Fraccionamiento

Los resutados del apartado anterior han llevado al supuesto de la naturaleza polar y bajo peso molecu'ar de la sustancia responsable de la inhibición. Por ello se efectuó un fraccionamiento de la sustancia inhibidora en bruto, mediante columna de intercambio iónico.

Ensayo sobre Citrobacter intermedium C₃ las dos fracciones obtenidas se encontró mayor actividad en la fracción fijada (del orden del 70 % del valor de partida) (9), fracción que contiene, por las condiciones empleadas, todos los cationes inorgánicos, los aminoácidos y algunos péptidos de bajo peso molecular.

Al acumularse el efecto inhibidor en la fracción fijada se estudió preferentemente la composición de la misma. Considerando que los cationes inorgánicos tendrían una polaridad aún más acentuada de la que se mostró en los ensayos previos con sustacia inhibidora, y que la técnica utilizada asegura la presencia de la totalidad de amino-ácidos en esta fracción, se profundizó en primer lugar en el estudio de sus componentes amínicos.

El análisis cromatográfico mostró eficaz separación de los mismos y dio la composición cuali y cuantitativa de las dos fracciones (cuadro 4) (9).

Acción inhibidora de la fracción amínica

Los aminoácidos hallados en la cromatografía fueron ensayados en cuanto a su efecto en el crecimiento de Citrobacter intermedium C_s en medio M_1 , en la concentración de 0,08 y 0,2 g/l. Los valores medios obtenidos para 0,08 g/l en diversas experiencias se encuentran en el cuadro 4.

Se ensayó la presencia simultánea de los aminoácidos presentes en concentración superior a 0,03 mM, en las concentraciones respec-

Cuadro 4. Composición amínica cuantitativa de las dos fracciones de la sustancia inhibidora producida por C, intermedium C_3 , después de su paso por resina de intercambio (concentraciones con referencia al medio inicial)

A minoácido	Fracción no fijada	Fracción fijada	ada C ₃ en M ₁	Número de experiencias		
	m M	m M	24 h	72 h	1	
Serina		0,020	- 0,23	- 0,20	- 0,25	2
Glicina	0,010	0,130	0,03	0,04	0,07	. 4
Cistina	0,020	0,097	0,09	0,04	0,05	4
Valina	0,030	0,040	0,07	0,06	0,07	6
Metionina	0,010	0,010	0,03	- 0,01	 0,03	2
Isoleucina	0,010	0,030	0,02	0,01	0,02	, 3,
Leucina	0,010	0,025	0,08	0,04	0,05	3
Acido aspártico		0,020	0,00	0,03	0,02	2
Acido glutámico		0,020	- 0,14	-0,12	— 0,15	2
Alanina		0,130	0,25	0,29	0,26	10
Triptófano	0,025	0,375	- 0,03	-0.03	0,00	4
Treonina		0,005	0,02	0,02	,- 0,01	2
Σ Total mM	0,115	0,902				
Σ Aminoácides concentración su rior a 0,03 mM		0,772				

tivas halladas en el análisis cromatográfico, dando un I_t más bajo (cerca del 50 %) que el correspondiente a la totalidad de la fracción. La misma molaridad total (0,772) aplicada a un solo aminoácido o a combinaciones de ellos se traduce en sensibles diferencias en la inhibición obtenida (cuadro 5). Ya que los aminoácidos parecen colaborar, al menos en parte, en el fenómeno de inhibición, se planteó la experiencia de constatar si la inhibición por la presencia de un aminoácido sigue un modelo de comportamiento superponible al definido anteriormente por Clotet (3) para inóculos crecientes.

Los resultados obtenidos con adición de alanina muestran mantenimiento de la pendiente y disminución de la ordenada en el origen, igual que al aumentar el inóculo (cuadro 6).

Cuadro 5. Inhibición del crecimiento de C. intermedium C_3 en medio M_1 en presencia de los aminoácidos mayoritarios de la fracción polar de la sustancia inhibidora, en las concentraciones dadas por la cromatografía

		Indice medio de inhibición					
Compuesto ensayado	mM	24 h	48 h	72 h			
Alanina	0,130	0,03	0,02	0,04			
Cistina	0,099	0.01	0,00	0,01			
Valina	0,070	0,01	0,02	0,02			
Glicina	0,140	 0, 02	0,01	- 0,01			
Triptôfano	0,400	0,02	-0.05	- 0.03			
Fracción amínica reconstruída	0,772	0,09	0,08	0,08			
Alanina	0,772	0,19	0,25	0,22			
Valina	0,772	0,09	0.11	0,10			
Glicina	0.772	- 0,02	- 0,07	- · 0.03			
Alanina + glicina	0,772	0,07	0.11	0,09			
Alanina + valina	0,772	0,07	0,09	0,06			
Alanina + glicina + valina + triptófano	0,772	0.02	0.05	0,04			
Fracción total de sustancia inhibidora rete- nida en columna		0,13	0.12	0,13			

Cuadro 6. Efecto de la alanina en la cinética del crecimiento de C. intermedium C_3 en medio M_1

Iniciador	Adición	Velocida	d de multip	licación	Pendiente	Ordenada	
g/l	de alanina	24 h	48 h	72 h	de la recta	en el origer	
0,3 . 10-3		0,300	0,210	0,160	0,970	0,95	
$0.7 10^{-3}$		0,291	0,152	0,101	-0.965	89,0	
$0.7 \cdot 10^{-3}$	$0.04 \mathrm{g/l}$	0.276	0.142	0.094	-0,980	0,62	
$0.7 \cdot 10^{-3}$	$0.08 \; g/1$	0 267	0,130	0,085	- 1,030	0 58	
$3.8 \cdot 10^{-3}$		0.245	0.120	0,079	- 0 950	0.54	

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El fenómeno de inhibición del crecimiento inicialmente descrito para Citrobacter intermedium C₃ (3) no es específico de esta cepa, sino que parece obedecer a una problemática más amplia de desarrollo bacteriano. La sustancia inhibidora producida por C. intermedium C₃ actúa de forma inespecífica sobre muchas cepas bacterianas, algunas de ellas muy alejadas taxonómicamente de la cepa productora (cuadro 1). Asimismo, hay otras cepas capaces de producir sustancias de características inhibidoras análogas, al desarrollarse en las mismas condiciones de inóculos masivos (cuadro 3).

La producción y la acción de estos componentes liberados al medio sobre la cinética del crecimiento está, en la mayoría de los procariotas ensayados, en estrecha relación con la fuente de nitrógeno del medio: si el nitrógeno es inorgánico se presenta inhibición; si es orgánico, el efecto desaparece. Con respecto a la producción, al desarrollarse en nitrógeno orgánico (M₁-glutámico es ya suficiente), ni Citrobacter intermedium C₃ ni otras cepas productoras de sustancia inhibidora en M₁, producen ningún factor que sea capaz de modificar el crecimiento de las mismas cepas productoras ni de otras cepas, sea cual sea el medio de desarrollo (cuadro 3). Sobre la acción se encuentra un comportamiento semejante; la sustancia inhibidora obtenida de C. intermedium, Escherichia coli o Bacillus megatherum creciendo en un medio mineral, sólo se muestra activa cuando la cepa ensayada se desarrolla igualmente en un medio con nitrógeno mineral.

La formación y acción de sustancias inhibidoras no es, pues, un fenómeno específico, sino que depende de unas determinadas condiciones de cultivo. Unicamente hay que señalar la excepción de *Pseudomonas*, ya que todas las cepas ensayadas se han mostrado insensibles a la sustancia inhibidora.

Todas las cepas de organismos eucariotas que se han ensayado manifiestan insensibilidad a la presencia de estos factores inhibidores, con independencia de la naturaleza del nitrógeno del medio (cuadro 2).

El estudio analítico de la sustancia inhibidora formada por C_3 al desarrollarse en medio M_1 presenta una sustancia de bajo peso mo-

lecu'ar, dializable, ligeramente polar y resistente al calentamiento a 121 °C. Con resina de intercambio se puede separar en dos fracciones, quedando el poder inhibidor en mayor proporción (70 %) en la fracción fijada. La fracción no retenida muestra cierto poder de inhibición, que puede explicarse por la presencia en la misma de ácidos nucleicos, dipéptidos, etc., ya citados (6 y 14), como inhibidores de crecimiento. La detección de cierta cantidad de proteína y ácidos nucleicos sugiere que estos compuestos contribuyen en algún modo a la inhibición.

El estudio cromatográfico de la fracción polar, responsable de la mayor parte de la inhibición, indica la presencia de varios amino-ácidos, algunos de los cuales se muestran capaces de modificar el crecimiento de Citrobacter intermedium C₃ en M₁, siendo alanina el que presenta mayor acción inhibidora. Parece desprenderse de los resultados (cuadro 5) que el efecto inhibidor de estos aminoácidos depende de su presencia individual o simultánea, pues las combinaciones entre aminoácidos son menos inhibidoras que la presencia individual de uno de ellos.

A pesar de que algunos aminoácidos de la sustancia inhibidora se muestran inhibidores del crecimiento, la combinación preparada según los resultados del análisis cromatográfico resulta bastante menos inhibidora que la fracción total retenida por la columna de intercambio. Además, la adición individual de los aminoácidos en la concentración hallada en la cromatografía no origina modificaciones significativas del crecimiento. Por todo ello, y a pesar de haber encontrado un paralelismo en la acción inhibidora debida al aumento del inóculo y a la adición creciente de un aminoácido (alanina) (cuadro 6), no puede de momento afirmarse que el efecto inhibidor de la sustancia inhibidora se deba a sus componentes amínicos.

Los aminoácidos segregados al medio colaboran seguramente en cierto modo al fenómeno de inhibición, pero las experiencias realizadas indican que existen otros compuestos que intervienen en el mismo. El efecto inhibidor no parece depender de un determinado compuesto, sino de un conjunto de acciones por diversos metabolitos, dependiendo de las condiciones de desarrollo del microorganismo.

RESUMEN

Cttrobacter intermedium C₃ y otros microorganismos procariotas facultativos segregan al medio componentes que limitan su crecimiento. La acción de estos componentes es eficaz sobre el propio productor y sobre cualquiera de los microorganismos ensayados. La producción y actividad están estrictamente relacionadas con la composición del medio de crecimiento y cultivo. Sólo en medios con nitrógeno estrictamente mineral se dan los hechos descritos.

El estudio analítico de la sustancia inhibidora muestra una importancia decisiva de la fracción polar, identificándose en la misma varios aminoácidos capaces, por separado, de producir inhibición en el crecimiento, siendo uno de los más representativos la alanina. Variaciones en la proporción de la fracción amínica modifican el efecto inhibidor global, mostrándose un efecto protector entre varios aminoácidos.

No ha sido posible describir el mismo mecanismo en procariotas aerobios estrictos y eucariotas estudiados.

SUMMARY

Growth inhibition of Citrobacter intermedium C₃ and other microorganisms by soluble agents excreted to the culture media

Citrobacter intermedium C₃ and other procariotic facultative microorganisms excret to the culture media chemical compounds that ishibit their growth. These isolated compounds showed inhibitory activity on C. intermedium and other microorganisms tested. The production and activity of these compaunds were strictly related to the composition of the culture media. Only in media with inorganic nitrogen showed inhibitory activity. Chemical analisys of the inhibitory fraction showed to be composed of several amino acids. The inhibitory action of each amino acid alone was tested. Te effect of alanine was higher than those from the other amino acids. Variations in the proportion of the amino acids modify the inhibitory effect.

Eucariotic and strictly aerobic microorganisms did not show the same inhibitory effect.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Block, R. J. 1963. Aminoacid Analysis of Protein Hydrolizates. Standard Methods of Chemical Analysis. Vol. II, A-D, Ed. E. J. Welcher.
- CLOTET, R. 1968. Producción directa de alanina por Citrobacter intermedium C₃-Publ. Fac. Cienc. Madrid, Ser. A, 132.
- CLOTET, R. 1969. Influencia del inóculo en el crecimiento de Citrobacter intermedium C₃ en cultivo discontinuo. Microbiol. Españ., 22, 271-82.
- CLOTET, R.; ĞUINEA, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1968. Segregación de aminoácidospor una cepa de C. intermedium. Microbiol. Españ., 21, 155-73.
- CHOU, T. W.; CREASHAM, R.; TANNENBAUM, S. R., and DEMAIN, A. L. 1972.
 Production of an autoinhibitor by a thermophilic Bacillus. J. Bacteriol.,
 111, 459-64.
- FLAVELL, B. R., and WOODWARD, D. O. 1970. The regulation of synthesis of Krebs cycle enzymes in Neurospora by catabolite and end product repression. Eur. J. Biochem., 13, 548-53.
- HAAS, D.; KURER, V., and LEISINGER, T. 1972. N-acetylglutamate synthetase
 of Pseudomonas aeruginosa. An. assay in vitro and feed-back inhibition
 by arginine Eur. J. Bicchem., 31, 290-95.
- 8. Hanson, R. S., and Cox, D. P. 1967. Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes. J. Bacteriol., 93. 1777.
- LLORET, M. 1973. Auto-regulación y regulación cruzada del tiempo de generación por factores solubles excretados al medio durante el crecimiento bacteriano. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona.
- LLORET, M., y CLOTET, R. 1971. Efecto inhibidor de la alanina sobre el crecimiento de C. intermedium C₃ con nitrógeno mineral. 2.º Congreso Nacional de Microbiología, Madrid.
- 11. Robert-Gero, M.; Le Borgne, L. and Cohen, G. N. 1972, Concerted feed-back inhibition of the aspartokinase of *Rhodospirillum tenue* by threonine and methionine: a novel pattern. J. Bacteriol., 112, 251.
- 12. Spackman, D. H.; Stein, W. H., and Moore, S, 1958, Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. Anal. Chem., 30, 7.
- 13. Stamatin, N. 1969. Blocage de la germination des spores et effect d'autoantibiose exercés par un metabolite synthetisé par *Bacillus laterosporus*. Ann. Ins. Pasteur, 116, 19.
- VONDER HAAR, R. A., and UMBARGER, H. E. 1972. Isoleucine and valine metabolism in E. coli. XIX. Inhibition of isoleucine biosynthesis by glycylleucine. J. Bacteriol., 112, 142-47.
- WARBURG, D., CHRISTIAN, N. 1941. Biochem. Z., 310, 384, En G. R. SEAMAN.
 1969. Experiments in Microbial Physiology and Biochemistry. Bengers Publ.
 Co., Minneapolis.

FUNDACION «JIMENEZ DIAZ» DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO DE LOS BACILOS GRAM-NEGATIVOS NO FERMENTANTES

por

M. C. PONTE, F. SORIANO y J. M. ALES

INTRODUCCION

La identificación de los bacilos gram-negativos no fermentantes (BGNNF) se ha considerado un problema nada fácil hasta ahora, en buena parte debido a la falta de acuerdo, tanto en la clasificación como en la nomenclatura.

Dado su interés, cada vez mayor, en la clínica como causantes de patología infecciosa en enfermos sometidos a intervenciones quirúrgicas de todo tipo y a las peculiaridades en que se encuentran muchos pacientes, sobre todo hospitalarios, conviene tener en cuenta a estos agentes que pueden malograr los más modernos tratamientos médicos o quirúrgicos, por brillantes que éstos sean.

Además, la sensibilidad de estos agentes frente a los antibióticos plantea, con frecuencia, problemas en la elección del tratamiento, ya que las resistencias frente a muchos antibióticos no son infrecuentes.

Nosotros hemos realizado unos esquemas de identificación después de revisar trabajos recientes (2, 8 y 14) que parten de pruebas que pueden incluirse dentro de la práctica habitual de cualquier laboratorio. Con tales esquemas hemos identificado gran parte de los BGNNF procedentes de muestras clínicas.

Microbiol. Españ, 29 (1976), 91.

MATERIAL Y METODOS

Se incluyen en este estudio todas aquellas bacterias que por su tinción con el gram y comportamiento en el triple azúcar hierro Difco (alcalino o inerte) eran sospechosas de pertenecer a este grupo. Se estudiaron 152 BGNNF procedentes de 139 muestras.

Para llegar a la identificación del microorganismo las pruebasrealizadas son las siguientes:

Triple azúcar hierro. Se repite nuevamente, permitiéndonos demostrar la falta de poder fermentante de la bacteria y la producción de sulfhídrico.

Oxidasa. Siguiendo el método de Kovacs (10).

Movilidad. En tubos de Craigie (6).

Medio de Hugh y Leifson con glucosa (9). Para ver el comportamiento metabólico de la bacteria con respecto a este azúcar (fermentante, oxidante o inerte).

Crecimiento en agar de MacConkey.

Medio de 2-cetogiuconato (13). Que pone de manifiesto la capacidad y fluoresceina, respectivamente.

Medio de 2-cetogluconato (13). Que pone de manifiesto la capacidad de una bacteria para oxidar el giuconato a 2-cetogluconato.

Lisina-descarboxilasa (Carlquist, ninhidrina base, Difco) (4).

Hidrólisis de la gelatina (caldo común y gelatina al 15 %, Difco).

Tinción de flagelos (técnica de Leifson) (11).

Hidrólisis de la arginina (12).

Crecimiento en agar-desoxicolato (Difco).

Hidrólisis de la urea (5).

ONPG (d'scos reactivos de B-D Merieux).

Cata'asa. En un tubo de hemólisis se colocan 3 ml de H_2O_2 al 30 %, se recoge una colonia con asa de vidrio y se introduce en el tubo. La aparición de burbujas indica una reacción positiva.

Indol(7).

Alcalinización del citrato de Simmons (Difco).

ADN-asa (3).

Hemos estudiado bacterias procedentes de diversas muestras clinicas (sangre, orina, esputo, etc.), y algunas ambientales, donde seincluyeron aparatos (respiradores, aspiradores urológicos, etc.), soíuciones desinfectantes (Hibitane, Fidex), manos de enfermeras, agua de la piscina de rehabilitación, etc.

La bacteria sospechosa se siembra en agar-sangre partiendo de una colonia y se incuba a 35 °C durante 18-24 h. El crecimiento sobre la placa es examinado con una lupa para asegurarse de que se trata de un cultivo puro, proporcionando información, además, respecto a la acción sobre la sangre, producción de pigmentos y morfología de las colonias. Una vez que disponemos de la bacteria en estas condiciones, se hace una suspensión en caldo común para realizar la siembra en los medios diferenciales adecuados.

Para una identificación provisional no se precisa la realización de todas las pruebas mencionadas. Las indicadas en el *cuadro 1* son, a nuestro juicio, las de realización rutinaria.

Cuadro 1. Identificación presuntiva de los bacilos gram-negativos no fermentantes

Bacilos	Oxidasa	Movilidad	Glucosa	MacConkey	Catalasa	Indol	Gelatina
I seudomonas, Alcaligenes, Comamonas, B. bronchiseptica	+	+					
Ps. mallei			Ox				
Moraxella			In	+			
Grupos IIf y IIj					+	+	
Moraxella							
M. bovis							+
E. corrodens, TM-1, M-1 (M. kingii)							
Ps. maltophilia		+					
Acinetobacter							

In = inerte. Ox = oxidante.

Los BGNNF con pigmento amarillo pueden identificarse con ayuda de los caracteres expuestos en el cuadro 2. Existe acuerdo unánime en la gran dificultad de identificar estos microorganismos

cuando no han desarrollado suficientemente su pigmento. La identificación del género *Chromobacterium* se hará teniendo en cuenta, en primer lugar, su característico pigmento violáceo, ser móvil y oxidasa-positivo.

Cuadro 2. Identificación presuntiva de los bacilos gram-negativos no fermentantes pigmentados en amarillo

Bacilos	Oxidasa	Glucosa	MacConkey	Beta-galac- tosidasa	Urea
Afines a Pseudomonas (11k-2)	+	Ox	+		
Afines a Pseudomonas (Ilk-1)			-		
F. meningosepticum		F		+	
Flavobacterium grupo IIb				newspa	
Grupo M-4f		ln	+		+
Grupo M-5					
E. corrodens					
Xanthomonas (Afines Pseudo- monas Ve)	_				

F = fermentante. In = inerte. Ox = oxidante.

Los BGNNF que poseen movilidad y son oxidasa-positivos precisan la realización de algunas pruebas adicionales y el esquema de identificación se muestra en el cuadro 3.

En último lugar, los organismos encuadrados presuntivamente en el cuadro 1, como pertenecientes al género Moraxella o afines, pueden identificarse con ayuda del cuadro 4.

Los autores quieren hacer constar que los esquemas de identificación aquí presentados tienen como único objetivo el diagnóstico-provisional de los BGNNF, y en ningún momento pueden sustituira a las descripciones y otros esquemas ya publicados. En nuestra sistemática de trabajo, la identificación presuntiva de los BGNNF según los esquemas expuestos, va siempre acompañada de la lectura en extenso del agente identificado y sus afines.

Cuadro 3. Identificación presuntiva de Pseudomonas y organismos afines

Pseudomonas y a fines	Oxidasa	Movilidad	Fluorescencia	Gelatina	Crecimiento a 42 °C	Lisina-descarboxi- lasa	Sulfhidrico	Glucosa ·	Flage'os	Arginina-descar- bexilasa	Crecimiento en S. S.	ADN-asa	Urea
Ps. aeruginosa	+	+	+	+	+								
Ps. fluorescens													
I's. putida													
Ps. cepacia				+		+							
Ps. putrefaciens							+						
Ps. pseudomallei				_				Ox	Po	+			
Ps. stutzeri											+		
Ps. picketti													
Alcaligenes (ant. Achromobacter)								T	Pe				
Comamonas								In	Po > 2				
Ps. diminuta									Po < 3			+	
Ps. alcaligenes													
B. bronchiseptica									Pe				+ R
Alcaligenes									Do I				$- \circ + Lt$
Grupo IVe Ps. mallei		-							Po y L				
Ps. maltophilia	_												

In = inerte, L = laterales, Lt = lenta, Ox = oxidante. Pe = perítricos, Po = polares. R = rápida,

Cuadro 4. Identificación presuntiva del género Moraxella y organismos afines

<i>Moraxella</i> y afines	Glucosa	Indol	Urea	MacConkey	Catalasa	Citrato	Nitratos	Pigmento amarillo	Gelatina
M-1 (M. kingii)	Ac					*			
Grupo IIj	In	+	+						
Grupo IIf			_						
·Grupo M-4f			+			+			
M. phenylpiruvica						_			
Grupo M-5			_	+	+			+	
Grupo M-6									
Grupo M-4						+			
Grupo M-3, M. osloensis									
M. lacunata				_	+		+		+
M. nonliquefaciens									
M. osloensis									
M. bovis									

Ac = acidificante. In = inerte.

A la mayor parte de estas bacterias se les realizó un estudio de sensibilidad frente a los antibióticos más habitualmente empleados en clínica, siguiendo la técnica de difusión de Kirby y Bauer (1).

RESULTADOS

La frecuencia de los distintos BGNNF identificados figura en el cuadro 5, y éstos procedían de muestras que se exponen en el cuadro 6. Los estudios de sensibilidad frente a los antibióticos se expresan en el cuadro 7.

Cuadro 5. Frecuencia de géneros y/o especies de 152 BGNNF identificados

Géneros, especies	Número	Total	Porcentaje
Acinetobacter calcoaceticus		41	27,1
Pseudomonas putida	10)		
Ps. maltophilia	9 /	90	01.1
Ps. fluorescens	4	3 2	21,1
Ps. putrefaciens Pseudomonas sp.	4)		
Moraxella osloensis	6)		
M. nonliquefaciens	4 (14	9,2
M. lacunata	1 (17	0,2
Moraxella grupo M-4f	3)		
Alcaligenes		26	17,0
Flavobacterium		9	5,9
Xanthomonas		18	11,8
No identificados		12	7,9

Cuadro 6. Procedencia de los BGNNF identificados

Muestras	Número
Hemocultivos	14
Liquidos cefalorraquideos	1
Catéteres venosos	8
Esputos y lavados bronquiales	21
Heridas	19
Abscesos	4
Exudados otorrinolaringológicos	20
Exudados conjuntivales	4
Necropsias	4
Heces	5
Otros	27
Ambientales	12
Total	139

Cuadro 7. Porcentaje de sensibilidad de los BGNNF frente a distintos antibióticos

Género	Número	Penicilina 10 U I (*)	Ampicilina 10 μg	Carbenicilina 50 μg	Cefalotina 80 μg	Estreptomícina 10 μg	Kanamicina 30 ug	Gentamicina 10 μg	fobramicina 10 μg	Colistina 300 U. I.	Rifampicina 30 µg	Tetraciclina 30 µg	Cloranfenicol 30 μg	Eritromicina 15 μg	Nov-biocina 30 μg	Sulfadiazina 250 μg	Trimetoprim-sulfame- toxazol 25 μg	Fosfomicina 50 µg
Alcaligenes	17	0	45	80	15	8	25	34	35	30	40	40	50	20	35	70	75	25
Pseudomonas	23	0	0	20	0	15	40	60	55	75	85	40	70	8	25	25	50	8
Acinetobacter	29	0	35	84	15	33	80	99	80	75	99	70	60	33	20	90	90	15
Flavobacterium	5	12	12	62	12	12	12	50	32	0	50	25	99	37	99	62	99	0
X anthomonas	10	12	35	45	20	50	75	80	80	70	99	70	90	35	35	90	90	80
Moraxella	9	90	99	99	99	80	80	90	90	55	99	90	80	80	80	60	99	55

^(*) Carga del antibiótico en los discos.

COMENTARIOS

Muchos autores consideran que el género Acinetobacter posee una sola especie, Acinetobacter calcoaceticus, pero otros admiten dos variedades o subespecies, la variedad anitratum, antigua Herellea vaginicola, y la variedad lwoffi, antigua Mima polymorpha: se diferencian por la capacidad de la primera de acidificar por oxidación a'gunos carbohidratos (giucosa, xilosa, lactosa, etc.), mientras que la segunda no lo hace.

Dentro del género *Pseudomonas*, excluímos de este estudio *Ps. aeruginosa* e incluímos *Ps. putrefaciens*, aunque no cumple los requisitos que figuran en la definición del género *Pseudomonas* en la última edición del manual de Bergey (2). Su porcentaje citosina + guanina y el tipo de flagelación que presenta en ocasiones es diferente del que se ve en el resto de las especies, lo que ha motivado su exclusión del mencionado género, pero sin encontrarse por el momento con un cierto asiento. *Ps. fluorescens*, aunque puede crecer a 37 °C, a esta temperatura no muestra algunas de sus características típicas, y hay que incubarla entre 18 ° y 20 °C.

En el género Alcaligenes incluímos cepas identificadas como Alcaligenes faecalis, A. odorans, A. denitrificans y el antiguo Achromobacter, que hasta ahora figuraba como un género independiente por su capacidad para oxidar la glucosa. En la última edición del manual de Bergey (2) se ha fundido en el género Alcaligenes, por presentar caracteres muy similares con éste.

En el género Flavobacterium incluimos F. meningosepticum y Flavobacterium sp., grupo IIb (15).

Dentro del género Moraxella incluimos las 5 especies reconocidas actualmente (lacunata, bovis, osloensis, nonliquefaciens y phenyl-pyruvica), y 5 grupos de bacterias con propiedades del género Moraxella, que son los grupos M 3, M-4, M-4f, M-5 y M-6 (15).

En el género Xanthomonas se incluyen, además, bacterias afines a Pseudomonas (grupos IIk y Ve) (15).

La proporción de BGNNF que no pueden ser identificados siguiendo estos esquemas es variable. De 152 cepas estudiadas por nosotros no pudieron identificarse 12 (7,9 %), cuyos motivos fundamentales fueron: ausencia de flageios, colonias no pigmentadas y dudas en la interpretación de la tinción de Gram. Cuando poseen flagelos, por la disposición de éstos es fácil conocer el género, pero no identificar la especie, sobre todo en *Pseudomonas*, género en el que, como se sabe, el número de especies pasa de 200. En nuestra serie encontramos 4 casos qu figuran como *Pseudomonas sp*.

Este grupo de bacterias presenta una amplia variación de sensibilidad frente a los antibióticos y, por lo tanto, está totalmente indicado realizar el antibiograma cuando se aíslan. Nuestros aislamientos confirman que no son bacterias de sensibilidad fija, si bien hay algunas generalidades que podemos comentar.

El género Acinetobacter, prácticamente, siempre fue resistente a la bencil-penicilina, y poco sensible al resto de penicilinas y grupo de las cefalosporinas, mientras que fue generalmente sensible a los aminoglucósidos, polimixinas, rifampicina y sulfamidas. En general, la variedad lwoffi es más sensible que la variedad anitratum.

Destaca la resistencia del género *Pseudomonas* frente al grupo de las penicilinas y cefalosporinas, siendo más sensible a gentamicina, colistina rifampicina y cloranfenicol. En nuestro estudio, la especie que se mostró más resistente fue *Ps. maltophilia*.

El género Alcaligenes mostró un alto grado de sensibilidad frente a carbenicilina, cloranfenicol y grupo de las sufamidas.

El comportamiento del género *Moraxella* fue muy homogéneo, siendo prácticamente sensible a casi todos los antibióticos, incluida la penicilina, exceptuando un aislamiento del grupo M-4f (no reconocido como *Moraxella*, aunque afín a ella).

El género Flavobacterium se mostró muy sensible al cloranfenicol, novobiocina y a trimetoprim-sulfametoxazol.

Los antibióticos más activos frente al género Xanthomonas fueron rifampicina, cloranfenicol y grupo de las suifamidas.

El significado clínico de estas bacterias no está claro. Hay autores que las consideran claramente patógenas, mientras que otros se muestran muy escépticos en este sentido. La opinión más extendida es que se trata de bacterias circunstanciales, que aparecen en infecciones provocadas por terapéuticas antibióticas e instrumentales, inmunodepresión, etc. Existen casos en que la relación entre el organismo aislado y el cuadro clínico parece evidente. En nuestra expe-

diencia, al menos un 10 % de los en ermos presentaban síntomas claramente atribuibles a infección por BGNNF (meningitis, sepsis); en el resto de los enfermos esta relación era dudosa o nos faltaron criterios para definir claramente su significado.

RESUMEN

La identificación de los bacilos gram-negativos no fermentantes plantea problemas en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. En este trabajo, apoyándonos en algunas revisiones publicadas recientemente, se proponen unos esquemas de identificación basados en pruebas sencillas y de realización habitual, por medio de las cuales se pueden identificar adecuadamente más de un 90 % de BGNNF. Se comentan asimismo su comportamiento frente a los antibióticos y su significación clnica.

SUMMARY

A stutdy about non fermentative Gram-negative bacilli

A new method for the identification of the Gram negative non-fermentative bacilli is proposed, based on common and routine test used in bactriological laboratories. With this method it can be adequately identified over 90 % of these bacteria. Antibiotic sensitivity and clinical aspects are also commented.

BIBLIOGRAFIA

- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C., and TURCK, M. 1966, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol., 45, 493.
- 2. Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 217. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 8. Buttiaux, R.; Beerens, H., et Tacquer, A. 1962. Manuel de Techniques Bacteriologiques, 437. Ed. Flammarion, Paris.
- CARLQUIST, P. R. 1956. A biochemical test for separating paracolon groups.
 J. Bacteriol., 71, 339.

- Christensen, W. B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. J. Bacteriol., 52, 461.
- 6. Cruickshank, R. 1968. Medical Microbiology, 221. E and S Livingstone Ltd. Edinburg and London.
- GADEBUSCH, H. H., and GABRIEL, S. 1956. Modified stable Kovacs reagent for the detection of indole. Amer. J. Clin Pathol., 23, 1373.
- 8. Hugh, R., and Gilardi, G. L. 1974. Manual of Clinical Microbiology, 251. Ed American Society for Microbiology, Washington.
- 9. Hugh, R., and Leifson, E. 1963. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. J. Bacteriol., 66, 24.
- 10. Kovacs, N 1956 Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London), 178, 703.
- Leifson, E. 1951. Staining, shape, and arrangement of bacterial flagella. J. Bacteriol., 62, 337.
- MOELLER, V. 1955. Simplified test for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 36, 158.
- 13. Moore, H. B., and Pickett, M. J. 1960. The Pseudomonas-Achromobacter group. Can. J. Microbiol., 6, 35.
- REPÁRAZ, J. M. 1975. Identificación del género Pseudomonas. Ponencia a la segunda Mesa redonda del Grupo especializado en Microbiología Clínica, Madrid.
- 15. TATUM, H. W.; EWING, W. H., and WEAVER, R. E. 1974. Manual of Cinical Microbiology, 271. Ed. American Society for Microbiology, Washington.

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

INFLUENCIA DEL pH EN LA COMPOSICION ANTIGENICA DEL BACILLUS AMYLOLIQUEFA-CIENS (*)

por

J. A. GONZALEZ, M. A. FALCON y A. CHORDI (**)

INTRODUCCION

Es bien conocida la influencia que tiene la variación del pH sobre la actividad de cada una de las enzimas (5). Por otro lado, también se conoce que las variaciones en el pH del medio tienen una influencia en la producción de enzimas (7) y antibióticos (4). Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo en lo referente a la influencia que debe tener el pH inicial del medio en las diferentes rutas metabólicas que utiliza la célula. Es de esperar por la acción sobre la productividad y actividad enzimática, que los distintos valores del pH inicial, cuando éstos sean extremos (pH 5 y 9), inutilicen la eficacia de las enzimas o rutas metabólicas, en relación con el pH inicial 7, con la consiguiente puesta en marcha de una inducción de enzimas o rutas metabólicas no existentes en estas últimas condiciones.

En un primer intento de adquirir una idea g'obal de la influencia que tienen las variaciones del pH del medio sobre las enzimas de una bacteria, se ha efectuado un análisis por inmunoelectroforesis de 5 muestras de Bacillus amyloliquefaciens, cultivado a diferentes pH iniciales. La finalidad de este trabajo era conocer si las modifi-

^(*) Con este trabajo obtuvo el grado de Licenciado en Ciencias por la Universidad de La Laguna el primero de los autores.

^(**) Dirección actual de los autores: Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina. Universidad de Extremadura (Badajoz).

caciones del pH del medio variaban el patrón de proteínas detectadas por inmunoelectroforesis, y si esto sucedía, determinar en qué condiciones aparecían o desaparecían estas proteínas.

Dado que en un trabajo anterior (1) se encontró que las diferencias en el tiempo de duplicación influían en la composición cualitativa de proteínas, se determinaron las curvas de crecimiento y los tiempos de generación y de duplicación en cada tipo de cultivo, en un intento de discernir la causa de la aparición o desaparición de algunas proteínas.

MATERIAL Y METODOS

Este estudio se realizó con la cepa H del Bacillus amyloliquefaciens (9), cultivándose en un medio que contenía extractos de carne y triptona Difco, al 1 %, en agua destilada.

De acuerdo con el planteamiento descrito, la experimentación con esta bacteria se realizó en un fermentador modelo F. L. 300, Biotec, en el que se conseguían unas condiciones estandard de 2 l/min de aireación, una temperatura de 37 °C y una agitación de 300 r/m, pudiendo de esta forma establecer las distintas curvas de crecimiento a diferentes pH iniciales. Para ello se tomaron muestras cada hora, a las que se les medía su turbidez en un espectrofotómetro Spectronic 20, con una longitud de honda de 555 nm. A estas muestras se les medía el pH en un peachímetro, modelo 5101, de Polymetron Ag. Glattbrugg, observándose de esta manera cómo variaba el pH del medio de cultivo a lo largo de la curva de crecimiento. Además, se calculó el tiempo de duplicación y de generación entre 3-4 h de crecimiento.

El estudio antigénico se hizo mediante las técnicas inmunoe ectroforéticas, utilizándose la microtécnica de Scheidegger (8) y las de Chordi y Kagan (3), llevándose a cabo dichos experimentos en un aparato Shandon S. A. E. 2761, en el que se eligió una intensidad de 40 mA y un vo taje de 120 V.

RESULTADOS

La figura 1 muestra las curvas de crecimiento de los diferentes cultivos de Bacillus amyioliquefaciens a distintos pH iniciales. Se observa que existen diferencias en la duración de la fase de latencia. El cultivo con pH inicial 7 fue el que presentó una menor fase de latencia y un mayor crecimiento (mayor número de célu'as) en la fase estacionaria. A medida que los pH iniciales del medio se des-

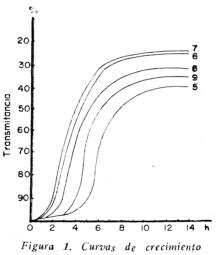


Figura 1. Curvas de crecimiento del B. amyloliquefaciens cepa H en los cultivos a distintos pH iniciales

viaban del pH inicial 7, la duración de la fase de latencia era mayor, y el número total de las células en la fase estacionaria era menor. Esto sucedía de la misma manera cuando la variación se hacía, tanto hacía el lado alcalino como al ácido.

A las mismas muestras utilizadas para la realización de las diferentes curvas se les midió el valor del pH, observándose que dichofactor mostraba un descenso en todos los cultivos. Sin embargo, en los cultivos realizados con pH inicial 5, 6, 7 y 8 el valor mínimo se-

alcanzaba a las 4 h, mientras que en el cutivo a pH inicial 9 lo hacía a las 11 h de crecimiento. En todos ellos, llegando a las 48 h de crecimiento, dicho valor era de 8,5 (figura 2).

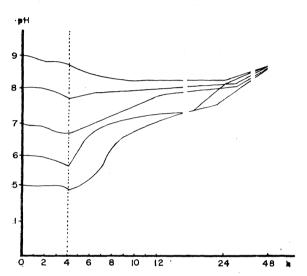


Figura 2. Curvas de variación del pH en los diferentes cultivos

Cuadro 1. Tiempos de generación y de duplicación entre las muestras de los cultivos tomadas a las tres y cuatro horas de crecimiento

pH inicial del cultivo	Tg	Td		
5	3,80	2,62		
6	0,98	0,63		
7	0,88	0,61		
8	0,97	0,67		
9	2,64	1,82		

Tg, tiempo de generación. Td, tiempo de dup'icación

En las curvas de crecimiento se calculó el tiempo de generación y de duplicación entre 3-4 h de haberse iniciado el cultivo. En el cuadro 1 se expresan los valores calculados para este período de tiempo, observándose que el tiempo de duplicación oscilaba entre 0,88 y 3,80, y el tiempo de generación entre 0,61 y 2,62, en relación con los diferentes cultivos.

El análisis antigénico evidenció un total de 19 proteínas inmunollógicamente diferentes, que se expresan en el cuadro 2, ordenadas

Cuadro 2. Movilidades reales de las diferentes bandas de los distintos cultivos

		48 h pH inicial					
Movilidad real							
	5	6	7	8	9	7	
36	+	+	+	+	+		
57 a	+ .	+	+	+	+	+	
5 7 b		+	+		+	+	
67	+	+	+		+		
77		+	+	+	+	+	
83	++		+	+	+	+	
96			+	+			
103	+	+		+	+		
109	+	+			+		
113		+	+	+	+	+	
116	+	+	+	+	+	+	
120	+	+	+	+	+		
124	+	+	+			+	
132	+	+	+	+	+		
136	+	+	+	+	+	+	
144	+	+	+	+	+		
152		+	+	+			
168			+				
176		+	+	+			

en relación con su movilidad electroforética respecto a la albúmina humana. En este cuadro se observa la presencia de cada uno de los antígenos en las 5 muestras de bacterias cultivadas a diferentes pH iniciales. Los antígenos detectados pueden agruparse en 5 grupos diferentes, según su aparición en las distintas muestras: a) el grupos de los antígenos comunes o constitutivos, compuesto por los anti-

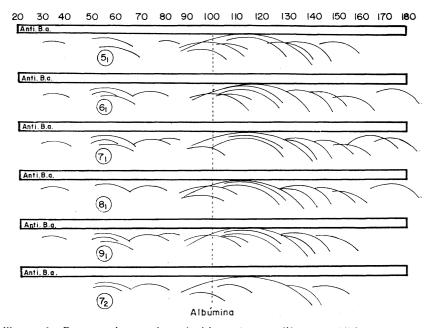


Figura 3. Patrones inmunoelectroforéticos de los diferentes cultivos. Canales: antisuero B. amyloliquefaciens. Pocillos: antígenos denominados con el valor deli pH inicial y subíndices, 1 (4 h) y 2 (48 h)

genos productores de las bandas de precipitación 36, 57a, 116, 132, 136 y 144, que se encontraron en las 5 muestras estudiadas; b) el grupo de los antígenos que aparecían a pH 6, 7 y 8 y no aparecían a pH extremos, y estaba constituido por los antígenos productores de las bandas 152, 168 y 176, ya que ninguno de éstos se encontraba en las muestras cultivadas a pH iniciales 5 y 9; c) el grupo de antígenos presentes a pH extremos y ausentes a pH neutros, antígenos de movilidad 103 y 109; d) so'amente se encontró el antígeno de-

movilidad 124, que aparecía en las muestras a pH ácidos y que estaba ausente en las muestras a pH alcalinos; e) por último, el grupo de los antígenos con movilidad 77 y 113, que solamente no se encontraron a pH 5, estando presentes en el resto de las muestras.

Hemos de resaltar también que predominan las bandas producidas por proteínas electronegativas, de forma que solamente 7 de 19 tenían una movilidad inferior a la albúmina humana; las 11 restantes superaban dicho valor (figura 3).

Además, las bandas parecían encontrarse en 3 zonas bien demarcadas. Una primera zona de movilidad inferior a la albúmina humana, que comprende a las bandas de movilidad 36 a 96; una segunda zona, que agrupa a las bandas de movilidad 103 a 152, y la tercera zona, con las bandas 168 a 176. Como vemos, estas 3 zonas no son típicas para todos los antígenos, ya que los de pH inicial 5 y 9 solamente presentan las dos primeras.

Por último, realizamos un estudio antigénico con la masa bacteriana del cultivo a pH inicial 7, y de 48 h de crecimiento, observándose que las bandas de movilidad 36, 67, 83, 113, 124, 136, 152, 168 y 176 desaparecían con respecto al patrón inmunológico del mismo cultivo a pH inicial 7, pero de 4 h de crecimiento.

DISCUSION

La curva de crecimiento de cualquier microorganismo presenta una fase de latencia de mayor o menor duración, dependiendo de ias condiciones a que se cultiva el microorganismo. Así, Nakata y Halvorson (7) observaron que al cultivar el Bacillus cereus en un medio carente de giucosa, la fase de latencia era de mayor duración que cuando se desarrollaba en medios con glucosa; esto era debido a que estos medios de cultivo eran mejores para el crecimiento. Nosotros encontramos un comportamiento semejante al cultivar el B. amyloliquefaciens en medios con pH extremos (5 y 9), es decir, que en estos medios la especie presenta una mayor fase de latencia que en los cultivos con pH neutros.

En relación con la variación del pH a lo largo de la curva de crecimiento, Nakata (6) observó en *Bacillus cereus* que se produce primeramente una disminución del pH debida a la producción de

ácidos que posteriormente serán utilizados para los mecanismos de esporulación. Nosotros comprobamos que en cultivos de *B. amyloliquefaciens* con diferentes pH iniciales de 5, 6, 7, 8 y 9, se produce siempre esta disminución, aunque depende del pH inicial.

Por otro lado, con el estudio inmunológico realizado con los distintos cultivos, hemos observado que algunos de los componentes antigénicos solamente se manifestaban en un cultivo (banda 168, exclusiva del microorganismo cultivado a pH inicial 7), otros antigenos aparecían en cultivos a pH ácidos o básicos y no se encontraban en los realizados a pH neutro (bandas 103 y 109) y, por último, otros antígenos que se encontraban a pH muy ácidos (banda 124) o no (bandas 77 y 113). Estas diferencias antigénicas podían ser atribuidas a los diferentes tiempos de duplicación en este estado, como a los diferentes pH utilizados, debido a que eran los únicos factores que variaban en los distintos cultivos.

Calvo (2) observó, mediante cultivo continuo, que para valorescomprendidos entre 2 y 7 del tiempo de duplicación no existen diferencias antigénicas. Estos datos los interpoló en la curva de crecimiento del microorganismo en cuestión y encontró que dichos valores estaban comprendidos entre el final de la fase de latencia y el final de la fase exponencial. En nuestra experiencia, los valores del tiempo de duplicación no son suficientes para atribuirles los cambios antigénicos encontrados, debido a que dichos valores se hallaban dentrodel intervalo de las fases de crecimiento anteriormente dichas, y además, en los cultivos que presentaban aproximadamente igual valor en el tiempo de duplicación (cultivos a pH inicial 6 y 8), presentaban también diferencias antigénicas. Por otro lado, nosotros encontramos que algunos de los antígenos de la bacteria cultivada a pH inicial 7 desaparecen en el momento en que existe una máxima variación de este factor pH con respecto a su valor inicial. Esto se ve corroborado por Kominen y Halvorson (5), quienes demuestran en Bacillus cereus que la formación de un sistema enzimático es un mecanismo influidopor el pH de cultivo. Por lo tanto, a la vista de estos resultados, es de esperar que las diferencias antigénicas encontradas sean debidas directamente al pH del medio, y no como resultado de las diferencias en los tiempos de duplicación producidas por los distintos pH del medio.

RESUMEN

Se efectúa un estudio de 5 muestras de Bacillus amyloiquefaciens en cultivos a diferentes pH iniciales, determinándose las curvas de crecimiento, el tiempo de generación y de duplicación y las modificaciones del pH a lo largo de la curva de crecimiento. Se efectúa también un análisis antigénico de unas muestras de estos cultivos a las 4 h de inoculación. Se pudo observar que las curvas de crecimiento eran similares, aunque la fase de latencia aumentaba en los pH extremos, y el número total de células en la fase estacionaria aumentaba en el pH neutro.

El análisis antigénico evidenció 5 grupos de antígenos: un grupo de 7 antígenos constitutivos comunes a las 5 muestras estudiadas; un grupo de 3 antígenos, propios de los pH 6, 7 y 8; un grupo de 2 antígenos específicos de pH extremos y ausente en el pH neutro. Por último, 1 antígeno propio de pH ácidos, y 2 antígenos de pH alcalinos.

SUMMARY

pH influence on antigens composition from Bacillus amyloliquefaciens

A study of 5 Bacillus amyloliquefaciens cultures at different initial pH values, was carriet out, and growth curves, generation and doubling times and differences in pH values along the growth curve were determined. An antigenic analysis of samples taken from these cultures was carried out 4 hours after inoculation. It was observed that the growth curves were similar although the lag phases increased in the extreme pH values the total number of cells in the stationary phase increased in the neutral pH values.

The antigenic analysis clearly shawed 5 different groups of antigent. A group of 7 constitutive antigens common to the 5 samples studied. A group of 3 antigens peculiar to pH 6, 7 and 8. A group of 2 antigens peculiar to the extreme pH values and absend from the neutral pH values. Finally an antigen peculiar to acid pH values and 2 antigens peculiar to alkaline pH values.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Calvo, M.; Cardell, E.; Falcón, M., y Chordi, A. 1974. Modificaciones de las proteínas de Sarcina flava en correlación con el tiempo de duplicacion y el ciclo celular. Laboratorio, 348, 511-23.
- 2. Calvo, M.; Cardell, E.; Falcón, M., y Chordi, A. 1975. Evolución cuantitativa y cualitativa de las proteínas en la curva decrecimiento de Sarcina fiava. Microbiol. Españ., 28, 103-15.
- Chordi, A., and Kagan. I. J. G. 1964. Analysis of normal sheep serum by immunoelectrophoresis. Immunology, 93, 439-55.
- GOULD, A. R.; MAY, B. K., and ELLIOTT, W. H, 1971, Studies on the protoplast-bursting factor from Bacillus amyloliquefaciens. Fed. Eur. Biochem. Soc Lett., 14, 320-21.
- Kominek, L. A., and Halvorson, H. O. 1965. Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. J. Bacteriol., 90, 1251-59.
- 6. Nakata, H. M. 1963. Effect of pH on intermediates produced during growth and sporulation of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 86, 577-81.
- NAKATA, H. M., and HALVORSON, H. O. 1960. Biochemical changes occurring during growth and sporulation of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 80, 801-10.
- 8. Scheideger, J. J. 1955. Une microméthode de l'immunoelectrophoresis. Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 7, 103-10.
- 9. Welker, N. F., and Campbel, L. L. 1967. Comparison of the α-amylase of Bacillus subtilis and Bacillus amyloliquefaciens. J. Bacteriol., 94, 1131-35.

ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN (CSIC), GRANADA DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ACTIVIDAD SULFOOXIDANTE Y SULFATORRE-DUCTORA EN DIVERSOS TIPOS DE SUELOS. RESPUESTA A LA ADICION DE AZUFRE Y MATERIA ORGANICA

por

C. LLUCH y J. OLIVARES

INTRODUCCION

En la fertilización de las plantas con azufre, la microflora sulfooxidante y sulfatorreductora juega un papel importante. El paso del estado elemental a sulfato, forma esencial de absorción para las raíces, está condicionado por la activación potencial de dichas bacterias en presencia de substrato oxidable. Sin embargo, esta activación puede encontrarse de alguna forma afectada por condiciones dependientes de la naturaleza del suelo donde se encuentran (9 y 12).

Por ello se ha considerado interesante realizar un estudio en distintos tipos de suelos para conocer la evolución de la microfiora sulfooxidante y sulfatorreductora a lo largo de un período de observación adecuado y la respuesta a la adición de azufre, de materia orgánica o los dos conjuntamente.

MATERIAL Y METODOS

Suelos utilizados

Se eligieron 5 tipos de suelos, pertenecientes todos ellos a la provincia de Granada: I) Tierra parda; II) Pardo rojo calizo; III) Rendsina sierosem; IV) Pardo de vega; V) Xerorrendsina. Las características físicas y químicas se recogen en el cuadro 1.

Microbiol. Bspañ., 29 (1976), 113.

Cuadro 1

	Tipo de suelo						
Características	I	П	111	IV	V		
Arena fina(a)	35,80	30,00	17,80	16,00	20,00		
Limo'(a)	37,00	37,40	33,60	44,40	45,60		
Arcilla(a)	26,40	32,40	48,60	39,60	34,40		
Grava	64,20	70,00	82,20	84,00	80,00		
Capacidad catiónica de cambio(b)	17,50	14.99	15,53	10.28	15,52:		
pH (agua)	1,45	1,58	1.02	2,08	0.94		
Materia orgánica(a)	7,05	7,70	7,60	8,10	7,50		
pH (C ^I K)	6,15	6,20	6,80	7.30	6,80		
Fósforo (c)	8,13	12,68	11,70	$65,\!98$	13,17		
Nitrógeno(c)	149,80	127,40	122,10	108.60	95,20		
Potasio (c)	29,68	17,47	29,15	66,08	19,75		
Potasio(c)	29,68	17,47	29,15	66,08	19,75		
Humedad equivalente(d)	18,43	27,61	30,33	41.77	28,99)		
Azufre asimilable(c)	0,79	2,61	4,06	13,07	100.00		

⁽a) g/100 g. (b) meq/100 g. (c) mg/100 g. (d) ml/100 g.

Preparación e incubación de los suelos

Los suelos fueron tamizados por malla de 1 mm, siendo llevados a incubación en condiciones óptimas de humedad y temperatura [2/3 de la humedad equivalente y 28 °C (14)]. En experiencias dirigidas a determinar el efecto de la adición de azufre, fueron incubados con la cantidad de este elemento correspondiente a 80 kg/ha (10) (3.2 mg/100 g de suelo). Para conocer el efecto de la materia orgánica se adicionó, independientemente de la cantidad presente en cada suelo, el 3 % de estiércol de oveja.

Determinaciones microbiológicas

Se tomaron semanalmente muestras de suelos, realizándose el recuento de sulfooxidantes y sulfatorreductores por las técnicas de Pochon y Tardieux (16). Las diluciones seriadas 1/10 fueron preparadas según las técnicas recomendadas por Allen (1) y Pochon (15), modificadas por Gallardo-Lara (8). La interpretación de los resultados, número más probable (NMP) de microorganismos, se determinó según las tablas de McGrandy (17).

RESULTADOS

En los cuadros 2-3 se expone la evolución seguida por la microflora sulfooxidante y su fatorreductora, respectivamente, expresada en NMP de microorganismos/g de suelos, peso seco, presentes en cada tipo de suelo ensayado a lo largo del período de incubación.

Cuadro 2. NMP de sulfooxidantes/g de suelo, peso seco, en las muestras tomadas a lo largo del período de incubación. La cifra real corresponde al valor indicado × 10⁵. Valores medios de tres repeticiones

Suelo	Tiempo de incubación, semanas									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Ī	4,3	0,4	1,0	3,0	0,4	0,20	0,13	0,16		
11	1,5	0,5	1,9	0,7	0,3	0,20	0,08	0,06		
Ш	7,1	9,9	4,9	4,8	4,7	4,60	0,90	0,20		
IV	23,8	41.4	40,8	47.7	26,5	6,50	5,30	3,60		
v	0,7	0,5	0 5	0,4	0,4	0,16	0,16	0,16		

En las figuras 1-5 se representan gráficamente las respuestas obtenidas en la evolución de la microflora oxidante del azufre, correspondiente a los 5 tipos de suelos. En cada figura se expone esta respuesta microbiana cuando el suelo ha sido incubado sólo, con adición de azufre, de materia orgánica y los dos conjuntamente.

Cuadro 3. NMP de suifatorreductores/g de suelo, peso seco, en las muestras tomadas a lo largo del período de incubación. La cifra real corresponde al valor indicado × 10⁵. Valores medios de tres repeticiones

Suelo	Tiempo de incubación, semanas									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
I				0,03	0,017	0,018	0,064			
11		0,005								
111	0,005	0,013	0,021	0.10	0,060	0,015	0,005	0,004		
IV	0,040	0,070	0,070	0,12	0,120	0,110	0,030	0,020		
v										

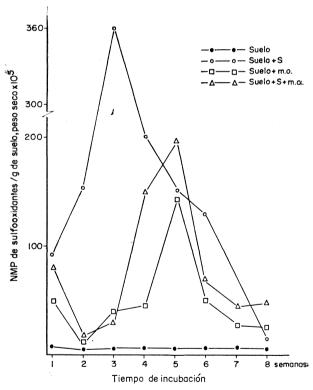


Figura 1. Evolución de la microflora oxidante del azufre en el suelo I, incubado solo, con adición de azufre, demateria orgánica (m. o.) y los dos conjuntamente

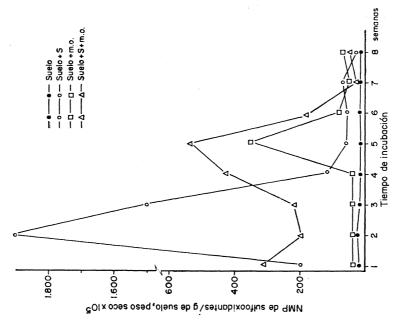
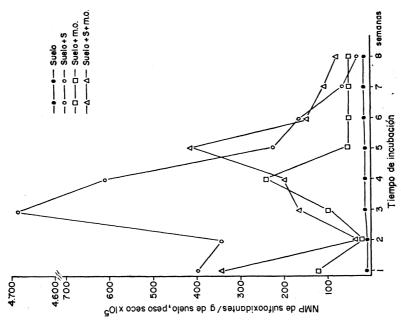


Figura 3. Evolución de la microflora oxidante del azufre en el suelo III, incubado solo, con adición de azufre, de materia orgánica y los dos conjuntamente



AND THE

Figura 2. Evolución de la microflora oxidante del azufre en el suelo II, incubado solo, con adición de azufre, de materia orgánica y los dos conjuntamente

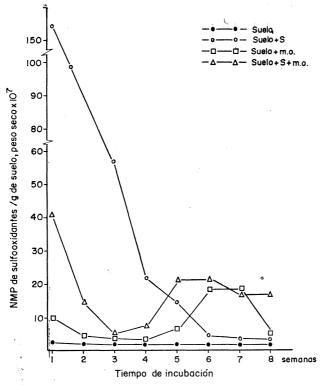


Figura 4. Evolución de la microflora oxidante del azufre en él suelo IV, incubado solo, con adición de azufre, de materia organica y los dos conjuntamente

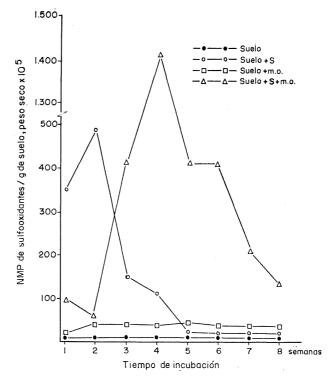


Figura 5. Evolución de la microflora oxidante del azufre en el suelo V, incubado solo, con adición de azufre, de materia orgánica y los dos conjuntamente

DISCUSION

Los resultados obtenidos en estas experiencias de incubación muestran el contenido tan diferente en microflora sulfooxidante en los suelos estudiados. Los datos presentados en el cuadro 1 muestran una evolución en el número de estas bacterias, paralela en todos los suelos, siendo el nivel alcanzado en las distintas tomas de muestra diferente en cada tipo de suelo, pero apreciándose los puntos máximo y mínimo hacia la misma época del tiempo de incubación.

La evolución a lo largo del período de estudio es común a la quepresenta la microflora total o cualquier clase de microorganismos: en experiencias de incubación de suelos. Se aprecian dos máximos: uno, muy próximo al comienzo de la incubación, y otro, bastantemayor, que ocurre generalmente entre la segunda y tercera semana, aunque a veces se desplaza hasta la cuarta.

El primer máximo, más apreciable en unos que en otros suelos de los ensayados, puede deberse al hecho descrito por Stevenson (18) y Birch (3-5), sobre la rápida proliferación microbiana que ocurre en un suelo desecado cuando es humedecido, y que hacia los 10 díastiende a cesar. Parece ser que este hecho está condicionado por el humus del suelo. Esta materia no es microbiológicamente inatacable, pero se hace resistente cuando se encuentra absorbida sobre la superficie de algunos minerales de la arcilla (19). Este comportamiento es prácticamente universal para los microorganismos del suelo y para todos los suelos, manifestándose de distinta manera en los ensayados en este estudio, de acuerdo con el grado de humedad que contenían al comienzo y al tiempo transcurrido en el laboratorio antes de las experiencias. El segundo máximo corresponde a cuando ya se hamestab ecido las condiciones óptimas para el desarrollo.

No se consideraron de interés los datos obtenidos a tiempo cero por la influencia ejercida por el diferente estado de humedad de las muestras cuando fueron tomadas.

De los datos expuestos se deduce que no hay correlación alguna entre la actividad sulfooxidante del suelo y el nivel de azufre asimilable y cualquiera otra de las características físicas o químicas estudiadas. Sólo parece existir una relación aparente, aunque no exacta,

entre el grado de actividad oxidante del suelo y la cantidad de materia orgánica presente en el mismo.

Los resultados obtenidos cuando los suelos son incubados con azufre en cantidad proporcional a la utilizada en los ensayos de campo, presentados en las figuras 1-5, muestran valores muy superiores respecto a la respuesta obtenida cuando se incuban los suelos sin adición alguna.

Es conocido que la mayor parte del azufre disponible, aunque no directamente asimilable, en el suelo, lo es en forma orgánica (11), constituyendo parte de los residuos más o menos evolucionados de animales o vegetales.

Teniendo en cuenta el contenido de materia orgánica como posible factor que condicione el desarrollo de la microflora del azufre, se creyó de interés la adición antes de la incubación, de una determinada cantidad de materia orgánica. La actividad sulfooxidante apreciada en el número de los correspondientes microorganismos, representados, para cada tipo de suelo, en las figuras 1-5, muestra en todos los suelos un incremento considerable, siguiendo una evolución paralela a la manifestada en incubación sin materia orgánica, lo que confirma que ésta sola no es la causa del diferente comportamiento de los distintos tipos de suelos. Este incremento es, sin embargo, unas 10 veces menor que el observado en la incubación con azufre solo.

En la última serie de incubaciones realizadas con adición conjunta de azufre y materia orgánica, se apreció una evolución normal, con unos valores intermedios entre los encontrados para suelos con adición de azufre y con adición de materia orgánica. El fenómeno es común para los cuatro primeros suelos estudiados, mientras que en el quinto se comporta de un modo distinto. La explicación de estos resultados, contrarios, en dichos cuatro suelos, a lo que cabría esperar, un efecto acumulativo de ambos aditivos, podría ser la inhibición del desarrollo de las bacterias del azufre por la rápida e intensa proliferación de la microflora heterótrofa consecuente a la adición de la materia orgánica. El alto nivel en azufre asimilable en el quinto suelo puede ser reducido por la población microbiana aportada con la materia orgánica, no inhibiéndose la oxidación del elemento en cuestión por exceso de producto final. La incorporación de dicha

materia orgánica eleva la cifra de sulfooxidantes a los niveles alcanzados en el suelo IV cuando se adiciona azufre + materia orgánica. Actualmente se encuentra en marcha una investigación sobre el posible papel inhibidor o represor de la sulfooxidación por la presencia de sulfato en el medio de desarrollo de una micropoblación sulfooxidante.

Todo lo anteriormente expuesto sobre la microf ora sulfooxidante puede, sin error, ser transportado o aplicado a los microorganismos sulfatorreductores cuyo contenido corre en todo momento paralelo al de aquéllos (cuadro 3). La significación de la microflora reductora no es alta, como corresponde a un suelo colocado en condiciones óptimas de aireación. Este paralelismo no es privativo de este tipo de microorganismos, manifestándose con iguales características en otros grupos microbianos, desnitrificantes, por ejemplo, pudiendo ser índice de actividad microbiana, como Barjac (2) considera a estos últimos.

RESUMEN

En diferentes tipos de suelos han sido determinadas las actividades sulfooxidante y sulfatorreductora, así como la evolución del NMP de los grupos microbianos implicados a lo largo de un período de incubación suficientemente largo a temperatura y humedad adecuadas. Se ha observado que el número de sulfobacterias es independiente de la cantidad de azufre asimilable del suelo, existiendo una cierta correlación entre la actividad sulfooxidante y el contenido en materia orgánica. La evolución de esta actividad microbiana presenta un máximo entre la segunda y tercera semana de incubación, manteniéndose la misma evolución cuando los suelos son incubados con adición de azufre, de materia orgánica o los dos conjuntamente. En este último caso se desarrolla un número de sulfobacterias inferior al que aparece cuando se adiciona azufre solo, no presentándose efecto acumulativo y sí un cierto retraso en el desarrollo microbiano.

SUMMARY

Sulfur-oxidizing and su'phate-reducing activities in different types of soils. Effect of sulfur and organic matter addition

Sulfur-oxidizing and sulphate-reducing activities and the evolution of the MPN of the microorganisms involved in a sufficiently long period of incubation under adequate conditions have been evaluated in different types of soils. It has been observed that the number of sulfobacteria does not depend on the quantity of available sulfur in the soil, although a certain correlation exists between sulfur-oxidizing activity and the level of organic matter. The evolution of this activity presents a maximum about the second or third week of incubation, being observed the same evolution in soils incubated with sulfur, organic matter or both together. In the last case, a number of sulfur-microorganisms lower than that corresponding to sulfur addition is developed without an acumulative effect of both additives, showing, on the other hand, a certain delay in the development of this microbial group.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, O. N. 1951. Experiments in Soils Bacteriology. Burgess Publishing, Minneapolis, Minnesota.
- BARJAC, H. DE. 1954. Denitrifying microflora, its normal presence in the soil. Ann. Inst. Pasteur, 8, 440-44.
- 3. Birch, H. F. 1958. The effect of soil dryig on humus decomposition and nitrogen availability. Plant Soil, 10. 9.
- BIRCH, H. F. 1959. Further observations on humus decompositions and nitrifications. Plant Soil, 11, 262-86.
- Birch, H. F. 1961. Nitrification in soils after different periods of dryness. Plant Soil, 12, 81.
- 6. Esteban, E.; Gómez, M.; García-Chicano, J., y Gallardo, F. 1973. Estudio de algunos métodos de determinación de fósforo asimilable en suelos. An. Edafol. Agrobiol., XXXII. 135-42.
- 77. ESTEBAN, E.; GÓMEZ, M., y LAVADO, R. 1972. Determinación de azufre asimilable en suelos típicos de la provincia de Granada. Agrochimica, XVII, 210-16.

- 8. Gallardo-Lara, F. 1971. Estudio agrobiológico sobre la activación de una turba por fermentación para incrementar su poder fertilizante. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- HAQUE, I, and WALMSLEY, D. 1972. Incubations studies on mineralization of organic sulphur and organic nitrogen. Plant Soil, 37, 255-64.
- JORDAN, H. V. and REISENAUER, H. M. 1957. Sulphur and soil fertility. U. J. Agr., Yearb, Agr., 107-11.
- 11. Kelly, D. P. 1972. Transformation of sulphur and its compounds in soils. Ann. Agron., n.º hors serie, 217-32.
- 12. Krol, M.; Maliszewska, W., and Sinta, J. 1972. Bioogical activity of soils stringly polluted with sulphur. Pol. J. Soil Sci., 5, 25-33.
- Lluch, C. 1974. Aspectos microbiológicos y fisiológicos de la utilización del azufre como fertifizante por vía foliar. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- 14. Lluch, C., y Olivares, J. 1976. Evolución de las actividades sulfooxidante, amonificante y nitrificante en suelos fertilizados con azufre. Agrochimica, 20, 93-100.
- 15. Росном, J. 1954. Manuel Technique d'Analyse en Microbiologie du Sol. Masson et Cie., Editeurs, Paris.
- 16. POCHON, J., et TARDIEUX, P. 1962. Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol. Editions de la Tourelle.
- 17. Postgate, J. R. 1969. Viable counts and viability. Methods Microbiol., 1, 611.
- 18. Stevenson, I. L. 1956. Some observations on the microbial activity in remoistened air dried soils. Plant Soil, 8, 170-82.
- WILLIAMS, C. H. 1968. Seasonal fluctuations in mineral under subterranean clover pasture in Southern New South Wales, Aust. J. Soil Res., 6, 131-39.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (CSIC) DEPARTAMENTO DE PROTOZOOLOGIA

POSSIBLE NUCLEAR-CYTOPLASMIC TRANSFERS IN THE EXCONJUGANTS OF STYLONYCHIA MYTILUS: ULTRASTRUCTURAL OBSERVATIONS

bv

Rosario GIL

INTRODUCTION

The polytene chromosomes in some ciliate protozoans have been studied in our laboratory (1-4, 12-14, 17, 19, 22) as well as in other laboratories (5-7, 9, 15, 20-21, 23-28, 30).

The present work was undertaken to examine the possibility that exchange occurs between the nucleus and cytoplasm in exconjugants of Stylonychia mytilus.

MATERIAL AND METHODS

Of the two strains of *Stylonychia mytilus* used, one was isolated and maintained in our laboratory as previously described (18), the other one was supplied by D. Ammermann (Tübingen).

Approximately 40 h old exconjugants of Stylonychia mytilus were fixed for 20 min with cold 2,5 % glutaraldehyde buffered to pH 7 $4 \le$

Groups of exconjugants embedded in agar prior to dehydration were embedded in Epon. Random and serial sections were cut with a Reichert OMU2 ultramicrotome and mounted on formvar and carbon coated grids

Microbiol. Éspañ, 29 (1976), 125.

Staining was carried out with uranyl acetate-lead citrate (29) and uranyl-EDTA-lead according to Bernhard (8).

The preparations were viewed with a Philips EM 300 electron microscope.

RESULTS

Ultrastructure of polytene chromosomes

Section of the macronuclear anlage of about 40 h old exconjugants reveal the conspicuous banding of the polytene chromosomes, electron dense regions alternate with less dense areas (figure 1A).

Some of the less dense bands are constituted by a number of granules, approximately 100 Å in diameter (figures 1A-B).

In order to investigate whether or not the granules are composed of RNA, uranyl-EDTA-lead staining was performed. The macronuclear anlage contents show a loss of electron density although the dense granules were well stained (figures 5A-B).

Nucleocytoplasmic transport

When the macronuclear anlage is constituted by well developed polytene chromosomes, the granular component is not only associated with some regions of the chromosomes (figure 1B) but also distributed throughout the nuclear sap. Within the nucleoplasm free granules and clusters of granules can also be found (figure 2). The size of the granules is about 100 Å in diameter.

On the other hand careful inspection of sections of the macronuclear anlage at higher magnification reveals a number of free granules (figure 1C) and strings of granules (figure 3) within the nuclear envelope. The same type of dense granules of approximately 100 A in diameter could be seen at both sides of the nuclear membrane (figure 4). Numerous granulated vesicles are attached to the outer side of the nuclear envelope as can be clearly seen in figure 1C.

Figures 1.4-1C. Section of a 40 h old exconjugants. Glutaraldehyde fixed, Epomembedbed, uranyl acetate-lead citrate stained.

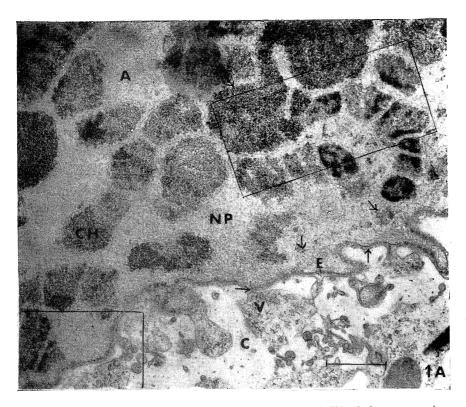


Figure 1A. In the well developed polytene chromosomes (CH) of the macronuclear aniage (A), granular material can be seen. There are granules (arrows) in the nucleoplasm (NP), in the nuclear envelope (E) and in the vesicles (V) attached to the nuclear envelope. The two delimited areas are enarged in figures 1B and 1C (\times 16,188) Bar = 1 μ m.

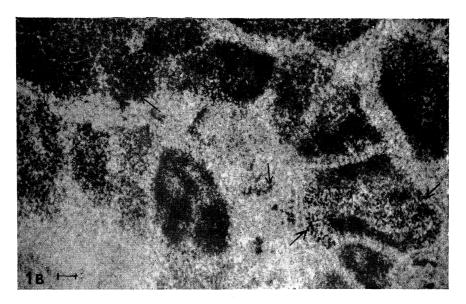


Figure 1B. Higher magnification of the rectangular area shown on top of figure 1A. Granular material is clearly observable in the polytene chromosomes (arrows) and in the nucleoplasm (arrows) (\times 41.040) Bar = 0.1 μ m.

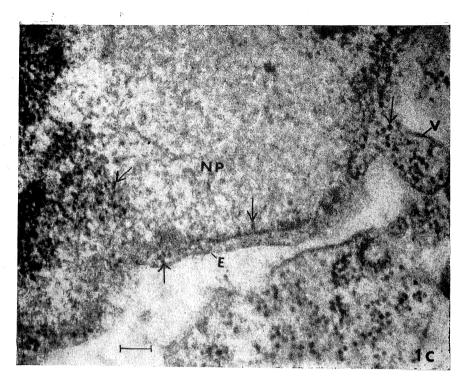
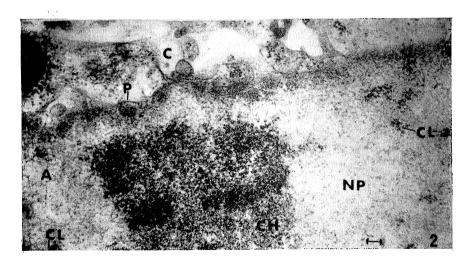


Figure 1C. Higher magnification of the rectangular area shown at the bottom of figure 1A. The granules (arrows) are clearly observed in the chromosomes, in the nucleop asm, through the nuclear envelope and in some cytoplasmic vesicles attached to the nuclear envelope (\times 80.940) Bar = 0.1 μ m.



rigure 2. Section of a 40 h old exconjugant. Glutaraldehyde fixed, Epon embedded, uranyl-EDTA-lead stained. Clusters of dense granules (CL) are clearly observed in the nucleop asm (NP) and in the chromosomes (CH) (× 34.500) Bar = 0.1 μ m.

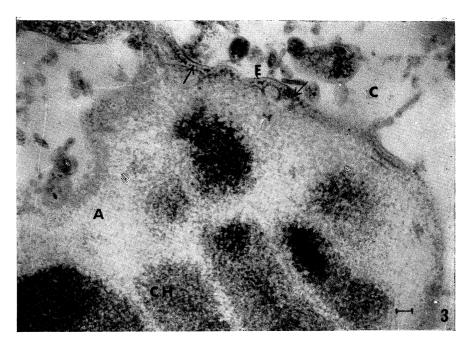


Figure 3. Section of a 40 h old exconjugant. Glutaraldehyde fixed, Epon embedded, uranyl-acetate-citrate stained. Dense granules (arrows) can be observed within the nuclear envelope (E) (\times 46,000) Bar = 0.1 μ m.

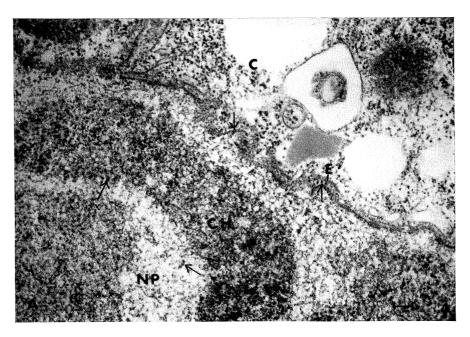


Figure 4. Section of a 40 h old exconjugant. Gutaraldehyde fixed, Epon em'edded, uranyl-EDTA-lead stained. Free dense granules (arrows) are clearly observed in the chromosomes (CH), in the nucleoplasm (NP), through the nuclear envelope (E) and the cytoplasm (C) (\times 47.196) Bar = 0.1 μ m.

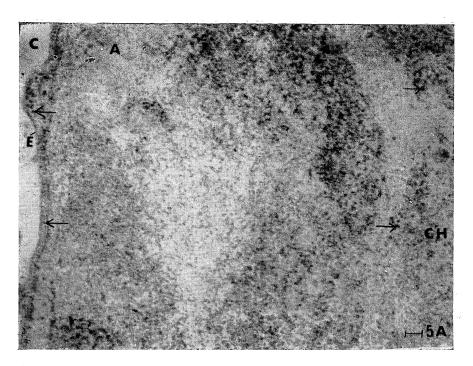


Figure 5A. Section of a 40 h old exconjugant. Glutara dehyde fixed, Epon embedded; with uranyl-EDTA-lead (from a 30 min, EDTA treatment). The chromatin bands of the chromosomes (CH) appear partially attacked and granules (arrows) are well stained. Macronuclear anlage (A), cytoplasm (C) (\times 40,500) Bar = 0, $\overline{1}$ = ym.

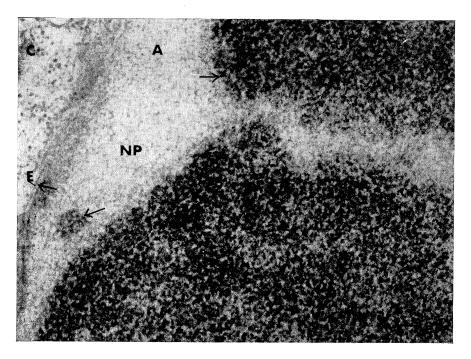


Figure 5B. Control section of that show in figure 5A, stained with uranyl-acetate-tead crirate. The bands of the chromosomes (CH) are darkly stained. Granules are shown by arrows (\times 57,400) Bar = 0,1 μ m.

DISCUSSION

When the macronuclear anlage of $Stylonychia\ mytilus$ exconjugants is constituted by well developed polytene chromosomes, dense granular material is found associated with the chromosomes $(figure\ 1B)$ and dense free granules and clusters or strings of granules are found in the nucleoplasm $(Figures\ 2,\ 4)$. On the other hand similar granules $(figure\ 5A)$ or strings of granules $(figure\ 3)$ are found within the nuclear membrane. The presence of granules within the nuclear envelope suggests that a nuclear material transport from the nucleus to the cytoplasm takes place.

The nuclear-cytoplasmic transfers are well known in Diptera. Granules, probably containing messenger RNA molecules, have been observed by electron microscopy in cells of the salivary glands of *Chironomus thummi*; the granules about 400-500 Å in diameter were seen to go from the nucleus to the cytoplasm through the pores of the nuclear membrane (32). The transfer mechanism was extensively reviewed by Stevens and Andre (31). The puff granules of *Hybosciara fragilis* were found enclosed into the space between the two membranes of the nuclear envelope by Da Cunha et al. (10). When studying nuclear-cytoplasmic transfer.

Derksen et al. (11) described RNP particles in the region 2-48C of a polytene chromosome of *Drosophila hydei* and suggested that the large particles produced within puff 2-48C are released from this region into the nucleop'asm, further the small particles could pass through the pores the nuclear envelope.

On the other hand, in the macronuclear anlage of Stylonychia mytilus, in addition to the passage of the granules through the suclear pores, the presence of blebs of the outer nuclear membrane with numerous granules probably indicates another mechanism of nuclear transport to the cytoplasm. Both mechanisms have been suggested in the oocyte nucleus of the spider crab Libinia emarginata (16).

The results gained with uranyl-EDTA-lead staining indicate that the dense granules shown inside the chromosomes, in the nucleoplasm and within the nuclear envelope could be ribonucleoprotein particles, since they remain darkly stained after the EDTA treatment (figure 5A).

ACKNOWLEDGEMENTS

The author expresses her gratitude to Dr. G. Sierra for help in the preparation of the manuscript, Dr. P. Alonso for her critical reading of the manuscript, Mr. F. García Hidalgo for the electron micrographs and to Miss M. I. Tejero for her excellent technical assistance. Also thanks are due to Dr. D. Ammermann for supplying one of the Stylonychia mytilus strains used in this work.

SUMMARY

Electron dense granules about 100 Å in diameter are present in polytene chromosomes, nucleoplasm and nuclear membrane of the macronuclear anlage of *Stylonychia mytilus*. Uranyl-EDTA-lead staining suggests that they are ribonucleoproteins.

RESUMEN

Posible transporte de material entre el núcleo y el citoplasma en exconjugantes de Stylonychia mytilus: observaciones ultraestructurales

En el esbozo macronuclear se han observado unos gránulos de unos 100 Å de diámetro, los cuales se encuentran en los cromosomas politénicos, en el nucleoplasma y entre la membrana nuclear.

Después de utilizar la coloración uranilo-EDTA-plomo sugerimos que dichos gránulos podrían contener ribonucleoproteínas.

REFERENCES

- 1. Alonso, P., and Jareño, M. A. 1974. Incorporación de uridina-H³ en el esbozo macronuclear de Stvlonychia mytilus. Microbiol. Españ., 27, 199-211.
- 2. Alonso, P., and Pérez-Silva, J. 1965. Giant chromosomes in Protozoa. Nature, 205, 313-14

- Alonso, P., and 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.
- Alonso, P., and Pérez-Silva, J. 1967. Apareamiento somático y politenización en los cromosomas gigantes de ciliados hipótricos. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Natur. Secc. Biol., 65, 469-75.
- 5. Ammermann, D. 1965. Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten Stylonychia mytilus, Ehrenberg. Arch. Protistenk., 108, 109-152.
- Ammermann, D. 1968. Synthese und abbau der Nucleinsäuren während der Entwicklung des Makronucleus von Stylonychia mytilus (Protozoa, Ciliata). Chromosoma, 25, 107-20.
- Ammermann, D.; Steinbrück, G.; Berger, L., and Henning, W. 1974. The development of the macronucleus in the ciliated protozoan Stylonychia mytilus. Chromosoma, 45, 401-29.
- Bernhard, W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res., 27, 250 65.
- 9. Возтоск, С. J., and Prescott, D. M. 1972. Evidence of gene diminution during the formation of the macronucleus in the protozoan Stylonychia. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 69, 139-42.
- DA CUNHA, A. B.; RIESS, R. W.; BIESELE, J. J.; MORGANTE, J. S.; PAVAN, C., and GARRIDO, M. C. 1973. Studies in cytology and differentiation in sciaridae VI: Nuclear-cytoplasmic transfers in *Hybosciara fragilis* Morgate. (Diptera, Sciaridae). Caryologia, 26, 549-61.
- 11. Derksen, J.; Berendes, H. D., and Willart, E. 1973. Production and release of a locus-specific ribonucleoprotein product in polytene nuclei of *Droso-phila hydei*. J. Cell Biol., 59, 661-68.
- 12. GIL, R., and Alonso, P. 1973. Further ultrastructural observations in the exconjugants of *Stylonychia myticus*, Progr. Protozool., 152.
- 13. Gil, R.; Alonso, P., and Pérez-Silva, J. 1972. Ultrastructure of the macronuclear anlage in *Stylonychia mytilus*. Exp. Cell Res., 72, 509-18.
- 14. GIL, R.; PÉREZ-SILVA, J., and Alonso, P. 1969. Fine structure of exconjugants of Stylonichia mytilus Ehrenberg. Progr. Protozool., 61.
- GOLIKOVA, M. N. 1965. Der Aufbau des Kernapparates und die Verteilung der Nukleinsauren und Proteine bei Nyctotherus cordiformis Stein. Arch. Protistenk.. 108. 191-216.
- 16. Hinsch, G. 1970. Possible role of intranuclear membranes in nuclear-cytoplasmic exchange in spider crab oocytes. J. Cell Biol., 47, 531-35.
- 17. JAREÑO, M. A., and ALONSO, P. 1973. Incorporation de l'uridine tritiée par les exconjugants de *Stylonychia mytilus*. Progr. Protozool., 199.
- 18. Jareño, M. A.; Alonso, P., and Pérez-Silva, J. 1970. Induced autogamy in 2 species of Stylonychia. J. Protozool., 17, 384-88.
- 19. Jareño, M. A.; Alonso, P., and Pérez-Silva, J. 1972. Identification of some puffed regions in the polytene chromosomes of *Stylonychia mytilus*. Protistologica, 8, 237-43.

- 20. KLOETZEL, J. A. 1970. Compartmentalization of the developing macronuc'eus following conjugation in *Stylonychia* and *Euplotes*. J. Cell Biol., 47, 395-4(7.
- 21. Murti, K. G. 1973. Electron-microscopic observations on the macronuclear development of Stylonychia mytilus and Tetrahymena pyriformis (Ciliophora, Protozoa). J. Cell Sci., 13, 479-509.
- 22. Pérez-Silva, J.; Alonso, P.; Gil, R., and Jareño, M. A. 1969. Puffing in the polytene chromosomes of Stylonychia mytilus Ehrenberg. Progr. Frotozool., 36.
- 23. Prescott, D. M.; Bostock, C. J.; Murti, K. G.; Lauth, M. R., and Gamow, E. 1971. DNA of ciliated protozoa. I. Electron microscopic and sedimentation analyses of macronuclear and micronuclear DNA of Stylonychia mytilus. Chromosoma, 34, 355-66.
- Prescott, D. M., and Murti, K. G. 1973. Chromosome structure in Ciliated Protozoans. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 609-69
- 25. Prescott, D. M.; Murti, K. G., and Bostock, C. J. 1973. Genetic apparatus of Stylonychia sp. Nature, 242, 576.
- 26. RADZIKOWSKI, S. 1967. Nuclear behaviour during conjugation and polytene chromosomes in the exconjugants of *Chilodonella cucullulus* (O. F. Müller). Bull. Acad. Pol. Sci. B, 15, 749 51.
- RADZIKOWSKI, S. 1973. The organization of the nuclear apparatus and synthesis of nucleic acids during conjugation in Chilodonella cucullu'us. Arch. Protistenk., 115, 419-28.
- 28. RAO, M. V. N., and Ammermann, D. 1970. Polytene chromosomes and nucleic acid metabolism during macronuclear development in *Eup.otes*. Chromosoma. 29, 246-54.
- 29. 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.
- 30. SAPRA, G. R., and DASS, C. H. S. 1970. Organization and development of the macronuclear anlage in *Stylonychia notophora* Stokes. J. Cell Sci., 6, 251.68
- 31. Stevens, B., and Andre, J. 1969. Handbook of Molecular Cytology, 837-71. Lima-de Faria A, Amsterdam, North-Holland.
- 32. Stevens, B., and Swift, H. 1966. RNA transport from nucleus to cytoplasm in Chironomus salivary glands. J. Cell. Biol., 31, 55-77.

IFACULTAD DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

FORMAS DEFECTIVAS DE PARED CELULAR EN CITROBACTER INTERMEDIUS C₃

por

J VIVES-REGO, S. HERNANDEZ y J. GUINEA

INTRODUCCION

La inducción de formas L, protoplastos y esferoplastos se ha verificado con agentes químicos, físicos y físico-químicos. La utilización de compuestos orgánicos no bactericidas o bacteriostáticos, no ha sido frecuente y en cualquier caso, bajo la acción de colorantes, violeta de genciana y agentes citoes:áticos, como el fluorouración y el degrado! (3). El presente trabajo muestra la inducción de formas deficientes de pared celular, cuando se emplea el citrato como única fuente de carbono y energía en el desarrollo de Citrobacter intermedius C₃. Se describen los diferentes tipos de desarrollo ce'u'ar y la morfología colonial, que sugieren la posibilidad de un desarrollo L por inducción del citrato.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismo

Se utiliza la cepa Citrobacter intermedius C₃ aislada inicialmente como productora de aminoácidos (1) y cuyas características sistemáticas, genéticas y culturales han sido descritas por Parés y colaboradores (4).

Microbiol. Bspan., 29 (1976), 135.

Medios

Se utiliza el medio M₁ cuya composición en g/l. es la siguiente: glucosa, 20; NH₄Cl, 7; KH₂PO₄, 1; MgSO₄, 0,5; bacto agar (Difco), 10; pH final, 7.2. El medio M₁C contiene 19,3 g/l de citrato trisódico dihidratado (Merck art. 6448) en lugar de g'ucosa. El resto de la composición es idéntica a la descrita para el medio M₁.

Inducción de formas anómalas

Se obtienen colonias de Citrobacter intermedius C₃ sobre placasde Petri con M₁, a partir de un cultivo de 16-18 h sobre el mismo
medio. La incubación se efectúa a 30 °C durante 48 h. Una colonia
normal (figura 1a) se resuspende en líquido de Ringer 1/4 (Oxoid
BR 52) y se emplea para inocular las placas que contengan M₁C,
manteniéndose a 30 °C durante 2-4 días. La observación microscópica colonial se efectúa a lo largo de los días tercero y cuarto.
Las fotografías de las células y de las colonias se han obtenido com
una cámara automática Wild MKa5, montada sobre un microscopioWild M-20. Las observaciones de las células se efectúan por dos
métodos: a campo claro, previa tinción con safranina por espaciode 5 min, y bajo contraste de fases, sin tinción.

RESULTADOS

Al efecuar la inducción de formas anómalas, como se ha expresado en «Material y métodos», aparecen colonias pequeñas, lobuladas y con una zona central granular y densa (figura 1b) con una frecuencia aproximada del 1 % (colonias anómalas/colonias normales). El tamaño y aspecto se muestran altamente coincidentes com las colonias correspondientes al desarrollo L. Las dimensiones oscilan entre 0,1-0,2 mm de diámetro medio, en contraposición al tamaño sensiblemente superior de las formas normales (1-1,5 mm de diámetro), presentando, además, bordes lisos y forma circular (figura 1a).

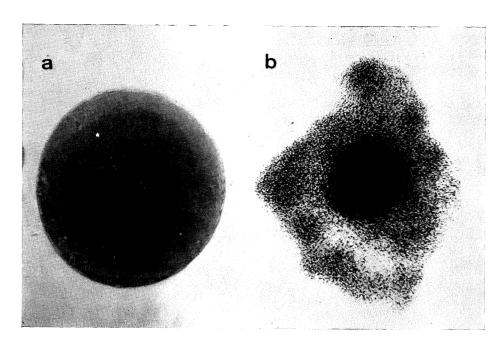


Figura 1. C. intermedius C_3 , a) Aspecto microscópico de una colonia normal. \times 82,5. b) Aspecto microscópico de una colonia anómala inducida por el citrato \times 275.

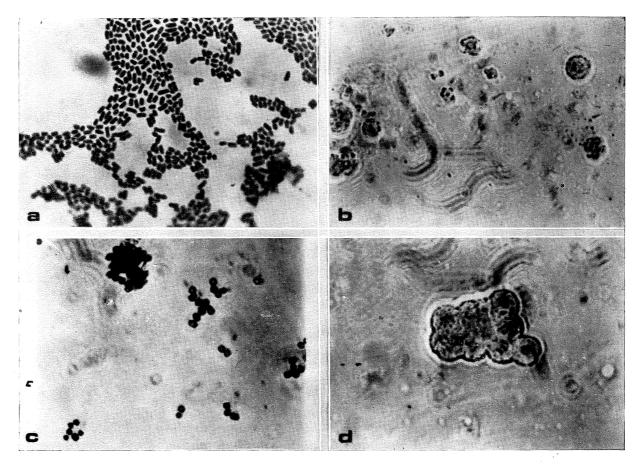


Figura 2. C. intermedius C_3 . a) Tinción gram, desarrollo sobre M_1 (30°, 24 h). b) Formas esféricas teñidas con safranina. c) Formas granulares teñidas con safranina. d) A gregados de formas esféricas. Contraste de fases. \times 2.750.

Las colonias anómalas están constituidas por elementos celulares totalmente distintos a los cocobacilos de la cepa paterna Citrobacter intermedius C₃ cuando se desarrolla sobre el medio M₁ (figura 2a). Pueden observarse elementos esféricos y refringentes muy abundantes, que sugieren formas protoplasmáticas carentes o defectivas de pared celular. También se ponen de manifiesto unos corpúsculos más pequeños y de tamaño variable, que se encuentran como formas independientes en unos casos (figura 2c), o bien, que parecen originarse de las formas esféricas antes descritas (figura 2b). Ocasionalmente se observan masas sin estructura y de dimensiones variables, constituidas por agregados de elementos esféricos o globulosos (figura 2d). Estos tipos de agregados celulares sugieren la existencia de formas sinciciales, concomitantes con el desarrollo del tipo L, antes sugerido.

La resiembra de una colonia anómala sobre el medio M₁C muestra un desarrollo mayoritario de colonias anómalas. Todos los subcultivos obtenidos a partir de una colonia anómala muestran una gran uniformidad en cuanto a los tipos celulares descritos y al tipo colonial, sin necesidad de modificar las características culturales del medio M₁C.

DISCUSION

La inducción de formas celulares anómalas por el citrato al 2 % se ha descrito y estudiado extensamente como una característica sistemática de Arthrobacter (2) y en Corynebacterium (5), denominándose «efecto citrato». Sin embargo, las anomalías descritas no incluyen formas como las señaladas por nosotros. Tampoco se evidencia la ausencia parcial o total de pared celular.

Por otra parte, es interesante señalar la incapacidad de obtener formas normales revertidas por supresión del citrato en el caso de *Citrobacter intermedius* C₃. Contrariamente, la eliminación del citrato origina formas normales en los microorganismos que presentan el denominado «efecto citrato».

RESUMEN

Se ha puesto de manifiesto la inducción de un tipo de desarrolloanómalo en Citrobacter intermedius C₃, cuando se utiliza el citrato como única fuente de carbono y energía. Las características morfológicas, celulares y coloniales del desarrollo inducido sugieren una re ación con las formas L. Se observan formas mayores y menoresque las formas normales.

SUMMARY

Cell reall deficient forms in Citrobacter intermedius C3

L-form induction in *Citrobacter intermedius* C₃ by citrate is suggested. Small, lobulated and dense granular central area colonies appears at a approximated frequency of 1 %. Spherical cellular elements, smaller granules and structureless masses, different from parent coccibacilli are described.

The induction is achieved using citrate as the only source of carbon and energy. Stability of L-form is obtained without changing the cultural conditions.

BIBLIOGRAFIA

- CLOTET, R.; GUINEA, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1968. Segregación de aminoácidos por una cepa de C. intermedium. Microbiol. Españ., 21, 155-73.
- KOMAGATA, K.; YAMADA, K., and OGAWA, H. 1969. Taxonomic studies on coryneform bacteria. I. Division of bacterial cell. J. Gen. Appl. Microbiol.. 15, 243-59.
- 3. MATTMAN, L. H. 1974. 1974. Cell Wall Deficient Forms. CRC Press, Cleveland.
- Parés, R.; Guinea, J.; Hernández, S.; Valoix, J. and Jofre, J. 1974, A new episomic element controlling fermentative metabolism and excretion of amino acids by Citrobacter intermedium C₃. J. Bacteriol., 119, 9-18.
- Yamada, K, and Komagata, K. 1972. Taxonomic studies on coryneform bacteria.
 IV. Morphological, cultural, biochemical and physiological characteristics.
 J. Gen. Appl. Microbiol., 18, 399-416.

CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

El 6.º Congreso Nacional de Microbiología, patrocinado por la Sociedad Española de Microbiología y la Universidad de Santiago, se celebrará durante los días 6, 7, 8 y 9 de julio de 1977.

La correspondencia debe dirigirse a la Secretaría del 6.º Congreso Nacional de Microbiología, Departamento de Microbiología, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela.

CURSOS EN LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Un ciclo de 25 conferencias sobre «Estructura y función en microorganismos» se desarrollará en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca, a partir del 21 de febrero próximo, bajo la dirección de los Profs. Julio R. Villanueva (Director del Departamento) y Rafael Sentandreu.

Del 11 al 16 de abril, y en el mismo Departamento, tendrá lugar un curso acerca de «Genética y Biología Molecular de Microorganismos Industriales», organizado por el Instituto de Microbiología Bioquímica, del CSIC, y el ya citado Departamento.

Para más información, los interesados pueden dirigirse al Prof. Julio R. Villanueva, en la Universidad salmantina.

PRIMERA REUNION NACIONAL SOBRE BRUCELOSIS

Esta Reunión se celebrará en Valladolid durante los días 15 y 16 del próximo mes de abril. Inscripciones e informes: Dr. Ricardo Landínez, Secretario de la 1.ª Reunión Nacional sobre Brucelosis, Jefatura Provincial de Sanidad, Avenida Ramón y Cajal, 6, Valladolid.

Microbiol. Españ., 29 (1976), 141.

CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

El 6.º Congreso Nacional de Microbiología, patrocinado por la Sociedad Española de Microbiología y la Universidad de Santiago, se celebrará durante los días 6, 7, 8 y 9 de julio de 1977.

La correspondencia debe dirigirse a la Secretaría del 6.º Congreso Nacional de Microbiología, Departamento de Microbiología, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela.

CURSOS EN LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Un ciclo de 25 conferencias sobre «Estructura y función en microorganismos» se desarrollará en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca, a partir del 21 de febrero próximo, bajo la dirección de los Profs. Julio R. Villanueva (Director del Departamento) y Rafael Sentandreu.

Del 11 al 16 de abril, y en el mismo Departamento, tendrá lugar un curso acerca de «Genética y Biología Molecular de Microorganismos Industriales», organizado por el Instituto de Microbiología Bioquímica, del CSIC, y el ya citado Departamento.

Para más información, los interesados pueden dirigirse al Prof. Julio R. Villanueva, en la Universidad salmantina.

PRIMERA REUNION NACIONAL SOBRE BRUCELOSIS

Esta Reunión se celebrará en Valladolid durante los días 15 y 16 del próximo mes de abril. Inscripciones e informes: Dr. Ricardo Landínez, Secretario de la 1.ª Reunión Nacional sobre Brucelosis, Jefatura Provincial de Sanidad, Avenida Ramón y Cajal, 6, Valladolid.

Microbiol. Españ., 29 (1976), 141.

CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

El 6.º Congreso Nacional de Microbiología, patrocinado por la Sociedad Española de Microbiología y la Universidad de Santiago, se celebrará durante los días 6, 7, 8 y 9 de julio de 1977.

La correspondencia debe dirigirse a la Secretaría del 6.º Congreso Nacional de Microbiología, Departamento de Microbiología, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela.

CURSOS EN LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Un ciclo de 25 conferencias sobre «Estructura y función en microorganismos» se desarrollará en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca, a partir del 21 de febrero próximo, bajo la dirección de los Profs. Julio R. Villanueva (Director del Departamento) y Rafael Sentandreu.

Del 11 al 16 de abril, y en el mismo Departamento, tendrá lugar un curso acerca de «Genética y Biología Molecular de Microorganismos Industriales», organizado por el Instituto de Microbiología Bioquímica, del CSIC, y el ya citado Departamento.

Para más información, los interesados pueden dirigirse al Prof. Julio R. Villanueva, en la Universidad salmantina.

PRIMERA REUNION NACIONAL SOBRE BRUCELOSIS

Esta Reunión se celebrará en Valladolid durante los días 15 y 16 del próximo mes de abril. Inscripciones e informes: Dr. Ricardo Landínez, Secretario de la 1.ª Reunión Nacional sobre Brucelosis, Jefatura Provincial de Sanidad, Avenida Ramón y Cajal, 6, Valladolid.

Microbiol. Españ., 29 (1976), 141.

CONGRESO DE QUIMIOTERAPIA

El 10.º Congreso Nacional de Quimioterapia se reunirá, del 18 al 23 de septiembre del año próximo, en el Instituto Federal de Tecnología, de Zurich (Suiza), auspiciado por la Sociedad «P. Ehrlich», de Quimioterapia.

Correspondencia: Administrative Secretariat, 10th International Congress of Chemotherapy, P. O. Box 182, CH-4013, Basle (Suiza).

CONGRESO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Se proyecta celebrar el 7.º Congreso Internacional de Enfermedades Infecciosas y Parasíticas en Varna (Bu'garia), del 2 al 6 de octubre de 1978.

Información: Organizing Committee of the 7th International Congress of Infectious and Parasitic Diseases, 26, Vl. Zaimov Bld., P. O. B. 33, 1504, Sofia (Bulgaria).

CONGRESO DE QUIMIOTERAPIA

El 10.º Congreso Nacional de Quimioterapia se reunirá, del 18 al 23 de septiembre del año próximo, en el Instituto Federal de Tecnología, de Zurich (Suiza), auspiciado por la Sociedad «P. Ehrlich», de Quimioterapia.

Correspondencia: Administrative Secretariat, 10th International Congress of Chemotherapy, P. O. Box 182, CH-4013, Basle (Suiza).

CONGRESO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Se proyecta celebrar el 7.º Congreso Internacional de Enfermedades Infecciosas y Parasíticas en Varna (Bu'garia), del 2 al 6 de octubre de 1978.

Información: Organizing Committee of the 7th International Congress of Infectious and Parasitic Diseases, 26, Vl. Zaimov Bld., P. O. B. 33, 1504, Sofia (Bulgaria).

BIBLIOGRAFIA

BACTERIOPHAGES, por John Douglas. 1975. Chapman and Hall Ltd., Londres. VII + 136 páginas.

Es difícil resumir en un pequeño libro los conocimientos actuales sobre el tema de los bacteriófagos; el libro que nos ocupa, lo consigue. Es ideal para ponerlo en las manos de los que quieran entrar en el tema, ya sea por su condición de estudiantes o por dedicarse a otras ramas de la Ciencia y verse precisados a informarse de los bacteriófagos. Claro, conciso, ilustrado, con un destacado capítulo dedicado a la «Importancia del fago en la biología fundamental». Y hasta con un toque de humor, al comparar a los antiguos augures que vaticinaban los sucesos por el examen de las entrañas de los animales, con los actuales «sacerdotes del fago», que descubren los secretos de la vida por el examen de los fagos del E. coli, que se encuentra en los intestinos del hombre.

L. VILAS

MEDIZINISCHE MICROBIOLOGIE, I y II, por Georg y Wolfgang Wildführ. 1975. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Ber in. XXVI + 564 páginas.

Esta obra contiene las nociones fundamentales de microbiología necesarias para un estudiante de medicina. Es un libro para los estudiantes, y hasta tiene impresos, con diferente tipo de letra, los conceptos de distinta importancia. Pero la organización del libro es muy distinta de la corriente en esta clase de obras, debiéndose

Microbiol. Españ., 29 (1976), 143.

algunas de las cosas nuevas a las sugerencias de estudiantes y ayudantes, según declara el autor.

El tomo I contiene la parte general y la bacteriología, mientras el tomo II completa la bacteriología y estudia los virus, los hongos, los protozoos y los helmintos. Concede especial importancia a la terapéutica, a la epidemiología y a la desinfección y esterilización. Científicamente está al día, aunque no es un libro para científicos, sino para médicos que estén solamente interesados en el aspecto práctico de la Microbiología.

L. VILAS

DIE MYKOPLASMOSE BEIM TIER, por Claus Eichwald, Friedrich Illner y Hans Trolldenier. 1971. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 291 páginas.

Un poco atrasada aparece esta reseña, pero, la indole práctica del libro, en asunto tan poco común, le salva de su presunto envejecimiento, siendo el primero que ha aparecido en lengua alemana sobre la materia. Es un libro de bolsillo, «vademecum» lo llaman sus autores, que pretende mostrar, de modo ordenado y al alcance de veterinarios y microbiólogos, lo que se sabe acerca de las enfermedades causadas por micoplasmas en animales, su terapéutica, su diagnóstico por el laboratorio, su profilaxis e higiene, sin omitir la presentación de las numerosas cuestiones que están sin aclarar en la práctica, o cuya causa se ignora por completo. El apasionante mundo de los micoplasmas, de notoria ubicuidad, y que sólo se estudia científicamente desde hace dos decenios, deja al lector del libro impresionado por la importancia de la repercusión económica de los micoplasmas en la crianza de animales, por la necesidad de perfeccionar las técnicas de diagnóstico y por la urgencia de intensificar la investigación sobre estos seres, que, por su semejanza con las formas L, tantas sorpresas pueden depararnos en la epidemiologia de las infecciones bacterianas.

Para la zootécnia y la veterinaria es un libro muy útil. Para la visión aplicada del problema de las micoplasmosis, muy recomendable.

GRUNDRISS DER MEDIZINISCHEN MIKROBIOLOGIE, por Werner Köhler y Hanspeter Mochmann. 1975. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 648 páginas.

Esta cuarta edición de la obra de Köhler y Mochmann sale cinco años después de la anterior, por lo que ha sido necesario reformar muchas partes de la obra, algunas totalmente redactadas de nuevo

El rápido progreso en el conocimiento de los microorganismos y en el de algunas de sus actividades que han llegado a independizarse como ramas de la ciencia biológica, como es el caso de la inmunología, hacen necesaria la revisión completa de estas obras fundamentales en plazos relativamente cortos.

En la obra que nos ocupa, la revisión ha sido minuciosa, logrando una presentación actual de la microbiología especialmente dedicada al médico, con el mérito de que no elude la explicación de ningún fenómeno, sin dejar de presentar su aplicación para el diagnóstico de laboratorio, tanto de las enfermedades de nuestro clima como de las tropicales.

Trata bacterias, virus, hongos, protozoos y gusanos patógenos. Tiene la estructura de un libro de texto, pero es más extenso y detallado que un libro de texto. Es el libro que puede tener a mano un médico que no sea microbiólogo para informarse de sus dudas sobre cualquier punto de la Microbiología.

L. VILAS

BAKTERIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER CHEMOTHE-RAPIE DER TUBERKULOSE, por K. Bartmann, H. Eule, H. Iwainsky, W. Käppler, A. Krebs, H. Kröger, E. Krüger-Thiemer (†), H. J. Nestler, H. Reutgen, J. K. Seydel, W.-H. Wagner, E. Werner y J. White. 1975. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 389 páginas.

Esta obra es la parte tercera (tomo cuarto) de una colección de monografías de la editorial Gustav Fischer, titulada «Las enfermedades infecciosas y sus agentes», que consta de nueve partes, aunque no se publican en el orden programado. La colección está dirigida por los Dres. G. Meissner, A. Schmiedel y A. Nelles, estos dos últi-

mos fallecidos recientemente. La parte tercera está escrita por los trece autores que se indican en la cabecera. La coordinación de los autores para crear esta obra de conjunto ha sido una idea digna de elogio.

El libro tiene dos partes claramente diferenciadas, una, general, y otra, especial, con diferente mérito a juicio del autor de esta nota, a quien parece superior la parte general. El índice nos puede dar idea de la distribución de las materias. Parte general: 1) Biometría de las micobacterias. 2) Valoración microbiológica cuantitativa in vitro de sustancias tuberculostáticas. 3) Valoración in vivo de sustancias tuberculostáticas. 4) Valoración por medio de micobacterias de la concentración de sustancia antituberculósica en los líquidos y órganos del cuerpo. 5) Resistencia micobacteriana y determinación de la resistencia.

Estos capítulos, redactados por especialistas, ocupan 253 páginas. En la parte especial, después de una introducción general sobre el modo de acción, se tratan, por separado, los siguientes casos:

1) Isoniacida. 2) Tiamida del ácido piridincarbónico. Tiocarbanilida y tiosemicarbazona. 3) Etambutol. 4) Acido paraminosalicílico (PAS).

5) Análogos de la inosita (estreptomicina, kanamicina, viomicina).

6) Tetraciclinas. 7) Cicloserina. 8) Rifampicina. La única colaboración no alemana es la del Dr. R. J. White, de los laboratorios Lepetit, de Mi'án, que se ocupa de la rifampicina.

Toda la obra tiene intención informativa, divulgadora a alto nivel, sin pretensiones de trabajo original, acompañándose de una nutrida literatura. Este tipo de libros es muy necesario para mantener el nivel científico de médicos y microbiólogos. La parte general también es útil para el trabajo de laboratorio.

L. VILAS

ENDOMYKOSEN DES MENSCHEN, Director: Horst Gemeinhardt. 1976. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 427 páginas.

Este excelente tratado de las enfermedades internas del hombre causadas por hongos, ha sido elaborado por el Dr. Gemeinhardt, naturalista, y los médicos Dres. Bader (Rostock), Deicke (Berlin-

Buch), Spitzbart (Leipzig) y Wiesner (Berlin-Buch), formando un conjunto que permite, en la primera parte, la presentación naturalista actual de los agentes de las endomicosis, y el estudio de las endomicosis humanas, su diagnóstico y tratamiento, en la segunda.

Esta obra es original, por varios conceptos, entre los que sobresale la clasificación de las endomicosis por los órganos afectados en el paciente, tarea posib'e por los avances que se han hecho en el conocimiento de estas enfermedades durante el decenio de los años sesenta. Esto ha dado lugar al siguiente índice de la obra: la parte general, titulada «Revisión general de las endomicosis humanas y de sus agentes», se compone de: 1) historia, 2) nomenclatura y clasificación, 3) los causantes de las endomicosis y su epidemiología, 4) diagnóstico de las endomicosis por el laboratoro, 5) patogénesis, 6) antimicóticos y 7) desinfección y esterilización en micología. La parte especial estudia las micosis del aparato respiratorio, del tracto digestivo, de los órganos genita'es, del aparato urinario, del sistema vascular y del sistema nervioso central; un capítulo aparte se dedica a los «micetomas», otro al diagnóstico de las endomicosis en las autopsias y el último, muy interesante, a la morfología que los hongos causantes presentan en los tejidos del huésped, con sus cualidades histoquímicas y su posible utilización para la identificación, lo que se facilita por unas tablas que acompañan al capítulo.

Es un tratado muy complejo, avalado por la larga experiencia personal de los autores; con informes y opiniones de primera mano, que serán muy útiles a los clínicos.

Las fotografías, muy cuidadas, lo que en obras de este tipo es muy importante.

L. VILAS

CONTROL PROCESSES IN VIRUS MULTIPLICATION. Directores: D. C. Burke y W. C. Russell. 1975. Cambridge University Press, Londres, Nueva York, Melbourne. X + 500 páginas.

Como todos los libros que resultan de la recopilación de trabajos presentados a un simposio, en el caso presente el 25 de la Society for General Microbiology (Imperial College, Londres, abril 1975), éste carece también de la cohesión necesaria, así como se hace notar

la diferencia de estilos y orden en los escritos. A pesar de ello, como los 18 autores o coautores son excelentes investingadores, las revisiones que hacen son de gran interés y cubren lo mejor posibe los diferentes temas, aunque la amplitud de los mismos hacen que aparezcan bastantes omisiones.

La primera parte del libro trata brevemente de lo que se conoce acerca de los mecanismos de control de la transmisión, translación y replicación en células procariotas y eucariotas. La segunda parte cubre los mismos temas en las infecciones por virus en dichos tipos de células, y la tercera parte se dedica a explicar la información que controla la multiplicación del virus, el transporte en la célula de las moléculas que forman los viriones y otros factores. La cuarta parte es una revisión de los mecanismos de control en el ensamblaje de viriones.

Es un libro que puede ser de utilidad para los especialistas en virología, biología molecular e incluso genética.

M. RUBIO-HUERTOS

RADIOSTERILIZATION OF MEDICAL PRODUCTS. 1974.
International Atomic Energy Agency, Viena. 1975. X + 541 páginas.

Por sus ventajas sobre los métodos convencionales de esterilización, la esterilización con radiaciones ionizantes se ha desarrollado rápidamente en los países tecnológicamente avanzados. Hoy, entre las aplicaciones pacíficas de la energía atómica, después de la producción de energía, la esterilización de productos médicos representa la aplicación industrial más importante de las grandes plantas atómicas. Por ello, y con el objetivo de actualizar las recomendaciones para un Código práctico que regule los procesos de esterilización y los productos finales, la IAEA quiso resumir y hacer una revisión crítica de las últimas novedades sobre este tema, en el Simposio de Bombay, en 1974, reunión que siguió al primer Simposio, de Budapest, de 1967. Este libro recoge las personales investigaciones y discusiones de los participantes en el Simposio de Bombay sobre control microbiológico de los procesos de esterilización,

evaluación y eficacia de las fuentes de irradiación, sistemas prácticos de dosimetria, dosis de radiación adecuada al producto, esterilización de suturas, instrumentos, productos farmacéuticos y tejidos biológicos, investigación de los mecanismos que inducen alteraciones en las propiedades químicas, físicas e inmunológicas de los productos, y la manera de evitarlas. En el área de radiopasterización, un único artículo sobre su utilidad en la preparación de productos farmacéuticos y sus materias primas, llama la atención acerca de la necesidad de un Código para la práctica con productos no necesariamente estériles. La última comunicación recoge las recomendaciones de la IAEA para la radiesterilización de productos médicos, cuya actualización se discutió en el Simposio, y que no habían sido renovadas desde su original formulación en 1967.

El volumen, con buena presentación, está editado en inglés, con excepción de 11 comunicaciones, 7 de las cuales sólo se pueden leer en ruso, 3 en francés y 1 en español. Algunas de las discusiones que aparecen —todas en inglés— al final de los trabajos son, a mi juicio, tan informativas e interesantes como algunos de los artículos.

Aquellos microbiólogos interesados en los efectos de las radiaciones ionizantes y los expertos en el control de calidad de productos farmacéuticos, obtendrán con este volumen excelente guía y consultor.

G. SIERRA

DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO DE LA MENINGITIS. Grupo de Microbiología Clínica de la Sociedad Española de Microbiología. 1975. Antibióticos, S. A. 36 páginas.

El aumento de la incidencia de la meningitis meningocócica en España, en el último lustro, tiene alarmado no sólo a médicos y sanitarios, sino incluso a la población en general. Por este motivo, la Sociedad Española de Microbiología organizó en momento muy oportuno esta mesa redonda sobre el diagnóstico de las meningitis.

En ella intervinieron: el Dr. Baquero Gil, del Hospital del Rey, sobre el diagnóstico bacteriológico de las meningitis purulentas, entre las que la meningitis meningocócica representa el 95 %. El Dr. Baquero aporta su experiencia en los métodos

utilizados para el ais!amiento, seña ando los medios con los que ha obtenido mejores resultados.

El Dr. Fadon González, del Servicio de Bacteriología del Hospital del Rey, disertó sobre balances de tres campañas (1970-71, 1971-72 y 1972-73) de meningitis meningocócica y de profilaxis de portadores, en circuitos abiertos y en circuitos cerrados. Cerca del 70 % de las cepas aisladas corresponden al tipo B, siendo las A el 14,2 %, y ninguna del tipo C; correpondiendo al resto las «no tipificables». Se discute la negativización de los portadores con diferentes antibióticos.

El Dr. Alés Reinlein, del Departamento de Microbiología de la Fundación «Jiménez Díaz», aporta su experiencia sobre meningitis tuberculosas, micóticas y parasitarias.

El Dr. Valenciano, del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, de Majadahonda, hace una exposición sobre meningitis víricas y resume su experiencia acerca de los aislamientos de estos agentes en España como productores de meningitis.

Por último, el Dr. Casal, del mismo Centro de Majadahonda, esquematiza las técnicas de diagnóstico indirecto de las meningitis bacterianas. Estas técnicas las clasifica en dos tipos: las que permiten hacer un diagnóstico rápido y precoz y las que hacen un diagnóstico a posteriori, como la determinación de anticuerpos.

F. RUIZ-FALCÓ

CONFERENCIAS, SIMPOSIOS Y PLENARIO DEL 5.º CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA. Directores de edición: Juan Carlos Bacigaiupi y Edín Raúl Castro. 1973. Sociedad Uruguaya de Microbiología, Montevideo. XII + 408 páginas.

Este volumen, editado en 1973, recoge las conferencias del 5.º Congreso Latinoamericano de Microbiología, así como las diversas ponencias de los diferentes simposios y sesiones plenarias que, con este motivo, se celebraron en Punta del Este (Uruguay). en el mes de diciembre de 1971.

Se compone el libro de una serie de documentados trabajos en relación con diversos aspectos de la biología microbiana, en sus vertientes de fisiología, bioquímica, inmunología, patogénesis y perspectivas en el estudio de distintas infecciones microbianas.

Resulta muy difícil, dada la variabilidad de temas, efectuar un resumen del contenido del texto, ya que se trata, tanto de informar sobre el aspecto general de algunas infecciones, como de otros temas más concretos en relación con algunas facetas de estudios muy particulares.

En resumen, el volumen constituye una recopilación de interesantes temas de la literatura microbiológica, que será de gran utilidad para científicos y estudiantes interesados en Microbiología.

A. PORTOLÉS

GLOSSARY OF BACTERIOLOGICAL TERMS, por P. Samson. 1975. Butterworths, Londres y Boston. V + 155 páginas.

En esta época en que la falta de tiempo es un problema acuciante, este pequeño volumen se convierte en una guía rápida para aclarar algunos términos y abreviaturas que pueden resultar desconocidos en la lectura de trabajos de microbiología clínica.

Resulta prácticamente imposible incluir todos los términos y vocablos microbiológicos —así como sus diferentes sinónimos y abreviaturas— que pueden tener aplicación en los campos de microbiología de infecciones y microbiología alimentaria, para los que parece especialmente dedicado este glosario de términos bacteriológicos. De ello tiene conciencia el propio autor, y se propone realizar periódicas revisiones de actualización.

En este volumen, que no es totalmente riguroso en la definición de algunos términos científicos, es posible encontrar referencia de numerosas pruebas microbiológicas y de diagnóstico empleadas en los laboratorios hospitalarios; asimismo, se indica la nomenclatura de especies microbianas poco conocidas y fácilmente confundibles con otras más importantes y frecuentes en los materiales clínicos.

El libro resulta útil, tanto para auxiliares y técnicos de labora-

torio como para estudiantes interesados en microbiología clínica. Su apropiado tamaño y la clasificación alfabética de los numerosos términos incluidos favorecen la utilización práctica del mismo.

A. PORTOLÉS

EFFECTS OF INTERFERON ON CELLS, VIRUSES AND THE INMUNE SYSTEM. Director: A. Geraldes. 1975. Academic Press Inc., Londres, Nueva York, San Francisco. XXIV + 661 páginas.

La presente publicación incluye las comunicaciones presentadas en la reunión celebrada por el Gulbenkian Institute of Science, en Oeiras (Portugal), del 19 al 21 de septiembre de 1973. Está dividida en siete capítulos, cada uno de los cuales comprende de cuatro a ocho comunicaciones, con un total de 42, incluyendo al final de cada una de ellas la discusión mantenida y la bibliografía sobre el tema estudiado.

Este libro no es uno más entre todos los dedicados al interferón, ya que los publicados anteriormente tienen una marcada tendencia hacia la metodología de la producción y titulación de esta glicoproteína antivírica, quedando los mecanismos de acción y regulación no plenamente aclarados (cierto es que en el momento de su aparición la investigación del interferón estaba centrada en los aspectos tecnológicos más asequibles al laboratorio de la década de los 60), en tanto que el que estamos reseñando nos pone al día sobre los mecanismos de inducción, regulación y acción, tanto al nivel celular como al molecular. Se encuentran estudios muy concienzudos de la actividad depresora del interferón o de sus inductores sobre el sistema inmunitario, con la consiguiente supervivencia de injertos. Esta actividad sobre el sistema inmunitario ha abierto horizontes apasionantes en el estudio del interferón, ampliándolo desde el campo de su actividad antivírica hasta el de sus posibilidades como sustancia antirrechazo.

Cabe recomendar la lectura de esta publicación, que ha logrado reunir una gran cantidad de datos dispersos en buen número de revistas, y llega a poner de acuerdo posturas científicas que, aparentemente, parecían contrapuestas, lo cual representa un avance en los conocimientos de tema tan actual y prometedor como el aquí comentado.

E. RONDA

INFEKTIONSKRANKHEITEN DER HAUSTIERE, I y II. Director: Joachim Beer. 1974. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 656 páginas.

La publicación de este tratado de enfermedades infecciosas de los animales domésticos ha de calificarse como un acierto editorial. Se revisa plenamente este importante sector de la patología animal, donde se hacía necesaria una obra moderna que refundiese sistemáticamente los recientes avances científicos con la pauta de la vigente terminología biológica.

El director de la obra considera este tratado como una continuación del volumen relativo a «Enfermedades infecciosas», de R. Manninger, integrado en la obra maestra iniciada por Hutyra y Marek, publicada en 11 ediciones alemanas y 17 en otros idiomas, entre ellos el castellano, y que ha sido utilizada como libro de texto y consulta durante dos generaciones, pues su última edición alemana se agotó hace años y parece que no será reeditada. En nuestra lengua no existe ahora ningún texto moderno que informe conjuntamente sobre las infecciones animales, cuyo conocimiento ha alcanzado sobresaliente desarrollo en las dos últimas décadas, en tal forma que este libro ha de cobrar singular importancia en la bibliografía especializada.

La redacción del tratado, bajo la dirección de J. Beer, se ha confiado a un grupo de 41 especialistas, que han conseguido descripciones claras, concisas y equilibradas de los procesos morbosos. Este éxito de lograr uniformidad y unidad en la composición de un texto tan diversos, a pesar del gran número de autores, se acrecienta, porque, tal aparente desventaja ha permitido la colaboración de quienes conocen las respectivas enfermedades por sus propios trabajos de investigación. Todas las cuestiones patológicas se plantean contestando siempre al mismo esquema de etiología, epizootología, patogenia, diagnóstico, inmunología y profilaxis, con criterios eclécticos.

El libro está dirigido a aquellos que lo requieren para la práctica

de su profesión y a quienes precisan un libro de texto; con tales objetivos está impreso en dos tipos de caracteres, que facilitan su consulta. En los complejos de enfermedades, como los causados por enterovirus, mixo- y paramixovirus, oncornavirus, Corynebacterium, Mycobacterium, etc., una descripción general precede al siguiente estudio específico de las afecciones.

La obra, repartida en dos volúmenes, aproximadamente de 300 páginas cada uno, muy manejables, se refiere, en su primera parte, a las enfermedades animales producidas por virus, clamidias, rickettsias y micoplasmas, y el segundo volumen, a bacteriosis, micosis y micotoxicosis.

La sistemática de estudio de las enfermedades debidas a virus se ajusta a la división de éstos en virus ARN y virus ADN y, por este orden, siguen los autores la última clasificación de tales agentes etiológicos para describir sucesivamente las enfermedades.

Entre otras consideraciones dignas de mención, se ha de hacer constar que a los títulos en alemán de cada enfermedad, se acompañan sus denominaciones en otros idiomas, generalmente latín, francés, ruso, inglés y español; la descripción perteneciente a cada afección finaliza con una breve bibliografía.

En suma, se han conseguido unos textos prácticos y actualizados de los conocimientos de la patología infecciosa de los animales domésticos, que permiten confirmar los diagnósticos y establecer rápidos medios de lucha, en una época en que se presentan frecuentes problemas epizootológicos y epidemiológicos internacionales.

M. RODRIGUEZ-REBOLLO

SCHWEINEPEST, por Helmut Mahnel y Anton Mayr. 1974. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 163 páginas.

La peste porcina ha asolado enzoóticamente nuestra ganadería, hasta desarraigarla en una época como la presente, en la que persiste la peste porcina africana, etiológicamente diferente. Esta epizootía exótica ha hecho que se conozca la primera como peste porcina «clásica». La monografía de Mahnel y Mayr trata exclusivamente de esta última, que mereció siempre en la bibliografía nacional una significativa atención.

Durante el tiempo en que se ha luchado con éxito frente a la enfermedad animal, han aparecido los cultivos celulares, con posibilidad de cultivar el virus fuera del cerdo, y se ha logrado consiguientemente un más fácil manejo del agente causal, y un mejor conocimiento de su estructura, ayudado por la inmunofluorescencia y microscopia electrónica.

Por ello, la principal justificación del libro radica en el estudio del agente etiológico, su cultivo y descripción de sus cualidades morfológicas, físico-químicas y biológicas, ordenando los datos científicos más recientes, razonada y sinópticamente, con la ayuda de figuras, esquemas y cuadros. En esta forma el libro puede interesar tanto a los patólogs como a los microbiólogos dedicados al estudio de los virus animales.

M. RODRIGUEZ-REBOLLO

PONENCIAS DEL SYMPOSIUM SOBRE INTOXICACIONES Y TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS DE ORIGEN BAC-TERIANO. 2.ª Reunión Científica de la Sección Regional del Noroeste, de la Sociedad Española de Microbiología. Facultad de Veterinaria, León, 1974. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo. VI + 294 páginas.

Contiene una información muy completa de las principales toxiinfecciones producidas por alimentos, de las que destacamos las salmonelosis y estafilocócica, por su frecuencia, y la botulínica, por su gravedad.

En relación con las intoxicaciones, los autores revisan la naturaleza y tipos de toxinas estafilocócicas y botulínicas, resistencia a diversos agentes inactivantes, condiciones de síntesis en el alimento, factores que influyen en la contaminación de los productos y en la germinación de las esporas, cuando se trata de *Cl. botulinum*.

En relación con el botulismo, es de interés indiscutible y a la vez polémica la ponencia sobre su control mediante el nitrito en acción sinérgica con el contenido de sal, pH del alimento, número de células contaminantes y temperatura de almacenamiento. El autor sugiere un estudio más detallado de su acción inhibidora frente al botulismo ante las medidas restrictivas tendentes a limitar su uso. En efecto,

su toxicidad y su indudable acción mutagénica plantean serios problemas.

En las infecciones por Salmonella se analizan exhaustivamente las causas del progresivo incremento, se establece el paralelismo entre la infección animal y en el hombre y se detallan las medidas higiénicas indispensables en las granjas, mataderos e industrias. Por el momento no es previsible la erradicación de estas infecciones, por lo que los métodos de lucha deben orientarse a la obtención de piensos y alimentos libres de Salmonella.

En las infecciones por *E. coli*, son muy raros los serotipos enteropatógenos comunes a hombres y animales, como lo son también entre las diversas especies animales. El agua, la leche y derivados lácticos son los alimentos más incriminados.

En las infecciones por Cl. perfringens T., aparece ya dudosa la relación entre esporas resistentes al calor y tipos enterotóxicos. La autora analiza los parámetros que favorecen la multiplicación de células en los alimentos, ya que la dosis infectiva es de millones de células/grano de alimento. La prevención de las toxiinfecciones se basa en la refrigeración del alimento condimentado, si no es consumido de inmediato, y en la supresión de las condiciones anaerobias, indispensables para la multiplicación de la bacteria. Los antisueros, lamentablemente numerosos y no comercializados, permiten la identificación de las estirpes enterotóxicas.

Sigue una ponencia donde se hace una breve reseña de otras bacterias causa de infecciones, algunas discutibles, y se concluye con la problemática en cuanto a la elección de bacterias indicadoras de contaminación fecal y calidad higiénica, terminando con la revisión de las bases que han de servir para establecer las Normas Microbiológicas.

En definitiva, ponencias magistrales como corresponde a la categoría de los profesores y especialistas que las han expuesto, y a las que han contribuido con su investigación personal, de indudable interés para cuantos nos movemos en este campo.

Lamentamos que el retraso en la publicación haga perder actualidad a algunos temas, y que no se haya cuidado la corrección de numerosas faltas de imprenta.