
VOLUMEN 30-31

1977-1978

Microbiología Española

*Revista
del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología*



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

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)

	Page
Determination of the phylogenetic relationships of various species of yeasts of the genus <i>Saccharomyces</i> through immunoprecipitation, by P. Cáceres and A. Chordí	37
Variations in the competence of <i>Bacillus</i> induced by cAMP, by M. Espinosa, M.ª Teresa Pérez-Ureña, E. García and A. Portolés	49
Distribution pattern of enzymic activities catalyzing the transformation of progesterone in some fungi, by A. F. Abdel-Fattah, A. H. El-Refai, L. A. R. Sallam and M. A. Badawi	59
ATP-ase of <i>Escherichia coli</i> K 12 membrane. A kinetic study of the soluble and membrane associated enzyme, by J. Carreira	67
A method for the determination of the richness of trypsin observing the activity of the rolitetracycline citrate on a strain of <i>Staphylococcus aureus</i> , by J. F. Somavilla, V. Arroyo, N. Khayyat and M. C. Esteban	83
Some properties of a cell-free cortisol 1,2-dehydrogenating system from <i>Bacillus cereus</i> , by N. Naim, L. Sallam and A. El-Refai	93
Phosphoric metabolism of <i>Aspergillus niger</i> in calcareous and saline soils, by A. Ortuño, J.ª Noguera, A. Hernansáez and T.ª Armero	101
Solubilization power of phosphorus by <i>Aspergillus niger</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i> , by A. Ortuño, A. Hernansáez, J.ª Noguera, V. Morales and T.ª Armero	113
Salting in progesterone hydroxylases from <i>Aspergillus niger</i> 12 Y, by A. F. Abdel-Fattah and M. A. Badawi	121
Fermentative production of cobalamin by <i>Streptomyces olivaceus</i> , by A. A. Abou-Zeid and M. R. El-Sherbeeny	129
Bibliography, by A. Portolés, A. García Gancedo and G. Sierra	137

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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

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

Número; España, 85 PTA; extranjero, 120 PTA

RECOMENDACIONES A LOS AUTORES

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

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en 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 contener 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 página 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 veinticinco 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 distintos tipos de hormonas vegetales sobre el crecimiento de microalgas, por <i>E. Fernández-Valiente</i> y <i>M. Rodríguez-López</i>	1
Aislamiento de un bacteriófago procedente de un <i>Pseudomonas</i> tumorigeno de plantas, por <i>M. Santaolalla</i> y <i>L. Cañas</i>	9
Producción de exopolisacáridos en cepas de <i>Pseudomonas</i> y <i>Achromobacter</i> , por <i>J. Vives</i> , <i>M. A. Manresa</i> y <i>J. Ripoll</i>	23
Producción del antibiótico NRC-501 aislado de los cultivos de fermentación de las especies de <i>Streptomyces</i> , utilizando melazas egipcias, por <i>Y. M. Shehata</i> , <i>A. A. Abou-Zeid</i> y <i>M. M. Abdel-Hamid</i>	29
Determinación de las relaciones filogenéticas entre varias especies de levaduras del género <i>Saccharomyces</i> por inmunoprecipitación, por <i>P. Cáceres</i> y <i>A. Chordi</i>	37
Variaciones en la competencia de <i>Bacillus subtilis</i> por adenilico cíclico, por <i>M. Espinosa</i> , <i>M.ª Teresa Pérez-Ureña</i> , <i>E. García</i> y <i>A. Portolés</i>	49
Modelo de distribución y actividades enzimáticas que catalizan la transformación de la progesterona en algunos hongos, por <i>A. F. Abdel-Fattah</i> , <i>A. H. El-Refai</i> , <i>L. A. R. Sallam</i> y <i>M. A. Badawi</i>	59
ATP-asa de la membrana de <i>Escherichia coli</i> K 12. Estudio cinético de la enzima soluble y asociada a la membrana, por <i>J. Carreira</i>	67
Un método para la determinación de la riqueza de la tripsina observando la actividad del citrato de rolitetraciclina sobre una cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> , por <i>J. F. Somavilla</i> , <i>V. Arroyo</i> , <i>N. Khayyat</i> y <i>M. C. Esteban</i>	83
Algunas propiedades de un sistema de cortisol 1,2-deshidrogenante de un extracto de <i>Bacillus cereus</i> libre de células, por <i>N. Naim</i> , <i>L. Sallam</i> y <i>A. El-Refai</i>	93
Metabolismo fosfórico de <i>Aspergillus niger</i> en suelos calizos y salinos, por <i>A. Ortuño</i> , <i>J.ª Noguera</i> , <i>A. Hernansáez</i> y <i>T.ª Armero</i>	101
Acción solubilizadora del fósforo por <i>Aspergillus niger</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> , por <i>A. Ortuño</i> , <i>A. Hernansáez</i> , <i>J.ª Noguera</i> , <i>V. Morales</i> y <i>T.ª Armero</i>	113
Precipitación de hidroxilasas de la progesterona del <i>Aspergillus niger</i> 12 Y, por <i>A. F. Abdel-Fattah</i> y <i>M. A. Badawi</i>	121
Producción fermentativa de cobalamina por el <i>Streptomyces olivaceus</i> , por <i>A. A. Abou-Zeid</i> y <i>M. R. El-Sherbeeney</i>	129
Bibliografía, por <i>A. Portolés</i> , <i>A. García Gancedo</i> y <i>G. Sierra</i>	137

CONTENTS

	Page
Effect of differents plant hormones on the microalgae growth, by <i>E. Fernández-Valiente</i> and <i>M. Rodríguez-López</i>	1
A bacteriophage isolate from a plant tumorigen <i>Pseudomonas</i> sp., by <i>M. Santaolalla</i> and <i>L. Cañas</i>	9
Exopolisaccharide production in strains of <i>Pseudomonas</i> and <i>Achromobacter</i> , by <i>J. Vives</i> , <i>M. A. Manresa</i> and <i>J. Ripoll</i>	23
Production of the antibiotic NRC-501 isolated from fermentation cultures of <i>Streptomyces</i> species, using Egyptian molasses, by <i>Y. M. Shehata</i> , <i>A. A. Abou-Zeid</i> and <i>M. M. Abdel-Hamid</i>	29

(Continúa en 2.ª de cubierta)

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (CSIC)
LABORATORIO DE FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA DE MICROALGAS

ACCION DE DISTINTOS TIPOS DE HORMONAS VEGETALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE MICROALGAS

por

E. FERNANDEZ-VALIENTE y M. RODRIGUEZ-LOPEZ

INTRODUCCION

Los estudios sobre la acción de las hormonas vegetales en criptógamas no vasculares, y más concretamente en microalgas, en contraste con los realizados en las plantas superiores, son escasos y los resultados que presentan son confusos (8).

Algunos autores han puesto en evidencia la presencia de fitohormonas endógenas en algunas especies de algas (7, 9). Sin embargo, las investigaciones en este sentido no han dado siempre resultados positivos, no siendo posible en muchos casos demostrar la presencia de fitohormonas endógenas en gran número de algas (2-3, 5).

El estudio de los efectos de fitohormonas exógenas en las algas es otra vía para detectar si las hormonas vegetales conocidas están relacionadas con la regulación del crecimiento o morfogénesis de las algas.

En el presente trabajo se estudia el efecto de tres hormonas vegetales sobre el crecimiento de diferentes especies de microalgas.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon tres especies de algas: una Cianofícea, *Anacystis montana*, una Euglenofícea, *Euglena gracilis*, y una Clorofícea, *Chlorella pyrenoidosa* cepa 8H, todas ellas procedentes de la Colección

de Algas y Protozoos, de la Botany School University, de Cambridge.

Anacystis montana creció en el medio de Kratz y Myers (6); *Euglena gracilis* en el medio de Hutner y colaboradores (4), y *Chlorella pyrenoidosa* en el medio A, de Rodríguez-López (10).

Las algas se cultivaron en autotrofismo, en los medios antes citados, gaseados con aire conteniendo un 2 % de CO₂, e iluminados permanentemente con luz fluorescente y a una temperatura constante de 24 °C.

Para la determinación del crecimiento se pusieron 25 ml de cultivo en matraces de 50 ml, en las condiciones anteriormente expuestas. A las 12, 24, 48 y 72 h, se observó el crecimiento por estimación de la densidad óptica (D. O.), a 600 mμ, en un espectrofotómetro Varian Techtron modelo 635, así como también por recuento directo de células en una cámara cuentaglóbulos de Bürker.

Las sustancias de crecimiento utilizadas fueron: ácido indolacético (AIA), ácido giberélico (AG) y cinetina (Kt), en soluciones acuosas.

RESULTADOS

Una de las características de las sustancias de crecimiento vegetal es que, si se suministran a concentraciones excesivamente altas, inhiben el crecimiento y pueden llegar a ser letales. En consecuencia, nuestros primeros pasos se encaminaron a determinar las concentraciones críticas a partir de las cuales se produce inhibición del crecimiento.

Tales concentraciones fueron de 50 ppm para el AIA y de 100 ppm para el AG y el Kt, inhibidoras para los géneros *Anacystis* y *Chlorella* y letales para *Euglena*.

Cuando se usaron concentraciones por debajo de las citadas, se pudo observar que tanto en *Anacystis* como en *Chlorella* ninguna de las tres sustancias empleadas y a ninguna de las concentraciones utilizadas determinaban efecto alguno sobre el crecimiento de la población celular, tanto si las determinaciones se hacían por medición de la D. O., como por recuento de células. Valga de ejemplo la figura 1, correspondiente a *Anacystis*, que es equivalente a la que se presenta en *Chlorella*.

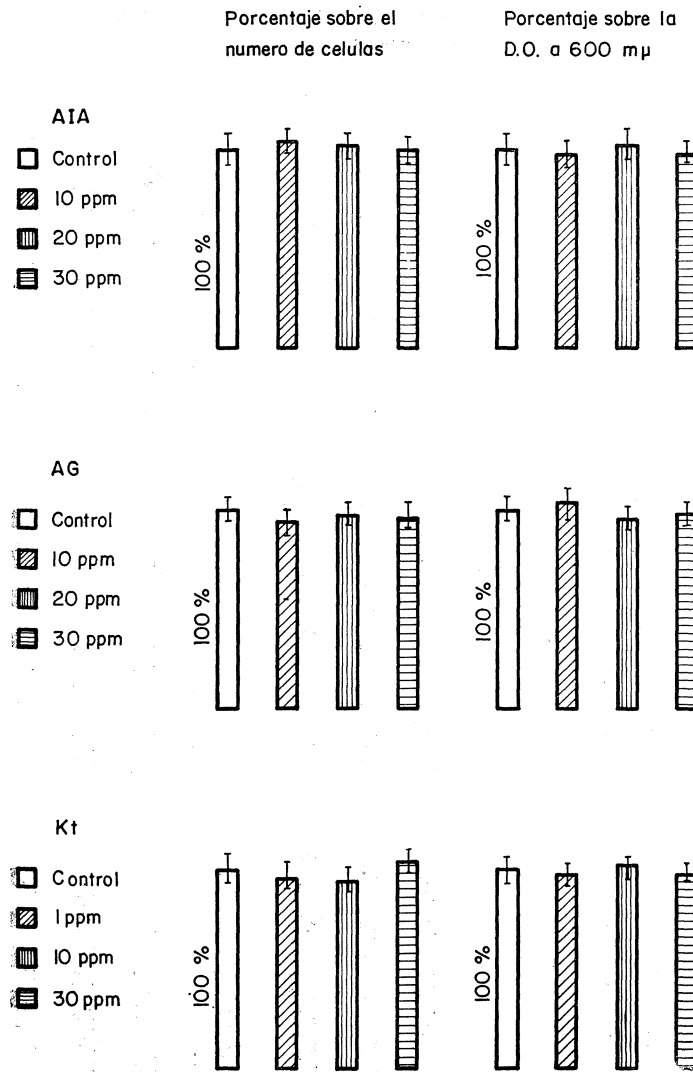


Figura 1. Efecto de las fitohormonas sobre el crecimiento de Anacystis, a las 72 h del tratamiento

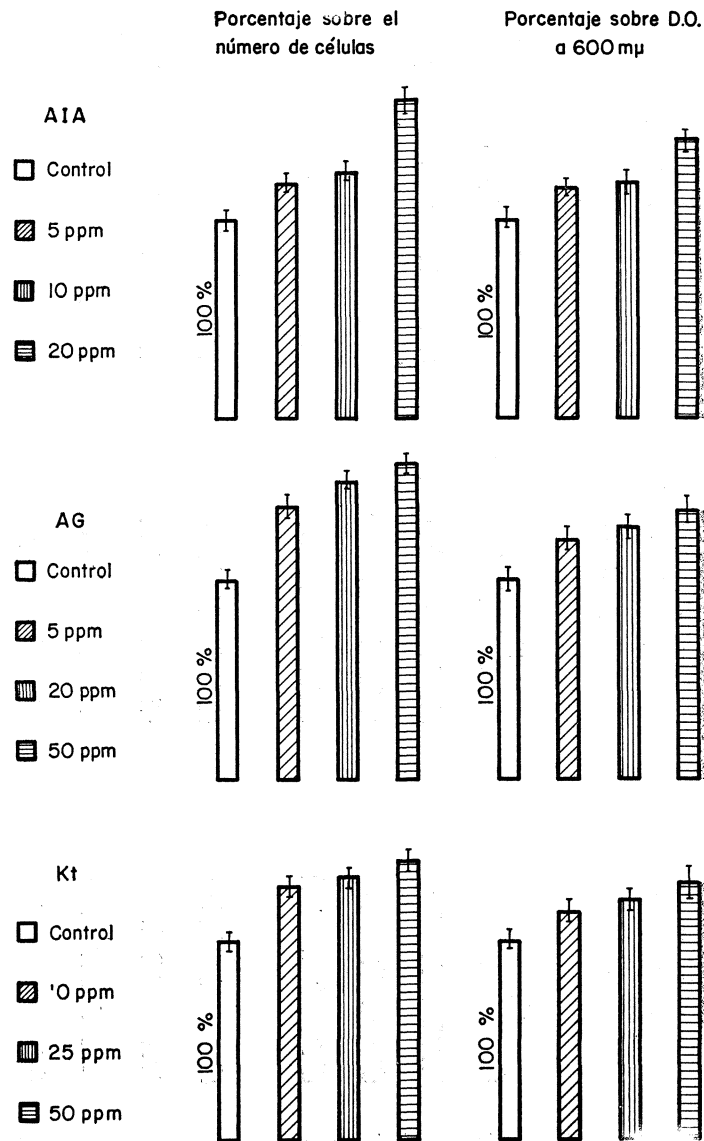


Figura 2. Acción de las fitohormonas sobre el crecimiento de *Euglena*, a las 72 h del tratamiento

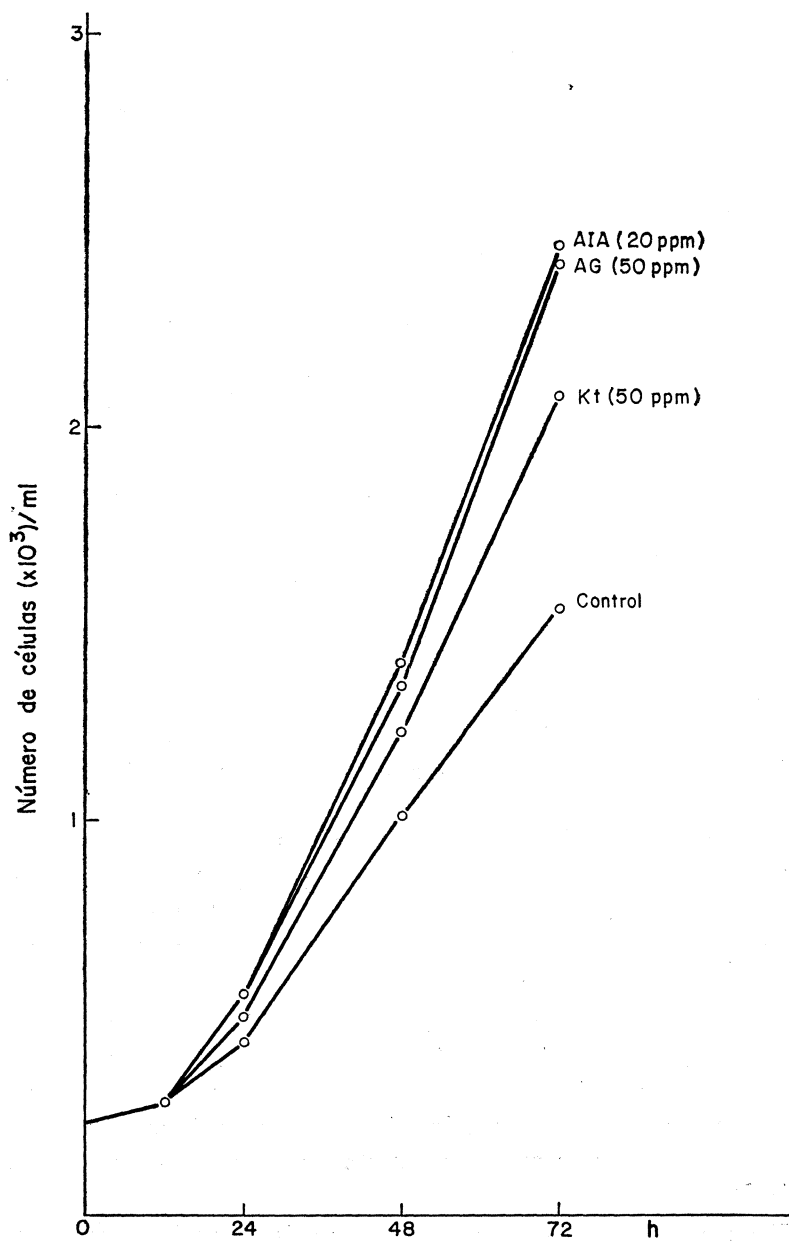


Figura 3. Efecto de las sustancias de crecimiento vegetal sobre el crecimiento de Euglena

Por el contrario, la respuesta de *Euglena* al tratamiento con cada una de las fitohormonas es positivo en todos los casos, estimulándose el crecimiento de la población celular. El efecto positivo se observa lo mismo por la medición de la D. O., como por recuento de células, si bien a través de este último método los resultados son más significativos (*figura 2*).

La estimulación del crecimiento inducida por las fitohormonas en *Euglena* no es apreciable en las 12 h primeras del tratamiento; a partir de las 24 h, el efecto se hace patente y al final del experimento (72 h) las diferencias son significativas, siendo más marcadas en los casos del AIA y del AG que en Kt (*figura 3*).

DISCUSION

Como decíamos en la Introducción, los estudios sobre la acción de las sustancias de crecimiento vegetal en microalgas son escasos, y los resultados que presentan son confusos y en muchas ocasiones claramente contradictorios.

En gran medida, estos resultados confusos y contradictorios se deben, según Bach y Fellig (1), al empleo de soluciones alcohólicas de las fitohormonas. Estos autores demostraron que el etanol estimula el crecimiento de diversas especies de algas y de este modo puede enmascarar los posibles efectos de las hormonas vegetales.

Todos estos hechos fueron tenidos en cuenta a la hora de abordar nuestro trabajo, empleando soluciones acuosas de las distintas sustancias y estudiando paralelamente el crecimiento, tanto por D. O. como por recuento directo de células.

Los resultados obtenidos indican que, de las tres especies estudiadas, *Euglena gracilis* es la única cuyo crecimiento se ve afectado positivamente por el tratamiento con las tres hormonas. Este efecto estimulante es detectable por los dos métodos utilizados, si bien se hace más patente por recuento directo de células que por medición de la D. O.

Un aspecto a destacar es la necesidad de controlar estrictamente las concentraciones a las que se suministran las fitohormonas, pues concentraciones excesivamente altas producen efectos inhibidores que

llegan hasta la letalidad, mientras que concentraciones excesivamente bajas no producen efecto alguno sobre el alga.

El hecho de que sólo *Euglena* responda al tratamiento hormonal induce a pensar que en las microalgas, aunque son vegetales sencillos sin problemas de diferenciación y especialización celular, las fitohormonas actúan de forma tan selectiva como en los vegetales superiores.

Por otra parte, el hecho de coincidir en su actuación las tres hormonas vegetales utilizadas sobre una misma especie de microalga, de las estudiadas, podría indicar que dichas sustancias son «reconocidas» por la célula a través de mecanismos similares o muy próximos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda técnica prestada en todo momento por D.^ª M. V. Azorín López, que tan eficazmente ha contribuido en este trabajo.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia el efecto de auxinas, giberelinas y citocininas sobre el crecimiento de diferentes especies de microalgas, tanto eucarióticas como procarióticas.

De las tres especies de microalgas estudiadas, únicamente *Euglena gracilis* presenta estimulación del crecimiento como respuesta al tratamiento con los tres tipos de hormonas vegetales. En las otras dos especies, *Anacystis montana* y *Chlorella pyrenoidosa*, no se presentan diferencias entre las células tratadas y los controles.

SUMMARY

Effect of different plant hormones on the microalgae growth

The present work studies the auxins, gibberellins and cytokinins effects on the growth of different microalgae so eukaryotics as prokaryotics.

On the three kind of microalgae studied, only *Euglena gracilis* presents growing stimulation as reply to the treatment with the three plant hormones used. On the others two kinds, *Anacystis montana* and *Chlorella pyrenoidosa*, there are not differences between the cells treated and the controls.

BIBLIOGRAFIA

1. BACH, M. K., and FELLIG, J. 1958. Effect of etanol and auxins on the growth of unicellular algae. *Nature*, **182**, 1359-60.
2. BUGGELN, R. G., and CRAIGIE, J. S. 1971. Evaluation of evidence for the presence of indole-3-acetic acid in marine algae. *Planta*, **97**, 173-78.
3. DAWES, C. J. 1971. Indole-3-acetic acid in green algae coenocyte *Caulerpa prolifera*. *Phycologia*, **10**, 375-79.
4. HUTNER, S. H.; BACH, M. K., and ROSS, G. I. M. 1956. A sugar containing basal medium for vitamin B₁₂. Assay with *Euglena*, application to body fluids. *J. Protozool.*, **3**, 101-12.
5. KATO, J.; PURVES, W. K., and PHINNEY, B. O. 1962. Giberellin-like substances in plants. *Nature*, **196**, 687-88.
6. KRATZ, W. A., and MYERS, J. 1955. Nutrition and growth of several blue-green algae. *Amer. J. Bot.*, **42**, 281-87.
7. MOWAT, J. A. 1965. A survey of results on the occurrence of auxins and gibberellins in algae. *Bot. Mar.*, **8**, 149-55.
8. PROVASOLI, L., and CARLUCCI, A. F. 1974. Vitamins and growth regulators. *Bot. Monogr.*, **10**, 741-87.
9. RADLEY, M. 1961. Giberellin-like substances in plants. *Nature*, **191**, 684-85.
10. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. 1964. Influence of the inoculum and the medium on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Nature*, **203**, 666-67.

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

AISLAMIENTO DE UN BACTERIOFAGO PROCE- DENTE DE UN *PSEUDOMONAS* TUMORIGENO DE PLANTAS

por

M. SANTAOLALLA y L. CAÑAS

INTRODUCCION

Desde que iniciamos el estudio de la pared celular de distintos microorganismos gram-negativos pensamos en el papel que pudieran jugar los distintos componentes de ella en la fijación del bacteriófago.

Miller y Goebel (18), en estudios realizados sobre las relaciones entre el antígeno somático de *Shigella sonnei* y su susceptibilidad a las virosis sugirieron que el antígeno 0 de tipo específico actuaba como receptor de bacteriófagos.

Weidel (20), con la ayuda del microscopio electrónico, observa la unión directa del bacteriófago a las paredes aisladas del *Escherichia coli*. Posteriormente, Weidel y Primosigh (21) señalan que estas paredes que todavía son capaces de fijar los fagos T2, T4 y T6 presentaban en su capa más externa un componente lipoproteico.

En una reciente revisión sobre los receptores de bacteriófagos, Lindberg (16) demuestra claramente que los polímeros de la pared bacteriana sirven generalmente como receptores de bacteriófagos. En los microorganismos gram-negativos, los receptores más estudiados son los lipopolisacáridos; no obstante, también se han encontrado receptores en lipoproteínas y proteínas; en los gram-positivos se han mostrado receptores los ácidos teicoicos, polisacáridos y proteínas de la pared celular.

Por otra parte, siguiendo el estudio de los microorganismos patógenos de patatas, estudiamos ahora una bacteria hallada por nosotros en tumores de las ramas del olivo y capaz de producir tumores por inoculación en plantas de judía. Esta bacteria es huésped de un virus, que creemos no está descrito.

Intentaremos estudiar los componentes de la pared celular, tanto del microorganismo en cuestión como la correspondiente al microorganismo parasitado, y sobre todo las diferencias y lugar receptor del bacteriófago.

En esta primera publicación exponemos las principales características de la bacteria y su bacteriófago.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento del microorganismo productor de los tumores

Se recogieron unos tumores de las ramas de olivos situados en el término municipal de El Molar (Madrid). Después de una desinfección superficial de los mismos con solución clorhídrica de cloruro mercúrico y posterior lavado con agua estéril, se trocearon asépticamente y se procedió a la siembra en placas de agar común por simple deslizamiento de los cortes sobre placas.

Después de la permanencia de las placas de agar sembradas en estufa a 27 °C, durante 48 h, se observaron unas colonias de color gris, circulares, con bordes ondulados. A partir de estas colonias sembramos en tubos de agar glucosado inclinado, y cuando empezó el crecimiento se colocaron en el frigorífico: a los pocos días observamos la lisis de los cultivos.

Realizamos distintas pruebas bioquímicas para tratar de clasificar el microorganismo, así como su observación en los microscopios óptico y electrónico, cuyos resultados referimos en el lugar correspondiente.

Infección en otra planta huésped

A partir de un cultivo sólido en agar glucosado se hicieron inoculaciones por incisión en el tallo de plantas de *Vicia faba*, cubriéndolo

las posteriormente con papel de celofán hasta que observamos el principio de la formación del tumor.

Aislamiento y purificación del bacteriófago

Sembramos el microorganismo que creemos portador de un bacteriófago procedente de un cultivo sólido con lisis manifiesta, en matraces de Erlenmeyer con caldo glucosado, colocándolos a continuación en estufa a 27 °C, durante 48 h. Realizamos una primera centrifugación a 10.000 r/m durante 15 min para eliminar los microorganismos, el sobrenadante obtenido lo ultracentrifugamos a 38.000 r/m durante 3 h; los sedimentos de los diferentes tubos se suspenden en agua y centrifugan a baja velocidad (5.000 r/m) durante 1 h para eliminar restos de paredes celulares, etc. El sobrenadante se sometió a una extracción con agua-cloroformo (60:40) y se mantuvo unas horas en el frigorífico, con objeto de eliminar proteínas y lípidos contaminantes. Por último, con la capa acuosa, se repitió el ciclo anterior de ultracentrifugación seguida por centrifugación a 10.000 r/m, quedando los bacteriófagos purificados en el sobrenadante.

Microscopia electrónica

Empleamos las tinciones negativas con ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo. Las técnicas fueron las corrientemente empleadas.

Las secciones ultrafinas se hicieron a partir del centrifugado del microorganismo, fijándolo durante 2 h a 4 °C, en tetraóxido ósmico, con tampón palade-acetato de veronal.

Las microfotografías electrónicas fueron hechas con un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I.

Placas del bacteriófago por el método de las capas de agar

Se realizaron por el método de Adams (1) modificado por Meduff y colaboradores (17).

Investigación del ácido nucleico del bacteriófago

Investigamos el ácido nucleico a partir del bacteriófago purificado, precipitando la proteína con ácido tricloroacético al 5 %, filtramos e identificamos el ácido desoxirribonucleico con el reactivo de Dische (11).

RESULTADOS

La *figura 1*, muestra los tumores producidos por inoculación de la bacteria en *Vicia faba*.

a) *Características de la bacteria*

El microorganismo aislado de los tumores es gram-negativo, tiene forma bacilar, no esporula ni presenta cápsula, es móvil, y posee flagelos polares.

La *figura 2* representa el microorganismo observado en tinción negativa con ácido fosfotúngstico. La *figura 3* muestra un corte transversal del mismo, donde se aprecia la forma sinuosa de su pared.

Los resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas fueron los siguientes: no produce sulfhídrico, no licúa la gelatina, vuelve alcalina la leche tornasolada, no reduce los nitratos, hidroliza el almidón; acidifica la sacarosa, la glucosa y la galactosa, sin producir gas; también acidifica la lactosa y maltosa produciendo gas, y la salicina sin producir gas.

Cultivando en caldo común o glucosado produce enturbamiento con película parcial; y soporta una temperatura de 55 °C durante 30 min.

La *figura 4* muestra una bacteria en la que se aprecia perfectamente la presencia de bacteriófagos, lo cual nos indujo a tratar de su aislamiento e iniciar su estudio.

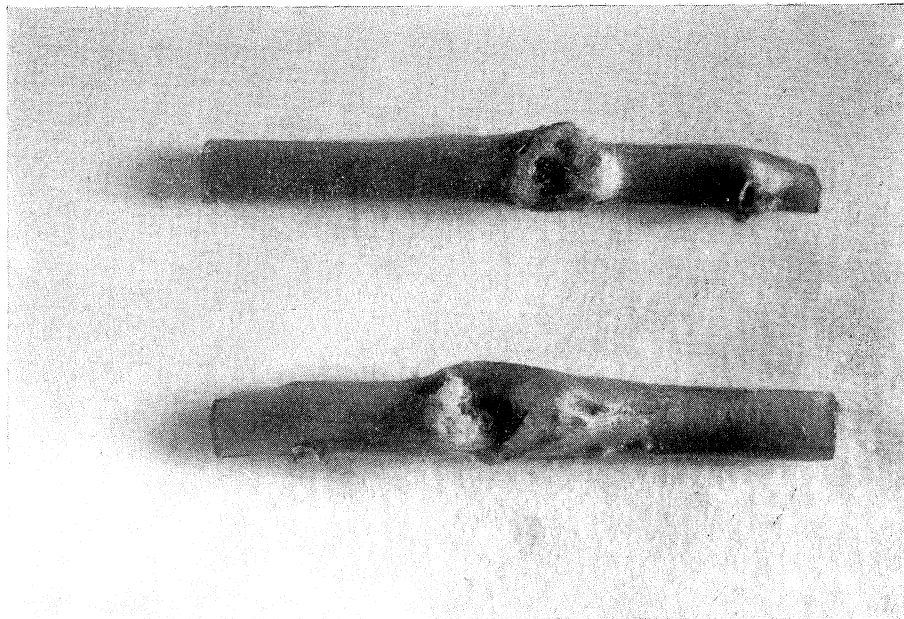
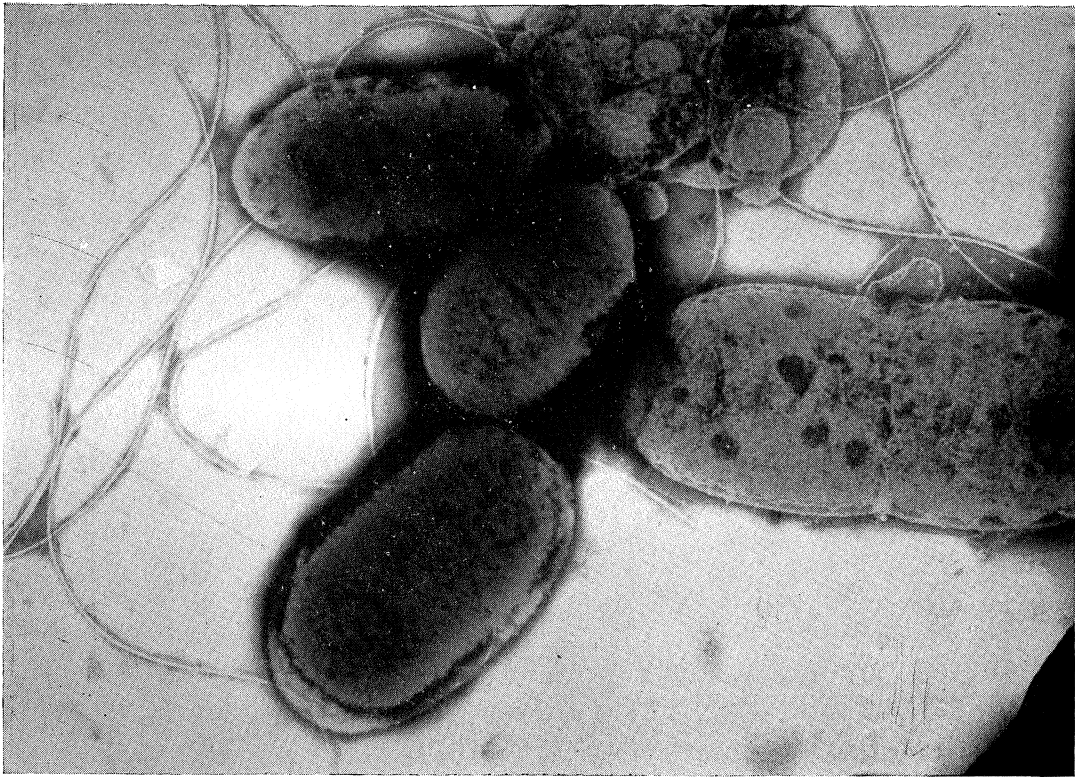


Figura 1. Tumores producidos a los 15 d de inoculación de la bacteria en Vicia faba



*Figura 2. Microfotografía electrónica del microorganismo productor de los tumores. Tinción negativa.
× 28.000*

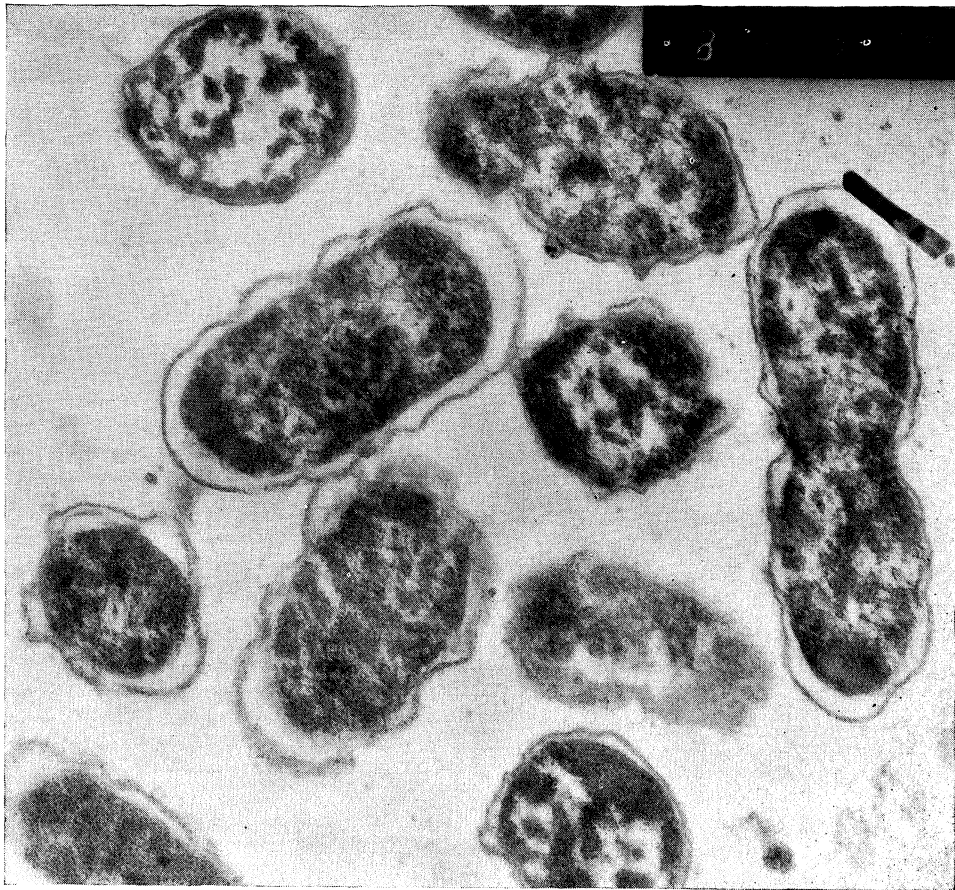
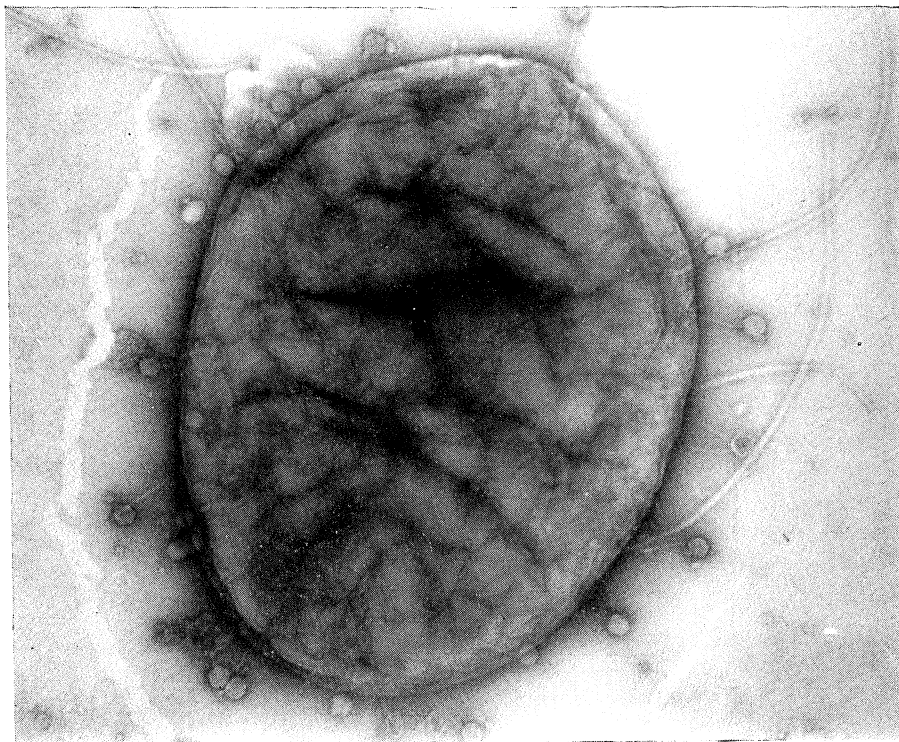
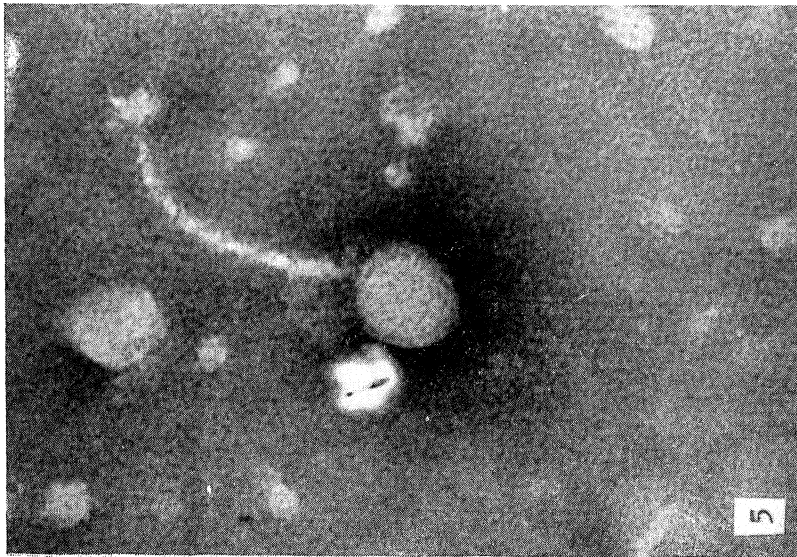
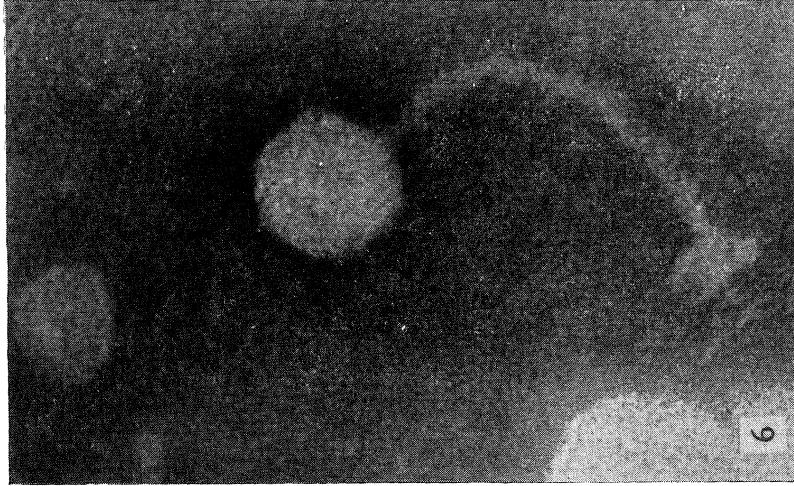


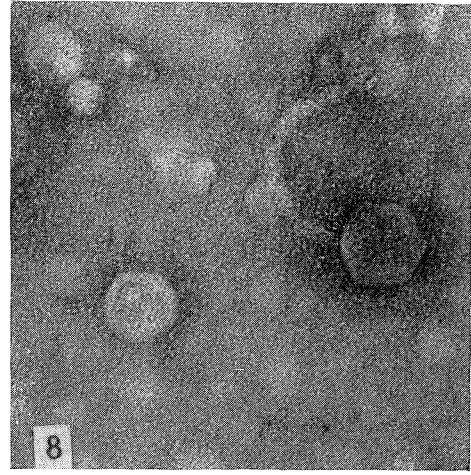
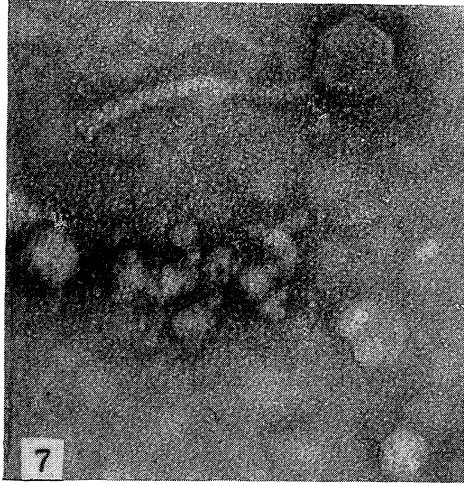
Figura 3. Corte transversal del microorganismo. $\times 30.000$



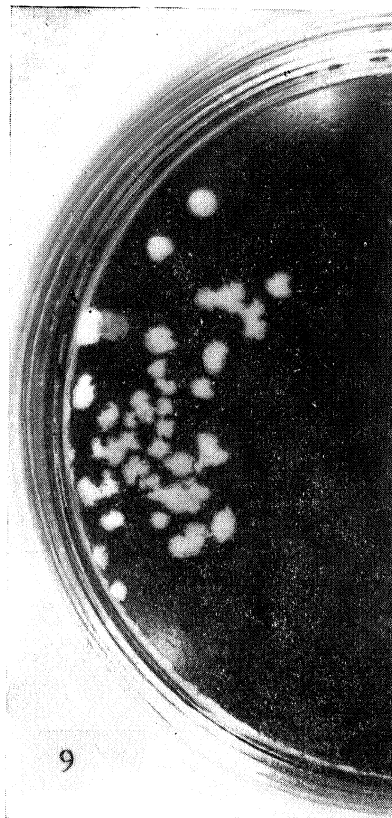
*Figura 4. Bacteria en la cual se aprecian perfectamente bacteriófagos. Tinción negativa.
× 88.000*



Figuras 5-6. Bacteriófagos aislados. Tinción negativa. 5) $\times 223.440$. 6) $\times 44.000$



Figuras 7-8. Bacteriófagos purificados. Tinciones negativas con acetato de uranilo. $\times 220.000$



Figuras 9-10. Placas en placas de agar caldo, 9) a las 48 h. 10) a las 72 h

b) Características del bacteriófago

El bacteriófago parcialmente purificado según indicábamos en la parte correspondiente a materiales y métodos, resultó estar formado por una cabeza de forma icosaédrica cuyo mayor diámetro es de unos 44 nm, a continuación presenta un cuello con un diámetro aproximado de unos 4 nm seguido de una cola con una longitud de 120×6 nm de anchura; para terminar en una placa, que creemos posee 6 espículas.

Las *figuras 5-6* nos muestran bacteriófagos aislados, en tinción negativa con ácido fosfotúngstico, tomadas a distintos aumentos; en ambas se aprecian perfectamente los capsómeros de la cabeza y la forma regular de sus caras. Las *figuras 7-8* representan bacteriófagos purificados por ultracentrifugación y tratamiento con cloroformo, según indicamos en la parte correspondiente a materiales y métodos, en tinciones negativas con acetato de uranilo; en la *figura 8* se aprecian bien las espículas.

El bacteriófago origina unas placas en placas de agar blando, irregulares, de contorno sinuoso y aspecto céreo; a las 48 h su tamaño oscila entre 0,6 y 0,2 mm; a las 72 h su contorno y aspecto es semejante, si bien su tamaño aumenta, siendo en algunos casos superior a los 0,7 mm para el eje mayor (*figuras 9-10*).

Después de precipitar la proteína identificamos perfectamente el ácido desoxirribonucleico del bacteriófago con el reactivo de Dische.

DISCUSION

Los tumores de las ramas del olivo, origen de este trabajo, tienen forma más o menos esférica, aspecto esponjoso y color castaño; los jóvenes son blancos, mientras los más viejos son duros y de color negruzco, semejantes a los originados por *Pseudomonas savastanoi*.

El microorganismo gram-negativo originario de los mismos y cuyas características morfológicas y bioquímicas señalamos anteriormente, parece corresponder al género *Pseudomonas*; probablemente a una estirpe del *Ps. savastanoi*, ya que produce tumores en diferentes plantas, pero difiere del *Ps. savastanoi* tipo en que acidifica la lactosa, maltosa y salicina.

Por inoculación en el tallo de plantas de judía, a los 15 d aparecen tumores cuya forma podemos apreciar en la *figura 1*.

Al observar los cultivos en medio sólido después de 6-15 d, según las condiciones de temperatura (conservados en estufa o frigorífico), se apreciaron síntomas claros de lisis bacteriana; esto nos hizo pensar en la posibilidad de la existencia de un bacteriófago, cosa que nos confirmó el estudio por microscopía electrónica. La *figura 4*, que corresponde a una tinción negativa del microorganismo, nos demostró sin lugar a dudas la presencia de bacteriófagos.

Se conocen muchos bacteriófagos específicos de *Pseudomonas*. Ya en el año 1945, Fastier (14) aísla un bacteriófago del *Ps. pyocyanea* y estudia las relaciones líticas entre éste y la bacteria. En el año 1948, Dickinson (12) estudia el efecto de diversas sustancias sobre el desarrollo de distintos bacteriófagos del género *Pseudomonas*. Sin embargo, en general, han sido poco estudiados los bacteriófagos de las bacterias patógenas de plantas (no ha sido descrito ningún bacteriófago en *Ps. savastanoi*), bien que se conocen distintos bacteriófagos de *Agrobacterium*. Roslycky y colaboradores (19) se ocupan de las propiedades fisicoquímicas de bacteriófagos de cola corta y no contráctil del *Agr. radiobacter*. Boyd y colaboradores (5) estudian, por microscopía electrónica, distintos bacteriófagos del *Agr. tumefaciens* y Deley y colaboradores (10), otros, indistinguibles morfológicamente, con cabeza hexagonal y cola flexible, pero de dimensiones superiores al encontrado por nosotros.

Bacteriófagos del género *Rhizobium* han sido estudiados por varios autores (2-4).

Estructuralmente, ninguno de estos bacteriófagos de microorganismos patógenos de plantas que hemos podido encontrar descritos, coincide con el hallado por nosotros, siendo el más parecido el 7 m del *Pseudomonas aeruginosa*, estirpe Ps. 7, estudiado por Feary y colaboradores (15); sin embargo, parece ser que la cola del bacteriófago encontrado por nosotros es dos veces y media más ancha y presenta un collar perfectamente visible. No obstante, creemos que es necesario continuar el estudio para poder determinar más concretamente las características de este bacteriófago.

RESUMEN

Aislamiento de un bacteriófago procedente de un *Pseudomonas* tumorígeno de plantas.

Estudiamos un *Pseudomonas* productor de tumores en *Olea europea* y que origina tumores por inoculación en *Vicia faba*, pero cuyas características bioquímicas no corresponden exactamente con el *Ps. savastanoi*.

Este microorganismo es huésped de un bacteriófago completo, formado por una cabeza icosaédrica, con sus capsómeros y una cola que en su extremo presenta espículas. Su ácido nucleico es ADN.

Después de comparar su estructura con la de distintos bacteriófagos, creemos que no está descrito.

SUMMARY

A bacteriophage isolate from a plant tumorigen Pseudomonas sp.

A *Pseudomonas sp.* bacterium inducing tumors in *Olea europea* and in *Vicia faba* differing in some biochemical characters from *Ps. savastanoi* was found to carry a bacteriophage with an icosahedric head and long tail with fibers at its end. Its nucleic acid was found to be DNA. By comparison with other phages from *Pseudomonas sp.* we think it is a new phage.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, M. H. 1959. Bacteriophages. Intersciens Publishers, New York.
2. ATKINS, G. G., and AVERY, R. J. 1974. DNA homology, redundancy genome size of four *Rhizobium* bacteriophages. J. Gen. Virol., 24, 301-6.
3. BARNET, Y. M. 1975. Bacteriophages of *Rhizobium trifolii*. I. Morphology and host range. J. Gen. Virol., 15, 1-15.
4. BARNET, Y. M., and HUMPHREY, B. 1975. Exopolysaccharide depolymerases induced, by *Rhizobium* bacteriophages. Can J. Microbiol., 21, 1947-50.
5. BOYD, R. J.; HILDEBRANDT, A. C., and ALLEN, D. N. 1970. Electron microscopy of phages for *Agrobacterium tumefaciens*. Arch. Mikrobiol., 73, 47-54.
6. BRADLEY, D. E. 1963. The structure of some *Staphylococcus* and *Pseudomonas* bacteriophages. J. Ultrastruct. Res., 552-65.

- 7 BRADLEY, D. E. 1966. The structure and infective process of a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage containing ribonucleic acid. J. Gen. Microbiol., 45, 83-96.
- 8 BRADLEY, D. E., and DEWAR, C. A. 1966. The structure of phage-like objects associated with non-induced bacteriocinogenic bacteria. J. Gen. Microbiol., 45, 399-408.
- 9 BRADLEY, D. E., and PITT, T. L. 1974. Pilus-dependence of four *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages with non-contractile tails. J. Gen. Virol., 24, 1-15.
- 10 DELEY, J. M.; GILLS, M.; POOTJES, C. F.; KESTER, K.; TYTGAT, R., and VAN BRACKEL, M. 1972. Relationship among temperate *Agrobacterium* phage genomes and coat proteins. J. Gen. Virol., 16, 199-214.
- 11 DISCHE, Z. 1955. Color reactions of nucleic acid component. In E. CHARGAFF and J. N. DAVIDSON (ed.). Nucleic acid, 1, 285-305. Academic Press. Inc., New York.
- 12 DICKINSON, L. 1948. The bacteriophages of *Ps. pyocynea*. The effect of various substances upon their development. J. Gen. Microbiol., 2, 154-61.
- 13 ELLIOT, C. 1951. Manual of Bacterial Plant Pathogens. Waltham, Mass.
- 14 FASTIER, L. B. 1945. A bacteriophage for *Pseudomonas pyocynea* (*Ps. aeruginosa*). J. Bacteriol., 50, 301-15.
- 15 FEARY, T. W.; FISHER, E., and FISHER, T. N. 1964. Isolation and preliminary characteristics of three bacteriophages associated with a lysogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 87, 196-208.
- 16 LINDBERG, A. A. 1973. Bacteriophage receptor. Ann. Rev. Microbiol., 27, 205-41.
- 17 MCDUFF, C. R.; JONES, L. M., and WILSON, J. B. 1962. Characteristics of *Brucella* phage. J. Bacteriol., 83, 324-29.
- 18 MILLER, E. M., and GOEBEL, W. F. 1949. Studies on bacteriophage. I. The relationship between the two somatic antigens of *Shigella sonnei* and their susceptibility of bacterial viruses. J. Exp. Med., 90, 255-65.
- 19 ROSLYCKY, E. B.; ALLEN, O. N., and MCCOY, E. 1965. Growth characteristics of phages of *Agrobacterium radiobacter*. Can J. Microbiol., 11, 95-101.
- 20 WEIDEL, W. 1951. Über die Zellmembran von *E. coli* B. I. präparien mg der membranen. Analytische daten. Morphologie. Verhalten der membranen pegnüber den bakteriohagen der T. serie. Z. Naturforsch., 6b, 251-62.
- 21 WEIDEL, W. y PRIMOSIGH, J. 1958. Biochemical parallels between lysis by virulent phages and lisis by penicillin. J. Gen. Microbiol., 18, 513-17.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS EN CEPAS DE *PSEUDOMONAS* Y *ACHROMOBACTER*

por

J. VIVES, M. A. MANRESA y J. RIPOLL

INTRODUCCION

La producción de polisacáridos extracelulares (= exopolisacáridos) bacterianos y su acumulación alrededor de la célula como cápsulas y limos, es una propiedad que presentan numerosos microorganismos (6). *Azotobacter* y otros fijadores de nitrógeno elemental presentan esta característica, en especial cuando se desarrollan en condiciones de fijación (2-3). Por otro lado, los cultivos de bacterias no fijadoras de nitrógeno elemental en condiciones limitantes de nitrógeno combinado presentan con frecuencia un notable incremento de la producción de exopolisacáridos (9).

Se han aislado del suelo cepas caracterizadas como *Pseudomonas* y *Achromobacter*, cuyas características culturales son la capacidad de desarrollarse en medios libres de nitrógeno combinado y una notable producción de exopolisacáridos. Los ensayos de reducción de acetileno han sido negativos en todos los casos, excluyéndose, por tanto, la presuntiva capacidad fijadora del nitrógeno elemental en estas cepas. Se estudia la producción de exopolisacáridos en relación con la presencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo y con la acumulación de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en el citoplasma celular. Se discute la posible función biológica de los limos y las cápsulas en este tipo de microorganismos.

MATERIAL Y METODOS

Cepas

Las cepas utilizadas se exponen en el *cuadro 1*. Su aislamiento y caracterización se han descrito previamente (11). Los medios utilizados han sido los siguientes: el medio de Burk sin nitrógeno combinado (8), y el medio de Honma, que contiene glutamato como fuente de nitrógeno (4). La incubación tiene lugar a 30 °C durante 4 d.

Cuadro 1. Producción de exopolisacáridos, biomasa celular y acumulación de PHB, expresados en porcentajes relativos al peso seco total de los componentes

Cepas	Medio	Biomasa celular (*)	PHB	Exopolisacáridos	
				Cápsulas	Limos
<i>Pseudomonas azotogenis</i> CCB-1568	Honma	5,14	0,01	1,43	93,42
<i>Ps. azotogenis</i> CCB-1568	Burk	1,25	0,01	21,96	76,78
<i>Ps. fluorescens</i> D-56	Honma	1,75	2,70	31,85	63,70
<i>Ps. fluorescens</i> D-56	Burk	0,30	0,50	5,60	93,60
<i>Achromobacter</i> D-10	Honma	4,60	4,80	1,70	88,90
<i>Achromobacter</i> D-10	Burk	10,62	0,71	22,06	66,61
<i>Achromobacter</i> D-15	Honma	19,64	0,40	0,44	79,52
<i>Achromobacter</i> D-15	Burk	22,62	0,02	35,65	41,71

(*) PHB no incluido.

Determinaciones de nitrogenasa

La actividad nitrogenasa se determina por reducción de acetileno con células intactas por incubación en atmósfera de argón-oxígeno ($pO_2 = 0,004$) durante 60 min, siguiendo la metodología descrita previamente (1).

Extracción de exopolisacáridos

La producción, extracción y purificación de los limos se ha efectuado como se describe en (4). Los productos obtenidos por extracción alcalina, una vez extraídos los limos, se consideran cápsulas (10). Se determina el peso seco de las muestras así obtenidas y se refieren al peso seco celular correspondiente; posteriormente se determina el espectro infrarrojo (Perkin Elmer 45) en pastillas de bromuro potásico.

Determinaciones de PHB

Se efectúan por el método de Slepecky (7).

RESULTADOS

Las cepas relacionadas en el *cuadro 1* presentan un importante crecimiento mucoviscoso en los dos medios utilizados. Cuando por medio de inóculos adecuados sobre el medio de Burk se obtienen 20-40 colonias independientes/placa, los diámetros coloniales conseguidos son de 3-4,5 mm, previa incubación a 30 °C durante 4 d. Sin embargo, ninguna de las cepas es capaz de reducir acetileno en estas condiciones; en consecuencia, se excluye la capacidad fijadora del nitrógeno elemental para explicar el desarrollo de estas cepas sobre el medio de Burk.

La producción de exopolisacáridos se pone de manifiesto tanto en el medio de Burk como en el de Honma. Sin embargo, la cantidad de exopolisacáridos relativa a la masa citoplasmática es más importante en el medio de Burk que en el medio de Honma (*cuadro 1*). Por otro lado, la acumulación de PHB en el medio de Burk ha sido inferior a la obtenida en el medio de Honma y a veces llega a ser inexistente. En todos los casos, la cantidad de exopolisacáridos producida y acumulada en el exterior de la célula es 5-20 veces superior a la biomasa celular.

Tanto el material capsular como los limos presentan una elevada viscosidad en solución acuosa al 1 %, gran solubilidad en agua y,

son precipitables con etanol. Estas características, junto con el espectro infrarrojo que presentan estos materiales, sugieren que se trata de hidratos de carbono. Se han asignado los siguientes grupos funcionales de acuerdo con la banda infrarroja obtenida (*figura 1*): OH, 3.200-3.500 cm^{-1} ; C-H, 2.920 y 2.960 cm^{-1} ; O = C — O⁻, 1.585 y 1.400 cm^{-1} ; C — O, 1.080 y 2.280 cm^{-1} .

En algunas cepas, los compuestos extraídos como cápsulas y limos muestran un espectro infrarrojo idéntico. Este hecho nos sugiere que se trata del mismo compuesto en un caso y otro, adoptando un nivel de polimerización mayor al constituir el material capsular.

DISCUSION

Se ha puesto de manifiesto que el crecimiento de las cepas aisladas de *Pseudomonas* y *Achromobacter* sobre el medio de Burk es debido fundamentalmente a la producción de exopolisacáridos. La biomasa celular representa un valor reducido comparativamente con el peso seco total. Estas cepas son capaces de acumular PHB en el citoplasma. Sin embargo, al desarrollarse en medios sin nitrógeno combinado, el PHB disminuye o desaparece. Este fenómeno puede interpretarse como una canalización de los carbohidratos y lípidos citoplasmáticos en exopolisacáridos.

El crecimiento inicial de estas cepas posiblemente tenga lugar a partir de nitrógeno combinado contaminante de la atmósfera, que con facilidad es adsorbido en los medios con agar. Por otro lado, en condiciones limitantes de nitrógeno combinado se incrementa la producción de exopolisacáridos (9). Se sugiere que la naturaleza polianiónica (6) de estos limos puede actuar como un sistema captador de cationes, incrementando de este modo la incidencia de nutrientes alrededor de la célula y facilitando el crecimiento en medios sin nitrógeno combinado. Existen referencias de bacterias capaces de utilizar trazas de nitrógeno combinado atmosférico, que presentan un desarrollo en medios sin nitrógeno combinado, de bajo contenido proteico (5). Posiblemente, la capacidad de captar este tipo de nitrógeno y de crecer con niveles proteicos reducidos esté relacionada con la alta producción de exopolisacáridos en los casos expuestos.

2. COHEN, G. H., and JOHNSTONE, D. B. 1964. Extracellular polysaccharides of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., 88, 328-38.
3. COUPERWHITE, I., and Mc CALLUM, M. F. 1971. The influence of EDTA on the composition of alginases synthesized by *Azotobacter vinelandii*. Arch. Mikrobiol., 97, 73-80.
4. GOTO, S.; MURAKAWA, T., and KUWAHARA, S. 1973. Slime production by *Pseudomonas aeruginosa*. II. A new synthetic medium and cultural conditions suitable for slime production by *Pseudomonas aeruginosa*. Jap. J. Microbiol., 17, 45-51.
5. HILL, S., and POSTGATE, J. R. 1969. Failure of putative nitrogen fixing bacteria to fix nitrogen. J. Gen. Microbiol., 58, 277-85.
6. KWAPINSKI, J. B. G. 1974. Molecular Microbiology. John Wiley and Sons Inc., New-York, London.
7. LAW, J. H., and SLEPECKY, R. A. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric. J. Bacteriol., 82, 33-36.
8. NEWTON, J. W.; WILSON, P. W., and BURRIS, R. H. 1953. Direct demonstration of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by *Azotobacter*. J. Biol. Chem., 204, 445-51.
9. SUTHERLAND, I. W. 1973. Bacterial exopolysaccharides. Advan. Microbial Physiol., 8, 143-208.
10. SUTHERLAND, I. W., and WILKINSON, J. F. 1971. Chemical extraction methods of microbial cells. Methods Microbiol., 5b, 362.
11. VIVES, J., and PARÉS, R. 1975. Enumeración y caracterización de la flora desnitrificante quimioorganotrofa en una pradera experimental. Microbiol. Españ., 28, 43-53.

NATIONAL RESEARCH CENTRE, DOKKI, CAIRO (EGYPT)
MICROBIAL AND ENZYME CHEMISTRY RESEARCH UNIT
ZAGAZIG UNIVERSITY, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

PRODUCTION OF THE ANTIBIOTIC NRC-501 ISOLATED FROM FERMENTATION CULTURES OF *STREPTOMYCES* SPECIES, USING EGYPTIAN MOLASSES (*)

by

Y. M. SHEHATA, A. A. ABOU-ZEID and M. M. ABDEL-HAMID

INTRODUCTION

The demonstrated ability of actinomycetes to produce antagonistic phenomenon and useful antibiotics has directed the attention towards factors related to their isolation from their natural habitats, the soils (4). The identification of the organism producing the antimicrobial metabolite revealed that it showed great similarity with *Streptomyces erythrochromogenes* (2). The identification of the antimicrobial metabolite indicated that it is a new, broad spectrum, peptide in nature, antibiotic.

The present work deals with some essential nutrients controlling the production of the antibiotic by the isolated organism resembling *Streptomyces erythrochromogenes*.

The Egyptian black strap molasses was used as cheap, local and available fermentation medium for the production of the antibiotic. The addition of NaNO_3 , KH_2PO_4 and starch to the molasses medium and their influences on the antibiotic production was studied. The influence of some chelating agent such as $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CH})_6)$, EDTA and methylene blue on the removal of the toxic effects of certain elements present in molasses to increase the antibiotic yield was also studied.

(*) This work forms a part of Ph. D. thesis of M. M. Abdel-Hamid.

MATERIALS AND METHODS

Maintenance of Streptomyces species

The organism was maintained on the following medium (g/l): starch, 20.0; NaNO₃, 3.0; KH₂PO₄, 2.0; Mg SO₄.7H₂O, 1.0; KCl, 1.0; Fe SO₄.7H₂O, 0.005; agar-agar, 20.0, and distilled water to one litre. The inoculated slants were incubated at 28°-30 °C for 10 days to permit luxuriant growth. The slants later were kept in a refrigerator at 5 °C.

Fermentation medium

The crude molasses was diluted with distilled water and centrifuged to remove mud, suspended foreign, substances and other insoluble impurities. The following concentrations of molasses sugar are prepared (molasses contains 50 % sugars) (g/l): 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100. The initial pH of the diluted portions was adjusted to 7.0. Triplicate set of Erlenmeyer conical flasks were used for each concentration mentioned above. The flasks were plugged, sterilized at 120 °C for 15 min, cooled and inoculated with standard inocula of spore suspensions of *Streptomyces* sp. NRC-501 of 10 days old. The flasks were then inserted on a rotary shaker of 200 r/m at 28°-30 °C for 72 h. At the end of the incubation period the flasks were removed and analysed for final pH, consumed and residual sugars (5), suspended dry matter and antibiotic NRC-501 produced (1).

RESULTS AND DISCUSSION

Physico-chemical properties of the antibiotic NRC-501

The antibiotic substance NRC-501 is amorphous, cream in colour. The melting point of the antibiotic substance is 110 °C (decomposition). It is freely soluble in chloroform, methyl alcohol, ethyl

alcohol, acetone, ethyl acetate, n-butanol and ethylene glycol, sparingly soluble in toluene, water and benzyl alcohol but insoluble in petroleum ether, n-hexane, n-butyl ether and benzene. The ultraviolet light spectrum of the antibiotic substance showed two light absorption maxima at 210 and 280 m μ . In the infrared analysis the antibiotic showed the following absorption bands: medium bands at 1710 (broad), 1610 (broad), 1215 and 1116; weak bands at 3410, 2930, 1515, 1457, 1425, 1375, 1330, 1032, 825, 757 and a shoulder at 2880. On elementary analysis, the antibiotic NRC-501 contain C 53.74 %, H 6.36 %, S 1.53 % and O 36.86 %. The empirical formula was calculated to show C₃₆H₄NO₂₄S.

Use of molasses as fermentation medium

The data obtained showed that the clarified molasses was suitable as complete fermentation medium due to its content of sugars, amino acids, salts of Ca, P, Fe, Cu and other trace elements in addition to some vitamins acting as growth factors (3). The antibiotic NRC-501 increased with the increase of molasses concentration till it reached its maximal concentration (46.77 mg/100 ml) when the sugar concentration in molasses was 4.0 g/100 ml fermentation medium. The sugar consumption was 2.125 g/100 ml fermented medium while the dry mycelial growth was 0.334 g/100 ml.

The organism showed its maximum metabolic activity at sugar concentration of 9-10 g %, at which the microbial cell building was high (0.375-0.756 g %) but the antibiotic yield was very low. This means that the cell building was on the expense of the antibiotic yield. The final pH value shifted towards the alkaline side up to 7.0 g % sugar concentration over which it showed slight acidity 6.4 at sugar level of 10.0 g %.

Influence of different concentrations of NaNO₃

In the above experiment the mycelial growth increased with the increase of sugar concentration, though NaNO₃ was added in different concentrations to rise the nitrogen level in the medium and

to bring the carbon/nitrogen ratio to the suitable utilization level. The results showed that the antibiotic yield increased with the addition of 0.1 g % NaNO_3 from 46.77 to 63.10 mg % while the addition of further NaNO_3 maintained the antibiotic yield up to 0.3 g % over which the antibiotic production showed high decrease till it reached 3.72 mg % at a concentration of nitrate 0.6 g %. The sugar consumption and mycelial growth showed no detectable variations. The final pH showed slight gradual increase towards the alkaline side.

Influence of different concentrations of KH_2PO_4

The addition of KH_2PO_4 to the fermentation medium supplemented with 0.1 g % NaNO_3 showed an increase in the antibiotic yield. A concentration of 0.05 g % KH_2PO_4 was ineffective while 0.1 to 0.2 g % was the effective concentration range at which the antibiotic yield was 72.44 mg/100 ml fermentation medium. The mycelial growth and consumed sugar increased slightly with the increase of phosphate concentration. The final pH value was shifted towards the alkaline side and ranged from 7.6 to 7.8.

Influence of different concentrations of starch

Starch was utilized by *Streptomyces* species and it was used on a large scale in their isolation from their habitats, studying of their physiological and biochemical characteristics. The addition of 0.4 g % of starch to the molasses medium supplemented with 0.1 g % NaNO_3 and 0.1 g % KH_2PO_4 , showed a detectable increase in the antibiotic yield of about 112.2 mg %. The mycelial growth and the final pH value showed no remarkable variations while the consumed sugars increased with the increase of starch concentration up to 0.8 g % when it was 3.39 %.

Effect of the reduction of the inorganic salts present in molasses on the antibiotic NRC-501 production

The clarified molasses indicated that it could be utilized favorably for the fermentation production of the antibiotic NRC-501. The total

ash content of the factory molasses ranged between 13-15 % identified as Ca, D, Fe, P and Cu. Treatment of molasses to reduce its mineral content or to remove certain elements, do not mean that they are found in the readily available form for the specified organism.

Treatment of molasses with potassium ferrocyanide $K_4(Fe(CN)_6)$

The role of potassium ferrocyanide was ascribed to form insoluble complexes with iron and probably with other metals such as copper, manganese, zinc, aluminium and inorganic phosphorus. Various concentrations of potassium ferrocyanide was added to the molasses, steamed and centrifuged. The molasses medium in addition to 0.1 g % $NaNO_3$, 0.2 g % KH_2PO_4 and 0.4 g % starch was prepared.

The results indicated that the most effective ferrocyanide concentration was 0.04 g % which remarkably increased the yield of the antibiotic NRC-501 from 112.2 to 158.5 mg %. The mycelial growth recorded a slight increase while consumed sugars and final pH values are more or less not affected. This means that the ferrocyanide affected remarkably the yield of the antibiotic due to the removal of unavailable inorganic elements.

Treatment of molasses with disodium salt of ethylenediamine-tetraacetate (EDTA)

The role of EDTA was to form a chelate complexes with the divalent cations present in molasses in higher concentrations to reduce their amounts or to prevent their toxic action on the enzymatic reactions needed for antibiotic production.

Though, EDTA was added in different concentrations to the fermentation medium previously described in the above experiment.

The results showed that the role of EDTA was less effective than that of potassium ferrocyanide while at the same time it increased the antibiotic yield by about 41.3 mg %. The mycelial growth showed a slight gradual increase by increasing the EDTA concentration, this indicate that the complex has no toxic effect on the microbial cell formation or in other words it stimulates the cell formation.

Treatment of molasses with methylene blue

The role of methylene blue was the formation of complexes with some of the elements present in molasses which retard the antibiotic formation. As in the above experiment the methylene blue was added in different concentrations to the fermentation medium.

The results indicated that methylene blue in concentration of 0.05-0.06 g % remarkably increased the yield of the antibiotic by about 49 %. This means that the effect of methylene blue on the reduction of toxic effect of some elements present in molasses may be accompanied with stimulatory effect on the antibiotic formation and the mycelial growth. The final pH recorded reached its maximum alkalinity (8.0) at the higher concentrations of methylene blue.

Therefore, the natural medium favoring the fermentation production of the antibiotic NRC-501 using molasses as a nutritive medium must be composed of (g/100 ml): molasses 8.0 (sugar, 4.0), starch 0.4, NaNO₃ 0.1, KH₂PO₄ 0.2 and methylene blue 0.05. The initial pH was 7.0. The above medium showed a remarkable increase in the biosynthesis of the antibiotic evaluated as 250 % more than a medium composed only of molasses as a sole fermentation medium.

Finally, molasses can not be used as the main carbon, nitrogen and phosphate sources or in other words, the mentioned sources are present in molasses but in less or unfavorable states to be utilized by the organism for the production of the antibiotic. Also, the inorganic elements are accumulated in molasses in forms rendered them toxic or having an inhibitory action on the antibiotic formation. These conclusions arised from the recorded increase of the antibiotic on addition of the chelating or complex forming substances to the molasses medium such as K₄(Fe(CN)₆), EDTA and methylene blue. The data obtained arised the stimulatory action of methylene blue on the antibiotic production and microbial cell formation without more sugar consumption.

SUMMARY

The antibiotic substance NRC-501 was produced by *Streptomyces* species isolated from Egyptian soils. Egyptian black strap molasses

was used as medium for the antibiotic production. Influences of NaNO_3 , KH_2PO_4 and starch on the fermentative production of antibiotic NRC-501 were investigated. Treatment of black strap molasses with potassium ferrocyanide, EDTA and methylene blue to improve its utilization for production of antibiotic-501 was also conducted.

RESUMEN

Producción del antibiótico NRC-501 aislado de los cultivos de fermentación de las especies de Streptomyces, utilizando melazas egipcias

El antibiótico NRC-501 se ha obtenido con especies de *Streptomyces* aisladas de suelos egipcios, empleando melazas egipcias como medio. Se han estudiado las influencias de NO_3Na , $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y almidón sobre la producción de este antibiótico. Para mejorar la utilización de las melazas se sometieron éstas a tratamiento con ferrocianuro potásico, tetraacetato de etilendiamina y azul de metileno.

REFERENCES

1. ABOU-ZEID, A. A., and SHEHATA, Y. M. 1969. A simple technique for assaying antibiotics using methylene blue as an indicator. *Indian J. Pharm.*, **31**, 72-75.
2. ABOU-ZEID, A. A.; SHEHATA, Y. M., and ABD EL-HAMID, M. M. 1973. *Streptomyces* species producing antimicrobial metabolites isolated from Egyptian soils. *Pak. J. Biochem.*, **VI**, 28-44.
3. MOSTAFA, M. A.; (Late) TAHA, E. M., and ABOUD-ZEID, A. A. 1969. Utilization of Egyptian raw by-products by *Streptomyces aureofaciens* for the production of tetracyclines. *J. Bot. U. A. R.*, **12**, 67-80.
4. OSMAN, H. G., and ABOU-ZEID, A. A. 1958. A technique for the isolation of actinomycetes from soils. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **14**, 317-19.
5. SOMOGYI, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, **160**, 61-69.

DETERMINACION DE LAS RELACIONES FILOGENETICAS ENTRE VARIAS ESPECIES DE LEVADURAS DEL GENERO *SACCHAROMYCES* POR INMUNOPRECIPITACION

por

P. CACERES y A. CHORDI

INTRODUCCION

El género *Saccharomyces* ha sido estudiado desde el punto de vista taxonómico, empleando diversos métodos para su clasificación; desde los sistemas clásicos basados en caracteres morfológicos y fisiológicos, como el de Lodder (7), hasta otros sistemas utilizados actualmente que se basan en la aplicación de nuevas técnicas, como son la taxonomía numérica empleada por Campbell (5), estudio de la composición de bases nitrogenadas de ácidos nucleicos, llevada a cabo por Nakase y Komagata (9), y homología de ácidos nucleicos, estudiada por Bicknell y Douglas (1).

También se han realizado estudios taxonómicos, con métodos serológicos, por Tsuchiya y colaboradores (12-14), y Campbell (3-4), mediante pruebas de aglutinación. Sin embargo, llaman la atención ciertas discrepancias de los estudios serológicos respecto a los realizados por otros sistemas, tanto clásicos como de taxonomía molecular.

Dado que en estos estudios serológicos no se ha efectuado un análisis de los antígenos solubles o inmunoprecipitantes, sino únicamente de antígenos aglutinantes, que, en general, son antígenos de superficie, el objeto del presente trabajo sería establecer las relaciones filogenéticas en varias especies del género *Saccharomyces*, detectando los antígenos inmunoprecipitantes. Pretendemos dilucidar

si las discrepancias citadas anteriormente de los estudios serológicos que detectan antígenos aglutinantes con respecto a otros sistemas, existen también en el estudio de los antígenos precipitantes.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos utilizados

Las cepas de levaduras empleadas fueron de diversas procedencias. *Saccharomyces carlsbergensis* az N-C-Y-C-74, del Van't Hoff Laboratorium (Holanda); *S. cerevisiae* UN-Y-110, procedente de nuestro laboratorio, y *S. uvarum* Y-1205 y *S. fragilis* 10022, ambas del Departamento de Microbiología de la Universidad de Washington.

Dado que los microorganismos utilizados eran de procedencias diversas, se comprobaron sus caracteres morfológicos y fisiológicos de acuerdo con los métodos de Lodder (7).

Obtención de antígenos

Se realizaron cultivos en agitación durante 48 h, posteriormente se centrifugaban y el sedimento se mezclaba con acetona a -20°C y se mantenía así durante 24 h. Esta mezcla se centrifugaba y el sedimento se sometía a desecación hasta conseguir un polvo seco; junto con el coadyuvante incompleto de Freund, fueron empleados para la inmunización de conejos.

Por otra parte, las células obtenidas en cultivos en agitación, se sometieron a trituración con arena de mar y posteriormente a centrifugación diferencial, con el fin de obtener fracciones subcelulares. El proceso seguido era similar a la primera parte del método de obtención de ribosomas realizado por Brettahuer y colaboradores (2). De dichas fracciones, se eligió la fracción citoplásmica soluble para ser analizada desde el punto de vista antigénico, porque en ella se encuentra un elevado número de proteínas solubles, que se detectan de un modo óptimo por inmunoprecipitación.

Obtención de inmunosueros

La técnica elegida fue la inyección subcutánea a lotes de 3 conejos, para cada una de las cepas de levaduras, del polvo desecado junto con el coadyuvante, según la técnica de Tormo (11).

La pauta de inmunización fue controlada por inmunodifusión, según el método de Ouchterlony con la variante de Kagan y Norman (6).

Análisis antigénico

El análisis antigénico se realizó aplicando la técnica de inmunoelectroforesis, por medio de la cual se ponían de manifiesto los antígenos individualizados en cada una de las especies estudiadas.

La inmunoelectroforesis se efectuaba según el micrométodo de Scheidegger (10) con las modificaciones descritas por Martínez-Resa y colaboradores (8).

RESULTADOS

Realizando el análisis inmunoelectroforético, tanto con los inmunosueros homólogos como con los heterólogos de las especies estudiadas, detectábamos los antígenos propios de cada especie y los comunes con otras especies.

Las reacciones se llevaron a cabo enfrentando cada uno de los inmunosueros obtenidos con la fracción citoplásmica soluble de cada una de las especies sometidas a estudio.

Los resultados de las diversas reacciones podemos observarlos en el *cuadro 1*, en el que se refleja el número de arcos de precipitación detectados en cada una de las reacciones entre las especies, así como el porcentaje de antígenos comunes entre ellas.

*Comunidad antigénica con *S. carlsbergensis**

Las relaciones serológicas de las especies citadas en el *cuadro 1* con *Saccharomyces carlsbergensis* fueron determinadas por medio

de reacciones cruzadas con el inmunosuero correspondiente a esta especie, como podemos observar en la *figura 1*.

Cuadro 1. Reacciones cruzadas entre varias especies de Saccharomyces para detectar el número de antígenos comunes entre ellas

Especies	Anti- <i>S. carlsbergensis</i>	Anti- <i>S. cerevisiae</i>	Anti- <i>S. uvarum</i>
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	19 (100 %)	12 (86 %)	10 (83 %)
<i>S. cerevisiae</i>	13 (68 %)	14 (100 %)	8 (66 %)
<i>S. uvarum</i>	12 (63 %)	11 (78 %)	12 (100 %)
<i>S. fragilis</i>	7 (37 %)	5 (35 %)	4 (33 %)

Los números entre paréntesis indican el porcentaje de antígenos comunes.

En las relaciones cruzadas con *Saccharomyces cerevisiae* y *S. uvarum* aparecen un elevado número de arcos de precipitación, de los cuales la mayoría presentan una morfología y movilidad electroforética similares a las del patrón homólogo de *S. carlsbergensis*.

Con *Saccharomyces fragilis* se detectaron en la reacción cruzada 7 arcos de precipitación. En este caso, no solamente había una menor comunidad antigénica, sino que además la morfología de alguna de las bandas e incluso su posición era diferente, como la que presentaba movilidad 73; otras, como las de movilidad 46b y 56, a pesar de su aspecto diferente a las del patrón homólogo de *S. carlsbergensis*, tenían igual movilidad.

Comunidad antigénica con S. cerevisiae

Del mismo modo que en el caso anterior, se realizaron las reacciones cruzadas entre el inmunosuero anti-*Saccharomyces cerevisiae* y las especies citadas en el *cuadro 1*, como vemos en la *figura 2*.

Los antígenos comunes con *Saccharomyces cerevisiae* detectados en *S. carlsbergensis* y *S. uvarum* están representados por una serie de arcos de precipitación, que adoptan una disposición semejante a

la del patrón antigénico propio de *S. cerevisiae* y además aparecen en número bastante elevado.

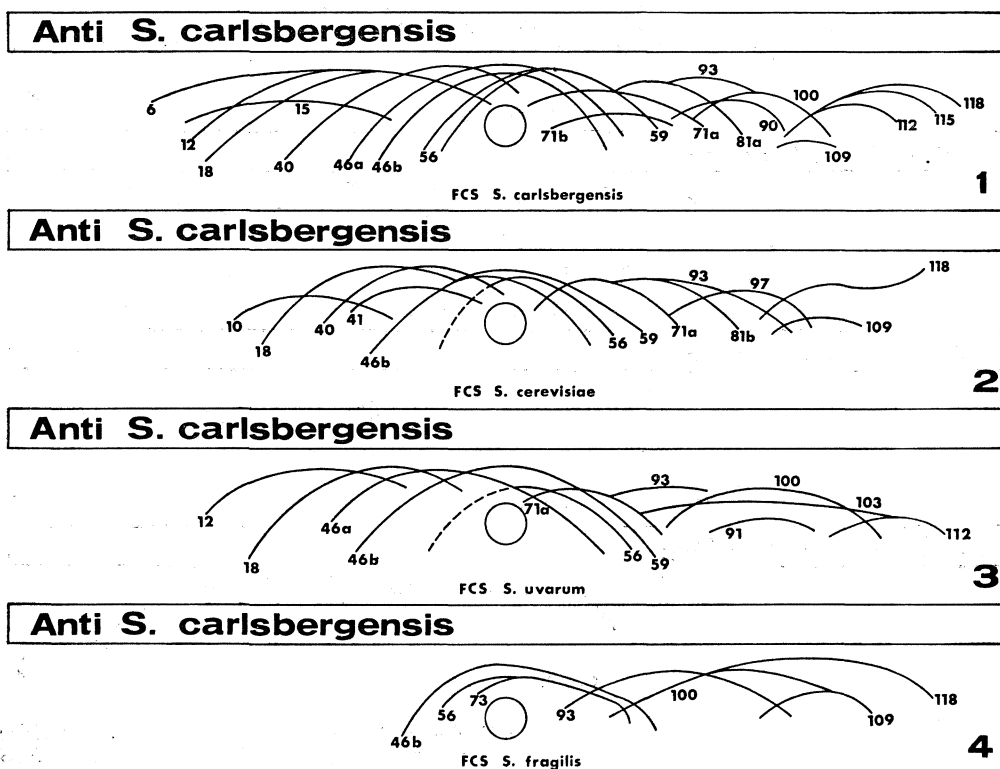


Figura 1. Esquema correspondiente a las reacciones cruzadas del inmunosuero anti-*S. carlsbergensis* con: 1) fracción citoplásmica soluble (FCS) de *S. carlsbergensis*; 2) FCS de *S. cerevisiae*; 3) FCS de *S. uvarum*; 4) FCS de *S. fragilis*

En la reacción con *Saccharomyces fragilis* aparecen 5 arcos de precipitación, algunos de los cuales, como el de movilidad 73, no se encuentran en el patrón homólogo de *S. cerevisiae*, y lo mismo ocurre con la banda de movilidad 89, mientras que el arco de movilidad 56 sí se encuentra en dicho patrón homólogo.

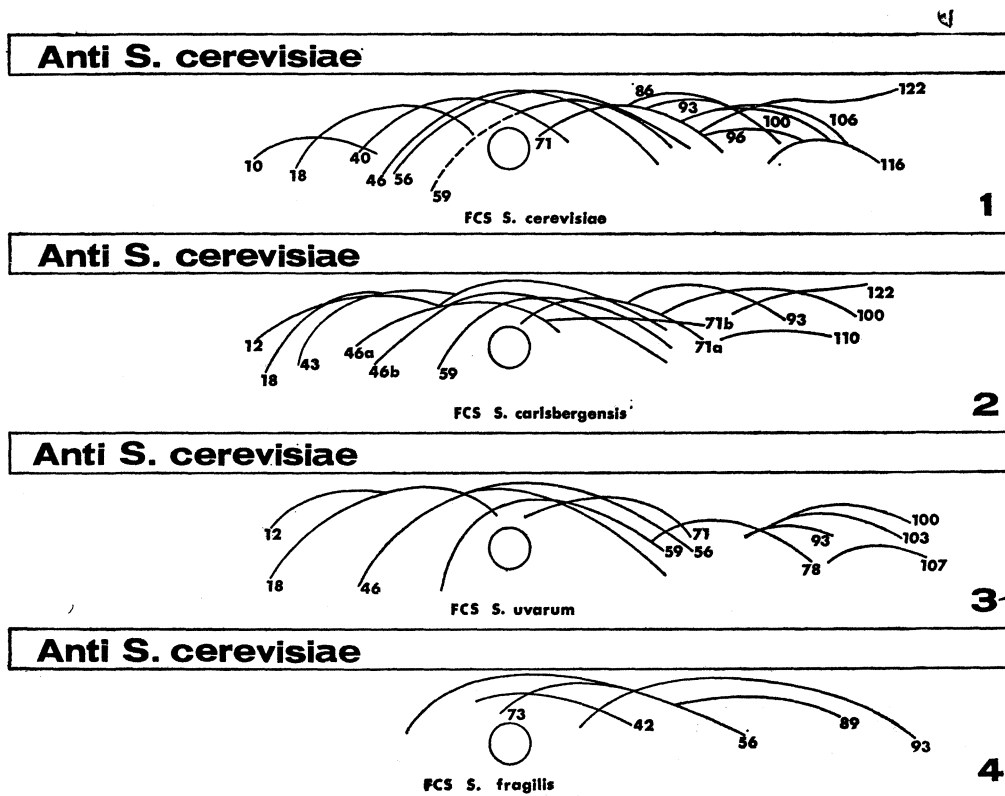


Figura 2. Esquema correspondiente a las reacciones cruzadas del inmunosuero anti-*S. cerevisiae* con: 1) FCS de *S. cerevisiae*; 2) FCS de *S. carlsbergensis*; 3) FCS de *S. uvarum*; 4) FCS de *S. fragilis*

Comunidad antigénica con *S. uvarum*

La comunidad antigénica con *Saccharomyces uvarum* se determinó, al igual que en los dos casos anteriores, con la utilización del inmunosuero anti-*S. uvarum*. Las reacciones cruzadas podemos observarlas en la figura 3.

Con *Saccharomyces carlsbergensis* y *S. cerevisiae* se observó una importante reacción cruzada, que fue de mayor intensidad en el caso de *S. carlsbergensis*, con el cual se detectaron 10 antígenos comu-

nes, y menor en el caso de *S. cerevisiae*, con el cual se observaron 8 únicamente.

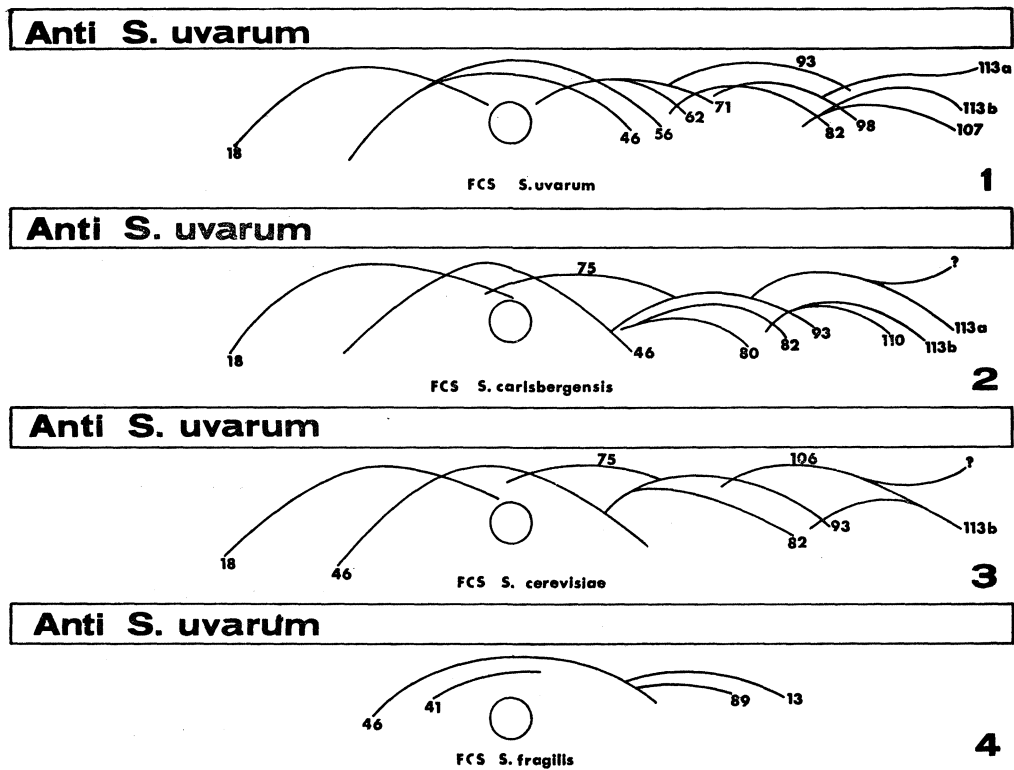


Figura 3. Esquema correspondiente a las reacciones cruzadas del inmunosuero anti-*S. uvarum* con: 1) FCS de *S. uvarum*; 2) FCS de *S. carlsbergensis*; 3) FCS de *S. cerevisiae*; 4) FCS de *S. fragilis*

Con *Saccharomyces fragilis* hubo una reacción menor que la que había dado con las otras dos especies de *Saccharomyces*, al aparecer únicamente 4 arcos de precipitación. De los 4 arcos, los de movilidad 41 y 89 no aparecían en el patrón homólogo de *S. cerevisiae*.

Como podemos observar de un modo general, la proximidad taxonómica entre especies se pone de manifiesto en las reacciones cruzadas, ya que según el grado de aproximación aparece un número de arcos de precipitación más o menos elevado.

DISCUSION

Las especies denominadas, *Saccharomyces carlsbergensis*, *S. cerevisiae* y *S. uvarum* pertenecen al grupo de *Saccharomyces* sensu estricto, según van der Walt (16).

En general, vemos que existe una estrecha relación entre las tres especies, como demuestra la fuerte reacción cruzada, indicando su gran proximidad taxonómica. Sintetizando los resultados, podemos afirmar, basándonos en criterios serológicos, que *Saccharomyces carlsbergensis*, *S. cerevisiae* y *S. uvarum* forman parte de un género homogéneo, aunque parece existir una relación más estrecha entre las dos primeras especies citadas.

Por otra parte, en las figuras 1-3 podemos apreciar en las reacciones cruzadas entre las tres especies de *Saccharomyces*, además de la existencia de una elevada comunidad antigénica, que los arcos de precipitación adoptan siempre en líneas generales una disposición típica, que nos permitiría determinar en un momento dado la inclusión o no inclusión de una especie de *Saccharomyces* en este grupo restringido del género.

Respecto a estas tres especies, los estudios de Nakase y Komagata (9) sobre la composición de bases nitrogenadas del ADN daban unos valores de un 40 % aproximadamente de guanina-citosina, datos que están de acuerdo con la gran similitud entre estas especies detectada por nosotros, pero no nos indican el grado de proximidad entre ellas.

Bicknell y Douglas (1) estudiaron la relación existente entre varias especies de *Saccharomyces*, determinando la homología del ADN con respecto a *S. cerevisiae*. Los resultados eran del 100 % para *S. cerevisiae*, 96 % para *S. carlsbergensis* y del 40 % para *S. uvarum*. Cuando la homología se determinaba por hibridación del ADN con ARN 25S, también respecto a *S. cerevisiae*, la homología era del 100 % para las tres especies. Estos datos concuerdan de un modo total, ya que confirman la estrecha relación que existe entre las tres especies de *Saccharomyces*.

Sin embargo, en los estudios serológicos mediante aglutinación por Tsuchiya y colaboradores (12-14) *Saccharomyces cerevisiae* y *S. uvarum* sí que estaban muy relacionados, ya que presentaban los

los mismos antígenos termoestables, aunque variaban los termolábiles, pero *S. carlsbergensis* tenía muy pocos antígenos comunes con ambos.

Campbell (3), empleando también aglutinación, determinó que *Saccharomyces cerevisiae* podía ser del grupo A, B o C de su clasificación serológica; *S. carlsbergensis*, del grupo A o del C; y *S. uvarum*, del grupo C, con lo cual existe una gran variabilidad.

Respecto a *Saccharomyces fragilis* podemos afirmar que presenta una comunidad antigénica con *S. carlsbergensis*, *S. cerevisiae* y *S. uvarum* digna de ser tenida en cuenta, pero el grado de relación es mucho menor que el existente entre estas tres últimas especies y por tanto presenta diferencias suficientes como para pertenecer a otro género diferente o, al menos, a un subgrupo claramente diferenciado dentro del género *Saccharomyces*.

Esto último está de acuerdo con la sugerencia hecha por Van der Walt (15), de trasladar algunas especies de *Saccharomyces*, entre las que se encontraba *S. fragilis*, al género *Kluyveromyces*, basándose en la forma de la espora y en la fragilidad del asca.

Estudiando la composición del ADN en *Saccharomyces fragilis*, Nakase y Komagata (9) detectaron un 40 % de guanina-citosina, aproximadamente, dato que no contradice en absoluto nuestros resultados, ya que la composición puede ser la misma, pero existir cierta variación en la secuencia de bases.

Bicknell y Douglas (1) determinaron que la homología del ADN para *Saccharomyces fragilis* con respecto a *S. cerevisiae* era cero, y del 92 % cuando la homología era por hibridación del ADN con ARN 25S. Como vemos en este caso, la relación entre *S. fragilis* y *S. cerevisiae* es mucho menor que la observada entre esta última y *S. carlsbergensis* y *S. uvarum*.

Desde el punto de vista serológico, Tsuchiya y colaboradores (12-14) detectaron una gran similitud antigénica entre *Saccharomyces fragilis* y *S. carlsbergensis*. Campbell (4), a su vez, determinó que *S. fragilis* pertenecía al grupo B de su clasificación serológica.

Es interesante observar cómo los resultados del estudio de los antígenos precipitantes concuerdan con los obtenidos en el estudio de hibridación de ácidos nucleicos y del porcentaje de guanina-citosina. Esto es lógico desde el punto de vista teórico, ya que todos

estos métodos tienden a determinar, de un modo directo o indirecto, la proximidad genética de los organismos.

Como la configuración proteica está directamente relacionada con la secuencia de bases del gen que controla su síntesis, si determinamos homologías proteicas entre dos especies podemos inferir una secuencia semejante en las bases de los nucleótidos que componen sus genes.

Dado que la especificidad de los anticuerpos es comparable a la de las enzimas, la detección (por inmunoelectroforesis) de una serie de antígenos comunes entre varias especies, sean o no proteicos, determinará indirectamente la presencia en ésta de genes comunes, lo que explica la concordancia de nuestros resultados con la hibridación de ácidos nucleicos y porcentaje de guanina-citosina.

Sin embargo, nuestros resultados con antígenos solubles, al igual que los de taxonomía genética, discrepaban en ciertos casos de los resultados obtenidos mediante aglutinación por Tsuchiya y colaboradores (12-14) y Campbell (3-4). La explicación de esta discrepancia podría ser que estos autores detectan generalmente antígenos de superficie, insolubles y en su mayoría de tipo polisacárido, mientras que en nuestro trabajo detectamos antígenos solubles pertenecientes a la fracción citoplásmica soluble, y generalmente de tipo proteico, obteniendo así resultados diferentes.

En cualquier caso, es obvio que el estudio de antígenos precipitantes se correlaciona con los resultados obtenidos por hibridación de ácidos nucleicos y porcentaje de bases nitrogenadas, por lo que el estudio de antígenos precipitantes parece más adecuado que el de antígenos aglutinantes para establecer relaciones filogenéticas.

RESUMEN

Se ha llevado a cabo un estudio de la comunidad antigénica de cuatro especies del género *Saccharomyces*, mediante inmunoelectroforesis.

Saccharomyces carlsbergensis y *S. uvarum* presentaron una comunidad antigénica respecto a *S. cerevisiae* de 86 % y 78 %, respectivamente, mientras que *S. fragilis* presentaba una comunidad antigénica del 35 %.

Finalmente se señala la concordancia de estos resultados con los obtenidos con los estudios de homología de ácidos nucleicos y la discrepancia, en algunos casos, con los estudios serológicos mediante aglutinación.

SUMMARY

Determination of the phylogenetic relationships of various species of yeasts of the genus Saccharomyces through immunoprecipitation

An antigenic study was carried out on four species of the genus *Saccharomyces* through the immunoelectrophoretic method.

Saccharomyces carlsbergensis and *S. uvarum* in relation to *S. cerevisiae* had 86 and 78 per cent of common antigens respectively, whereas *S. fragilis* had only 35 per cent.

Finally, it is noted that our results agree with the studies of nucleic acid homologies and disagree in some cases with serological studies through agglutination.

BIBLIOGRAFIA

1. BICKNELL, J. N., and DOUGLAS, H. C. 1970. Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.*, 101, 505-12.
2. BRETTHAUER, R. K.; MARCUS, L.; CHALOUPKA, J.; HALVORSON, H. O., and BOCK, R. M. 1963. Aminoacid incorporation into protein by cell-free extracts of yeast. *Biochemistry*, 2, 1079-84.
3. CAMPBELL, I. 1968. Serological identification scheme for the genus *Saccharomyces*. *J. Appl. Bacteriol.*, 31, 512-24.
4. CAMPBELL, I. 1970. Comparison of serological and physiological classification of the genus *Saccharomyces*. *J. Gen. Microbiol.*, 63, 189-98.
5. CAMPBELL, I. 1972. Numerical analysis of the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*. *J. Gen. Microbiol.*, 73, 279-301.
6. KAGAN, I. G., and NORMAN, L. 1961. Antigenic analysis of *Echinococcus* antigens by agar diffusion techniques. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 10, 727.
7. LODDER, J. 1970. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
8. MARTÍNEZ-RESA, P.; ALVAREZ-MORENO, C.; HERMIDA, F., and CHORDI, A. 1969. Identification by immunoelectrophoresis of bovine milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 52, 1.

9. NAKASE, T., and KOMAGATA, K. 1971. Significance of DNA composition in the classification of yeast genus *Saccharomyces*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 259-79.
10. SCHEIDEGGER, J. J. 1955. Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **7**, 103.
11. TORMO, J. Tesis doctoral. Madrid.
12. TSUCHIYA, T.; FUKAZAWA, Y., and KAWAKITA, S. 1961. Serological classification of the genus *Saccharomyces* (II). *Jap. J. Microbiol.*, **5**, 417-29.
13. TSUCHIYA, T.; FUKAZAWA, Y., and KAWAKITA, S. 1965. Significance of serological studies on yeasts. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **26**, 1-15.
14. TSUCHIYA, T.; FUKAZAWA, Y.; SATO, I.; KAWAKITA, S.; YONEZAWA, M., and YAMASE, Y. 1958. Serological classification of the genus *Saccharomyces* (I). *Yokohama Med. Bull.*, **9**, 359-70.
15. VAN DER WALT, J. P. 1965. The emendation of the genus *Kluyveromyces* v. d. Walt. *Antonie van Leeuwenhoek*, **31**, 341-48.
16. VAN DER WALT, J. P. 1970. Véase: 7. LODDER, J.

VARIACIONES EN LA COMPETENCIA DE *BACILLUS SUBTILIS* POR ADENILICO CICLICO

por

M. ESPINOSA, M.^ª TERESA PEREZ-UREÑA, E. GARCIA y A. PORTOLES

INTRODUCCION

Según es sabido, al principio de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano es cuando aparece mayor cantidad de adenil-ciclasa (3, 9). El hecho de que también sea en esta fase donde aparece el máximo de competencia transformante en *Bacillus subtilis* (2), hizo que investigáramos los posibles efectos de la molécula de adenilico cíclico (cAMP) en el proceso del desarrollo de la competencia (8). Cuando se comparan estos resultados, obtenidos en nuestro laboratorio, con los de Wise y colaboradores (15) para el sistema de transformación de *Haemophilus influenzae*, aparecen algunas características diferenciales, ya que en nuestro caso, el efecto del cAMP no parecía totalmente subordinado a la fase de crecimiento, como señalaban los citados autores.

En el presente trabajo, se pretende comprobar la posible influencia del cAMP en función del modo de adquisición de la competencia y precisar algunos detalles sobre su modo de acción.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Como bacteria receptora se utilizó *Bacillus subtilis* AR1T, una estirpe prototrófica obtenida en nuestro laboratorio mediante transformación. Por otra parte, *B. subtilis* MCB fue la bacteria indi-

cadora y el bacteriófago SPP1 se utilizó como fuente de ADN para las experiencias de transfección. También *B. subtilis* 2G-8 (tyr⁻ thy⁻) se usó para el aislamiento de ³H-ADN transfectante, lo que realizamos de acuerdo con el método de Rottlander y Trautner (12).

Medios

Como medio de crecimiento para la estirpe AR1T tanto en cultivos continuos como ordinarios, se utilizaron las sales de Bott y Wilson (2) suplementadas con glucosa exclusivamente. La bacteria indicadora se cultivó en medio TY (12) y en medio LTT como medio sólido para recuento de las unidades formadoras de placas (1).

Condiciones de crecimiento y transfección

Para el cultivo en quimiostato de las bacterias se siguió el procedimiento habitual (11), mientras que para los cultivos ordinarios utilizamos una modificación del método de Bott y Wilson (2) puesta a punto en nuestro laboratorio (4).

Los métodos de estimulación de la competencia, de preparación de células de baja competencia y de preparación de líquidos metabólicos aislados de cultivos altamente competentes fueron los descritos por Joenje y colaboradores (5). El procedimiento de transfección ha sido ya descrito previamente (7).

Unión del ³H-ADN a células competentes

Esta fue determinada de acuerdo con el método de Joenje y Venema (6).

Determinación de la síntesis de proteínas

La incorporación de ¹⁴C-fenilalanina se tomó como indicador de la síntesis de proteínas en los diferentes experimentos, siguiendo los criterios establecidos por Tichy (13) y Tomasz (14).

RESULTADOS

En primer lugar fueron estudiadas comparativamente las condiciones de crecimiento y competencia para las distintas circunstancias experimentales que en este trabajo se consideran (*figura 1*). La parte (A) de la figura corresponde al desarrollo normal de la competencia en el medio de Bott y Wilson (2), mientras que en (B) se representa el desarrollo de una competencia estimulada por sobrenadantes específicos obtenidos de cultivos altamente competentes (4) y en (C) queda indicado el nivel continuo de competencia obtenido en quimiostato para un tiempo de duplicación (t_d) de $2,5 \text{ h}^{-1}$.

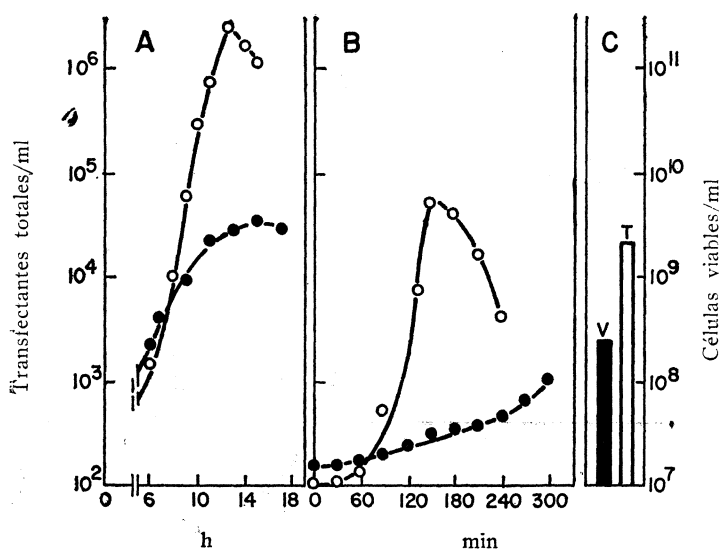


Figura 1. Comparación entre tres métodos de adquisición de la competencia en *B. subtilis*, estableciendo relación gráfica entre el número de transfectantes (○) y las células viables (●). (A): método de BOTT y WILSON (2); (B): por estimulación; (C): mediante cultivo continuo

Las variaciones que se producen en presencia de cAMP —para dosis de 10 mM —, cuyos efectos estimulantes han sido previamente comprobados [Pérez-Ureña y colaboradores (8)], se señalan en las figuras que siguen, según que se trate de un proceso estimulado de la competencia (*figura 2*) o del desarrollo normal de la misma (*figura 3*).

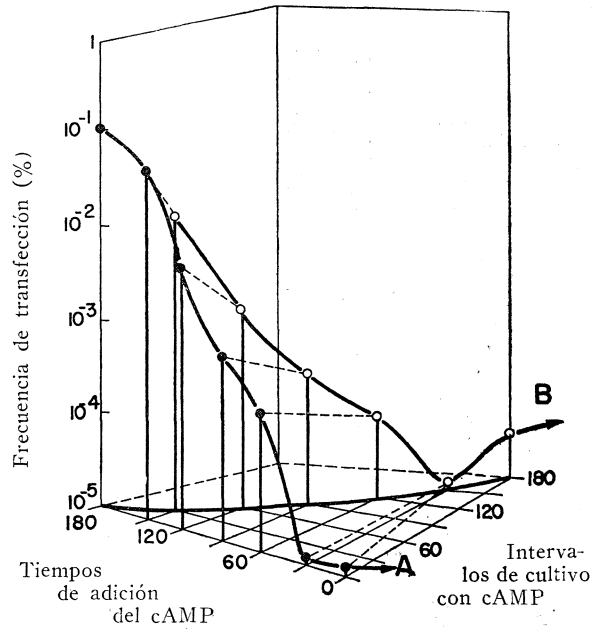


Figura 2. Efecto de una concentración 10 mM de cAMP sobre la competencia estimulada. Cada 30 min se sacaron muestras del cultivo y se añadió el cAMP, determinando los niveles de competencia a los 180 min. La línea A representa la curva básica de competencia, mientras que la línea B representa los niveles de transfectabilidad alcanzados después de la adición del fármaco.

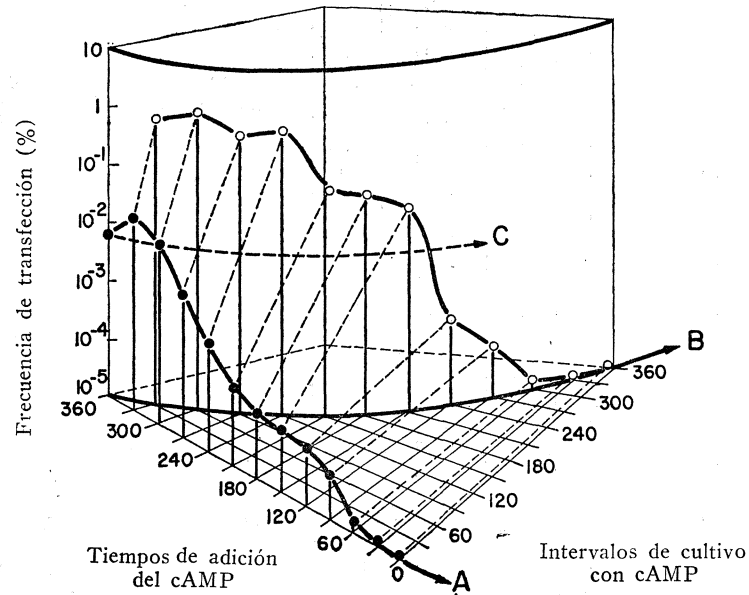


Figura 3. Efecto de concentraciones 10 mM de cAMP sobre la competencia normal. El fármaco se añadió a distintas muestras de cultivo a intervalos de 30 min y su efecto se determinó a los 360 min. Línea A = competencia normal, sin cAMP; línea B = niveles de competencia alcanzados después de la adición del fármaco; línea C = grado de estimulación debido al cAMP, alcanzado al final de la experiencia.

Por otra parte, como es sabido, dos de las fases esenciales en la competencia son la unión irreversible del ADN exógeno con las células receptoras y la síntesis continuada de proteínas durante la adquisición de la competencia (10). Con el fin de determinar si existe

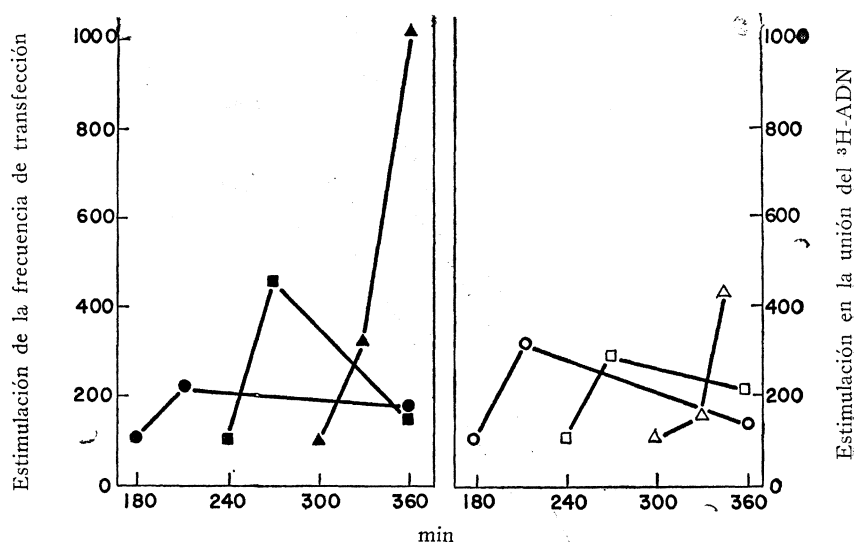


Figura 4. Grado de estimulación en la frecuencia de transfección (●, ■, ▲) y en la unión irreversible del $^3\text{H-ADN}$ (○, □, △) para los tres tiempos en que se observaron distintos niveles de estimulación: baja (180 min, ● ○); media (240 min, ■ □) y alta (300 min, ▲ △), según los resultados de la figura 3

influencia del cAMP sobre estos procesos, estudiamos las variaciones en la unión de $^3\text{H-ADN}$ para los tres tiempos que consideramos críticos y más significativos en presencia del fármaco. Estos tiempos fueron de 180, 240 y 300 min que corresponden, como se puede ver en la figura 3, a estimulaciones de bajo, medio y alto nivel, respectivamente. En la figura 4 se compara la actividad del cAMP sobre la unión irreversible del ADN y sobre la frecuencia de transfección, tomando como base los resultados obtenidos en el momento antes de la adición del fármaco.

Finalmente, al estudiar el efecto sobre la síntesis proteica, mediante las variaciones de incorporación de ^{14}C -fenilalanina, también se encontraron variaciones como las indicadas en la figura 5.

En relación con las experiencias realizadas en cultivo continuo (td = 2,5 h) no se observó efecto alguno en presencia de cAMP.

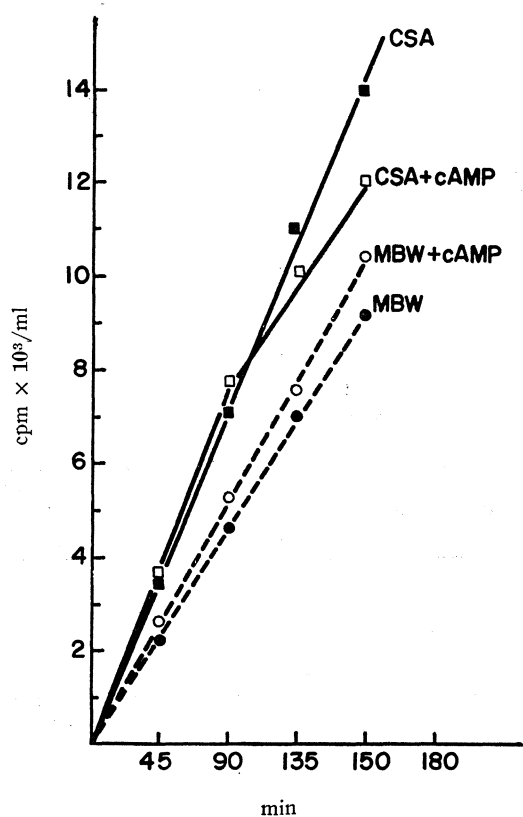


Figura 5. Incorporación de ¹⁴C-fenilalanina en función del tiempo del cultivo, para las dos modalidades de obtención de competencia: estimulada (CSA) y normal (MBW) cuando se añade el fármaco (+ cAMP)

DISCUSION

Como puede deducirse de los datos aquí presentados, el efecto del cAMP es variable dependiendo del método seguido para la obtención de la competencia. Así, cuando se añade a cultivos en los que la competencia se desarrolla lentamente (figura 3), se aprecia

un efecto estimulador variable dependiendo del momento en que se añade el fármaco. Sin embargo, cuando se trata de una competencia estimulada por sobrenadantes de cultivos altamente competentes, entonces se observa una inhibición independiente del tiempo de adición (*figura 2*); y para experiencias de cultivo continuo ($t_d = 2,5$ h) en las que el nivel de competencia es constante, no se pudo observar ningún tipo de efecto. Cuando se comparan las *figuras 1A* y *3* (línea A), existe una diferencia en el tiempo de desarrollo de la competencia que está condicionada porque en el segundo caso se utilizan células de baja competencia en las que no existe fase de latencia.

Esta variabilidad de efecto del cAMP puede ser atribuida tanto al modo de adquisición de la competencia como a las condiciones fisiológicas del estado competente de la bacteria en el momento de añadir el fármaco.

El efecto de estimulación observado en presencia de cAMP se produce a nivel de la unión irreversible del ADN (*figura 4*) y también favoreciendo, posiblemente, la síntesis de proteínas específicas para la competencia (*figura 5*).

RESUMEN

Sobre tres sistemas distintos de adquisición de competencia en *Bacillus subtilis* (normal, estimulada y en quimiostato) se estudia el efecto del cAMP, así como algunos detalles sobre su modo de acción. Se observa un efecto variable que resulta estimulante para la competencia normal, inhibitorio para la estimulada e indiferente en el caso de niveles continuos de competencia.

SUMMARY

Variations in the competence of Bacillus subtilis induced by cAMP

By using three different systems of development of the competence in *Bacillus subtilis* (e. g. normal, stimulated and in chemostat) the influence of cAMP is studied as well as some aspects on the activity of the drug.

It could be observed that the cAMP produces a variable effect on the competence: I) an enhancement of the normal competence; II) an inhibition of the stimulation of the competence development; and III) no effect could be observed on the competence developed in chemostat.

BIBLIOGRAFIA

1. BILWALL, N.; KLEINSCHMIDT, A. K.; SPATZ, H. CH., and TRAUTNER, T. A. 1967. Physical properties of the DNA of bacteriophage SP50. *Mol. Gen. Genet.*, **100**, 39-55.
2. BOTT, K. F., and WILSON, G. A. 1968. Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. Rev.*, **32**, 370-78.
3. CLARK, V. L., and BERNLOHR, R. W. 1972. En H. O. HALVORSON, R. HANSON and L. L. CAMPBELL (eds.) Spores, V, 167-73. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
4. GARCÍA, E. 1974. Características fisiológicas del estado de competencia en sistemas transfectantes de *Bacillus subtilis*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, Madrid.
5. JOENJE, H.; GRUBER, M., and VENEMA, G. 1972. Stimulation of the development of competence by culture fluids in *Bacillus subtilis* transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 189-99.
6. JOENJE, H., and VENEMA, G. 1975. Different nuclease activities in competent and noncompetent *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **122**, 25-33.
7. LÓPEZ, R.; TAPIA, A., and PORTOLÉS, A. 1975. The influence of glutamic acid and arginine on the competence of *Bacillus subtilis* growing in a chemostat. *Mol. Gen. Genet.*, **136**, 87-94.
8. PÉREZ-UREÑA, M. T.; GARCÍA, E.; ESPINOSA, M., and PORTOLÉS, A. 1974. *B. subtilis* SPP1 phage transfection in the presence of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *Eur. Meet. Transform. Transfection Microorganisms 2nd*, 101-2.
9. PETERKOFKY, A., and GAZDAR, D. 1971. Glucose and the metabolism of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in *E. coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2794-98.
10. PORTOLÉS, A.; LÓPEZ, R.; PÉREZ-UREÑA, M. T., y ESPINOSA, M. 1977. Transformación en procariontes. En E. CERDÁ (dir.). *Genética Microbiana*, 103-33. Editorial Alhambra, Madrid.
11. PORTOLÉS, A.; LÓPEZ, R., and TAPIA, A. 1973. An approach to the study of competence regulation in *B. subtilis* growing in a chemostat. En L. J. ARCHER (ed.). *Bacterial Transformation*, 65-80. Academic Press, London.
12. ROTLANDER, E., and TRAUTNER, T. A. 1970. Genetic and transfection studies with *B. subtilis* phage SP50. *J. Mol. Biol.*, **108**, 47-60.

-
13. TICHY, P. 1972. De novo protein synthesis during the development of competence in *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.*, 17, 213-20.
 14. TOMASZ, A. 1970. Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirements for protein synthesis during induction of competence. *J. Bacteriol.*, 101, 860-71.
 15. WISE, E. M.; ALEXANDER, S. P., and POWERS, M. 1973. Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate as a regulator of bacterial transformation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 471-74.

NATIONAL RESEARCH CENTRE, DOKKI, CAIRO (EGYPT)
LABORATORY OF MICROBIAL CHEMISTRY

DISTRIBUTION PATTERN OF ENZYMIC ACTIVITIES CATALYZING THE TRANSFORMATION OF PROGESTERONE IN SOME FUNGI

by

A. F. ABDEL-FATTAH, A. H. EL-REFAI, L. A. R. SALLAM
and M. A. BADAWI

INTRODUCTION

Recently, attention has been focused on microbial transformation of steroids. Progesterone is one of the fundamental biologic substances. Its hydroxylation yields adrenocortical hormones while degradation of its side chain yields androgenic and estrogenic hormones. Such important reactions are known in mammalian systems. However, available knowledge of these enzymic activities in microorganisms is still scanty. Studies aiming to investigate progesterone transforming enzymes in various microorganisms have therefore been carried out by many investigators. In this respect, Abdel-Fattah *et al.* (2) investigated the ability of several *Aspergillus niger* cultures for hydroxylating the 11-carbon atom of progesterone in the alpha configuration. Screening of the ability of some mold fungi for the transformation of progesterone to 11 β -hydroxy derivative was also carried out (8). On the other hand, side chain degradation of progesterone by *Aspergillus* and *Penicillium* species was investigated by some authors (2, 7). However, combination of hydroxylation and side chain degradation of progesterone with a strain of *A. fischeri* has recently been reported by the authors (9).

The present work was undertaken to investigate the distribution pattern of the different enzymic activities catalyzing the transformation of progesterone in some fungal cultures.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

The different organisms used in the present work were obtained from the fungal collection of the Centre of Cultures of the National Research Centre, Cairo.

Cultivation and transformation

All organisms were cultivated under identical conditions using the medium formulated by Capek *et al.* (5) of the following composition (g/l, w/v): glucose, 40.0; peptone, 1.0; KH_2PO_4 , 0.71; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0; yeast extract, 1.0 and asparagine, 0.7. The pH was adjusted to 5.6. Cultivation was performed in 250 ml Erlenmeyer flasks, each containing 70 ml medium. The flasks were sterilized at 1 atmosphere for 20 min and inoculated with 2 ml of inoculum suspension of a 48 h old culture of the pure organism. The culture flasks were agitated on a reciprocal shaker (110 strokes/min, amplitude 7 cm) at 30 °C for 48 h. Thereafter, 10 mg of progesterone dissolved in 2 ml of 96 % ethanol were added to each flask and fermentation was continued for another 48 h.

Extraction and analysis of a mixture of transformation products

As the end of the transformation period the contents of each flask were homogenized in a blender (16,000 r/m) with 2 volumes of chloroform for extracting the transformation products. After repeating the extraction three times, the combined chloroform extracts were washed with half its volume of 5 % sodium bicarbonate solution, followed by an equal volume distilled water, then dried over anhydrous sodium sulphate, filtered and then distilled to give a semisolid residue which was then dissolved in a measured volume of chloroform: methanol (1:1, v/v).

Qualitative determination of the transformation products was

achieved by thin-layer chromatographic analysis using silica gel G. The plates were developed with the solvent cyclohexane:acetone:chloroform (75:25:20, v/v) while detection of spots was effected with the Liebermann-Burchard chromogenic reagent. For comparison, authentic samples of different progesterone derivatives were also chromatographed as markers.

Quantitative determination of the concerned transformation products was performed by applying a measured volume of the transformation mixture as a streak on the plate. After development, the unsprayed areas corresponding to the positions of the individual steroids were marked, scrapped from the plate, quantitatively eluted with spectroscopic ethanol and finally evaporated to dryness. The residue of each compound was dissolved in 8 ml of the chromogenic reagent composed of absolute ethanol and concentrated sulphuric acid (55:44, v/v). The mixture was then held in a boiling water bath for 5 min. Standard curves of the individual steroids were constructed, using varying concentrations of authentic samples, by chromatography, elution and reaction in the same way. The developed colour was read at 495 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The capacities of the different fungal cultures to perform hydroxylation of progesterone were recorded visually in *table 1*. Thus, out of 24 fungal cultures 15 were capable of bringing about hydroxylation of progesterone at different positions. On the other hand, *Aspergillus flavus* AF, *Aspergillus* sp. Fm, *Fusarium semitectum* and *Penicillium* sp. 6Y were characterized by producing enzymic activities catalyzing the cleavage of progesterone side chain whereby androstenedione, testosterone, and testololactone were formed. Nevertheless, hydroxylation at C 11 was also recorded with the second mentioned organism. Hydroxylation and side chain degradation of progesterone with *A. fischeri* was also reported by Sallam *et al.* (9). On the other hand, side chain degradation of progesterone by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species was reported by many authors (2-4, 7).

It is worthy to note that transformation of progesterone to 11

Table 1. Distribution pattern of enzymic activities catalyzing the transformation of progesterone in some fungal cultures

Microorganism	R.P.	Transformation products										
		11 α	11 β -	15 α -	17 α -	21 -	11 β , 21 -	6 β , 11 α -	11 α , 15 α -	11 α , 17 α -	Cortisol	Epicor- tisol
<i>Aspergillus niger</i> 2 MST	+ 4	Trace	Trace							+ 2		+ 2
<i>A. niger</i> 99						No transformation						
<i>A. niger</i> 12 Y	+ 1	+ 5	+ 2			+ 2	+ 1					
<i>A. niger</i> 171	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2					+ 2			+ 1
<i>A. niger</i> 173	+ 3	+ 1	+ 1					+ 1		+ 2		
<i>A. niger</i> 175	+ 2	+ 2	+ 1		+ 3			+ 1				+ 3
<i>A. niger</i> 200	+ 4	Trace	Trace							Trace		
<i>A. niger</i> 601	+ 3	+ 1				+ 2		+ 1				
<i>A. flavus</i> AF	+ 1				Side-chain degradation products							
<i>A. funiculosus</i> 407	+ 5									+ 1		
<i>A. funiculosus</i> 518	+ 3	+ 3	+ 1		+ 1					+ 2		+ 3
<i>A. ochraceus</i> 67 L.						No growth						
<i>Aspergillus</i> sp. Fm	+ 1	+ 1			Side-chain degradation products							
<i>Cladosporium</i> sp. 3R	+ 1	+ 4				Allopregnane				+ 2		
<i>Cunninghamella</i> sp. 620	+ 5									Trace		
<i>Fusarium semitectum</i>	+ 4				Side-chain degradation products							
<i>Gliocladium</i> sp. 237	+ 4	Trace	Trace		+ 2							
<i>Mucor</i> sp. 410	+ 4	+ 2			+ 1					+ 2		+ 1
<i>Rhizopus nigricans</i> Rn A ₃	+ 3	+ 3			+ 2	+ 2		+ 1				
<i>R. nigricans</i> Rn HB	+ 3	+ 2			+ 2			+ 1		+ 1		
<i>R. nigricans</i> Rn 700	+ 1	+ 3			+ 4					+ 2		
<i>R. nigricans</i> 600	+ 1	+ 4			+ 2			+ 3		+ 1		
				11 α -Hydroxyallopregnane								
<i>Penicillium</i> sp 6 Y	+ 3			Side-chain degradation products								
<i>Fusarium moniliforme</i>				No transformation								

+ 1 & + 2 = reaction; + 3 = moderate reaction; + 4 & + 5 = strong reaction.; R.P. = residual progesterone 11 α - = 11 α -hydroxyprogesterone; 11 β - = 11 β -hydroxyprogesterone; 15 α - = 15 α -hydroxyprogesterone; 17 α - = 17 α -hydroxyprogesterone; 21- = 21-hydroxyprogesterone; 11 β ,21- = 11 β ,21-dihydroxyprogesterone; 6 β ,11 α - = 6 β ,11 α -dihydroxyprogesterone; 11 α -, 15 α - = 11 α ,15 α -dihydroxyprogesterone; 11 α ,17- = 11 α ,17 α -dihydroxyprogesterone

α -hydroxyprogesterone took place with all hydroxylators. It was rather of interest to record the formation of the epimers 11 α - and 11 β -hydroxy derivatives of progesterone, especially by some *Aspergillus niger* strains. Such accompanied 11 α and 11 β hydroxylations were, however, not recorded with either *A. niger* 601 or some *Aspergillus* strains. Furthermore, none of *Rhizopus nigricans* strains effected 11 β -hydroxylation of progesterone although 11 α -hydroxyprogesterone was recorded with all these strains. These results collectively indicated that accompanied 11 α - and 11 β -hydroxylations depended not only on the genus and the species but also on the strain of fungal organism. On the other hand, hydroxylation at C 15 of the progesterone molecule could only be achieved by means of *A. niger* 171.

Another characteristic pattern was found in *Rhizopus nigricans* strains. Thus, out of 8 fungal strains capable of hydroxylating progesterone at C 17, 4 were *R. nigricans* strains. Other *R. nigricans* and *Aspergillus niger* strains were also reported to be 17 α -hydroxylators (6). Furthermore, oxygenation of progesterone at C 21 to yield 21-hydroxyprogesterone (cortexone) was only detected with *A. niger* 12Y, *A. niger* 601 and *R. nigricans* RnA2. In addition, allopregnane and 11 α -hydroxyallopregnane were detected to be among the transformations products of progesterone by only *Cladosporium* sp. 3R and *R. nigricans* 600, respectively.

Dihydroxylation of progesterone at different carbon atoms was also achieved by many organisms. Thus 11 β -, 21- and 11 α -, 15 α -dihydroxy derivatives of progesterone were only detected with *Aspergillus niger* 12Y and *A. niger* 171 strains, respectively. 6 β -, 11 α -dihydroxyprogesterone was also recorded with several organisms, especially *A. niger* and *Rhizopus nigricans* strains. On the other hand, the formation of 11 α -, 17 α -dihydroxyprogesterone was mostly confined to *R. nigricans* strains.

Trihydroxylation of progesterone molecule was also affected by some fungal cultures. In this respect, oxygenation at C 11, C 17 and C 21 to give 11 α -, 17 α -, 21-trihydroxyprogesterone (epicortisol) took place by 4 *Aspergillus* cultures and *Mucor* sp. 410. On the other hand, 11 β -, 17 α -, 21-trihydroxyprogesterone (cortisol) was recorded to be formed by means of only *A. niger* 173.

For further experimentation on the enzymes catalyzing the hydroxylation of progesterone at C 11 (alpha and beta positions), C 17 and C 21, the capacities of some fungal strains to promote these hydroxylations were carried out. The data recorded in *table 2* are in agreement with those in *table 1*. The results demonstrated that

Table 2. Transformation of progesterone by some potent fungal cultures

Microorganism	R. P. (*) mg	Transformation products mg (*)			
		11 α -	11 β -	17 α -	21 -
<i>Aspergillus niger</i> 12 Y	3.75	4.20	1.46		0.21
<i>A. niger</i> 171	6.00	1.40	0.60		
<i>A. niger</i> 175	6.10	1.20	0.18	1.70	
<i>A. niger</i> 601	7.50	0.42			1.30
<i>A. funiculosus</i> 518	5.40	0.80	0.10	0.70	
<i>Rhizopus nigricans</i> Rn A2	6.30	1.40		0.55	0.26
<i>R. nigricans</i> Kn HB	6.30	1.00		0.55	
<i>R. nigricans</i> 600	7.60	1.50		0.40	

(*) mg/70 ml fermentation medium.

Aspergillus niger 12Y was the potent hydroxylator. Furthermore, the aforementioned organism was the only fungal strain which affected oxygenation of progesterone at C 11 and C 21 to afford 11 α -hydroxy, 11 β -hydroxy, and 21-hydroxy derivatives of progesterone, respectively. Also the highest yields of the epimers 11 α - and 11 β -hydroxyprogesterone derivatives were achieved with that organism. However, 11 α -hydroxylase seemed to be the dominant enzyme since 11 α -hydroxyprogesterone comprised the major portion of the transformation products.

Generally, the results of the present work indicated that the distribution pattern of the enzymic activities catalyzing the transformation of progesterone differed from one organism to another. Even different strains of the same species varied not only in their

efficiencies in transforming progesterone but also in their patterns of such enzymic activities.

SUMMARY

Out of 24 fungal cultures, 15 were capable of bringing about hydroxylation of progesterone at different positions. On the other hand, 4 fungal cultures were shown to be characterized by producing enzymic activities catalyzing the degradation of the side chain of progesterone. One *Aspergillus* species brought about both hydroxylation at C 11 and side chain degradation of progesterone. The formation of the epimers 11 α - and 11 β -hydroxy derivatives of progesterone was recorded, especially by some *A. niger* strains. Hydroxylation at C 17 of progesterone molecule was mostly confined to *Rhizopus nigricans* strains. Dihydroxylation at different positions and trihydroxylation of progesterone were also achieved by some fungal cultures. The results demonstrated that strains of the same species varied not only in their efficiencies of transformation activities of progesterone but also in their patterns of such enzymic activities.

RESUMEN

Modelo de distribución y actividades enzimáticas que catalizan la transformación de la progesterona en algunos hongos

De 24 cultivos de hongos, 15 fueron capaces de efectuar la hidroxilación de la progesterona en diferentes posiciones. Por otra parte, 4 cultivos presentaron actividades enzimáticas, catalizando la degradación de la cadena lateral de la progesterona. Una especie de *Aspergillus* se ha mostrado capaz de llevar a cabo la hidroxilación en C 11 y la degradación anterior. Se registró la formación de los epímeros 11 α - y 11 β -hidroxiderivados de la progesterona, especialmente por algunas estirpes de *A. niger*. La hidroxilación en el C 17 de la molécula de progesterona corrió a cargo, principalmente, de las estirpes de *Rhizopus nigricans*. Algunos cultivos de hongos permitieron la dihidroxilación en diferentes posiciones y la trihidroxilación de la progesterona. Los resultados han demostrado que estirpes de

las mismas especies variaban no solamente en la eficacia de las actividades de transformación de la progesterona, sino también en los modelos de tales actividades enzimáticas.

REFERENCES

1. ABDEL-FATTAH, A. F.; SALLAM, L. A. R.; EL-REFAI, A. H., and ZEINEL-ABDIN, A. 1972. Hydroxylation of progesterone by *Aspergillus niger* species. Pak. J. Biochem., 5, 28.
2. ABDEL-FATTAH, A. F.; SALLAM, L. A. R.; KINAWY, M. H., and EL-REFAI, A. H. 1973. Enzymic side-chain degradation of progesterone by *Penicillium lilacinum*. Z. Allg. Mikrobiol., 13, 723.
3. BRANNON, D. R.; MARTIN, J.; OEHLISCHLAGER, A. C.; DURHAM, N. N., and ZALKON, L. H. 1965. Transformation of progesterone and related steroids by *Aspergillus tamarii*. J. Org. Chem., 30, 760.
4. CAPEK, A., and HANC, O. 1960. Microbial transformation of steroids. XII. Transformation of steroids by different species and strains of *Fusaria*. Folia Microbiol., 5, 251.
5. CAPEK, A.; TADRA, M., and TUMA, J. 1964. Microbial transformation of steroids. XXIV. Separation of androstane 17-hydroxy epimers. Folia Microbiol., 9, 380.
6. EL-KADY, I. A.; SALLAM, L. A. R., and EL-REFAI, A. H. 1972. 17 α -hydroxylation of progesterone by microorganisms. Pak. J. Biochem., 5, 39.
7. EL-REFAI, A. H.; ABDEL-FATTAH, A. F.; IBRAHIM, K. A., and SALLAM, L. A. R. 1973. Degradation of progesterone by aspergilli-side chain cleaving enzymes. Z. Allg. Mikrobiol., 13, 201.
8. EL-REFAI, A. H.; SALLAM, L. A. R., and GEITH, H. 1972. Microbial 11 β -hydroxylation of progesterone. Acta Microbiol. Polonica, 4, 31.
9. SALLAM, L. A. R.; EL-REFAI, A. H.; NADA, S., and ABDEL-FATTAH, A. F. 1973. Enzymic hydroxylation and side-chain degradation of progesterone by *Aspergillus fischeri*. J. Gen. Appl. Microbiol., 19, 155.

ATP-ASA DE LA MEMBRANA DE *ESCHERICHIA COLI* K 12. ESTUDIO CINETICO DE LA ENZIMA SOLUBLE Y ASOCIADA A LA MEMBRANA

por

J. CARREIRA

INTRODUCCION

La ATP-asa de la membrana de *Escherichia coli* ha sido tema de una gran variedad de trabajos recientes (6, 7, 9, 11-13, 15, 17). Por nuestra parte, hemos descrito anteriormente una preparación de membranas de *E. coli* K 12 capaz de hidrolizar ATP añadido externamente y desarrollado un procedimiento para la solubilización selectiva de dicha enzima gracias al empleo de tampones con EDTA a pH alcalino. Tanto la enzima asociada a la membrana como la obtenida en forma soluble podían ser estimuladas por tripsina hasta un 100 % aproximadamente de su actividad basal (1). Estos resultados eliminaban la hipótesis de que la estimulación por tripsina fuera la consecuencia de un desenmascaramiento de una actividad críptica asociada a la membrana y parecía favorecer la idea de que esta latencia reflejaba un mecanismo de control de la actividad por medio de un inhibidor íntimamente unido a la molécula activa. Por otro lado, la complejidad de los procesos en que están envueltas las ATP-asas parece implicar la existencia de otros mecanismos de regulación entre los que los productos finales de la reacción, ADP y Pi, se presentan como buenos candidatos para modular las propiedades hidrolíticas de la enzima. Con objeto de aumentar la información existente sobre estos aspectos, emprendimos el estudio cinético comparativo de la ATP-asa de *E. coli* en dos estados físicos diferentes, «soluble» y asociado a la membrana. Los resultados obtenidos se describen en este artículo.

MATERIALES Y METODOS

Las condiciones de cultivo del microorganismo, la preparación de membranas y la solubilización de la ATP-asa se han descrito anteriormente (1, 3).

Ensayo de actividad y estudios cinéticos

La determinación de actividad ATP-asa en el ensayo «tipo» se llevó a cabo como se ha descrito en trabajos anteriores. Para la realización de los estudios cinéticos se variaron las concentraciones de ATP, de Mg^{2+} o de ambos a la vez, según se especifica en la sección de resultados.

En muchos experimentos y para aumentar la sensibilidad, los ensayos de actividad se efectuaron con ATP- γ - ^{32}P (actividad específica en el ensayo alrededor de 0,03-0,04 $\mu Ci/\mu mol$). La reacción se detuvo con 0,5 ml de carbón activo al 4 %, o en mayor concentración según la concentración de ATP, en ClK-ClH 0,2 M, pH 1,6. Las muestras se centrifugaron a $4.000 \times g$ y alícuotas de los sobrenadantes se contaron en un contador de centelleo Nuclear Chicago. En todos los casos se hicieron controles para corregir la hidrólisis espontánea de ATP.

Se ha definido la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de P_i en 1 min y la actividad específica como el número de μmol de P_i/min y mg de proteína. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry y colaboradores (10) con seroalbúmina bovina como patrón.

Inhibición de la ATP-asa por ADP y P_i

Los estudios de inhibición por productos finales fueron efectuados añadiendo los inhibidores al medio de reacción en Tris-HCl 30 mM, pH 7,5, sin alterar las condiciones normales del medio, y la reacción iniciada por adición de la enzima.

RESULTADOS

Cinética de la ATP-asa de E. coli

La cinética de la ATP-asa ha sido estudiada en los estados de asociada a la membrana y soluble con EDTA. Por razones de estabilidad, los ensayos con la fracción soluble se llevaron a cabo inmediatamente después de la solubilización. Por otra parte, buscando una explicación al problema de la estimulación por tripsina, todas las experiencias se han hecho en ausencia y en presencia de la proteasa

Determinación de la relación Mg^{2+}/ATP para una actividad enzimática óptima

La *figura 1* representa la curva de saturación de Mg^{2+} para una concentración constante de ATP (8 mM). En ausencia de magnesio, la actividad enzimática es indetectable. Esta actividad llega a un máximo a concentración de Mg^{2+} 4 mM y decrece posteriormente al incrementarse más las concentraciones del catión. Todo indica que la relación Mg^{2+}/ATP tiene un óptimo que coincide con el valor de 1/2. Cantidades crecientes de catión libre inhibían progresivamente la actividad hasta un 60-70 % cuando la concentración es 100 mM.

En la *figura 2* se compara la saturación de la ATP-asa con ATP, a concentración constante de Mg^{2+} (4 mM) con la saturación de la misma enzima con Mg^{2+}/ATP en relación 1:2. Por encima de ATP 8 mM, las curvas que tienen concentración constante de Mg^{2+} comienzan a descender, en tanto que se mantienen inalterables las que conservan la relación de $Mg^{2+}/ATP = 1/2$. Estos resultados indican que altas concentraciones de Mg^{2+} y ATP libre son inhibidoras de la actividad enzimática, mientras que esas mismas concentraciones no lo son cuando en el medio de reacción existe 1 mol de magnesio por cada dos moles de ATP.

Los resultados en presencia de tripsina son idénticos a los expuestos.

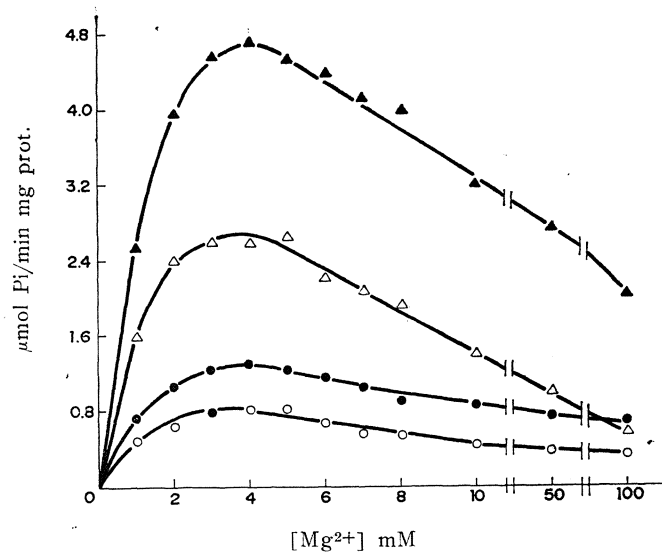


Figura 1. Variación de la actividad ATP-ásica en función de la concentración de Mg^{2+} , a concentración constante de ATP (8 mM). Actividad de la ATP-asa asociada a la membrana: $\circ - \circ$, en ausencia de tripsina; $\bullet - \bullet$, en presencia de tripsina. Actividad de la enzima soluble: $\triangle - \triangle$, en ausencia de tripsina; $\blacktriangle - \blacktriangle$, en presencia de tripsina

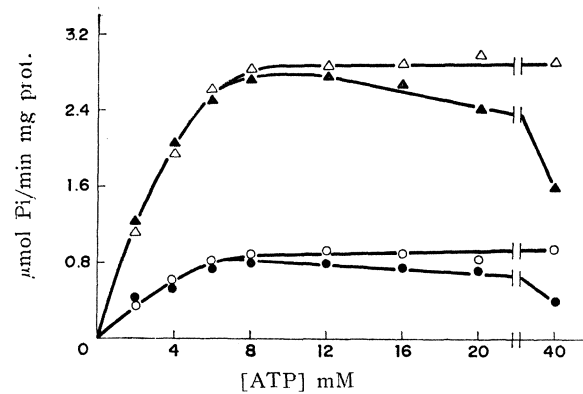


Figura 2. Variación de actividad en función de la concentración de ATP a concentración constante de Mg^{2+} (4 mM). $\bullet - \bullet$, actividad de la ATP-asa asociada a la membrana. $\blacktriangle - \blacktriangle$, actividad de la enzima soluble. En las dos restantes gráficas que aparecen en la figura se mantuvo la relación $Mg^{2+}/ATP = 1/2$ en todos los puntos, indicándose en abscisas sólo la del ATP. $\circ - \circ$, actividad de la ATP-asa unida a la membrana. $\triangle - \triangle$, actividad de la enzima solubilizada. Las actividades de esta figura fueron determinadas en ausencia de tripsina

Cinética de saturación de sustrato

Incluimos bajo la denominación de sustrato al Mg^{2+} y al ATP en relación 1/2, por ser ambos indispensables para la actividad enzimática óptima.

La curva de saturación de sustrato para la ATP-asa asociada a la membrana, tanto en ausencia como en presencia de tripsina, es michaeliana, como se ve en el recuadro de la *figura 3*. Los parámetros cinéticos determinados según la representación de Eisenthal y Cornish-Bowden (5) (*figura 3*) dan una V_{max} para la actividad en ausencia de tripsina de 1,56 μmol de Pi liberado/min y mg proteína y una K_m 2,5 mM. En presencia de tripsina (no se muestra gráfica) la V_{max} es 2,4, pero la K_m continúa siendo 2,5 mM.

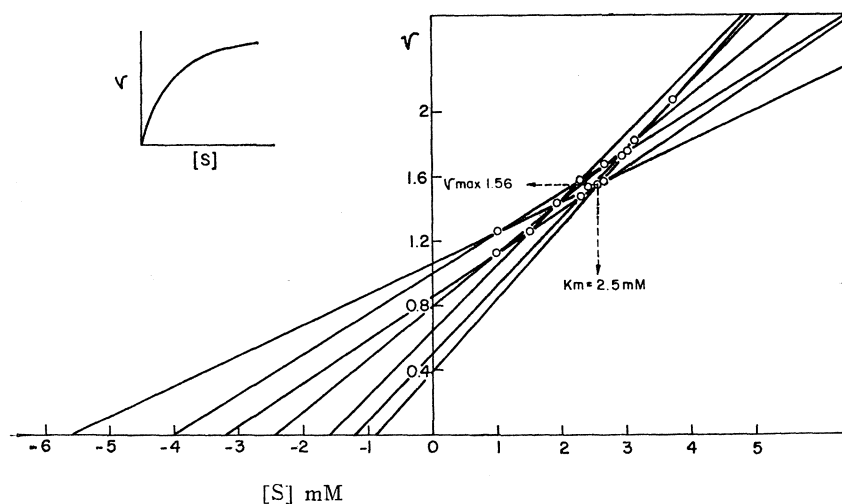


Figura 3. Representación de Eisenthal y Cornish-Bowden para la ATP-asa asociada a la membrana, en ausencia de tripsina. En el extremo superior izquierdo se muestra la curva de saturación de sustrato: $Mg^{2+}/ATP = 1/2$; v se expresa en $\mu\text{mol Pi/min}$ y mg proteína

La ATP-asa soluble se satura de sustrato dando lugar a curvas de tipo sigmoide en ausencia y en presencia de tripsina (véase recuadro de la *figura 4*). La V_{max} en ausencia de tripsina es 4,1 mol de Pi liberado/min y mg proteína, y la K_m 1,4 mM, como se indica en la

figura 4, mientras que en presencia de tripsina (resultados no mostrados) la K_m no cambió y la V_{max} es 6,6.

Podemos afirmar, en consecuencia, que la tripsina no afecta a la afinidad del sustrato por la ATP-asa y que aumenta la V_{max} , posiblemente incrementando la hidrólisis del ATP o la liberación de los productos finales de reacción.

El comportamiento de la ATP-asa asociada a la membrana, con:

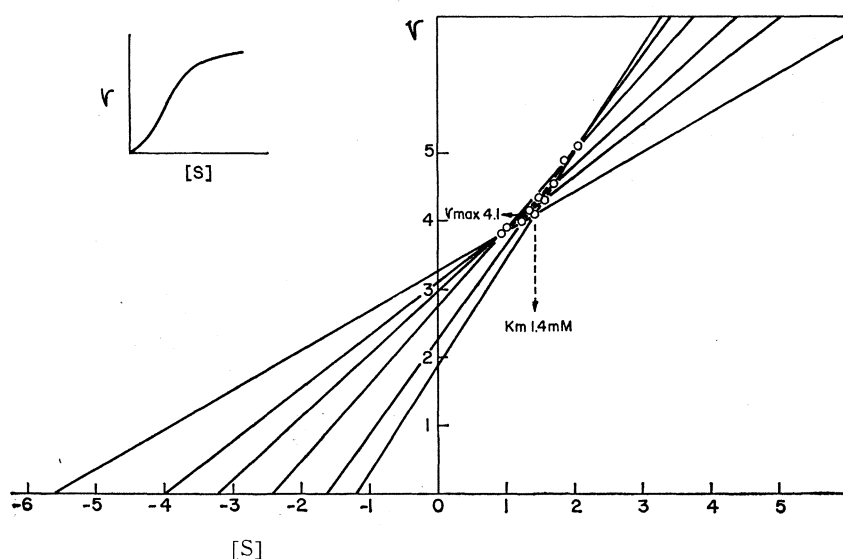


Figura 4. Representación de Eisinger y Cornish-Bowden para la ATP-asa soluble, en ausencia de tripsina. La curva de saturación de sustrato ($Mg^{2+}/ATP = 1/2$) puede verse en la parte superior izquierda de la figura

un coeficiente de Hill (8) de 0,94, parece indicar la existencia de un solo sitio o varios independientes. La enzima soluble es claramente cooperativa a bajas concentraciones de sustrato, con un coeficiente de Hill 1,9; sin embargo, por encima de la K_m tiene un coeficiente de Hill 0,95, que puede interpretarse como no cooperativo (2).

Saturación por ATP

La saturación de la ATP-asa asociada a la membrana por ATP, a concentración constante de Mg^{2+} (4 mM), da lugar a una cinética

compleja con dos curvas de saturación; una, a bajas concentraciones de ATP, y otra, a concentraciones superiores. En la *figura 5* podemos ver los parámetros cinéticos de estas dos curvas. Bajas concentraciones de ATP: V_{\max} 0,3, Km 0,5 mM. Altas concentraciones: V_{\max} 2 y Km 13,7 mM.

La *figura 6* nos muestra que sucede lo mismo con la enzima soluble. A concentraciones bajas de ATP, la V_{\max} vale 1,7 mol de Pi liberado/mg proteína min, y la Km es 2 mM, en tanto que para concentraciones de ATP superiores a 3,2 mM, la V_{\max} es del orden de 11,5 mol de Pi liberado/min y mg proteína, y la Km 16,5 mM.

Estos resultados parecen indicar la existencia de dos tipos de afinidad para el ATP netamente diferenciados.

Saturación de la ATP-asa por Mg^{2+}

La ATP-asa de *Escherichia coli* ha sido saturada por Mg^{2+} , a concentración constante de ATP (8 mM). La *figura 7* muestra la representación de Eisentahl y Cornish-Bowden (5) para la enzima asociada a la membrana. En ausencia de tripsina, la V_{\max} es 0,6, y la Km para el catión 1,5 mM. Sin embargo, cuando se ensaya la actividad en presencia de tripsina, la V_{\max} se eleva a 2,54 y la Km para el Mg^{2+} a 7,8 mM.

De modo semejante, ambos parámetros de la enzima soluble sufren alteración por efecto de la tripsina (*figura 8*). Para la actividad básica, la V_{\max} es 5,6, y la Km correspondiente al Mg^{2+} 1,3 mM; mientras que en presencia de tripsina, la V_{\max} es 15,1, y la Km para el catión 4,2 mM.

Con estos resultados a la vista podemos afirmar que, cuando la ATP-asa se satura con Mg^{2+} a ATP constante, la tripsina incrementa la velocidad máxima y disminuye la afinidad del catión por la enzima.

Inhibición de la ATP-asa por los productos finales de la reacción

La *figura 9* muestra la representación doblemente recíproca para la ATP-asa asociada a la membrana, a varias concentraciones de ADP. El haz de rectas se corta en un punto sobre el eje de orde-

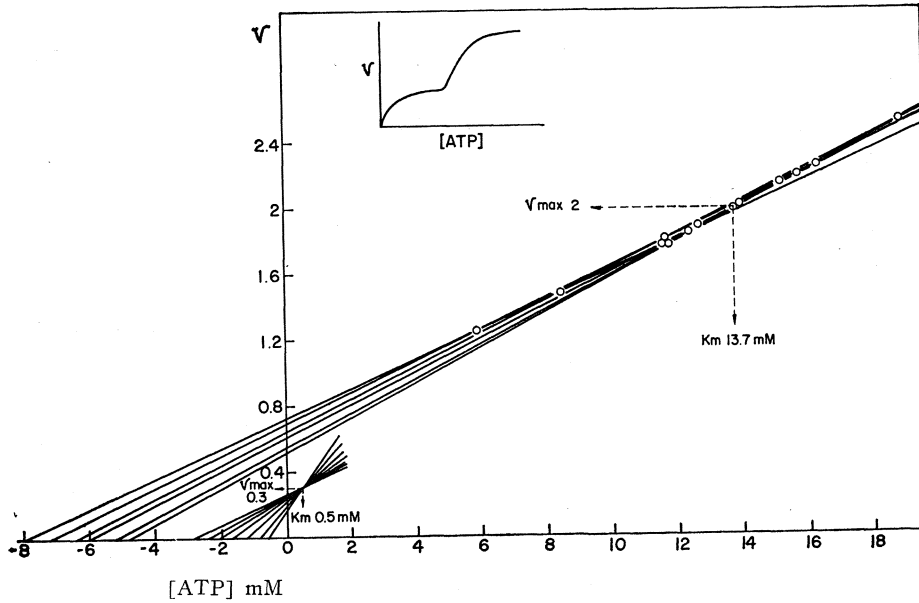


Figura 5. Representación lineal directa de actividades en función de concentración de ATP para la ATP-asa unida a la membrana. Los dos haces de rectas corresponden a las dos curvas de saturación que aparecen en el extremo superior izquierdo de la figura. Esta experiencia está hecha en ausencia de tripsina

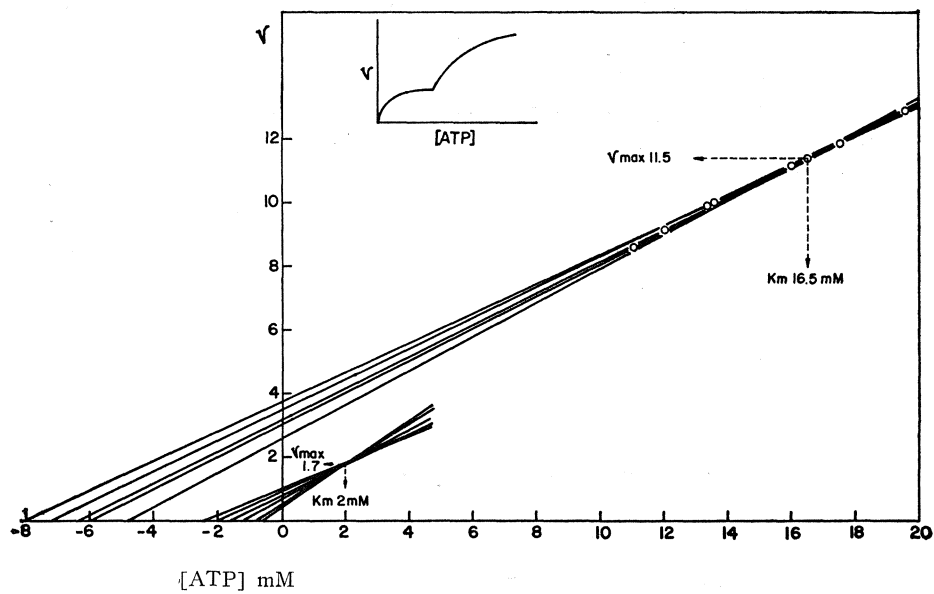


Figura 6. Representación lineal directa de actividades en función de concentración de ATP para la ATP-asa soluble en ausencia de tripsina. Existen dos haces de rectas correspondientes a las dos curvas de saturación de ATP de la gráfica superior

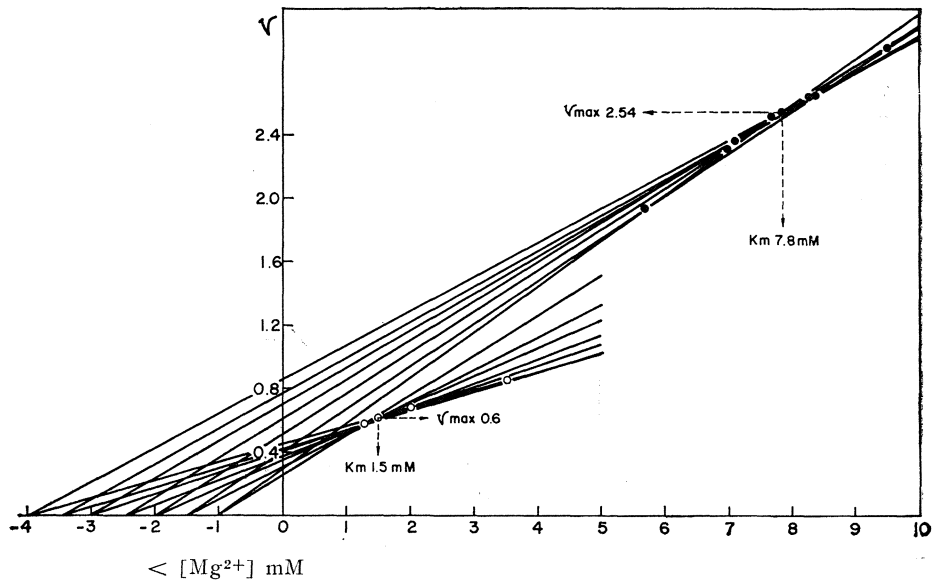


Figura 7. Representación de Eisenthal y Cornish-Bowden para la ATP-asa unida a la membrana. El haz de rectas cuyas intersecciones están marcadas con círculos vacíos deriva de las actividades medidas en ausencia de tripsina, mientras las que tienen círculos llenos proceden de las actividades ensayadas en presencia de tripsina.

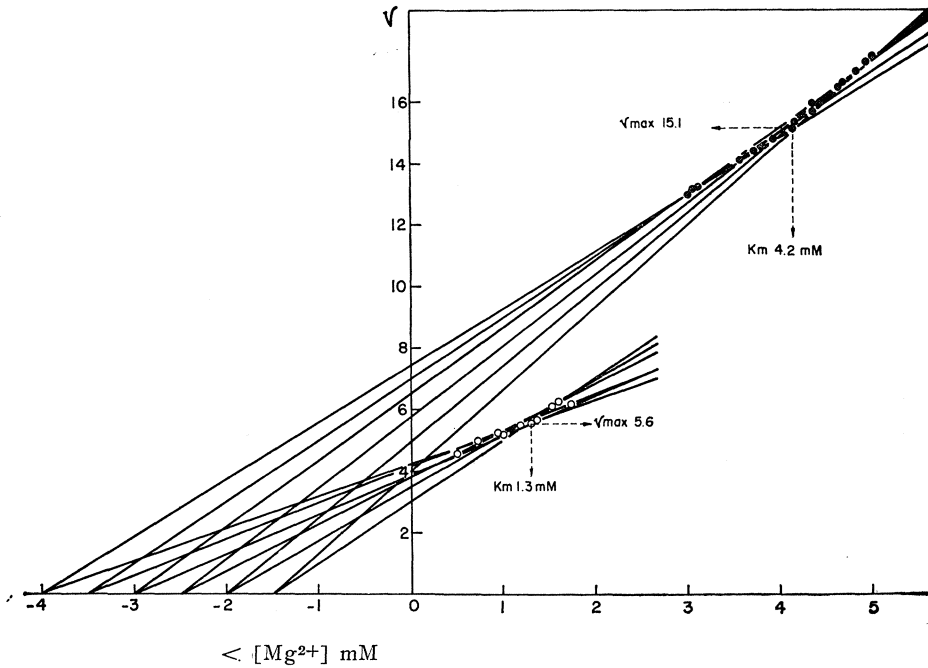


Figura 8. Representación idéntica a la figura 7, pero debida a la ATP-asa soluble. Círculos vacíos indican ausencia de tripsina. Círculos llenos indican existencia de tripsina en el medio de reacción.

nadas indicando que el ADP actúa como inhibidor competitivo. La K_i es 1,7 mM.

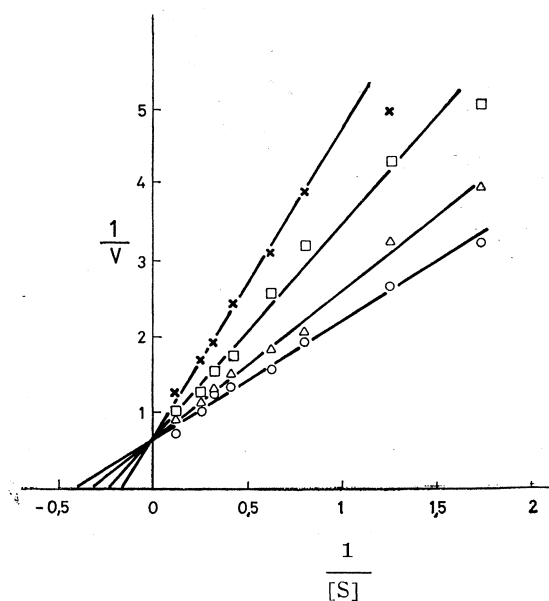


Figura 9. Inhibición de la ATP-asa asociada a la membrana por ADP, en ausencia de tripsina. Las concentraciones de ADP son: ○—○, sin ADP; △—△, 0,4 mM; □—□, 1,2 mM; ×—×, 2,4 mM

Los resultados de inhibición por ADP para la fracción soluble se encuentran en la *figura 10*. Las gráficas se cortan en un punto del eje de ordenadas y la constante de inhibición es 0,7 mM. Por consiguiente, en los dos casos, el ADP se comporta como inhibidor competitivo con mayor afinidad por la ATP-asa cuando está solubilizada. El tipo de inhibición por ADP y las constantes pudieron confirmarse plenamente mediante representaciones de Dixon (4).

El Pi es también inhibidor de la ATP-asa. Su mecanismo de inhibición parece de tipo competitivo, pero su afinidad es ligeramente inferior a la del ADP. Cálculos de la K_i nos dieron unos valores de 2,4 mM para la enzima particulada y 2 mM para la soluble.

Todos los resultados de inhibición por productos finales están

referidos a la actividad básica. En presencia de tripsina no se alteró el tipo de inhibición, ni las K_i , aumentando únicamente las velocidades máximas.

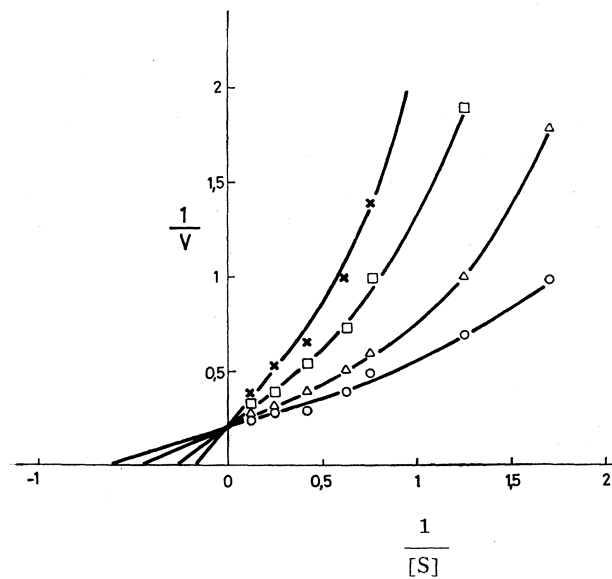


Figura 10. Inhibición de la ATP-asa soluble por ADP, en ausencia de tripsina. Las concentraciones de ADP son las siguientes: $\circ - \circ$, sin ADP; $\triangle - \triangle$, 0,4 mM; $\square - \square$, 1,2 mM; $\times - \times$, 2,4 mM

DISCUSION

Todas las ATP-asas conocidas tienen requerimientos absolutos de cationes para su actividad, especialmente calcio y magnesio. La relación catión/ATP no es idéntica para todos los organismos (6, 11, 13), ni siquiera se mantiene estrictamente fija, en algunos casos, dentro del mismo organismo (9). En *Escherichia coli* los límites de variación más allá de 1 mol de Mg^{2+} /2 mol de ATP son prohibitivos, de tal manera que cualquier exceso de uno de los componentes se convierte en inhibidor de la actividad. La ATP-asa no presenta inhibición por altas concentraciones de sustrato, pero sí por altas

concentraciones de alguno de sus componentes libres. Es difícil explicar estos hechos. Si admitimos que el ATP funciona como inhibidor competitivo (16), estamos suponiendo que el verdadero sustrato es el complejo Mg^{2+} -ATP; si le consideramos como inhibidor por altas concentraciones de sustrato, será porque el ATP sólo es el sustrato de la ATP-asa. Nuestros resultados no nos permiten decidir cuál es el verdadero sustrato, ATP o Mg^{2+} -ATP. Sin embargo, varios hechos cinéticos nos permiten sugerir que es el ATP: a) la relación Mg^{2+} /ATP no es 1/1 como cabría esperar; b) la cinética de saturación por ATP es compleja, con dos tipos de afinidad netamente diferenciados; c) la saturación de la ATP-asa por magnesio responde a cinética michaeliana en la enzima unida a la membrana, pero tiene una clara cooperatividad positiva cuando se ensaya con la ATP-asa soluble, con dos sitios de fijación como mínimo; d) la tripsina disminuye la afinidad entre el catión y la enzima, sin que parezca alterar la afinidad por el ATP.

La inhibición de la ATP-asa por altas concentraciones de Mg^{2+} tropieza con las mismas dificultades de interpretación. Admitiendo que el ATP es el sustrato de la ATP-asa, dos posibilidades parecen más verosímiles: a) el exceso de Mg^{2+} en el medio de reacción tiende a disminuir la concentración real de ATP al complejarse con el nucleótido; b) la acción directa de altas concentraciones de catión sobre la molécula de ATP-asa determina un cambio en ésta que se traduce en un descenso de actividad hidrolítica.

Los productos finales de la reacción son inhibidores de la ATP-asa. Las constantes de inhibición para el ADP son ligeramente inferiores a las respectivas K_m para el sustrato, pero esta diferencia aparece muy pequeña si la comparamos con la existente en *Micrococcus lysodeikticus* (Ayala, J., comunicación personal) y mitocondrias (14). La explicación parece inmediata. La ATP-asa de *Escherichia coli* debe sintetizar ATP y proporcionar la energía de su hidrólisis para todos los procesos en que el microorganismo la necesita, mientras que la función primordial, sino la única, de la ATP-asa de aerobios obligados y mitocondrias es el servir de último acoplante de la fosforilación oxidativa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. E. Muñoz la orientación y ayuda prestada durante la realización de este trabajo, y al Plan de Formación de Personal Investigador la concesión de una beca de investigación.

RESUMEN

Los resultados cinéticos de la ATP-asa de *Escherichia coli* K 12, tanto unida a la membrana como soluble, muestran que la actividad enzimática depende de la presencia de Mg^{2+} en relación $Mg^{2+}/ATP = 1/2$, que el ATP se une a la enzima con dos tipos de afinidad muy diferentes y que los productos finales son inhibidores competitivos de la reacción. Considerando como sustrato el complejo Mg-ATP, la ATP-asa asociada a la membrana muestra cinética michaeliana. La soluble tiene forma sigmoide, presentando una clara cooperatividad positiva.

SUMMARY

ATP-ase of Escherichia coli K 12 membrane. A kinetic study of the soluble and membrane associated enzyme

The kinetic results using both membrane-bound and soluble ATP-ase from *Escherichia coli* K 12 showed a strict Mg^{2+}/ATP ratio equal to 1/2 for optimum activity. On the other hand, ATP alone was bound to the enzyme to two sites with marked different affinities. The end products, ADP and P_i , were competitive inhibitors of the ATP-ase activity. Assuming that the substrate of the reaction was Mg-ATP, the membrane-bound enzyme had michaelian kinetics but the soluble ATP-ase showed sigmoidal kinetics with a clear positive cooperativity.

REFERENCIAS

1. CARREIRA, J.; LEAL, J. A.; ROJAS, M., and MUÑOZ, E. 1973. Membrane ATP-ase of *Escherichia coli* K 12. Selective solubilization of the enzyme and its stimulation by trypsin in the soluble and membrane-bound states. *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 541-56.
2. COOK, R. A., and KOSHLAND, D. E. 1970. Positive and negative cooperativity in yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, **9**, 3337-42.
3. CORAO, M. DE; SERRANO, J. A.; LEAL, J. A.; PUIG, J., and MUÑOZ, E. 1974. Isolation of murein-free spheroplast «ghosts» from a strain of *Escherichia coli* K 12. *Microbiol. Españ.*, **27**, 283-96.
4. DIXON, M., and WEBB, E. 1971. *The Enzymes* 2nd. ed. Longman.
5. EISENTHAL, R., and CORNISH-BOWDEN, A. 1974. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem. J.*, **139**, 715-20.
6. EVANS, D. J. 1969. Membrane adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*: activation by calcium Ion and inhibition by monovalent cations. *J. Bacteriol.*, **100**, 914-22.
7. EVANS, D. J. 1970. Membrane Mg^{2+} -(Ca^{2+})-activated adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*: characterization in the membrane-bound and solubilized states. *J. Bacteriol.*, **104**, 1203-12.
8. HILL, A. V. 1910. The possible effects of the aggregation of the molecule of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.*, **40**, IV-VII.
9. ISHIDA, M., and MIZUSHIMA, S. 1969. Membrane ATP-ase of *Bacillus megaterium*. I. Properties of membrane ATP-ase and its solubilized forms. *J. Biochem.*, **66**, 33-43.
10. LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, H. J.; FARR, A. L., and RANDALL, R. J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-75.
11. MIRSKY, R., and BARLOW, V. 1971. Purification and properties of ATP-ase from the cytoplasmic membrane of *Bacillus megaterium* KM. *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 835-45.
12. MUÑOZ, E.; FREER, J. H.; ELLAR, D. J., and SALTON, M. R. J. 1968. Membrane-associated ATP-ase activity from *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 531-33.
13. MUÑOZ, E.; NACHBAR, M. S.; SCHOR, M. T., and SALTON, M. R. J. 1968. Adenosine triphosphatase of *Micrococcus lysodeikticus*: Selective release and relationship to membrane structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 539-46.
14. PHILO, R. D., and SELWYN, M. J. 1973. Use of progress curves to investigate product inhibition in enzyme-catalyzed reactions. Application to the soluble mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochem. J.*, **135**, 525-30.

-
15. ROISIN, M. P., and KEPES, A. 1973. The membrane ATP-ase of *Escherichia coli*. II. Release into solution, allotropic properties and reconstitution of membrane-bound ATP-ase. *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 249-59.
 16. ULRICH, F. 1964. Kinetic studies of the activation of mitochondrial adenosine triphosphatase by Mg^{2+} . *J. Biol. Chem.*, **239**, 3532-36.
 17. WEST, I. C., and MITCHELL, P. 1974. The proton-translocating ATP-ase of *Escherichia coli*. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, **40**, 1-4.

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC)

A METHOD FOR THE DETERMINATION OF
THE RICHNESS OF TRYPSIN OBSERVING THE
ACTIVITY OF THE ROLITETRACYCLINE
CITRATE ON A STRAIN OF *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS

by

J. F. SOMAVILLA, V. ARROYO, N. KHAYYAT and M. C. ESTEBAN

INTRODUCTION

Many substrates have been used to determine the trypsin potential. Some of them of animal origin as casein, hemoglobin, eosinasein, etc., have been used by Bandi (2), Accioly (1) and Mayer (12). Other substrates have also been used (3, 5-8, 13, 15-18, 20, 22).

The substrate used more frequently is N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) recommended by The National Formulary (NF) for the determination of NF units.

The observations by Berheim (4) on the action of trypsin against *Pseudomonas aeruginosa*; the loss of activity of virus in presence of trypsin and chymotrypsin observed by Kim (10) along with work by Scioli and Koreleva (11) showing the increase of the activity of antibiotics in presence of these enzymes, have encouraged us to determine trypsin activity using *Staphylococcus aureus* and rolitetracycline citrate as antibiotic.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

The strain of *Staphylococcus aureus* (6538 P) was obtained from ATCC.

Stock culture

Staphylococcus aureus was maintained in peptone 0.6 %, yeast extract 0.3 %, bacto-casitone 0.4 %, beef extract 0.15 %, glucose 0.1 %, agar 1.5 %, distilled water 100.0 ml., adjusted to pH 6.5, and sterilized by autoclaving for 15 min at 121 °C.

Antibiotic

Rolitetraacycline citrate supplied by CEPA (Spain), 892 mg/g of pure rolitetraacycline.

Apparatus

Water-bath control of temperature and forced circulation of water and Spectronic-20 (Beckman) spectrophotometer were used.

Solvents

The rolitetraacycline is dissolved in 0.1 M phosphate buffer.

Formaldehyde solution

Formaldehyde (40 %) and water 1:3 (v/v).

Trypsin standard

From Sigma (Chemical Company, Saint Louis, Mo.). Type XI.

Seeds

A stock culture of *Staphylococcus aureus* was seed on the surface of 250 ml of a medium in a Roux bottle incubated for 18 h at 33-35 °C and washed with about 20 ml of saline. By adding a small quantity

of the stock solution to 400 ml of the suitable medium and 75 OD transmittance was obtained.

Standard and problem solutions of trypsin

A solution of trypsin of 2 $\mu\text{g/ml}$ is prepared with distilled water. The different dilutions for each experiment are prepared from this solution. Distilled water was used to dilute the trypsin in the assay number 1 and buffer (pH 4.5) in the assays 2 and 3, taking care to coincide value of the trypsin problem with the average of the standard solutions.

The trypsin concentrations (0.0004 to 0.008 $\mu\text{g/ml}$) were used.

Antibiotic solutions

Rolitetraacycline were used in 0.8-1.2 $\mu\text{g/ml}$. The rules followed were given by USP XVIII (21) and NF (14).

RESULTS

Keeping constant the concentration of the antibiotic assayed, the trypsin problem was valued using a known trypsin as patron. The results were summarized in *tables 1-3* and plotted in the *figures 1-3*.

Good results were obtained with *Staphylococcus aureus* and rolitetraacycline citrate being possible to plot straight line on semilogarithm paper relating transmittance and concentrations of trypsin solutions.

DISCUSSION

The results obtained with different concentrations of trypsin do not change in the three first assays. Even for almost the same concentrations the transmittances are quite different due to times of different incubation. Good results were reached with 7 h of incubation and 1.2 $\mu\text{g/ml}$ of rolitetraacycline citrate.

Table 1. Assay 1. Transmittance of the bacterium suspension (72). Incubation hours (7). Microorganism test: Staphylococcus aureus

3 series of tubes	Suspension bacterium ml	Buffer pH 4.5 ml	Solution formaldehyde ml	Solution rolitetracycline citrate 1.2 µg/ml ml	Trypsin solutions		Without incubation ml	At 12 h (*) ml	Transmittances 560 nm			
					ml	Concentration µg/ml			Series			Average
									A	B	C	
I	9.0			1.0	0.5	0.001	10.5	11.0	77.6	77.5	77.6	77.56
II	9.0			1.0	0.5	0.002	10.5	11.0	77.8	77.9	77.6	77.76
III	9.0			1.0	0.5	0.003	10.5	11.0	77.8	77.8	77.8	77.82
IV	9.0			1.0	0.5	0.004	10.5	11.0	77.9	77.9	77.9	77.90
V	9.0			1.0	0.5	0.005	10.5	11.0	77.5	78.0	78.5	78.00
P	9.0			1.0	0.5	± 0.003	10.5	11.0	77.8	77.6	77.7	77.70
T	9.0	1.5					10.5	11.0	64.5	60.5	55.0	60.00
TF	9.0	1.5	0.5				11.0		80.5	80.2	79.3	80.00

(*) The formaldehyde solution is added to all tubes except to TF tubes.

Table 2. Assay 2. Transmittance of the bacterium suspension (?2). Incubation hours (12). Microorganism test: Staphylococcus aureus

3 series of tubes	Suspension bacterium ml	Buffer pH 4.5 ml	Solution formaldehyde ml	Solution rolitetracycline citrate 0.8 µg/ml ml	Trypsin solutions		Without incubation ml	At 12 h (*) ml	Transmittances 560 nm			
					ml	Concentration µg/ml			Series			Average
									A	B	C	
I	9.0			1.0	0.5	0.001	10.5	11.0	61.2	61.6	61.7	61.50
II	9.0			1.0	0.5	0.002	10.5	11.0	62.7	62.0	61.0	61.90
III	9.0			1.0	0.5	0.003	10.5	11.0	62.0	62.6	62.0	62.20
IV	9.0			1.0	0.5	0.004	10.5	11.0	62.0	63.2	62.0	62.40
V	9.0			1.0	0.5	0.005	10.5	11.0	62.5	63.0	62.2	62.57
P	9.0			1.0	0.5	± 0.003	10.5	11.0	63.5	61.4	62.1	62.30
T	9.0	1.5					10.5	11.0	59.4	59.6	61.0	60.00
TF	9.0	1.5	0.50				11.0		72.5	70.5	71.5	71.50

(*) The formaldehyde solution is added to all tubes except to TF tubes.

Table 3. Assay 3. Transmittance of the bacterium suspension (76). Incubation hours (12). Microorganism test: Staphylococcus aureus

3 series of tubes	Suspension bacterium ml	Buffer pH 4.5 ml	Solution formaldehyde ml	Solution rolitetracycline citrate 12 µg/ml ml	Trypsin solutions		Without incubation ml	At 12 h (*) ml	Transmittances 560 nm			
					ml	Concentration µg/ml			Series			Average
									A	B	C	
I	9.0			1.0	0.5	0.0004	10.5	11.0	48.6	48.2	48.0	48.27
II	9.0			1.0	0.5	0.0008	10.5	11.0	48.5	49.3	48.0	48.60
III	9.0			1.0	0.5	0.0016	10.5	11.0	49.0	48.6	50.4	49.33
IV	9.0			1.0	0.5	0.0032	10.5	11.0	49.5	48.7	49.7	49.60
V	9.0			1.0	0.5	0.0064	10.5	11.0	48.1	50.8	50.3	49.73
P	9.0			1.0	0.5	± 0.0016	10.5	11.0	48.0	48.2	50.8	48.90
T	9.0	1.5					10.5	11.0	44.0	43.5	43.0	43.50
TF	9.0	1.5	0.5				11.0		66.0	66.0	66.0	66.00

(*) The formaldehyde solution is added to all tubes except to TF tubes,

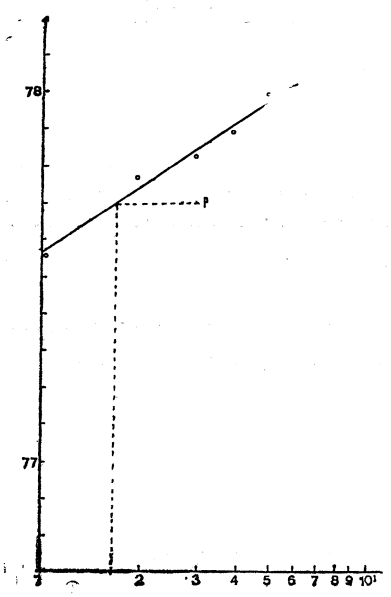


Figure 1

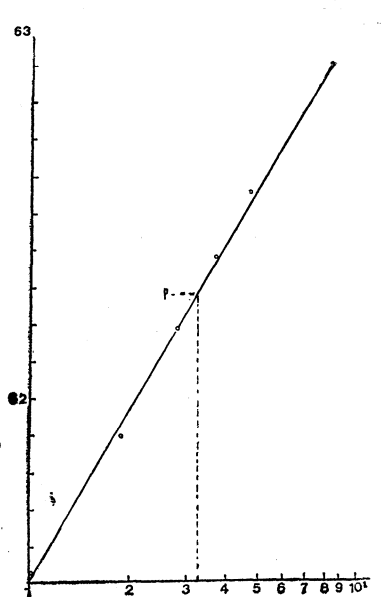


Figure 2

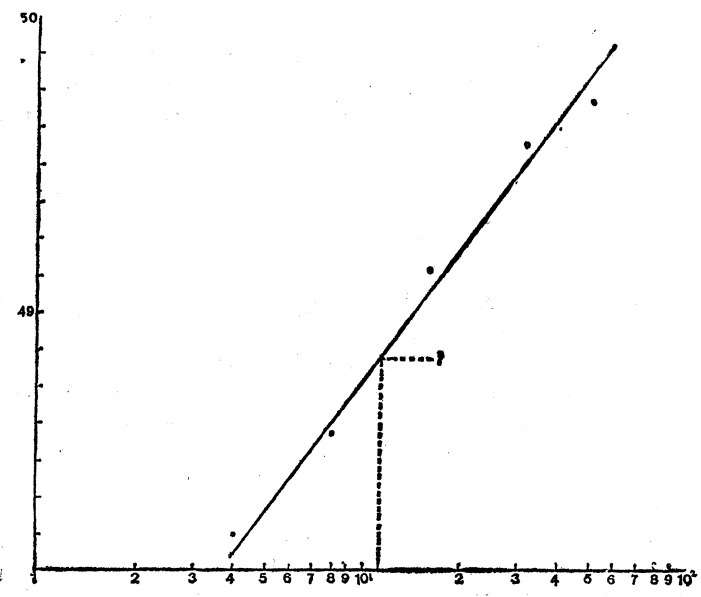


Figure 3

SUMMARY

One antibiotic and one microorganism have been used for the determination of the unknown activity of a trypsin using a known trypsin as reference. The growth of this microorganism is compared in presence of increasing amounts of trypsin and constant concentrations of rolitetracycline citrate.

The method using rolitetracycline citrate and *Staphylococcus aureus* proved to be a good way for the determination of the trypsin potential.

RESUMEN

Un método para la determinación de la riqueza de la tripsina observando la actividad del citrato de rolitetraciclina sobre una cepa de Staphylococcus aureus

Utilizando un antibiótico y un microorganismo se ha medido la actividad de la tripsina, con tripsina patrón como referencia. Se ha determinado el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia de cantidades crecientes de tripsina y concentraciones constantes de citrato de rolitetraciclina. Los resultados obtenidos han probado la bondad de este método.

REFERENCES

1. ACCIOLY, L., and DE CARVALHO, L. 1974. Spectrophotometric determination of trypsin activity. Mem. Inst. Biocienc. Univ. Fed. Pernambuco, 1, 57-63.
2. BANDI, G. L. 1967. Differentiation of trypsin and chymotrypsin in mixtures of the two using a protein substrate. Farmaco, Ed. Prat., 22, 514-28.
3. BENDER, M. L. 1966. The determination of the concentration of hydrolytic enzyme solutions, α -chymotrypsin, trypsin, papain, elastase, subtilisin and acetylcholinesterase. J. Amer. Chem. Soc., 88, 5890-13.
4. BERNHEIM, F. 1969. Action of trypsin and chymotrypsin on a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbios, 1, 295-303.
5. BIETH, J.; METAIS, P., and WARTER, J. 1966. Estimation of trypsin with benzoylarginine p-nitroanilide, its applications. Ann. Biol. Clin. (Paris), 24, 787-403.

6. BUNEAUX, J. J., and BUNEAUX, F. 1974. Autobanalysis of trypsin. Application to measurement of trypsin inhibition capacity of serum. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, **32**, 367-74.
7. ELMORE, D. T., and SMYTH, J. J. 1968. The behavior of trypsin towards α -N-methyl- α -toluene-p-sulfonyl-L-lysine- β -naphthyl-ester. *Biochem. J.*, **107**, 97-102.
8. GIRARD, M. L.; CANAL, J., and JOVANNELLE, J. 1966. Extension of the estimation of ammonia in the determination of enzymic activities. I. Application to trypsin. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, **24**, 1191-204.
9. GOINA, E., and KEREKES, M. 1967. Determination of the proteolytic activity of trypsin by means a colored protein substrate. *Rev. Med. (Tirgu-Mures)*, **13**, 156-58.
10. KIM, K. S., and CARP, R. I. 1973. Effect of proteolytic enzymes on the infectivity of a number of herpes viruses. *J. Infec. Dis.*, **128**, 788-90.
11. KOROLEVA, V. G.; GOSTISHCHEV, V. K.; SUTUKHIN, A. M., and NAVASHIN, S. M. 1974. Effect of proteolytic enzymes on the distribution of kanamycin in experimental animals. *Antibiotiki*, **19**, 360-62.
12. MAYER, M.; KHASSIS, S., and SHAFRIR, E. 1974. Determination of trypsin by its accelerating effect on the onset of trypsinogen activation. *Anal. Biochem.*, **58**, 25-29.
13. NAGEL, W.; WILLIG, F.; PESCHKE, W., and SCHMIDT, F. H. 1965. Determination of trypsin and chymotrypsin with p-nitroanilide derivates of amino-acids. *Z. Physiol. Chem.*, **340**, 1-10.
14. National Formulary XIII. 1970. American Pharmaceutical Association. Washington, D. C., 20037.
15. PERRONE, J. C.; DISITZER, L. V.; DOMONT, G. B., and IACHAN, A. 1964. The automatic determination of trypsin activity. *An. Acad. Brasil. Cienc.*, **36**, 131-35.
16. RICK, W. 1974. Trypsin. Neubearbeitete Erweiterte Avfl. 1, 1052-63. Ed. BERGMAYER, Hans Ulrich Verlag, Chem: Weinheim/Bergstr.
17. ROFFMAN, S., and TROLL, W. 1974. Microassay for proteolytic enzymes using a new radioactive anilide substrate. *Anal. Biochem.*, **61**, 1-5.
18. SACKS, H.; BANK, S.; KRAMER, I.; NUVIS, B., and MARKS, I. N. 1971. Comparison between spectrophotometric and titrimetric methods of estimating trypsin. *Gut.*, **12**, 727-28.
19. SCIOLI, C., and CIAFFI, G. 1965. The action of proteolytic enzyme on the serum concentrations of tetracycline. *Antibiotica*, **3**, 250-55.
20. STEWART, J. A., and DOBSON, J. E. 1965. Trypsin catalized hydrolysis of N-benzoyl-L-arginine ethyl ester at low pH. *Biochemistry*, **4**, 1088-91.
21. United States Pharmacopeia. XVIII revision. 1970. 4630 Montgomery Avenue, Bethesda. MD, 20014.
22. VDOVINA, R. G.; IVANOVA, M. E., and KRAINOVA, B. L. 1968. Synthesis of substrates necessary for determining the activity of trypsin, kallikrein and B and N carboxypeptidases. *Sovrem. Metody Biokhim.*, **2**, 183-99.

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

SOME PROPERTIES OF A CELL-FREE CORTISOL 1,2-DEHYDROGENATING SYSTEM FROM *BACILLUS CEREUS*

by

N. NAIM, L. SALLAM and A. EL-REFAI

INTRODUCTION

A variety of microorganisms and their cell extracts are capable of catalysing the introduction of double bonds into the C-1,2 and C-4,5 positions of A/B trans or A/B cis steroids (8). The 1,2-dehydro derivative of cortisol; namely prednisolone was found to be more potent than the parent 1,2-dihydro compound by a variety of criteria (1).

In a previous work, we (2) examined a variety of bacterial cultures for the performance of 1,2-dehydrogenation of cortisol. A culture of *Bacillus cereus*, isolated from local habitat was selected as the most active organism. The bioconversion of cortisol with the intact cells of this bacterial culture was investigated under different physiological conditions (5).

This paper describes the effect of some compounds on the bioconversion of cortisol with free extracts of *Bacillus cereus*.

MATERIALS AND METHODS

Cultivation

The organism (*Bacillus cereus*) was grown in 500 ml portions of the medium composed of (g/l; w/v): glucose, 40; peptone, 6; yeast extract, 2, per 2 l Erlenmeyer flasks; with shaking at 30 °C

for 24 h. The production of the intercellular 1,2-cortisol dehydrogenating system was induced by the addition of small amounts of cortisol (3 mg/500 ml medium) to 24 h old cultures of the experimental organism. The induction period was continued for 24 h.

Preparation of the cell-free extract

Mixtures of vegetative cells as well as germinated and ungerminated spores from 10 of such cultures were harvested, washed once with phosphate-citric acid buffer, pH 7.0. The washed cells were suspended in 100 ml of the buffer to which a small amount of acid washed sand was added and the mixture was homogenized at 0 °C for 10 min using serval OMNI mixer (16000 r/m). Such treatment led to complete disruption of the bacterial cells as shown microscopically. The cell homogenate was centrifuged at 4000 r/m at 0 °C for 7 min and the supernatant solution (cell-free extract) was separated. These conditions proved to be most suitable for preparing an active cell-free extract exhibiting 1,2-dehydrogenation activity.

Transformation process

The assay system consisted of 5 mg cortisol in 0.5 ml ethanol, 20 ml of the cell-free extract (protein content 1.6 mg/ml) and solution of the different compounds tested in a total volume of 50 ml 0.03 M phosphate-citric acid buffer, pH 7.0 distributed in 100 ml Erlenmeyer flasks. The flasks were shaken for 24 h at 30 °C.

Extraction and analysis

At the end of the transformation period, the contents of each flask was extracted twice their volume (100 ml) of chloroform. The chloroform extract was washed with half volume of 5% sodium bicarbonate solution, by an equal volume of distilled water, dried over anhydrous sodium sulphate, filtered and then concentrated by distillation to give the test material.

The preparative thin-layer chromatography was used to estimate

the residual cortisol and the formed prednisolone present in the test material. A measured volume of the test material was applied as a streak across the bottom of a glass plate (20 × 20 cm) covered with a layer of silica gel G (1 mm thickness). The plates were developed with chloroform:acetone:ethanol (40:10:0.7, v/v). After development of the plates, the band of cortisol and prednisolone were marked, scrapped from the plates and quantitatively eluted with chloroform:methanol 1:1 v/v. The concentration of the steroid compounds were then determined colourimetrically (4). The experiments were carried out in triplicates and the results of this work were the arithmetic mean of these replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

1) *Effect of some vitamins*

The conversion of cortisol to prednisolone was affected by the tested vitamins in different manners (*table 1*). Although the formation of prednisolone seemed not to be quantitatively affected in the presence of inositol and folic acid, reaction was markedly stimulated in the case of menadione (Vk) and riboflavin. Similarly, we found (5-6) that the 1,2-dehydrogenation reaction of cortisol performed by the intact cells of *Bacillus cereus* was markedly enhanced with the addition of riboflavin and menadione to the fermentation medium. The stimulatory effect of riboflavin may be explained through the finding of Talalay (10), who reported that flavines are required intermediates in the oxidation-reduction chain of the C 1-2 of steroids. Gale *et al.* (3) showed that *B. sphaericus* contained a quinone, characterised by them and vitamin K₂₍₃₅₎ which was essential for the dehydrogenation of cortisol to prednisolone. They concluded that vitamin K₂₍₃₅₎ is the cofactor for dehydrogenation with *B. sphaericus*.

2) *Effect of biological bases*

The effect of the addition of some purine (adenine, xanthine, guanine), pyrimidine (uracil) bases as well as a nucleoside (adenosine)

on 1,2-dehydrogenation reaction is given in table 2. Comparable yields of prednisolone were achieved with adenine and uracil. However, a noticeable activation of the reaction was obtained in the case of xanthine, guanine and adenosine.

Table 1. Transformation of cortisol with cell-free extract of *B. cereus* in the presence of some vitamins

Vitamins (*)	Residual cortisol μg	Prednisolone	
		μg	%
Control (**)	2472	1498	30
Thiamine HCl	2902	1301	26
Inositol	2895	1424	28
Riboflavin	1833	2812	43
Pyridoxine HCl	2399	1602	32
Choline	2810	856	16
Nicotinic acid amide	3115	944	18
Pantothenic acid	2261	1503	30
Folic acid	2071	1435	28
Cianocobalamine VB_{12}	3004	1278	25
Menadione VK_3	2247	2433	48

(*) The tested vitamins ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) were added to the reaction mixture at the time of cortisol addition.

(**) Control treatment: 20 ml of the cell-free extract of *B. cereus* 1.6 mg protein/ml in citric acid- PO_4 buffer, pH 7.0 were charged with 5 mg ($5000 \mu\text{g}$) cortisol dissolved in 0.5 ml ethanol, raised with he buffer solution to 50 ml. shaken for 24 h at 30 °C.

3) Effect of redox agents

Examination of the effect of some redox agents (table 3) on the 1,2-dehydrogenation reaction showed that while sufranine T appeared to be inert, the other tested compounds exerted different effects on the activity of the enzyme concerned. It seems therefore, that this azo dye (sufranine T) cannot fit the 1,2-cortisol dehydrogenase system of *Bacillus cereus*.

Table 2. Transformation of cortisol with cell-free extract of B. cereus in the presence of some biological bases

Added bases (*)	Residual cortisol µg	Prednisolone	
		µg	%
Control	2472	1498	30
Xanthine	2432	1820	36
Guanine	2055	1983	39
Adenine	3337	1468	29
Uracil	2418	1412	28
Adenosine	2564	1848	37

(*) The tested bases were individually added at 5 mg/50 ml reaction mixture at the time of cortisol addition.

Table 3. Transformation of cortisol with cell-free extract of B. cereus in the presence of some redox agents

Redox agents (*)	Residual cortisol µg	Prednisolone	
		µg	%
Control	2472	1498	30
Potassium permanganate	2884	1592	31
2,6-Dichlorophenol-indophenol	3279	1602	32
Potassium ferricyanide	3112	1600	32
Methylene blue	3059	1668	33
Glutathion (oxidised)	2315	2424	48
8-Hydroxyquinoline	2841	2047	41
Sufranine T	2410	1463	29
Phenazine methosulphate	2000	2746	55

(*) The tested redox agents (1 mg/50 ml reaction mixture) were individually added at the time of cortisol addition.

The formation of prednisolone was slightly increased in the presence of potassium ferricyanide, methylene blue, potassium permanganate and 2,6-dichlorophenolindophenol. Moreover, better convertibility of cortisol to prednisolone was achieved in the case of phenazine methosulphate (PMS), 8-hydroxyquinoline and glutathione (oxidised form). PMS seems to act as the best electron acceptor for the 1,2-dehydrogenase system produced by *Bacillus cereus*.

Table 4. Transformation of cortisol with cell-free extract of *B. cereus* in the presence of some inorganic ions

Added salts (*)	Residual cortisol µg	Prednisolone	
		µg	%
Control	2472	1498	30
Ferrous sulphate. 7H ₂ O	2175	1933	38
Magnesium chloride	3007	1168	23
Zinc sulphate. 7H ₂ O	3856	823	16
Nickel sulphate	3895	977	19
Magnesium sulphate. 7H ₂ O	3714	1844	36
Amonium molybdate	3889	1057	21
Lead nitrate	1900	2826	56
Mercuric chloride	4223	644	13
Cobalt nitrate	3972	868	17
Sodium tungstate	3100	1932	38
Copper sulphate. 5H ₂ O	3362	1044	20

(*) The tested slats (5 mg/50 ml reaction mixture) were individually added to the time of cortisol addition.

Analogously, Sih and Bennett (7) studied the introduction of double bonds into the 1-2 and 4-5 position of steroids possessing either the 5B- or 5-pregnane nucleus with the cell-free extract of *Nocardia* sp. in the presence of some redox agents. Nothing was found superior to PMS as electron acceptor. Stefanvoic *et al.* (9) furtheron reported that the 1,2-dehydrogenation process with *Bacillus sphaericus* was highly accelerated in the presence of substances with the quinone structure.

4) *Effect of some inorganic ions*

The results given in *table 4* revealed the response of 1,2-dehydrogenase system of *Bacillus cereus* to different salts. The production of prednisolone was appreciable enhanced in the presence of iron, magnesium, tungstate and particularly lead salts. In contrast, manganese, zinc, nickel, molybdate, cobalt and copper salts appeared to exert an inhibitory effect on the transformation of cortisol to prednisolone.

SUMMARY

The enzymatic 1,2-dehydrogenase of cortisol to prednisolone was investigated with a cell-free extract of *Bacillus cereus*, in the presence of vitamins, redox agents, biological bases and inorganic ions. The formation of prednisolone was particularly accelerated when menadione, riboflavine, phenazine methosulphate, glutathione (oxidised form) or 8-hydroxyquinoline was added to the reaction medium. The reaction was highly stimulated in the presence of Pb ions whereas, Cu, Co, molybdate, Ni and Zn ions were inhibitory.

RESUMEN

Algunas propiedades de un sistema de cortisol 1,2-deshidrogenante de un extracto de Bacillus cereus libre de células

Se ha estudiado la acción de la 1,2-deshidrogenasa para la conversión del cortisol en prednisolona con un extracto de *Bacillus cereus* libre de células, en presencia de vitaminas, agentes redox, bases biológicas e iones inorgánicos. La formación de prednisolona se aceleró especialmente cuando se añadieron al medio de reacción menadiona, riboflavina, metasulfato de fenacina, glutatión o 8-hidroxiquinolina. La presencia de iones de Pb estimulaba la reacción, mientras que la de Cu, Co, molibdato, Ni y Zn producía un efecto inhibitorio.

BIBLIOGRAPHY

1. BUNIM, J. J.; PECHET, M. M., and BOLLET, A. T. 1955. J. Amer. Med. Ass., 157, 311. In C. RAINBOW and A. H. ROSE (eds.). 1963. Biochemistry of Industrial Microorganisms, 537. Academic Press, New York and London.
2. EL-REFAI, A. H.; SALLAM, L. A. R., and NAIM, N. 1975. Metabolism of cortisol with representative bacteria. G. Microbiol., in press.
3. GALE, P. H.; PAGE, A. C.; STOUDET, T. H., and POLKERS, K. 1962. Biochemistry, 1, 788. See TALALY, P. (10).
4. MIZSEI, A., and SZABO, A. 1961. A rapid estimation of prednisolone produced by fermentation oxidation. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 3, 119-21.
5. NAIM, N. 1973. Microbiological transformation of steroids. Ph. D. thesis, Faculty of Science, Ain Shams University.
6. SALLAM, L. A. R.; EL-RAFAY, A. H., and NAIM, N. 1975. Some biochemical aspects of the enzymic transformation of cortisol with *Bacillus cereus*. Acta Biol. Med. Ger., 34, 21-26.
7. SIH, C. J., and BENNETT, R. E. 1960. Enzymic dehydrogenation of steroid A ring. Biochim. Biophys. Acta, 38, 378-79.
8. SIH, C. J., and WHITLOCK, J. R., H. W. 1968. Biochemistry of steroids. Ann. Rev. Biochem., 37, 661-94.
9. STEFANOVIC, V.; HAYANO, M., and DORFMAN, R. I. 1963. Some observations on the Δ^1 -dehydrogenation of steroids by *B. sphaericus*. Biochim. Biophys. Acta, 71, 429-37.
10. TALALY, P. 1965. Enzymatic mechanism in steroid biochemistry. Ann. Rev. Biochem., 34, 347-80.

CENTRO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA APLICADA
DEL SEGURA (CSIC). MURCIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

METABOLISMO FOSFORICO DE *ASPERGILLUS* *NIGER* EN SUELOS CALIZOS Y SALINOS

por

A. ORTUÑO, J.^a NOGUERA, A. HERNANSAEZ y T.^a ARMERO

INTRODUCCION

La riqueza en fósforo de un suelo se mide por la presencia de formas asimilables, pues éstas son las que interesan para la nutrición de las plantas (17). Cuando dicho bioelemento no está en forma directamente asimilable, necesita sufrir un proceso de solubilización, para poder ser utilizado por aquéllas (3, 11-12). A este respecto, creemos que la importancia de la investigación de los microorganismos solubilizadores de fosfatos es enorme, pues a su posible aplicación directa como fertilizantes microbianos en el suelo (1, 2, 20, 32), debe unirse el interés científico que presenta el estudio de los mecanismos bioquímicos por los que se realiza dicha solubilización (13, 16) y su relación con la nutrición vegetal (18, 26-27).

La solubilización microbiana del fósforo puede resultar, por una parte, de las reacciones entre los fosfatos insolubles y los productos del metabolismo microbiano (7, 25, 30) que se acumulen extracelularmente, y otra, de la asimilación de fosfatos insolubles, por microorganismos telúricos, seguida de una liberación de productos fosforados fácilmente utilizables por las plantas. En el primer caso se trata de una solubilización microbiana precedida de una inmovilización transitoria (9, 21).

La liberación lenta del fósforo fijado biológicamente representa un principio valioso para la nutrición vegetal, pues si aquella ocurriese en gran proporción, sería fijado químicamente, quedando en forma menos disponible para las plantas, por lo que el fósforo, no

sólo es nutriente esencial de éstas, sino un factor indispensable en la existencia y mantenimiento de la intensa actividad biológica del suelo (3, 22, 31).

La participación de los microorganismos en los procesos de fijación edáfica del fósforo, queda bien patente y se manifiesta a través de procesos, que son en parte de solubilización o de asimilación (4, 8, 14).

En la presente comunicación se estudia el mecanismo de solubilización del fósforo insoluble por el *Aspergillus niger* en suelos calizos y suelos calizos salinos.

PARTE EXPERIMENTAL

Sistemas microbioquímicos

Para la realización de este trabajo, elegimos dos tipos de suelo: uno calizo y otro calizo salino (*cuadro 1*) en zonas de cultivo perfectamente enclavadas y delimitadas en el área citrícola del Sureste Español.

Preparamos tres series experimentales con sus respectivos testigos de los sistemas microbioquímicos siguientes:

1) *Aspergillus niger* + czapek-suelo calizo; 2) *A. niger* + czapek-suelo calizo salino.

El medio de Czapek utilizado lo hemos preparado sin fosfato, ya que el fósforo necesario para el desarrollo de *Aspergillus niger* procede de los suelos considerados.

En ambos sistemas, los períodos de incubación de *Aspergillus niger* en frascos Roux fueron de 30 d.

Microorganismo

Hemos aislado *Aspergillus niger* de los suelos seleccionados, y lo hemos estudiado al microscopio electrónico Scanning. En las *figuras 1-2* mostramos una imagen tridimensional de las cabezuelas conidiales sobre conidióforos. Las cadenas conidiales se presentan

muy apretadas y los conidióforos rígidos y erectos debido a las vacuolas y otros componentes líquidos de los citoplasmas celulares.

Cuadro 1

	Análisis	Suelo calizo	Suelo calizo-salino
Químico	Carbonatos totales (CaCO ₃) %	37,00	32,50
	Carbonatos activos (CaCO ₃) %	10,60	13,44
	Carbono total %	1,07	1,50
	Materia orgánica %	1,84	2,76
	Nitrógeno total %	0,10	0,14
	C/N	10,50	11,50
	Fósforo asimilable ppm	< 1,00	3,00
	Potasio asimilable meq/100 g	1,02	1,70
	Sodio soluble meq/100 g	1,39	2,40
	Cloruros (Cl ⁻) meq/100 g	0,28	1,20
Sulfatos (CaSO ₄ · 2 H ₂ O) %	0,06	1,08	
Químico-físico	Capacidad de cambio total meq/100 g	18,12	10,93
	EC _s μ mho/cm	412,00	2.892,00
Físico	Arena gruesa (> 250 μ Ø) %	5,10	15,20
	Arena fina (250 - 50 μ Ø) %	32,90	41,20
	Limo (50 - 2 μ Ø) %	33,10	29,80
	Arcilla (< 2 μ Ø) %	28,90	11,04
	Textura	Franco-arcillosa	Franco-arcillosa

Técnicas microbiológicas

Las sistemáticas aplicadas *in vitro* en todas las experiencias efectuadas han sido descritas en comunicaciones anteriores (23-24).

Criterios analíticos

Tomamos muestras cada tres días por triplicado y separamos los micelios de sus respectivos substratos. Seguidamente, dichos micelios fueron sometidos a un proceso de extracción para obtener las

fracciones de fósforo siguientes: fósforo soluble, fósforo insoluble total; fosfolípidos; fósforo de ARN + ADN + fosfoproteínas, nucleótidos de ARN + ADN + fosfoproteínas, fosfoproteínas, nucleótidos de ARN y nucleótidos de ADN (25, 28-29). En cada una de estas fracciones determinamos el fósforo por técnicas adaptadas a nuestras condiciones experimentales (5-6, 10, 15, 19).

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudiamos comparativamente los procesos metabólicos relacionados con el fósforo que tienen lugar en los sistemas microbioquímicos: *Aspergillus niger* + czapek-suelo calizo y *Aspergillus niger* + czapek-suelo calizo salino, los cuales proporcionan en los medios de cultivo incrementos notables de fósforo asimilable como consecuencia de los procesos bioquímicos desarrollados.

Indicamos las grandes necesidades de fósforo que *Aspergillus niger* requiere en el período de juventud. Estos niveles de fósforo soluble total decrecen paulatinamente y alcanzan los valores mínimos durante la madurez (*figura 3*, P₁). Por el contrario, los contenidos de fósforo insoluble total se incrementan con la edad del microorganismo y alcanzan los valores máximos (*figura 3*, P₂) en la madurez del mismo.

Las evoluciones de fósforo de las restantes fracciones fosfóricas (*figuras 4-6*) de *Aspergillus niger*: fosfolípidos (P₃); ARN + ADN + fosfoproteínas (P₄); nucleótidos de ARN + ADN + fosfoproteínas (P₅) y fosfoproteínas (P₆), nucleótidos de ARN (P₇) y nucleótidos de ADN (P₈), demuestran la gran analogía de los sistemas microbioquímicos estudiados en cuanto a la dinámica evolutiva que sigue el fósforo en relación con el tiempo de incubación de *A. niger*, cuyos niveles experimentan aumentos progresivos con máximos en el período de madurez del mismo, pero se evidencia la influencia de la salinidad en las dispersiones de los niveles del bioelemento indicado.

La fijación biológica de fósforo por *Aspergillus niger* como consecuencia de la intervención decisiva de este bioelemento en los procesos anabólicos y catabólicos del mismo, es menor que la mineralización de este nutriente al estado de fosfato asimilable.

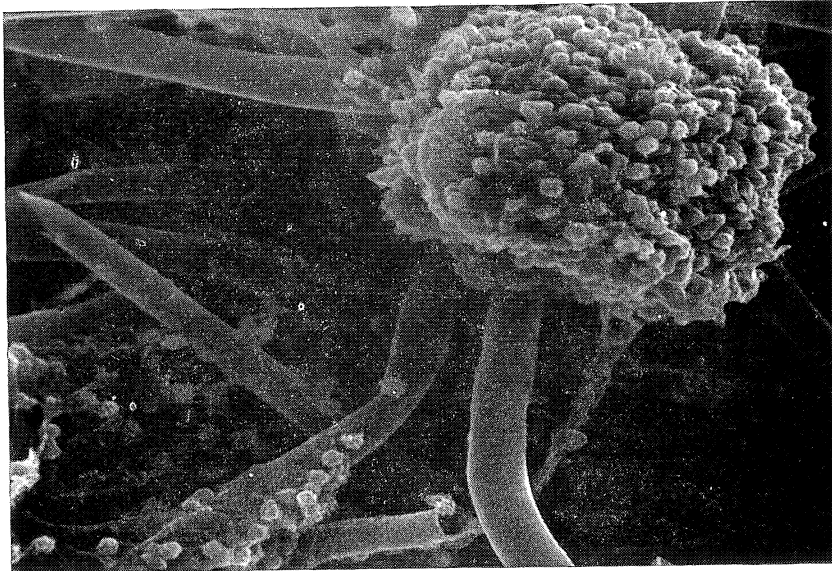


Figura 1

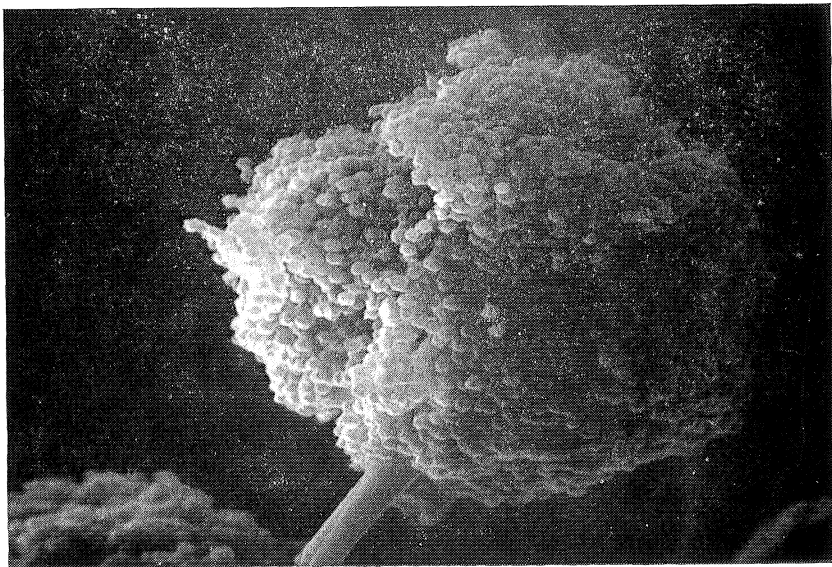


Figura 2

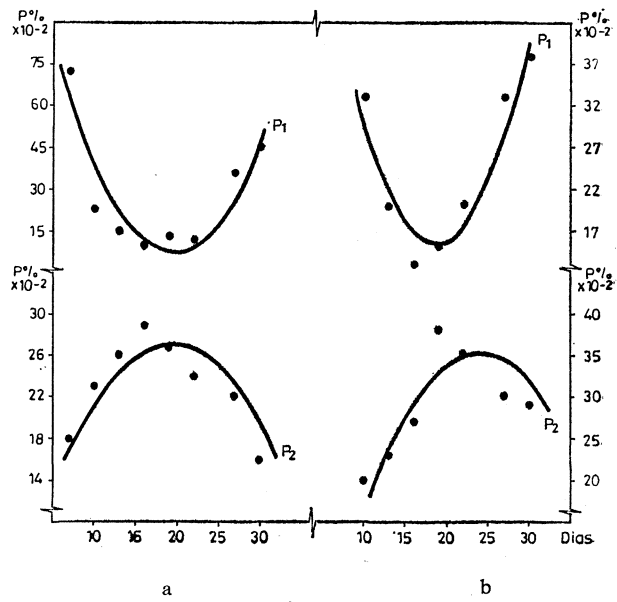


Figura 3

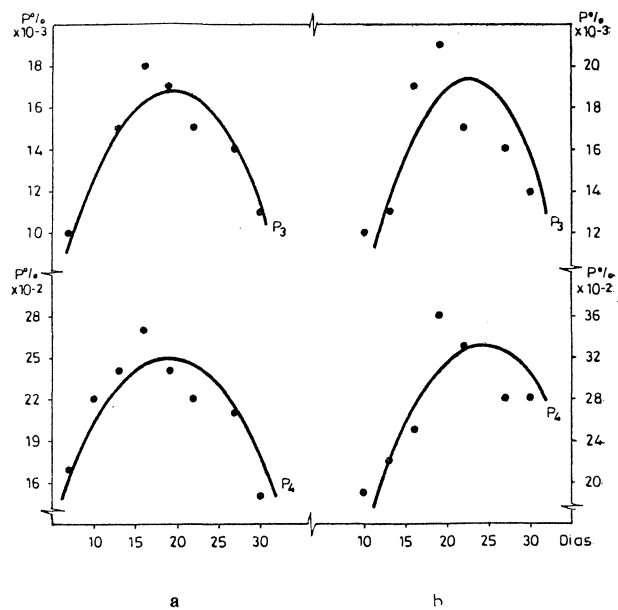


Figura 4

Figuras 3-4. a) *Aspergillus niger* + *cajete-suelo calizo*.
 b) *A. niger* + *cajete-suelo calizo salino*

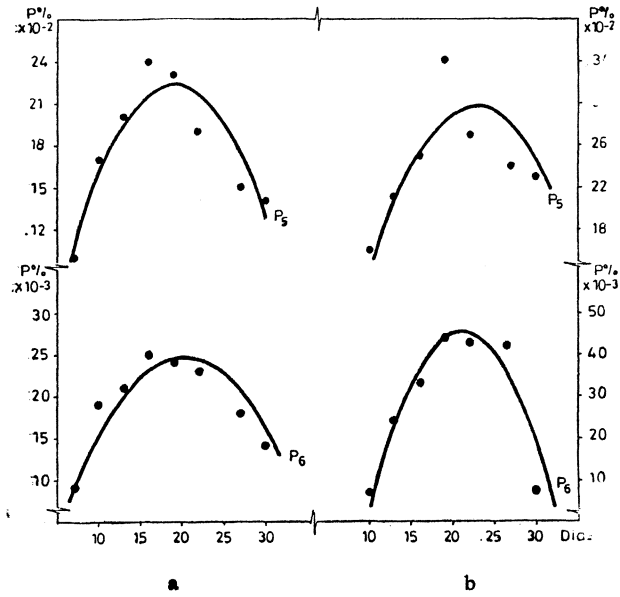


Figura 5

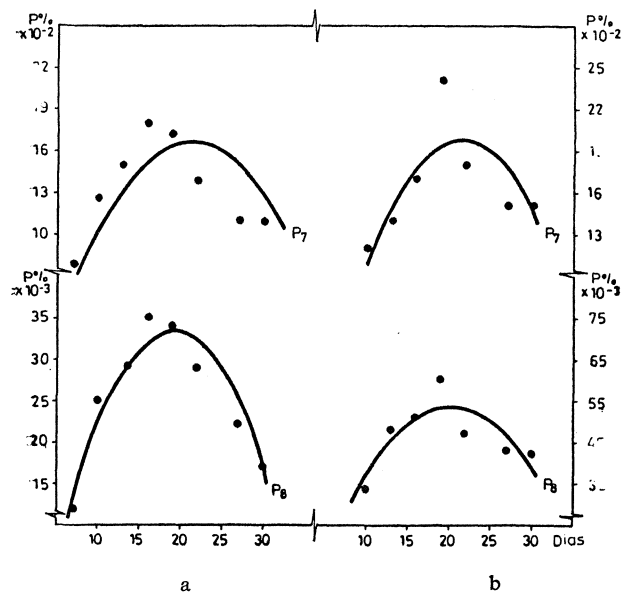


Figura 6

Figuras 5-6. a) *Aspergillus niger* + *caliche-suelo calizo*.
 b) *A. niger caliche-suelo calizo salino*

La salinidad edáfica solamente influye en el aumento del período de crecimiento y desarrollo de *Aspergillus niger*.

Observamos que *Aspergillus niger* posee gran poder de movilización fosfórica, así como la posibilidad de modificar las condiciones de pH en los suelos calizos.

Los sistemas microbioquímicos estudiados pueden considerarse como fertilizantes biológicos que suministran fósforo asimilable.

Las ecuaciones de regresión, coeficientes de correlación y niveles de probabilidad correspondientes, se especifican en los cuadros 2-3.

Cuadro 2. Ecuaciones de regresión, coeficientes de correlación y niveles de probabilidad

<i>Aspergillus niger</i> + czapek (*) — suelo calizo §		
$P_1 = 20,00 \cdot 10^{-4} t^2 - 75,00 \cdot 10^{-3} t + 85,67 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,9594$	0,1 %
$P_2 = -10,00 \cdot 10^{-4} t^2 + 48,10 \cdot 10^{-3} t - 22,44 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,9594$	0,1 %
$P_3 = -60,00 \cdot 10^{-5} t^2 + 27,40 \cdot 10^{-3} t - 11,82 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,8838$	0,1 %
$P_4 = -9,00 \cdot 10^{-4} t^2 + 4,36 \cdot 10^{-2} t - 19,50 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,9663$	0,1 %
$P_5 = -10,00 \cdot 10^{-4} t^2 + 45,50 \cdot 10^{-3} t - 21,92 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,9207$	0,1 %
$P_6 = -35,00 \cdot 10^{-4} t^2 + 14,78 \cdot 10^{-2} t - 110,68 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,9387$	0,1 %
$P_7 = -7,00 \cdot 10^{-4} t^2 + 30,00 \cdot 10^{-3} t - 12,31 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,8027$	1 %
$P_8 = -16,00 \cdot 10^{-4} t^2 + 65,10 \cdot 10^{-3} t - 12,44 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,8293$	1 %

(*) Czapek sin fosfato.

Cuadro 3. Ecuaciones de regresión, coeficientes de correlación y niveles de probabilidad

<i>Aspergillus niger</i> + czapek (*) — suelo calizo salino		
$P_1 = 36,00 \cdot 10^{-4} t^2 - 14,05 \cdot 10^{-2} t + 143,99 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,9216$	0,1 %
$P_2 = -70,00 \cdot 10^{-5} t^2 + 27,40 \cdot 10^{-3} t + 47,00 \cdot 10^{-4}$	$R = 0,8586$	0,1 %
$P_3 = -50,00 \cdot 10^{-5} t^2 + 19,30 \cdot 10^{-3} t - 18,20 \cdot 10^{-3}$	$R = 0,9232$	0,1 %
$P_4 = -60,00 \cdot 10^{-5} t^2 + 23,10 \cdot 10^{-3} t + 27,80 \cdot 10^{-3}$	$R = 0,8411$	1 %
$P_5 = -80,00 \cdot 10^{-5} t^2 + 30,40 \cdot 10^{-3} t - 64,90 \cdot 10^{-3}$	$R = 0,9198$	0,1 %
$P_6 = -90,00 \cdot 10^{-5} t^2 + 36,50 \cdot 10^{-3} t - 12,25 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,9593$	0,1 %
$P_7 = -50,00 \cdot 10^{-5} t^2 + 21,30 \cdot 10^{-3} t - 59,90 \cdot 10^{-3}$	$R = 0,8620$	0,1 %
$P_8 = -14,00 \cdot 10^{-4} t^2 + 53,80 \cdot 10^{-3} t - 18,13 \cdot 10^{-2}$	$R = 0,9502$	0,1 %

(*) Czapek sin fosfato.

RESUMEN

Se ha realizado en la presente comunicación un estudio crítico y comparativo de los procesos metabólicos que se producen en los sistemas microbioquímicos: *Aspergillus niger* + czapek-suelo calizo y *A. niger* + czapek-suelo calizo salino.

En micelios de distintas edades de *Aspergillus niger* se han extraído las fracciones de fósforo correspondientes y se han estudiado las evoluciones de este bioelemento en relación con el tiempo de incubación del microorganismo.

Se destaca el gran poder de movilización fosfórica de *Aspergillus niger*, la influencia que sobre él tiene la salinidad edáfica, así como la importancia de los fertilizantes biológicos en suelos agrícolas.

SUMMARY

Phosphoric metabolism of Aspergillus niger in calcareous and saline soils

A critical and comparative study of the metabolic processes which are present in the microbiochemical systems: *Aspergillus niger* + czapek-calcareous soil and *A. niger* + czapek-calcareous saline soil, is reported in this paper.

In micelia of different ages of *Aspergillus niger* the correspondent fractions of phosphorus were extracted and the evolutions in quantity of phosphorus in relation with time of incubation of the microorganism were studied.

We are pointing out the great phosphoric mobilization power of *Aspergillus niger*, the influence of the soil salinity upon it, as well as the importance of biological fertilizers in agricultural soils.

BIBLIOGRAFIA

1. AZCÓN, R.; BAREA, J. M., y CALLAO, V. (†). 1973. Inoculación conjunta de microorganismos movilizadores de fósforo y *Rhizobium* en cultivos enarenados de judías. I. Efectos sobre la parte aérea de las plantas en experiencias hasta floración. Microbiol. Españ., 26, 31-39.

2. AZCÓN, R.; BAREA, J. M., y CALLAO, V. (†). 1973. Selección de microorganismos movilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno para su empleo como fertilizantes biológicos en cultivos enarenados. Cuad. Cienc. Biol., III, 23-30.
3. BAREA, J. M. 1969. Estudio sobre gérmenes del suelo capaces de mineralizar los fosfatos orgánicos. I. Introducción y revisión bibliográfica. Ars. Pharm., 10, 117-28.
4. BARTHOLOMEW, W., and GORING, C. A. I. 1948. Microbial products and soil organic matter. I. Some characteristics of the organic phosphorus of microorganisms. Soil Sci., Soc. Amer. Proc., 13, 238.
5. BARTLETT, G. R. 1959. Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem., 234, 466-68.
6. BERENBLUM, I., and CHAIN, E. 1938. Studies on the colorimetric determination of phosphate. Biochem. J., 32, 286-94.
7. CHANDRASEKARAN, S. 1969. Production of organic acids by soil microorganisms. Plant Soil, 30, 299.
8. DAS, A. C. 1963. Utilization of insoluble phosphates by soil fungi. J. Indian Soc. Soil Sci., 11, 203-7.
9. DOMMERGUES, Y., et MANGENOT, F. 1970. Ecologie Microbienne du Sol. Edit. Masson y Cie., París.
10. FISKE CYRUS, H., and SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66, 375-400.
11. HERNANDO, V., and Díez, P. A. 1972. Solubility of the soil phosphorus as a function of time. Agrochimica, 16, 497.
12. HERNANDO, V.; LOMBARDIC, V., y DE CLEARK, R. 1968. Relaciones entre el pH, la materia orgánica y las formas de P en tres catenas de suelos. An. Edafol. Agrobiol., 27, 799-816.
13. HOFMANN, E. 1958. Die Bedeutung der Phosphorsäure beim Rotteprozess in ihrer Festigung und Lösung durch biologische Faktoren. Phosphorsäure, 18, 172-76.
14. KAISER, P. 1973. Some aspects of the effect of microbiological activity on soil fertility. Bull. Rech. Agron. Gembloux. Hors Serie. 212-255 (Fr, eu) Institut Pasteur, 78350 Jouy-en-Josas France (161-15). A review, with references.
15. KITSON, R. E., and MELLON, M. G. 1944. Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanado-phosphoric acid. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 16, 379-83.
16. LOUW, H. A., and WEBLEY, D. M. 1959. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. J. Appl. Bacteriol., 22, 227-33.
17. LUCENA-CONDE, F., y MARTÍNEZ DE PANCORBO, A. 1960. Determinación y formas del fósforo en los suelos de la provincia de Salamanca. An. Edafol. Agrobiol., 19, 59.
18. MAHMOUD, S. A. Z.; ABDEL-HAFEZ, A. M.; ELSAWY, M., and HANOFY, E. A. 1973. Inorganic insoluble phosphatedissolving bacteria in soils of Egypt and rhizosphere of broad bean and wheat. Agrokem. Talajtan, 22, 351-56.

19. MARTÍN, J. B., and DOTY, D. M. 1949. Determination of inorganic phosphate: *Anal. Chem.*, **21**, 965-67.
20. MENKINA, R. A. 1963. Bacterial fertilizers and their importance for agricultural plants. *Mikrobiologiya*, **33**, 352.
21. MERZARI, A.; FLORES, S., and GODOY, A. 1963. Solubilization of phosphates: by soil microorganisms. *Arg. Rep. Comisión Nac. Energía At. Informe 83*, 8.
22. NAPLEKOVA, N. N. 1967. *Sov. Soil Sci.*, 1495-1503.
23. ORTUÑO, A.; CARPENA, O.; HERNANSÁEZ, A., and PARRA, M.ª 1968. Microbiochemical systems suppling iron as ferrous ion in calcareous soils. *Trans. Int. Congr. Soil Sci.*, 9th, IV, 694-97
24. ORTUÑO, A.; PARRA, M.ª; HERNANSÁEZ, A., y NOGUERA, J.ª 1972. Sistemas microbioquímicos que suministrar: fósforo asimilable en suelos calizos. *An. Edafol. Agrobiol.*, **32**, 391-99.
25. PRASAD, N. N., and YAYARAMAN, K. N. 1971. Production of organic acids by certain soil Aspergilli. *Curr. Sci.*, **20**, 198-199.
26. RAMOS, A.; BAREA, J. M., and CALLAO, V. 1972. A phosphate dissolving and N fixing microganism and its possible influence of soil fertility. *Agrochimica*, **26**, 345-50.
27. RAMOS, A.; CALLAO, V., y CARVALHO, PCT. 1968. La solubilización de fosfatos por hongos del suelo. *Microbiol. Españ.*, **21**, 23-27.
28. SCHMIDT, G., and THANNHAUSSER, S. J. 1945. A method for the detection of deoxyribonucleic acid ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83-89.
29. SCHNEIDER, W. C. 1945. Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **161**, 293-303.
30. STEVESON, F. J. 1967. Organic acids in soil. *Soil Biochem.*, **119**.
31. TARDIEUX-ROCHE, A. 1966. Contribution a l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. *Ann. Agron.*, **17**, 403.
32. UAROVA, V. N. 1956. Bacteria decomposing tricalcium phosphate. *Dokl. Chem.*, **21**, 22-26.

CENTRO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA APLICADA
DEL SEGURA (CSIC). MURCIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

ACCION SOLUBILIZADORA DEL FOSFORO POR: *ASPERGILLUS NIGER* Y *PSEUDOMONAS FLUO-* *RESCENS*

por

A. ORTUÑO, A. HERNANSAEZ, J.^a NOGUERA, V. MORALES
y T.^a ARMERO

INTRODUCCION

La microflora de los suelos está formada por numerosos géneros de microorganismos de distintas características fisiológicas y bioquímicas. Comprende especies y subespecies de bacterias, algas y hongos, cuyas poblaciones están directamente influidas por diversos factores físicos y químicos del suelo (aire, pH, temperatura, humedad, etc.) (1-4, 8-9).

La investigación de microorganismos como solubilizadores de fosfatos, su aplicación directa como fertilizantes microbianos y la interpretación de los mecanismos bioquímicos por los que se realiza la movilización, han adquirido extraordinaria importancia. Existe una gran diversidad de microorganismos —hongos y bacterias— que presentan propiedades solubilizadoras de fosfatos insolubles (5, 7, 11-12, 14-15). Esta movilización fosfórica es el resultado de la actividad metabólica de dichos microorganismos (13).

El metabolismo microbiano de los glúcidos produce ácidos orgánicos quelantes de los cationes que acompañan al fósforo y, como consecuencia, una disminución del pH. La solubilización de fosfatos en el suelo se atribuye a varios ácidos, destacándose entre ellos el ácido glucónico o alguno de sus cetoácidos derivados especialmente del ácido 2-cetoglucónico.

En el presente trabajo se pretende estudiar comparativamente el poder solubilizador de *Aspergillus niger* y *Pseudomonas fluorescens* con el fin de modificar las condiciones de pH de los suelos calizos y solubilizar el fósforo para hacerlo fácilmente asimilable por las plantas.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Utilizamos para estas experiencias una raza de *Aspergillus niger* de micelio de color blanco, aislada de los suelos citrícolas del Sureste Español, y una estirpe de *Pseudomonas fluorescens* CECT-378-ATCC 13.525, suministrada por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca.

Medios de cultivo

En la solubilización de fosfatos con *Aspergillus niger* preparamos cultivos en medio de Czapek, sin fosfato, el cual lo distribuimos en frascos de Roux, a razón de 250 ml; en estos frascos se introduce previamente fosfato tricálcico.

Para el desarrollo de *Pseudomonas fluorescens*, hemos utilizado medio de cultivo de Ramos y Callao (12) modificado (fosfato tricálcico al 2,5 % y pH 7,2-7,4). Los estudios cuantitativos se prepararon con series de matraces a los que se les adiciona 200 ml del medio específico.

En cada una de las series adicionamos el inóculo correspondiente, efectuándose todas las siembras dentro de la cámara estéril de flujo laminar, provista de instalación de rayos ultravioletas.

Determinaciones analíticas

Se tomaron muestras periódicamente y determinamos en los medios de cultivo el pH y fósforo espectrofotométricamente (10).

Para las experiencias con *Pseudomonas fluorescens* las muestras recogidas se centrifugaron previamente a 10.000 r/m durante 30 min,

con el fin de eliminar las células bacterianas y el fosfato tricálcico insoluble. El sobrenadante se filtró a través de papel de filtro de cenizas conocidas y en el líquido obtenido se realizan las determinaciones analíticas.

RESULTADOS

Los potenciales de hidrógeno que *Aspergillus niger* y *Pseudomonas fluorescens* producen metabólicamente en sus respectivos medios de cultivo se especifican en las figuras 1-2. En ambos casos, los valores de aquéllos experimentan descensos progresivos hasta mantenerse prácticamente constantes, a partir de los 5 d en el primer caso y 10 d en el segundo. Se comprueba que *A. niger* consigue valores más bajos de pH en menos tiempo.

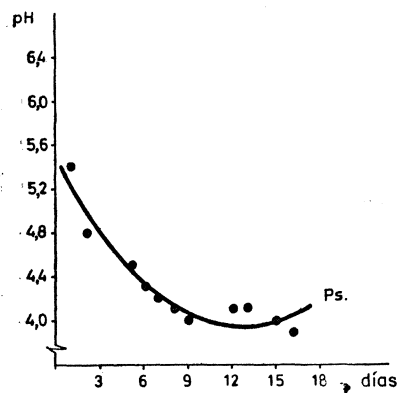


Figura 1

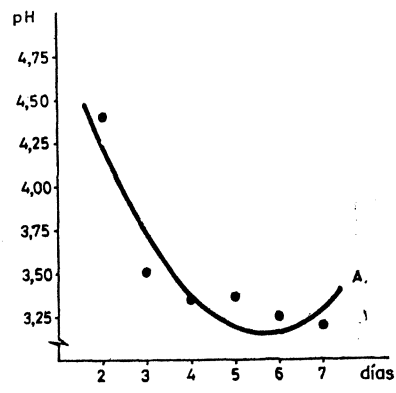


Figura 2

Las necesidades de fósforo para el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Pseudomonas fluorescens* se evidencian en las figuras 3-4. Como puede observarse, en los medios de cultivo donde existe fosfato tricálcico, la solubilización metabólica de aquel bioelemento experimenta una marcada variación en relación con el crecimiento y desarrollo de los microorganismos. Los valores presentan incrementos progresivos e intensos en relación con el tiempo de incubación.

El estudio de las interrelaciones entre potenciales de hidrógeno y

fósforo se indica en las *figuras 5-6*. Con ambos microorganismos los niveles de fósforo solubilizado aumentan a medida que los pH disminuyen.

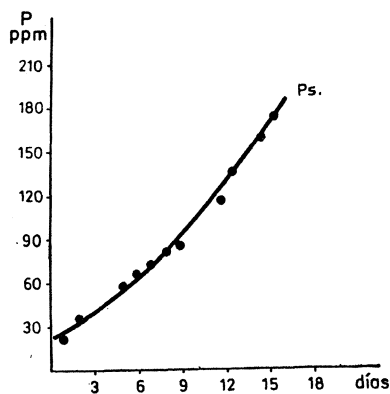


Figura 3

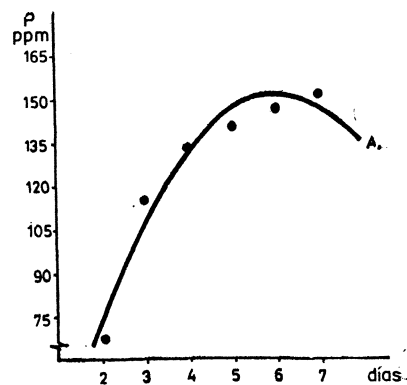


Figura 4

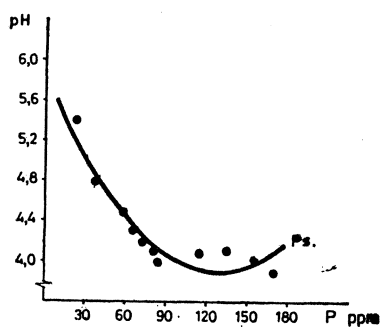


Figura 5

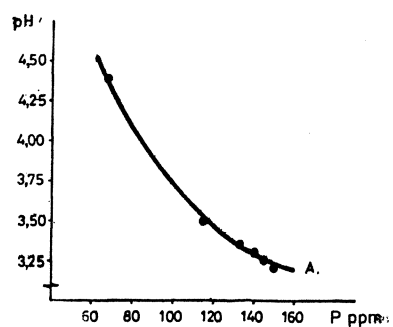


Figura 6

Las ecuaciones de regresión, coeficientes de correlación y niveles de probabilidad correspondientes, se especifican en el *cuadro 1*.

Cuadro 1. Ecuaciones de regresión, coeficientes de correlación y niveles de probabilidad

Aspergillus niger

pH — tiempo

$$y = 9,30 \cdot 10^{-5} x^2 - 2,92 \cdot 10^{-2} x + 53,87 \cdot 10^{-1} \quad R = 0,926 \quad 0,1 \%$$

fósforo — tiempo

$$y = -8,28 \cdot 10^{-3} x^2 + 23,97 \cdot 10^{-1} x + 23,48 \quad R = 0,981 \quad 0,1 \%$$

pH — fósforo

$$y = 1,16 \cdot 10^{-4} x^2 - 3,95 \cdot 10^{-2} x + 6,53 \quad R = 0,999 \quad 0,1 \%$$

Pseudomonas fluorescens

pH — tiempo

$$y = 0,01 \cdot 10^{-1} t^2 - 0,30 \cdot 10^{-1} t + 5,84 \quad R = 0,958 \quad 0,1 \%$$

fósforo — tiempo

$$y = 2,35 \cdot 10^{-1} t^2 + 5,35 t + 21,43 \quad R = 0,997 \quad 0,1 \%$$

pH — fósforo

$$y = 0,09 \cdot 10^{-1} t^2 - 2,34 \cdot 10^{-1} t + 5,43 \quad R = 0,964 \quad 0,1 \%$$

CONCLUSIONES

1.^a En esta comunicación se demuestra experimentalmente el poder solubilizador del fósforo al estado insoluble por *Aspergillus niger* y *Pseudomonas fluorescens* independientemente.

2.^a Se estudia la intensidad solubilizadora del fosfato tricálcico por la acción de ambos microorganismos, y se observa que el período experimental es de 7 d en *Aspergillus niger* y 16 d en *Pseudomonas fluorescens*.

3.^a Los niveles del fósforo solubilizado aumentan progresivamente en relación con el tiempo de incubación.

4.^a El pH disminuye a medida que aumentan los niveles de fósforo hasta mantenerse prácticamente constante a partir de 5 d en el caso del *Aspergillus niger* y de 10 d con *Pseudomonas fluorescens*.

5.^a Los resultados obtenidos respecto a la solubilización de fosfatos con ambos microorganismos demuestran la importancia que pueden tener las aplicaciones de los fertilizantes biológicos en los suelos agrícolas.

RESUMEN

En este trabajo estudiamos comparativamente la intensidad de solubilización de fosfatos por la acción de bacterias (*Pseudomonas fluorescens*) y hongos (*Aspergillus niger*). Utilizamos medios de cultivo en los que la fuente de fósforo es fosfato tricálcico.

Determinamos el pH y el fósforo en los sustratos. En ambos casos observamos una disminución del pH como consecuencia de los productos del metabolismo y un incremento notable de fósforo asimilable en los medios de cultivo.

La acción solubilizadora se inicia a las 24 h y aumenta con el tiempo de incubación hasta alcanzar valores máximos a los 7 d con *Aspergillus niger* y de 15 d con *Pseudomonas fluorescens*. Deducimos que la acción solubilizadora del *A. niger* es más rápida e intensa que la del *Ps. fluorescens*.

Los resultados obtenidos indican la importancia que pueden tener los fertilizantes biológicos de tipo microbiano en los suelos calcáreos del Sureste Español.

SUMMARY

Solubilization power of phosphorus by Aspergillus niger and Pseudomonas fluorescens

In this paper we study and compare the solubilization degrees of phosphates by means of bacteriae (*Pseudomonas fluorescens*) and fungi (*Aspergillus niger*). We used culture media in which the source of phosphorus is tricalcium phosphate.

We determined the pH and phosphorus content on the subs-

trates. In both cases we observed a decrease in the pH values of their metabolic products, as well as a remarkable increase of assimilable phosphorus in the cultures.

The solubilization begins 24 hours later and increases with the incubation time until it reaches maximum values on the 7th day with *Aspergillus niger* and on the 15th day with *Pseudomonas fluorescens*.

We conclude that the solubilization capacity of *Aspergillus niger* is stronger and acts quicker than the one of *Pseudomonas fluorescens*.

The results obtained show the importance that biological fertilizers of microbial type could have in calcareous soils of the Southeast of Spain.

BIBLIOGRAFIA

1. GARCÍA-SÁNCHEZ, A., y SÁNCHEZ, B. 1970. La influencia de las propiedades edáficas en el desarrollo del *Aspergillus niger* y la productividad potencial de suelos ácidos. An. Edafol. Agrobiol., **29**, 65.
2. GARRETT, S. D. 1963. Soil Fungi and Soil Fertility. The Fungi, 3. Pergamon Press, Oxford.
3. GELLER, L. A., and KHARITON, 1961. The effect of herbicides on soil microflora. Mikrobiologiya, **30**, 494-99.
4. GRIFFIN, D. M. 1963. Soil moisture and the ecology of soil fungi. Biol. Rev., **38**, 141-66.
5. KATZNELSON, H.; PETERSON, E. A., and RONNATT, J. W. 1962. Phosphate dissolving microorganisms in seed and in the root of plants. Can. J. Bot., **40**, 1181-86.
6. KITSON, R. E., and MELLON, M. G. 1944. Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanado-phosphoric acid. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **16**, 379.
7. LOUW, H. A., and WEBLEY, D. M. 1958. A plate method for estimating the numbers of phosphate dissolving and acid producing bacteria in soil. Nature, **182**, 1317-18.
8. MAHMOUD, S. A. Z.; ABDEL-HAFEZ, A. M.; EL-SAWY, M., and HANNAFY, E. A. 1947. Qualitative and quantitative evolution of microflora, phosphorus fractions and phosphorus-bacteria in Egyptian soil. Agrokem. Talajtan, **22**, 357-65.
9. NOVAK, B. 1973. Use of biochemical tests in soil microbiology. IV. Possibility of soil phosphorus availability determination. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg., Abt. 2, **128**, 369-76.

10. ORTUÑO, A.; HERNANSÁEZ, A., y MORALES, V. 1975. Contribución al estudio de la solubilización de fosfatos por *Pseudomonas fluorescens*. An. Edafol. Agrobiol., 34, 35-40.
11. ORTUÑO, A.; PARRA, M.^a; HERNANSÁEZ, A., y NOGUERA, J.^a 1973. Sistemas microbioquímicos que suministran fósforo asimilable en suelos calizos. An. Edafol. Agrobiol., 32, 391-99.
12. RAMOS, A.; CALLAO, V., y CARVALHO, P. C. T. 1968. La solubilización de fosfatos por hongos del suelo. Microbiol. Españ., 21, 23-37.
13. RODINA, A. G.; COLWEDD, R. R., and ZAMBRUSKI, M. S. 1972. Methods of studying transformations of phosphorus compounds by microorganisms. Methods Microbiol., 350-65.
14. SPERBER, J. I. 1957. Solution of mineral phosphates by soil bacteria. Nature, 180, 994-95.
15. TAHA, S. M.; MAHMOUD, S. A. Z.; HALIM EL-DAMATY, A., and ABDEL-HAFEZ, A. M. 1969. Activity of phosphate-dissolving bacteria in Egyptian soils. Plant Soil, 31, 149.

NATIONAL RESEARCH CENTRE, DOKKI, CAIRO (EGYPT)
LABORATORY OF MICROBIAL CHEMISTRY

SALTING IN PROGESTERONE HYDROXYLASES FROM *ASPERGILLUS NIGER* 12 Y

by

A. F. ABDEL-FATTAH and M. A. BADAWI

INTRODUCTION

Although a great deal of work has been reported on the transformation of steroids in mammalian systems, yet available knowledge about microbial transformation is necessary very incomplete. As regards steroid hydroxylases, Zuidweg *et al.* (7) obtained an active cell-free enzyme system from *Curvularia lunata* which converted cortexolone into cortisol. The last mentioned authors used sodium phosphate supplemented with EDTA for extracting the mycelium and reported that the enzymic activity was present in the supernatant and that omission of EDTA resulted in a marked decrease of activity. 11 α -hydroxylation of progesterone and 19-nortestosterone by cell-free preparations of *Aspergillus ochraceus* was also reported by Masayoshi *et al.* (5). In addition, a cell-free preparation of 20-keto steroid 11 α -hydroxylase and 17 (20)-lyase was also obtained from *A. ochraceus* by rupture of the mycelia in phosphate buffer (pH 7.2) containing EDTA (3).

Recently, we reported on the enzymic activities catalyzing the transformation of progesterone in fungi (2). Furthermore, we also reported on the production, induction and the activity of progesterone hydroxylases by *Aspergillus niger* 12 Y (1). It was found that progesterone induced the formation of 11 α -hydroxylase, 11 β -hydroxylase and 21-hydroxylase by the last mentioned fungal strain.

The present work was undertaken to investigate the preparation of cell-free progesterone hydroxylases of *Aspergillus niger* 12 Y with some salt solutions.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

Aspergillus niger 12 Y, a local strain, was used in the present work. It was obtained from the Centre of Cultures of the National Research Centre, Cairo.

Cultivation

The cultivation was made in 250-ml Erlenmeyer flasks, each containing 70 ml of the nutritive solution composed of (g/l): glucose, 40; peptone, 1.0; KH_2PO_4 , 0.74; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1.0; yeast extract, 1.0; asparagine, 0.7. The flasks were sterilized at 1 atm for 20 min and inoculated with 2-ml spore suspension of 48-h-old culture. The culture flasks were agitated on a reciprocal shaker (110 strokes/min, amplitude 7 cm) at 30 °C for 48 h.

Induction of progesterone hydroxylases

Cultivation was followed by filtration under sterile conditions. After washing with sterile distilled water, the mycelia were transferred to another flask containing fresh and sterilized medium buffered with citrate-phosphate buffer at pH 4.0. Thereafter, 4 mg of progesterone (in 1 ml ethanol) were added and the flasks shaken for 24 h at 30 °C. The flasks were then filtered to obtain the induced mycelia.

Preparation of cell-free extracts and transformation

This was done with ammonium sulphate and sodium chloride solutions of various concentrations. In each case, 3 g of cooled moist induced mycelium (corresponding to 0.6 g dry weight) were extracted by grinding in agate mortar with 40 ml of the ice-cold

agent for 20 min in an ice bath. The mixture was then filtered through Whatman No. 50 filter paper to obtain the cell-free extract, which was further centrifuged in a refrigerated centrifuge at 4,000 r/m and the mycelial debris. The latter was washed with sterile water and transferred to 40 ml of a reaction mixture composed of the following (mM): citrate-phosphate buffer (pH 4.0): EDTA: reduced glutathione (35:10:2, by vol.). Progesterone (10 mg in 2 ml ethanol) was then added and transformation was performed, under shaking, for 24 h at 30 °C. On the other hand, each of the cell-free preparations was dialyzed against citrate-phosphate buffer of pH 4.0 in a refrigerator for 24 h. To the dialyzed cell-free extract (pH 4.0) the calculated amounts of EDTA and reduced glutathione and 10 mg progesterone (in 2 ml ethanol) were added. Transformation was then performed, under shaking, for 24 h at 30 °C.

Protein determination

The protein contents of the cell-free extracts were determined according to the method of Lowry *et al.* (4).

Extraction and analysis of a mixture of transformation products

This was done using thin-layer chromatographic analysis as previously described by Abdel-Fattah and Badawi (1).

RESULTS AND DISCUSSION

The data recorded in *table 1* indicated that the protein content of the cell-free extracts obtained by salting in with ammonium sulphate decreased with the increase of ammonium sulphate saturation. This is in accordance with the general phenomenon of ammonium sulphate, being a salting out agent for proteins. On the other hand, salting in with ammonium sulphate solution of 5 % saturation afforded selective extraction of 11 β -hydroxylase. In this respect, the cell-free preparation afforded only 11 β -hydroxyprogesterone when acted upon

progesterone. Extraction with ammonium sulphate solutions of higher concentrations led to the isolation from the mycelium, besides 11 β -hydroxylase, of 11 α -hydroxylase. Furthermore, it is worthy to note that ammonium sulphate solution of up to 30 % saturation was unsuitable for salting in 21-hydroxylase, which remained in the mycelium unextractable. These results collectively indicated that salting in with ammonium sulphate afforded selective isolation of the progesterone hydroxylases from the mycelium and provided cell-free preparation with different enzymic activities.

Table 1 Activities of the cell-free progesterone hydroxylases salted in with ammonium sulphate, and the mycelial debris of *A. niger* 12 Y

Ammonium sulphate saturation %	Enzyme sample	Protein content of CE $\mu\text{g/ml}$	R. P. mg/40 ml reaction mixture	Hydroxyprogesterone products mg/40 ml reaction mixture		
				11 α -	11 β -	21 -
5	CE	70	9.80		0.015	
	MD		8.75	0.75	0.100	0.008
10	CE	77	9.20	0.35	0.075	
	MD		9.00	0.55	0.100	0.008
15	CE	64	9.10	0.55	0.100	
	MD		9.00	0.35	0.150	0.008
20	CE	64	8.50	1.00	0.075	
	MD		9.20	0.35	0.015	0.020
25	CE	55	9.90	0.55	0.100	
	MD		9.20	0.35	0.015	0.008
30	CE	55	9.60	0.15	0.015	
	MD		9.45	0.15	0.015	0.004

In this and the following table: CE = cell-free extract. MD = mycelial debris. R. P. = residual progesterone. 11 α - = 11 α - hydroxyprogesterone. 11 β - = 11 β -hydroxyprogesterone. 21 - = 21 - hydroxyprogesterone.

Taking the yields of 11 α -hydroxy and 11 β -hydroxyprogesterone derivatives as indexes for the extractability of 11 α -hydroxylase and 11 β -hydroxylase, respectively, the results indicated differences between these two enzymes. In this respect, salting in 11 α -hydroxylase

from the mycelium began with 10 % saturation ammonium sulphate solution. The extractability of the last mentioned enzyme increased gradually with the increase of ammonium sulphate saturation, reaching a maximum with that of 20 % saturation. On the other hand, 11 β -hydroxylase showed two maxima with the cell-free extracts prepared with 15 % and 25 % ammonium sulphate saturations. This may suggest the probability that 11 β -hydroxylase of *Aspergillus niger* 12 Y is an enzyme system composed of more than one component. This fungal enzyme might thus be similar to the steroid 11 β -hydroxylase system of adrenal cortex mitochondria which was reported to consist of 3 parts (6).

On the other hand, the mycelial debris remaining after salting in with ammonium sulphate showed activity when acted upon progesterone. Such activity decreased by the increase of ammonium sulphate saturation used in the extraction. All these mycelial debris gave, but weak, activity for 21-hydroxylase.

The protein content of the cell-free preparations obtained by extraction of the mycelium with sodium chloride solutions (1-3 %) varied within a limited range (table 2). The results also indicated that sodium chloride, similar to ammonium sulphate, afforded selective isolation but of progesterone 11 α -hydroxylase. Thus the cell-free preparation with 1 % sodium chloride solution contained only 11 α -hydroxylase since by action on progesterone it gave only 11 α -

Table 2 Activities of the cell-free progesterone hydroxylases, extracted with sodium chloride, and the mycelial debris of *A. niger* 12 Y

Sodium chloride concentration %	Enzyme sample	Protein content of CE $\mu\text{g/ml}$	R. P. mg/40 ml reaction mixture	Hydroxyprogesterone products mg/40 ml reaction mixture		
				11 α -	11 β -	21 -
1	CE	70	9.50	0.20		
	MD		9.00	0.40	0.190	0.032
2	CE	80	9.40	0.20	0.075	
	MD		9.15	0.40	0.100	0.020
3	CE	77	9.40	0.20	0.075	
	MD		9.00	0.40	0.100	0.012

hydroxyprogesterone. On the other hand, the corresponding mycelial debris showed activity of all the hydroxylases investigated. However, concentrations of sodium chloride solutions higher than 1 % gave similar cell-free preparations, which contained both 11 α -hydroxylase and 11 β -hydroxylase. On the other hand, none of the sodium chloride cell-free preparations, like those of ammonium sulphate, showed 21-hydroxylase activity. This enzymic activity was, however, recorded with all the mycelial debris remaining after extraction. In this respect, 21-hydroxylase showed higher activity than that remaining in the mycelial debris after ammonium sulphate extraction.

SUMMARY

Cell-free progesterone hydroxylases were prepared from *Aspergillus niger* 12 Y by salting in with ammonium sulphate and sodium chloride solutions. Ammonium sulphate solution of 5 % saturation afforded selective extraction of 11 β -hydroxylase from the mycelium. Higher concentrations of ammonium sulphate provided cell-free preparations containing 11 α -hydroxylase and 11 β -hydroxylase. The extractability of 11 α -hydroxylase increased with the increase of ammonium sulphate saturation while 11 β -hydroxylase showed two maxima at 15 % and 25 % saturations. 21-hydroxylase remained in the mycelium unextractable with ammonium sulphate solutions up to 30 % saturation. On the other hand, 1 % sodium chloride solution afforded selective isolation of 11 α -hydroxylase. Higher concentrations of sodium chloride solution gave similar cell-free preparations containing 11 α -hydroxylase and 11 β -hydroxylase. Sodium chloride was also unsuitable for extracting 21-hydroxylase and this enzyme remained in the mycelium. The mycelial debris remaining after sodium chloride extraction showed higher activity for 21-hydroxylase than those remaining after ammonium sulphate extraction.

RESUMEN

Precipitación de hidroxilasas de la progesterona del Aspergillus niger 12 Y

A partir de un extracto de *Aspergillus niger* 12 Y libre de células, se obtuvieron hidroxilasas de la progesterona mediante precipitación con soluciones de sulfato amónico y de cloruro sódico. La solución de sulfato amónico al 5 % permitió la extracción selectiva de 11,β-hidroxilasa del micelio; utilizando concentraciones más elevadas, las preparaciones libres de células contenían 11,α-hidroxilasa y 11,β-hidroxilasa. Al aumentar la concentración de la solución de sulfato amónico, aumentaba la cantidad de 11,α-hidroxilasa capaz de ser extraída, mientras que las máximas extracciones de 11,β-hidroxilasa se obtenían con soluciones al 15 y al 25 %; la 21-hidroxilasa quedaba retenida en el micelio, aun con soluciones de hasta el 30 %. Por otra parte, la solución de cloruro sódico al 1 % permitió un aislamiento selectivo de 11,α-hidroxilasa; concentraciones mayores daban preparaciones libres de células, similares, conteniendo 11,α-hidroxilasa y 11,β-hidroxilasa. El cloruro sódico no permitía la extracción de la 21-hidroxilasa, que permanecía en el micelio. Los residuos miceliales que restaban después de la extracción con cloruro sódico, mostraban una mayor actividad de 21-hidroxilasa que los correspondientes al sulfato amónico.

REFERENCES

1. ABDEL-FATTAH, A. F., and BADAWI, M. A. 1974. Production, induction and activity of progesterone hydroxylases by *Aspergillus niger* 12 Y. J. Gen. Appl. Microbiol., 20, 363-71.
2. ABDEL-FATTAH, A. F.; EL-REFAI, A. H.; SALLAM, L. A. R., and BADAWI, M. A. 1977-1978. Distribution pattern of enzymic activities catalyzing the transformation of progesterone in some fungi. Microbiol. Españ., 30-31, 59-66.
3. LIAT, T., and PIERRE, F. 1970. Interconversions of steroids and fungi. III. 11 α-hydroxylation and degradation of progesterone —4-C¹⁴ by a cell-free preparation from *Aspergillus ochraceus*. Steroid Biochem., 1, 221-27.
4. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., and RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-75.

5. MASAYOSHI, S.; JAMES, M. A., and LEROY, S. L. 1970. Microbial hydroxylations.. V. 11 α -hydroxylation of progesterone by cell-free preparations of *Aspergillus ochraceus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 172-79.
6. SIH, C. J. 1969. Enzymic mechanisms of steroid hydroxylation. *Science*, **163**, 1297-300.
7. ZUIDWEG, M. H. J.; VAN DER WAARD, F., and FLINES, J. DE. 1962. Formation of hydrocortisone by hydroxylation of Reichstein's compound S with an enzyme preparation. *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 131-33.

NATIONAL RESEARCH CENTRE, DOKKI, CAIRO (EGYPT)
MICROBIOLOGICAL AND ENZYME CHEMISTRY RESEARCH UNIT
NUTRITION INSTITUTE, CAIRO

FERMENTATIVE PRODUCTION OF COBALAMIN BY *STREPTOMYCES OLIVACEUS*

by

A. A. ABOU-ZEID and M. R. EL-SHERBEENY (*)

INTRODUCTION

Rickes and Wood (7-8) indicated that vitamin B₁₂ was exclusively a microbial product. Microorganisms especially bacteria produced compounds with vitamin B₁₂ activity (6). Some species of *Streptomyces* produced significant amounts of the vitamin B₁₂ as by-product besides the production of antibiotics e. g. *St. aureofaciens* produces chlortetracycline and cobalamin, *St. griseus* produces cobalamin, streptomycin and grisein. *St. fradiae* produces vitamin B₁₂ and neomycin. Some species of the genus *Streptomyces* produce vitamin B₁₂ without production of antibiotics (1-2, 4-5).

The discovery of synthesis of vitamin B₁₂ by microorganisms quickly led to search for higher yielding strains for fermentation processes. Among these were surveys by Tarr (11) and Saunders *et al.* (10).

The aim of this paper deals with the effect of the composition of the fermentation medium on cobalamin production by *Streptomyces olivaceus*.

(*) This work forms a part of M. Sc. thesis of M. R. El-Sherbeeny.

MATERIALS AND METHODS

Maintenance of Streptomyces olivaceus

The organism was maintained on the medium contained the following ingredients (g/l): glucose, 20.0; NaNO₃, 2.0; KH₂PO₄, 1.0; KCl, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeSO₄·7H₂O, 0.005; agar agar, 20.0 and 1,000 ml distilled water. The medium was distributed into test tubes and sterilized at 120 °C for 15 min. The organism was inoculated under aseptic conditions into the sterile slants and incubated at 27°-30 °C for 10 days to obtain good growth and sporulation. The growing slants were kept in a refrigerator at 5 °C.

Preparation of inoculum

Streptomyces olivaceus was grown on the medium contained the following ingredients (g/l): corn steep liquor, 5.0; starch, 50.0; CaCO₃, 5.0; NaCl, 5.0; NH₄NO₃, 5.0 and CoCl₂, 0.0025. The ingredients were thoroughly mixed in 1,000 ml distilled water. The medium was portioned into Erlenmeyer flasks (250 ml), each containing 50 ml of the medium. The initial pH value of the medium was adjusted to about 7.0. The flasks were plugged and sterilized for 20 min. When the flasks attained room temperature, they were inoculated with a standard inoculum of spore suspension of *St. olivaceus* under aseptic conditions. The flasks were incubated on a rotary shaker (200 r/m) at 27°-30 °C for 48 h. At the end of the incubation period, 2.5 ml of this culture were used to inoculate 50 ml of the fermentation medium.

Fermentation medium

Production of vitamin B₁₂ was carried out on seven media (table 1). The different media were prepared and portioned into Erlenmeyer flasks (250 ml), each containing 50 ml of the fermentation media. The flasks were plugged and sterilized at 1.2 atmospheric

pressure for 20 min. When the flasks attained room temperature, they were inoculated with 2.5 ml of the fermented vegetative medium under sterile conditions. The inoculated flasks were incubated at 27°-30 °C on a rotary shaker (200 r/m) for different incubation periods. At the end of the incubation period, the final pH value of the fermentation medium, microbial growth and vitamin were determined.

Table 1. Different fermentation media used in production of cobalamin

Ingredients g/l	Medium I	Medium II	Medium III	Medium IV	Medium V	Medium VI	Medium VII
Starch	50.0					50.0	
Molasses		2.0			50.0		
Sucrose		40.0	25.0	30.0			30.0
Corn steep Liquor	5.0	2.0	5.0	10.0	2.0	5.0	10.0
Milk whey						5.0	5.0
(NH ₄) SO ₄		3.0	2.6	3.0	3.0		3.0
NH ₄ NO ₃	5.0					5.0	
NaCl	2.0	5.0	2.0		5.0	2.0	
CaCO ₃	5.0	4.0	4.0	4.0	4.0	5.0	4.0
COCl ₂	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025
MgSO ₄ · 7 H ₂ O			0.16				
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O			0.02	0.03			0.03

Carbon sources

The carbon source of the fermentation medium used in the production of cobalamin was replaced by equivalent amounts of the following carbon sources: glucose, molasses, starch, fructose, mannose and xylose. The effect of the different concentrations of the best carbon sources affecting the biosynthesis of cobalamin was investigated. The different carbon sources were sterilized separately at 120 °C for 15 min and added to the flasks containing the ingredients under aseptic conditions.

Nitrogen sources

The nitrogen sources of the basal fermentation medium used in the biosynthesis of cobalamin was replaced by equivalent amount of total nitrogen of the following organic nitrogen sources: soybean meal, peptone, milk whey, yeast extract, asparagin, casein and meat extract and the inorganic nitrogen sources: $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl and $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_2$. The effect of different concentrations of the best organic and inorganic nitrogen sources affecting the biosynthesis of cobalamin was investigated.

Determination of cobalamin

The amounts of cobalamin produced by *Streptomyces olivaceus* were determined spectrophotometrically using the technique of Rudkin and Taylor (9).

RESULTS

The data obtained (*table 2*) showed that variable amounts of cobalamin were obtained on using different media containing variable chemical ingredients. All the fermentation media used contained the source of cobalt due to its importance in the biosynthesis of cobalamin. The best fermentation medium exhibited maximum yield of cobalamin was medium I. The suitable initial pH value favoured cobalamin production was 7.0.

The results obtained (*table 3*) showed that the time of incubation affected the production of cobalamin. The organism produced cobalamin after 24 h and the amount of cobalamin increased with the increase of the incubation period reaching its optimum at 120 h, above which a constant amount of the vitamin was obtained.

Glucose was the best carbon source favouring the biosynthesis of cobalamin. The amount of cobalamin produced by the organism increased with the increase of glucose concentration reaching its optimum at 10.0 g/l, above which a decrease of the yield of cobalamin was recorded.

Table 2. Selection of fermentation medium favouring biosynthesis of cobalamin by S. olivaceus

Media	Final pH value of the medium	Suspended dry matter	Cobalamin $\mu\text{g/ml}$
I	6.0	7.0	1.9
II	6.0	6.5	1.1
III	7.0	6.9	11.4
IV	7.5	6.2	0.9
V	6.5	7.2	1.7
VI	6.0	6.1	1.2
VII	7.0	6.2	0.9

Table 3. Influence of incubation period on biosynthesis of cobalamin

Incubation period h	Final pH value	Suspended dry matter mg/ml	Cobalamin $\mu\text{g/ml}$
24	7.0	4.0	0.3
48	7.0	5.4	0.6
96	6.0	7.6	1.5
120	6.0	7.5	1.9
144	6.0	7.5	1.9

Corn steep liquor was the best organic nitrogen source favouring the biosynthesis of cobalamin, while $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ were the best inorganic nitrogen sources for cobalamin production. The amount of cobalamin produced increased with the increase of $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ concentration, reaching its optimum at 2.0 g/l, above which a slight decrease in the yield of cobalamin was obtained.

The results obtained (table 4) showed that addition of vitamin A, vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin C, biotin, nicotinic acid, 5,6-dimethyl-

benzimidazole, urea, benzoic acid, salicylic acid, pyrimidine, acetamide, benzamide, glycine, alanine, valine, leucine, tyrosine, methionine, arginine, lysine, proline, tryptophan, aspartic acid and histidine to the fermentation medium did not markedly stimulate higher titre for the production of cobalamin by *Streptomyces olivaceus*.

Table 4. Influence of vitamins, amino acids and other compounds on biosynthesis of cobalamin

Ingredients	Final pH value	Suspended dry matter mg/ml	Cobalamin $\mu\text{g/ml}$
Vitamins			
Vitamin A	9.0	9.1	2.9
Vitamin B ₁	8.0	8.8	2.9
Vitamin B ₂	8.0	8.9	3.0
Vitamin C	9.0	8.8	2.9
Biotin	8.0	8.9	3.0
Nicotinic acid	8.0	9.0	2.9
Amino acids (0.1 mg/ml)			
Glycine	8.0	9.6	3.0
DL-alanine	8.0	8.8	3.0
L-valine	8.0	8.9	2.9
L-leucine	9.0	8.8	3.0
L-tyrosine	8.0	8.9	3.0
DL-methionine	9.0	8.9	2.9
L-arginine	9.0	8.8	3.0
L-lysine	8.0	9.1	3.0
L-proline	8.0	8.9	2.9
DL-tryptophan	8.0	8.8	2.9
L-aspartic acid	8.0	9.0	3.0
L-histidine	8.0	9.0	2.9
Other compounds			
5,6-dimethylbenzimidazole	8.0	8.8	2.9
Urea	8.0	8.6	2.9
Benzoic acid	7.5	8.9	2.9
Salicylic acid	7.5	8.6	2.9
Pyrimidine	8.0	8.8	2.9
Acetamide	8.0	8.8	3.0
Benzamide	8.0	9.0	2.9

SUMMARY

Medium I was the most suitable substrate for the production of cobalamin. Maximal yield of cobalamin was obtained at pH 7.0 and 120 h of incubation. Glucose gave the best titre for the production of cobalamin. $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ was the best nitrogen source. The addition of vitamin A, vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin C, biotin, nicotinic acid, 5,6-dimethylbenzimidazole, urea, benzoic acid, salicylic acid, pyrimidine, acetamide, benzamide, glycine, alanine, valine, leucine, methionine, arginine, lysine, proline, tryptophan and aspartic acid to the fermentation medium did not increase the yield of cobalamin.

RESUMEN

Producción fermentativa de cobalamina por el Streptomyces olivaceus

Se ha encontrado que el medio I es el substrato más conveniente para la producción de cobalamina, obteniéndose el máximo rendimiento a las 120 h de incubación, a pH 7. La glucosa es la fuente más adecuada de carbono, y el fosfato amónico, la de nitrógeno. La adición de vitamina A, vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina C, biotina, ácido nicotínico, 5,6-dimetilbenzimidazol, urea, ácido benzoico, ácido salicílico, pirimidina, acetamida, benzamida, glicina, alanina, valina, leucina, metionina, arginina, lisina, prolina, triptófano y ácido aspártico al medio de fermentación no aumenta el rendimiento en cobalamina.

REFERENCES

1. ABOU-ZEID, A. A. 1972. Production of cobalamin by *Streptomyces erythreus*. J. Exp. Biol., 10, 155.
2. ABOU-ZEID, A. A., and EL-GAMMAL, A. A. 1969. Biosynthesis of erythromycin and cobalamin by *Streptomyces* species. J. Bot. U. A. R., 12, 27.
3. ABOU-ZEID, A. A., and YOUSEF, A. A. 1971. Production of cobalamin by *Streptomyces* species. Pak. J. Sci. Ind. Res., 14, 244.

4. ABOU-ZEID, A. A.; YOUSEF, Y. M., and EL-SHERBEENY, R. M. 1973. Microbial production of cobalamin. *Zentralbl. Bakteriok. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt.*, **2**, 128, 285.
5. OSMAN, H. G.; ABOU-ZEID, A. A., and EL-GAMMAL, A. 1969. Biosynthesis of erythromycin and cobalamin by *Streptomyces erythreus*. *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 615.
6. PERLMAN, D. 1961. Cobalamin. U. S. Patent 2,980,591.
7. RICKES, E. L., and WOOD, T. R. 1951. Cobalamin. U. S. Patent 2,563,794.
8. RICKES, E. L., and WOOD, T. R. 1954. Cobalamin. U. S. Patent 2,695,862.
9. RUDKIN, G. O., and TAYLOR, R. J. 1952. Determination of cobalamin. *Anal. Chem.*, **24**, 754.
10. SOUNDERS, A. P.; OTTO, R. H., and SYLVESTER, J. C. 1952. Cobalamin. *J. Bacteriol.*, **64**, 725.
11. TARR, H. L. 1951. Biosynthesis of cobalamin. *Can. J. Technol.*, **29**, 391.

BIBLIOGRAFIA

FISICOQUIMICA PARA BIOLOGOS, por *J. Gareth Morris* (versión española: *R. Guerrero y F. Carretero*). 1976. Editorial Reverté, S. A., Barcelona, Bogotá, Buenos Aires, Caracas, México. 389 páginas.

En la actualidad, con el desarrollo de la Biología Molecular, se ha despertado un extraordinario interés por conocer los íntimos mecanismos de las reacciones vitales en términos físico-químicos, ya que éstos permiten cuantificar mejor el aspecto dinámico de las interacciones biológicas; y también, por otra parte, las poblaciones microbianas constituyen —en la mayoría de las ocasiones— un material idóneo para estudiar la problemática de muchos procesos bioquímicos esenciales. Todo ello justifica el que un microbiólogo, como el Prof. Morris, se sienta atraído hacia el mundo de la Fisicoquímica y quiera ponerla al alcance de los estudiosos de la Biología; objetivo que cumple con verdadera maestría al proporcionar una correcta y fácil visión matemática de ecuaciones biológicas tan esenciales como las que tienen lugar durante las variaciones de pH o en los procesos de oxidorreducción, en la energética y acoplamiento de reacciones o en la cinética de enzimas, entre otros.

La lectura de esta «Fisicoquímica para Biólogos» permite ir estudiando secuencialmente el aspecto físico de fenómenos muy conocidos, pero que, con frecuencia, son tratados únicamente desde un punto de vista biológico.

El desarrollo del libro es eminentemente práctico, ya que, partiendo del estudio de conceptos básicos, plantea y resuelve una serie de problemas y ejemplos prácticos que permiten —al interesado por la Biología— llegar a desenvolverse con soltura dentro de campos de la Física, a los que está menos habituado. Así, partiendo de

leyes que definen las propiedades y el manejo de gases —este libro— lleva a estudiar el fundamento y utilización del respirómetro de Warburg; desde el estudio de propiedades de soluciones acuosas nos permite conocer los pesos moleculares por osmometría o determinar el grado de ionización de unos electrolitos; o también, desde el concepto de interacción ácido-base, nos muestra la importancia del pH para las técnicas de cromatografía, la electroforesis o para las reacciones catalizadas por intervención de protones.

En fin, problemas y fundamentos, son mezclados armónicamente en esta «Fisicoquímica para Biólogos» con el propósito de demostrar a los interesados en esta temática que la viabilidad y la magnitud de una reacción química pueden predecirse a partir de las propiedades termodinámicas de sus reactantes; y también, que reacciones isotérmicas perfectamente acopladas pueden facilitar la síntesis espontánea de un compuesto.

La inclusión de constantes, tablas, problemas y referencias completan la utilidad de este libro; también son de destacar el meticoloso cuidado que se ha puesto en la versión española y la acertada presentación editorial, por lo que este libro parece llamado a tener una gran difusión en los ámbitos biológicos de habla hispana.

A. PORTOLÉS

THE SPECIFIC TREATMENT OF VIRUS DISEASES, por D. J. Bauer. 1977. MTP Press Limited, Lancaster. VIII + 194 páginas.

El tratamiento de las enfermedades causadas por virus es un problema que se encuentra muy lejos de estar resuelto. No obstante, desde el descubrimiento por Brownlee y Hamre, en 1951, de que la p-aminobenzaldehído-tiosemicarbazona inhibe la multiplicación del virus de la vacuna, se ha realizado un enorme esfuerzo en la investigación de drogas con capacidad antivírica. Numerosos compuestos se han ensayado por esta vía, tanto sobre infecciones experimentales en cultivos celulares, como en animales de laboratorio, y en humanos con infecciones inducidas o naturales. Desafortunadamente, aunque se han encontrado un número relativamente importante de drogas con actividad antivírica, demostrada en los ensayos de labo-

ratorio, se ha tropezado con una serie de escollos que muy frecuentemente imposibilitan su aplicación en la quimioterapia de las enfermedades víricas. Entre estos podemos destacar como los más importantes, la toxicidad de estos productos a las dosis terapéuticas, su elevado coste en ciertos casos, y la rápida evolución de ciertas enfermedades víricas a partir de los primeros síntomas, lo cual dificulta su adecuado tratamiento.

No obstante, aunque en número escaso, algunas drogas han entrado a formar parte del arsenal terapéutico, con ciertas reservas importantes en cuanto a su modo de utilización. Estas drogas hasta ahora son: citarabina, iododeoxiuridina, trifluorotimidina, vidarabina, amantadina y metisazona. Los datos referentes a dichos compuestos, obtenidos por una importante serie de investigadores, se encuentran muy dispersos, tanto en revistas de ámbito puramente virológico, como en revistas clínicas, lo que dificulta grandemente una evaluación completa del estado del problema. La obra del Dr. Bauer, que es una destacada autoridad en este tema, viene a resolver este importante problema y nos da una visión conjunta, en la fecha de su redacción, de los conocimientos sobre el tratamiento específico de las enfermedades víricas, con referencia únicamente a los quimioterápicos.

Tras un capítulo de introducción relativo a generalidades de virus, seguido de otro que considera a aquéllos en relación con la quimioterapia, entra en el estudio pormenorizado de las drogas. Se consideran únicamente las drogas anteriormente citadas, describiendo detenidamente su composición química, actividad biológica, mecanismos de acción, actividad antivírica, toxicidad, su metabolismo, farmacología clínica, métodos de detección en el organismo, uso clínico y contraindicaciones. Posteriormente, en los capítulos siguientes se aborda la quimioterapia de las enfermedades que han resultado sensibles al tratamiento por las drogas ya indicadas, agrupándolas en infecciones producidas por virus del grupo herpesvirus, del grupo poxvirus y de los grupos mixovirus y papovavirus. Aquí se comprenden enfermedades de tipo ocular, dérmico y respiratorio fundamentalmente, algunas de ellas de gran importancia, tanto por su carácter epidémico y pandémico en unos casos, cuanto por su evolución grave y aun fatal en otros.

Por todo lo expuesto anteriormente, consideramos que esta obra

es de utilidad para los médicos en general y especialmente los interesados en las enfermedades infecciosas, oftalmología, dermatología y neurología, así como los estudiantes de Medicina. Para el investigador en Virología es una obra importante de consulta, e imprescindible si ha abordado el estudio de la quimioterapia de las enfermedades producidas por virus.

A. GARCÍA GANCEDO

CHEMICAL MICROBIOLOGY. AN INTRODUCTION TO MICROBIAL PHYSIOLOGY, por *Anthony H. Rose*. 1976. Butterworths, Londres, Boston. X + 469 páginas.

En los once años transcurridos desde la primera edición, aparecida en 1965, la obra del Dr. A. H. Rose, fisiólogo microbiano inglés y autor de sólida experiencia, ha tenido una indudable demanda. La 1.^a edición se reimprimió en 1967 y en 1968 aparece la 2.^a edición, que se reimprimió también, en 1970.

La presente (3.^a) edición, que mantiene el mismo formato, es una actualización de la 2.^a; con la novedad de presentar, al final de cada capítulo, una lista razonable de revisiones recientes, creo que apropiadas, para los lectores que deseen ampliar los temas tratados.

De las 469 páginas que componen el texto, 46 están dedicadas a un excelente índice. A. H. Rose trata de una forma clara y concisa muchos de los temas que comprende el extenso campo de la Fisiología Microbiana. Los títulos de los capítulos del libro son los siguientes: Arquitectura molecular, El medio ambiente, Introducción al metabolismo microbiano, Transporte de compuestos hacia dentro y hacia fuera de los microorganismos, Metabolismo productor de energía, Gasto de energía: Biosíntesis, Regulación del Metabolismo, Crecimiento y supervivencia, y Diferenciación. Todos los temas son tratados con un planteamiento experimental, poco común en los libros de texto, y esto, junto al impecable estilo de exposición, hacen muy amena su lectura.

En resumen, «Chemical Microbiology» es un trabajo meritorio y una valiosa aportación para la formación de pregraduados y para todo aquel que desee iniciarse en la investigación de las actividades químicas de microorganismos.

Por otra parte, la presentación del volumen es poco atractiva. El papel, con cierto color, no contrasta debidamente con una letra pálida y pequeña. La rústica encuadernación se muestra deficiente: el ejemplar que manejamos no pudo resistir una cuidadosa manipulación; las cubiertas se despegaron del lomo en los primeros días de su lectura.

G. SIERRA

THE SURVIVAL OF VEGETATIVE MICROBES. Directores: T. R. G. Gay y J. R. Postgate. 1976. Cambridge University Press, Cambridge, Londres, Nueva York, Melbourne. X + 432 páginas.

Los microorganismos, igual que los demás seres vivos, encuentran en la biosfera una variedad de condiciones adversas y muchos de ellos son capaces de sobrevivirlas. Sobre los mecanismos de resistencia de las formas vegetativas de los microorganismos se conoce poco y aún menos sobre la transición a la muerte, a pesar de ser ésta la última respuesta metabólica.

Este libro contiene todas las ponencias presentadas al XXVI Simposio de la Society for General Microbiology, que tuvo lugar en Cambridge, en abril de 1976, y cuyo propósito fue recopilar las investigaciones de interés fundamental sobre los procesos que conducen a la muerte de las formas vegetativas de los microorganismos o les permiten sobrevivir en condiciones adversas que les impone la naturaleza o el hombre.

Catorce especialistas invitados contribuyeron al Simposio con revisiones inéditas muy completas, de una extensión media de veinticuatro páginas por trabajo. En general, están bien escritas, presentadas con autoridad y seguidas de una extensa bibliografía, con citas hasta el año 1975 inclusive, en la que observamos referencias a trabajos de algunos autores españoles.

Respecto a su contenido, cinco trabajos tratan de la supervivencia de microorganismos en términos generales: La transición de la vida a la muerte (J. R. Postgate), El metabolismo endógeno de los procariotas en ausencia de sustancias nutritivas (E. A. Dawes), La transición al estado de reposo de eucariotas (A. P. J. Trinci y C. F. Thurston), Las formas vegetativas de las bacterias que sobreviven en los animales (H. Smith) y en los suelos (T. R. G. Gray). Los

demás trabajos consideran los efectos de condiciones adversas más específicas: El «shock» por el frío y daños por congelación (R. A. Macleod y P. H. Calcott), La supervivencia de bacterias secas y del aire (R. E. Strange y C. S. Cox), La influencia de la presión osmótica (A. H. Rose), Las radiaciones ultravioletas e ionizantes (B. A. Bridges), La luz visible (N. I. Krinsky), El calor (N. E. Walker), La presión hidrostática y ambientes psicrófilos (R. Y. Morita), Ausencia de tiamina (K. A. Stacey) y Exposición a productos químicos (W. B. Hugo). Aunque algunos de los aspectos prácticos de estos temas relacionados con la Medicina, la Industria y la Agricultura han sido tratados en un simposio anterior organizado por la Society for Applied Bacteriology y publicados en 1975, no hay libro comparable en estos temas con «The Survival of Vegetative Microbes», volumen que ha de ocupar una posición singular en todas las bibliotecas que mantengan secciones de Microbiología.

La presentación del libro y su índice son excelentes, como es tradicional en esta magnífica serie de simposios que publica la Society for General Microbiology.

G. SIERRA