
VOLUMEN 32-33

1979-1980

Microbiología Española

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Director: Dr. Miguel Rubio, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirector: Dr. Angel G. Gancedo, Vicedirector 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
Identification of dense bodies appearing in <i>Chlorella</i> cultured in a medium with an ammoniacal salt as a source of nitrogen, by <i>M. Villarroya-Sánchez, M. Rodríguez-López</i> and <i>M.^a L. Muñoz-Calvo</i>	75
Contribution to the study of wine-film yeast. I, by <i>N. Khayyat, M. C. Esteban</i> and <i>V. Arroyo</i>	85
Contribution to the study of wine-film yeast. II, by <i>M. C. Esteban, N. Khayyat</i> and <i>V. Arroyo</i>	95
Characterization of rennin-like enzyme produced in submerged cultures of <i>Aspergillus niger</i> , by <i>M. S. Foda</i>	103
Eighth Spectroscopy National Meeting	115
International Meetings in Bogotá	115
Bibliography, by <i>M. Rubio, E. García, G. Tejerina, R. Beltrá</i> and <i>E. Ronda</i>	117

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 × 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.

I N D I C E

	Página
Control de las síntesis de ARN y proteínas por las hormonas vegetales en <i>Euglena gracilis</i> , por E. Fernández-Valiente y M. Rodríguez-López.	1
Acción de los ácidos indolacético y giberélico sobre la síntesis de paramilón en <i>Euglena gracilis</i> , por E. Fernández-Valiente y M. Rodríguez-López	11
Investigaciones sobre <i>Trichomonas foetus</i> , <i>in vitro</i> , por C. P. Christow ...	21
El lipopolisacárido y la endotoxina del <i>Pseudomonas viridiflava</i> , por M. Santaolalla	27
Desarrollo con epicilina de <i>Citrobacter intermedius</i> C3 y de una mutante no excretora de glutamato, por J. Ripoll, J. Vives-Rego, A. Juárez, J. Imperial y R. Parés	43
Capacidad enterotoxigénica y algunas propiedades relacionadas con este carácter en estafilococos aislados de leche mamítica, por M. L. García y B. Moreno	53
Desulfuración microbiana del carbón. I. Aislamiento e identificación de bacterias ferro- y sulfo-oxidantes, por M. C. Ruiz-Alares, B. Iñigo, V. Gómez-Aranda y J. M. Gavilán	65
Identificación de cuerpos densos que aparecen en <i>Chlorella</i> cultivada en un medio con una sal amoniacal como fuente de nitrógeno, por M. Villarroya-Sánchez, M. Rodríguez-López y M. ^a L. Muñoz-Calvo	75
Contribución al estudio de levaduras de velo. I, por N. Khayyat, M. C. Esteban y V. Arroyo	85
Contribución al estudio de levaduras de velo. II, por M. C. Esteban, N. Khayyat y V. Arroyo	95
Caracterización de una enzima de tipo rennina en cultivos sumergidos de <i>Aspergillus niger</i> , por M. S. Foda	103
8. ^a Reunión Nacional de Espectroscopia	115
Reuniones Internacionales en Bogotá	115
Bibliografía, por M. Rubio, E. García, G. Tejerina, R. Beltrá y E. Ronda.	117

C O N T E N T S

	Page
Control of RNA and proteins synthesis by plant hormones in <i>Euglena gracilis</i> , by E. Fernández-Valiente and M. Rodríguez-López	1
Action of indole-acetic acid and gibberellic acid on the paramylon synthesis in <i>Euglena gracilis</i> , by E. Fernández-Valiente and M. Rodríguez-López.	11
Investigations on <i>Trichomonas foetus</i> , <i>in vitro</i> , by C. P. Christow	21
The lipopolysaccharide and endotoxin from <i>Pseudomonas viridiflava</i> , by M. Santaolalla	27
Growth with epicillin of <i>Citrobacter intermedius</i> C3 and a non glutamate-excreting mutant, by J. Ripoll, J. Vives-Rego, A. Juárez, J. Imperial and R. Parés	43
Enterotoxigenicity and some related properties of staphylococci isolated from mastitic milk, by M. L. García and B. Moreno	53
Microbial desulfurization of coal. I. Isolation and identification of iron oxidizing and sulfur oxidizing bacteria, by M. C. Ruiz-Alares, B. Iñigo, V. Gómez-Aranda and J. M. Gavilán	65

Continúa en 2.^a de cubierta

CONTROL DE LAS SINTESIS DE ARN Y PROTEINAS POR LAS HORMONAS VEGETALES EN *EUGLENA GRACILIS*

por

E. FERNANDEZ-VALIENTE y M. RODRIGUEZ-LOPEZ

INTRODUCCION

Desde que en 1954 Skoog sugirió que la acción de las fitohormonas o sustancias de crecimiento vegetal está íntimamente ligada al metabolismo de los ácidos nucleicos, se han presentado numerosas pruebas de que efectivamente dichas sustancias estimulan la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en numerosas especies de vegetales superiores (7). Asimismo, en estos últimos años se ha prestado gran atención al mecanismo por el cual las auxinas estimulan las síntesis de ARN y proteínas. Los trabajos de Teissere y colaboradores (13) y Guilfoyle y colaboradores (4) ponen de manifiesto que este mecanismo supone una estimulación de la actividad de la enzima ARN-polimerasa por distintos tipos de auxinas.

Sin embargo, en contraste con la amplitud de los trabajos realizados en plantas superiores, poco se sabe de cómo actúan estas hormonas vegetales sobre las criptógamas no vasculares.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio parecen indicar que también en el caso de la microalga *Euglena gracilis* las hormonas vegetales podrían actuar a través de un control del proceso de transcripción.

En el presente trabajo se estudia la acción de dos tipos distintos de hormonas vegetales, sobre la síntesis de ARN y proteínas en células y cloroplastos de *Euglena gracilis*, así como su efecto sobre la actividad ARN-polimerasa del alga.

MATERIALES Y METODOS

Como material vivo se utilizó *Euglena gracilis* cepa Z, crecida en el medio de Hutner y colaboradores (6), gaseada con aire que contenía un 2 % de CO₂, con luz y temperatura constante de 24 °C.

Las sustancias de crecimiento vegetal utilizadas fueron el ácido indolacético (AIA) a las concentraciones, según el caso, de 5-10 y 20 ppm, y el ácido giberélico (AG₃) a las concentraciones, también según el caso, de 20-25 y 50 ppm.

La síntesis de ARN en sistemas celulares se estudió midiendo la incorporación de 0,2 µCi/ml de ³H-uridina de actividad específica 26 Ci/mM. A las 2 h, 24 h y 48 h se tomaron partes alícuotas de 1 ml que se llevaron sobre 4 ml de TCA 6,25 % a 0 °C durante 2 h. A continuación se filtraron los tubos sobre membranas Whatman GF/A lavando con TCA 5 % y ácido acético glacial 1 %. Los filtros se secaron en estufa y se leyó su radiactividad con líquido de centelleo tolueno-butil-PBD en un Liquid Scintillation Spectrometer Packard.

Para el estudio de la síntesis de proteínas se siguió el mismo método que para el ARN, sustituyendo la ³H-uridina por ³H-leucina de actividad específica 57 Ci/mM.

Para la obtención de extractos con actividad ARN-polimerasa, seguimos el método de Babinet (1), excepto el paso de columnas de DEAE-Sephadex. La valoración de proteínas se realizó por el método de Lowry (8). El ensayo de la actividad ARN-polimerasa se estudió por la conversión de ³H-UTP en material insoluble en ácido, en un sistema que contenía: 0,05 M tris HCl, pH 7,8; 0,3 M CTP; 0,3 M ATP; 3 mM GTP; 10 mM 2-mercaptoetanol; 12 mM MgCl₂; 2,5 mM MnCl₂; 20 µM ³H-UTP de actividad específica 50 Ci/mM; 25 µg de ADN de timo de ternera y 0,02 ml del extracto de la enzima.

Los sistemas se incubaron a 37 °C durante 10 min. El ARN formado se precipitó con TCA 5 %. Se filtraron los tubos a través de filtros Whatman GF/A lavando con TCA 5 %. Los filtros se secaron en estufa y se leyó su radiactividad con líquido de centelleo tolueno-butil-PBD.

Para la obtención de cloroplastos de *Euglena gracilis* seguimos el método de Eisenstadt (3). Para el estudio de las síntesis de ARN y proteínas en los cloroplastos aislados se resuspendieron éstos en

un tampón que contenía: 10^{-2} M tris HCl, pH 7,6; 4 mM $MgCl_2$; 1 mM 2-mercaptoetanol y 10 % de sacarosa. Las síntesis de ARN y proteínas se estudiaron midiendo la incorporación de, respectivamente, 0,2 μ Ci/ml de 3H -uridina de actividad específica 26 Ci/mM y de 0,2 μ Ci/ml de ^{14}C -leucina de actividad específica 331 mCi/mM, por un método análogo al descrito para los sistemas celulares.

RESULTADOS

La incorporación de 3H -uridina a la fracción ARN de células de *Euglena gracilis* tratadas con distintas concentraciones de AIA o AG_3 , se encuentra fuertemente estimulada si la comparamos con la que presentan células del alga no tratadas con ninguna de las dos fitohormonas (*cuadro 1*). Asimismo, la incorporación de 3H -leucina a la fracción proteica de células sometidas al tratamiento con cualquiera

Cuadro 1. Acción del AIA y AG_3 sobre la incorporación de 3H -uridina en la fracción ARN de E. gracilis. Los resultados se expresan en porcentajes

Sustancia	Concentración ppm	2 h	24 h	48 h
Control		100	100	100
AIA	5	81	142	146
AIA	10	87	208	228
AIA	20	83	120	128
AG_3	5	80	145	157
AG_3	20	80	170	188
AG_3	50	85	193	202

de las dos hormonas, se encuentra estimulada frente a la incorporación que presentan las células no tratadas (*cuadro 2*). En uno y otro caso la estimulación se aprecia para tiempos de marcaje largos (24 h y 48 h).

Estos resultados parecen indicar, que al igual que sucede en las plantas superiores, en *Euglena gracilis* el efecto primario del AIA es sobre la síntesis de ARN y subsecuentemente sobre la síntesis de

proteínas. Asimismo, el AG₃ parece actuar de forma análoga a como lo hace el AIA. Para confirmar estos hechos, se pasó a estudiar el efecto de ambas sustancias de crecimiento sobre la actividad de la enzima ARN-polimerasa.

Cuadro 2. Acción del AIA y AG₃ sobre la incorporación de ³H-leucina en la fracción proteica de E. gracilis. Los resultados se expresan en porcentajes

Sustancia	Concentración ppm	2 h	24 h	48 h
Control		100	100	100
AIA	5	97	147	146
AIA	10	88	210	183
AIA	20	91	132	122
AG ₃	5	88	165	159
AG ₃	20	87	178	183
AG ₃	50	86	203	238

En un primer paso se estudió el efecto que ambas fitohormonas determinaban sobre una fracción proteica, obtenida a partir de células no tratadas previamente con ninguna de las dos sustancias, que contenía la enzima. Los resultados indican que no se registra estimulación de la actividad polimerasa por ninguna de las dos hormonas y a ninguna de las concentraciones estudiadas (*cuadro 3*).

Cuadro 3. Efecto del AIA y AG₃ sobre la actividad de la ARN-polimerasa procedente de células normales de E. gracilis

Sustancia	Concentración ppm	Monofosfato de uridina UMP pmol	Porcentaje
Control		4,30	100
+ AIA	1	4,18	97
+ AIA	10	4,27	99
+ AG ₃	5	4,45	103
+ AG ₃	50	4,18	97

Sin embargo, cuando se compara la actividad de la enzima procedente de células no tratadas con la que presentan las procedentes de células tratadas durante 48 h con AIA o AG₃, se ve claramente que las obtenidas de células tratadas con cualquiera de las dos sustancias de crecimiento vegetal, presentan una actividad ARN-polimerasa muy superior a la que presenta la obtenida a partir de células no tratadas (cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de la actividad de la ARN-polimerasa procedente de células normales de *E. gracilis* y células tratadas con AIA o AG₃

Sustancia	Concentración ppm	pmol UMP/mg proteína	Porcentaje
Control		21,39	100
AIA	10	54,67	255
AG ₃	50	34,43	160

En los cloroplastos aislados de *Euglena gracilis*, al contrario de lo que ocurre con las células intactas, ninguna de las dos fitohormonas estimula la incorporación de precursores marcados a las fracciones ARN y proteínas (cuadros 5-6).

Cuadro 5. Acción del AIA y AG₃ en la incorporación de ³H-uridina en la fracción ARN de cloroplastos de *E. gracilis*. Los resultados se expresan en porcentajes

Sustancia	Concentración ppm	30 min	120 min	24 h
Control		100	100	100
AIA	10	93	97	101
AIA	20	100	94	105
AG ₃	25	83	101	102
AG ₃	50	95	98	102

Cuadro 6. Acción del AIA y AG₃ en la incorporación de ¹⁴C-leucina en la fracción proteica de cloroplastos de *E. gracilis*. Los resultados se expresan en porcentajes

Sustancia	Concentración ppm	30 min	120 min	24 h
Control		100	100	100
AIA	10	102	96	104
AIA	20	102	103	104
AG ₃	25	102	100	97
AG ₃	50	103	103	101

DISCUSION

Los resultados que presentamos en este trabajo indican la existencia de un paralelismo en el modo de acción de las dos hormonas vegetales estudiadas, por lo menos en lo que se refiere al alga *Euglena gracilis*.

Tanto el AIA como el AG₃ inducen en las células del alga una estimulación de las síntesis de ARN y proteínas, detectable después de largos períodos de incubación. El mecanismo por el cual las dos hormonas inducen la estimulación de la síntesis de ARN, es similar al que presentan las auxinas en plantas superiores (4, 10, 13), es decir, el incremento en la síntesis de ARN es debido a que ambas hormonas estimulan la actividad de la enzima ARN-polimerasa.

Esta estimulación se manifiesta al comparar la actividad de enzimas procedentes de células tratadas con AIA o AG₃ con las procedentes de células no tratadas. Pero, sin embargo, no se manifiesta cuando se suministran directamente las hormonas al extracto que contiene la enzima. Esto quiere decir que es necesaria la presencia intacta de la célula para que las hormonas manifiesten su acción sobre la enzima.

El hecho de que sea necesaria la presencia intacta de la célula, parece indicar que ambas hormonas no modulan directamente la actividad de la enzima, sino a través de algún factor o mecanismo

activador existente en la célula, que podría ser similar a los obtenidos por distintos autores en plantas superiores (2, 5, 11-12, 14).

Como consecuencia del incremento en la síntesis de ARN, se produce una elevación de los niveles del mismo, que se traduce en un aumento de la síntesis de proteínas con el objeto de mantener un crecimiento equilibrado.

Al contrario de lo que ocurre en las células intactas, en los cloroplastos de *Euglena gracilis* no se detecta estimulación de la síntesis de ARN y proteínas por ninguna de las dos fitohormonas. Si consideramos conjuntamente estos resultados con los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (9), en los que se veía que las rifamicinas inhibían la ARN-polimerasa del cloroplasto de *E. gracilis* mientras que no afectaban la síntesis de ARN nuclear, parece lógico pensar en la existencia de una marcada diferencia de las propiedades de ambos tipos de ARN-polimerasas, cloroplástica y nuclear, diferencias que se señalan por su distinto comportamiento, tanto frente a sustancias inhibitorias de su actividad, como frente a sustancias estimuladoras de la misma.

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

Cuando se tratan células de *Euglena gracilis* con ácido indolacético o ácido giberélico, las síntesis de ARN y proteínas del alga se ven estimuladas. Los extractos celulares procedentes de células tratadas con AIA o AG₃ presentan una actividad ARN-polimerasa muy superior a la que presentan las procedentes de células control. Sin embargo, cuando se añaden las hormonas directamente a extractos procedentes de células control, no se registra estimulación de la transcripción.

Las síntesis de ARN y proteínas de cloroplastos aislados del alga, no se ven estimuladas por ninguna de las dos hormonas vegetales.

SUMMARY

*Control of RNA and proteins synthesis by plant hormones
in Euglena gracilis*

When *Euglena gracilis* cells are treated with indole-acetic acid or gibberellic acid, RNA and proteins synthesis is stimulated. Extracts procedents of cells treated with IAA or GA₃ present an activity RNA-polymerase higher than the one presented by control cells. Nevertheless, when the hormones are directment added to extracts from control cells, it's not registred stimulation of transcription.

RNA and proteins synthesis in chloroplasts is not stimulated by anyone of two plant hormones.

BIBLIOGRAFIA

1. BABINET, C. 1967. A new method for the purification of RNA-polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 639-44.
2. CLARK, J. E.; MORRE, D. J.; CHERRY, J. H., and YUNGHANS, W. N. 1976. Enhancement of RNA-polymerase activity by non protein components from plasma membranes of soybean hypocotyls. *Plant Sci. Lett.*, **7**, 233-38.
3. EISENSTADT, J., and BRAWERMAN, G. 1963. The incorporation of aminoacids into the protein of chloroplasts and chloroplasts ribosomes of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 319-21.
4. GUILFOYLE, T. J.; LIN, C. Y.; CHEN, Y. M.; NAGAO, R. T., and KEY, J. L. 1975. Enhancement of soybean RNA-polymerase I by auxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 69-72.
5. HARDIN, J. W.; CHERRY, J. H.; MORRE, D. J., and LEMBI, C. A. 1972. Enhancement of RNA-polymerase activity by a factor released by auxin from plasma membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3146-50.
6. 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.
7. KEY, J. L. 1969. Hormones and nucleic acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**, 449-74.
8. 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.
9. MUÑOZ-CALVO, M. L. 1972. Acción de las rifamicinas sobre algas y cloroplastos. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.

10. O'BRIEN, T. J. ; JARVIS, B. C. ; CHERRY, J. H., and HANSON, J. B. 1968. Enhancement by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid of chromatin RNA-polymerase in soybean hypocotyl tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, **169**, 35-43.
11. RIZZO, P. J. ; PEDERSEN, K., and CHERRY, J. H. 1977. Stimulation of transcription by a soluble factor isolated from soybean hypocotyl by 2,4-D affinity chromatography. *Plant Sci. Lett.*, **8**, 205-11.
12. TEISSERE, M. ; PENON, P. ; AZOU, Y., and RICARD, J. 1976. On the mode of action of transcription factors in higher plants. *Plant Sci. Lett.*, **6**, 49-55.
13. TEISSERE, M. ; PENON, P., and RICARD, J. 1973. Hormonal control of chromatin availability and of the activity of purified RNA-polymerases in higher plants. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, **30**, 65-70.
14. TEISSERE, M. ; PENON, P. ; VAN HUUSTEE, R. B. ; AZOU, Y., and RICARD, J. 1975. Hormonal control of transcription in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **402**, 391-402.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (CSIC)
UNIDAD DE FICOLOGIA MICROBIANA Y PROTOZOOLOGIA

ACCION DE LOS ACIDOS INDOLACETICO Y GIBERELICO SOBRE LA SINTESIS DE PARAMI- LON EN *EUGLENA GRACILIS*

por

E. FERNANDEZ-VALIENTE y M. RODRIGUEZ-LOPEZ

INTRODUCCION

Los estudios sobre la acción de las hormonas vegetales o sustancias de crecimiento en algas unicelulares se han visto limitadas, en la mayoría de los casos, a sus efectos sobre los fenómenos de crecimiento celular. Poco se sabe, sin embargo, sobre cómo pueden afectar dichas hormonas a otros fenómenos metabólicos de las algas unicelulares.

Algunos autores han visto en plantas superiores que las sustancias de crecimiento vegetal pueden actuar, a través de mecanismos enzimáticos, en los procesos de síntesis y degradación de polisacáridos, tanto de reserva como estructurales (8).

En el presente trabajo se estudia el efecto de distintos tipos de hormonas vegetales sobre la síntesis de paramilon, polisacárido de reserva de *Euglena*.

MATERIALES Y METODOS

Como material vivo se utilizó *Euglena gracilis* cepa Z, procedente de la Colección de Algas y Protozoos, de la Escuela de Botánica de la Universidad de Cambridge.

Las células crecieron en autotrofismo, en el medio de Hutner y colaboradores (6), gaseadas con aire conteniendo un 2% de CO₂ e iluminadas permanentemente con luz Fluora (Osram) y a una temperatura de 24 °C.

Las sustancias de crecimiento utilizadas fueron ácido indolacético (AIA), a las concentraciones de 10 y 20 ppm, y ácido giberélico (AG₃), a las concentraciones de 10, 20 y 50 ppm.

Para determinar la síntesis total de hidratos de carbono nos basamos en el método de la antrona (2), adaptándolo a nuestro caso. La extracción de los hidratos de carbono se realizó con potasa al 30 %, en baño de agua hirviente, durante 1 h. Se precipitaron con etanol al 95 %, en baño de agua hirviente, en dos pases sucesivos.

En los experimentos en los que se añadió actinomicina D, el antibiótico se suministró a la concentración de 20 µg/ml, 30 min antes de añadir la hormona correspondiente. Las determinaciones de proteínas y ARN se realizaron, respectivamente, por los métodos de Lowry (7) y de Ogur y Rosen (9).

Para el estudio al microscopio electrónico, las células fueron recogidas por centrifugación y lavadas sucesivamente en solución de Milloning, prefijadas en glutaraldehído y postfijadas en tetraóxido de osmio al 2 %. El material fue deshidratado con acetona, una porción de la cual contenía acetato de uranilo como contraste. Posteriormente, las células fueron incluidas en araldita, siguiendo el método de Glauert (3).

RESULTADOS

Las células de *Euglena gracilis* sometidas a un tratamiento con 20 ppm de AIA o con 50 ppm de AG₃, presentan al microscopio óptico un embolsamiento en el polo posterior de la célula, que se encuentra cargado con gran número de gránulos de paramilon (*figuras 1-3*).

Al microscopio electrónico se confirman las observaciones anteriores, en el sentido de que en el citoplasma de las células tratadas tanto con AIA como con AG₃, aparecen gran número de gránulos de paramilon (*figuras 4-5*).

Al determinar los niveles de hidratos de carbono en las células de *Euglena gracilis* sometidas al tratamiento con distintas concentraciones de las dos hormonas, se observó que las células tratadas con cualquiera de ellas presentaban unos niveles de hidratos de carbono muy superiores a los de las células que no habían sido sometidas al tratamiento. El incremento en los niveles de hidratos de carbono está

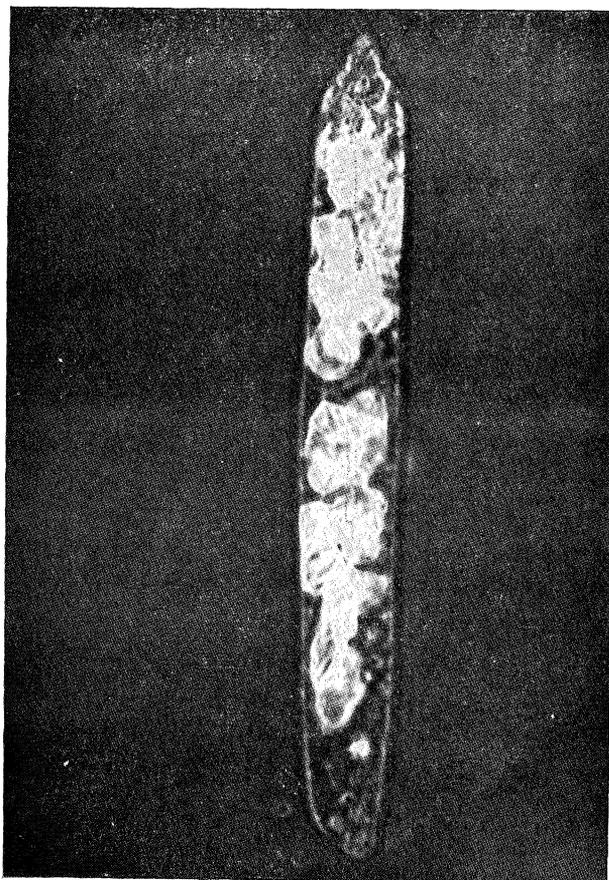


Figura 1. Células normales de Euglena (microscopio óptico)



*Figura 2. Células de Euglena tratadas con 20 ppm de AIA
(microscopio óptico)*



*Figura 3. Células de Euglena tratadas con 50 ppm de AG₃
(microscopio óptico)*

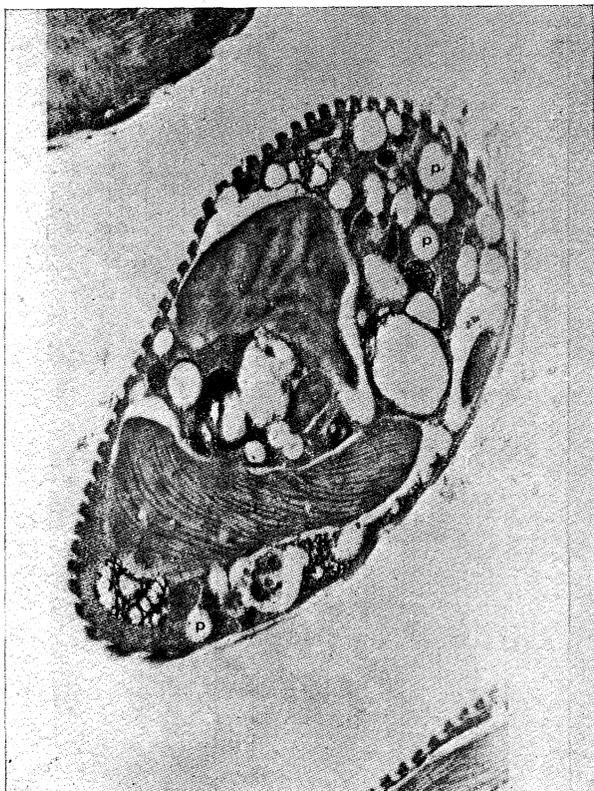


Figura 4. Célula de Euglena tratada durante 48 h con 20 ppm de AIA

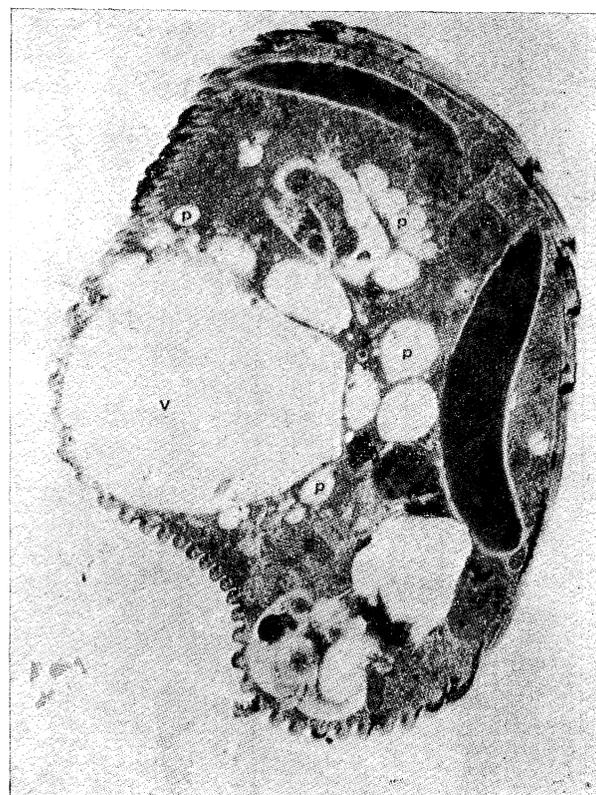


Figura 5. Célula de Euglena tratada durante 48 h con 50 ppm de AG₃

en relación directa con la concentración de la sustancia de crecimiento y llega, en el caso óptimo, a duplicar los valores control (*cuadro 1*).

Cuadro 1. Aumento de los hidratos de carbono (Hc) totales, hallados en células de E. gracilis tratadas con AIA y AG₃

Sustancia	Concentración ppm	24 h		72 h	
		mg Hc/100 mg células	Porcentaje	mg Hc/100 mg células	Porcentaje
Control		14,10	100	15,37	100
AIA	10	16,27	115	18,77	122
AIA	20	25,68	167	32,26	210
AG ₃	10	18,30	130	23,98	156
AG ₃	20	19,34	137	27,08	176
AG ₃	50	23,25	165	34,81	220

Este aumento va acompañado de un incremento no tan marcado de los niveles de proteínas y ARN (*cuadro 2*).

Cuadro 2. Efecto del AIA y AG₃ sobre los niveles de proteínas y ARN. Los resultados se expresan en porcentaje

Sustancia	Concentración ppm	24 h		72 h	
		ARN	Proteínas	ARN	Proteínas
Control		100	100	100	100
AIA	10	124	133	131	130
AIA	20	136	143	149	143
AG ₃	10	115	116	118	120
AG ₃	20	122	120	128	122
AG ₃	50	125	123	130	127

Cuando se bloquea la transcripción por adición del antibiótico actinomicina D, se elimina el efecto estimulador de ambas sustancias de crecimiento sobre la síntesis de paramilón del alga (*cuadro 3*).

Cuadro 3. Efecto de la actinomicina D sobre los niveles de hidratos de carbono de células de *E. gracilis* tratadas con AIA y AG₃ durante 24 h

Sustancia	Concentración ppm	mg Hc/100 mg células	Control %
Control		14,82	100
Control + act. D		12,74	86
AIA	20	25,51	172
AIA	20 + act. D	12,48	82
AG ₃	50	24,32	164
AG ₃	50 + act. D	13,80	93

DISCUSION

Los estudios microscópicos ponen claramente de manifiesto que las células de *Euglena gracilis* responden al tratamiento hormonal con un incremento muy acusado de paramilon, polisacárido de reserva típico de este género de algas. El citoplasma de la célula se carga de gránulos de dicho polisacárido, que aparecen en cavidades carentes de membrana envolvente, hecho que ya había sido puesto de manifiesto por otros autores (1); en dichos gránulos no se aprecia ningún tipo de estructura interna, hecho que probablemente está relacionado con la dificultad de fijación del paramilon y la subsecuente pérdida de material durante el proceso de corte de los bloques (1).

Los resultados obtenidos por métodos bioquímicos confirman los estudios microscópicos. El alto índice de incremento de los niveles de hidratos de carbono que presentan las células tratadas tanto con AIA como con AG₃, se refleja en la acumulación del polisacárido de reserva en el citoplasma.

El hecho de que los niveles de proteínas y ARN sean asimismo estimulados por el tratamiento hormonal, parece indicar la existencia de una relación entre el incremento en los niveles de paramilon y los niveles de proteínas y ARN.

En plantas superiores, tanto las auxinas como las giberelinas inducen la síntesis de enzimas específicas relacionadas directamente con

el metabolismo de los hidratos de carbono (8). Este hecho nos hace pensar que en el caso de *Euglena gracilis*, el incremento en la síntesis de paramilon podía ser debido a la inducción por el AIA y el AG₃ de un aumento en la síntesis de la enzima paramilon-sintetasa, posiblemente a través de la estimulación de un ARN mensajero específico para la enzima.

El hecho de que cuando se bloquea la transcripción con actinomicina D se suprime el efecto estimulador de ambas hormonas sobre los niveles de paramilon, parece apoyar la hipótesis anterior; hipótesis que, por otra parte, está de acuerdo con los resultados obtenidos por diferentes investigadores (4-5, 10-11) en el sentido de la existencia de un control de la transcripción por las auxinas.

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. Es de destacar la aportación de sus conocimientos y dominio en los métodos y técnicas de microscopia electrónica aplicados en esta publicación.

RESUMEN

El tratamiento con ácido indolacético o ácido giberélico produce en las células de *Euglena gracilis* un incremento en la síntesis del polisacárido de reserva del alga, incremento que se refleja en una acumulación de granos de paramilon en el citoplasma de la célula y en los niveles totales de hidratos de carbono.

El tratamiento previo con actinomicina D anula los efectos estimulatorios inducidos por ambas hormonas vegetales.

SUMMARY

Action of indole-acetic acid and gibberellic acid on the paramylon synthesis in Euglena gracilis

The treatment with indole-acetic acid or gibberellic acid produce in the *Euglena gracilis* cells an increment in the paramylon synthesis ;

increment which is reflected in the paramylon grains accumulation in cell cytoplasm, and in the total level of carbohydrates.

The previous treatment with actinomycin D avoided the stimulant effects induced by both plant hormones.

BIBLIOGRAFIA

1. BUETOW, D. E. 1968. Morphology and ultrastructure of *Euglena*. En D. E. BUETOW (ed.). The Biology of *Euglena*, 1, 109-84. Academic Press, New York.
2. CARROLL, N. V.; LANGLEY, R. W., and ROE, J. H. 1956. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. J. Biol. Chem., 220, 583.
3. GLAUERT, A. M., and GLAUERT, R. H. 1958. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 191-94.
4. GUILFOYLE, T. J.; LIN, C. Y.; CHEN, Y. M.; NAGAO, R. T., and KEY, J. L. 1975. Enhancement of soybean RNA polymerase I by auxin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 69-72.
5. HARDIN, J. W.; CHERRY, J. H.; MORRE, D. J., and LEMBI, C. A. 1972. Enhancement of RNA polymerase activity by a factor released by auxin from plasma membrane. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3146-50.
6. 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.
7. 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.
8. MILLER, C. O. 1970. Plant hormones. En G. LITWACK (ed.). Biochemical Actions of Hormones, 1, 503-18. Academic Press, New York.
9. OGUR, M., and ROSEN, G. 1950. The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxyribose nucleic acid and ribose nucleic acid. Arch. Biochem., 25, 262.
10. TEISSERE, M.; PENON, P., and RICARD, J. 1973. Hormonal control of chromatin availability and of the activity of purified RNA polymerases in higher plants. FEBS. Let., 30 65-70.
11. TEISSERE, M.; PENON, P.; VAN HUYSSTEE, R. B.; AZOU, Y., and RICARD, J. 1975. Hormonal control of transcription in higher plants. Biochim. Biophys. Acta, 402, 391-402.

FACHHOCHSCHULE HILDESHEIM (BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND)
SEMINAR FÜR SOZIALHYGIENE

INVESTIGATIONS ON *TRICHOMONAS FOETUS* IN VITRO

by

C. P. CHRISTOW

INTRODUCTION

The development of parasites (protozoa and others) and the detrimental effect on the macroorganism are, on the one hand, favoured by certain properties of the parasite and, on the other hand, inhibited by various preventive mechanisms in the host. The properties of the parasite are, among others, its constitution and disposition (1), infectivity and toxicity as a product of this own metabolism. The effect of the parasite on the host may be restricted to the withdrawal of biosubstances (metabolites for macroorganism and microorganism alike), which are immediately absorbed by the parasite or decomposed to form split products due to the secretion of ferments. In many cases, the parasitic infestation leads to functional disorders in the host by blocking the exchange of substances or by the decomposition of the infected tissue. If the metabolites secreted by the parasites work as toxins, antimetabolites respectively (e. g. hyaluronidase) on the macroorganism, the phenomenon disease of the host may be the result. The metabolite or antimetabolite relation between parasite and host depends largely on whether and to what extent the host manages to fight the parasite (as antimetabolite). Thus, the dualistic character of some metabolites —as transition stage from metabolite to antimetabolite macro- or microorganism— is able to manifest itself. Any analytical elucidation of the biological connections between macro- and microorganism requires an investigation into the relation between certain individual metabolites and micro-

organism. In this treatise, we have made it our business to examine the relation between some vitamine - like substances and *Trichomonas foetus*.

METHODOLOGY

The material and methodology and development of the *Trichomonas* has been extensively described by Christow (1-4). It is wellknown that fresh isolates do not behave with uniformity as far growth and reaction on therapeutic compounds are concerned. Therefore we only used defined broods in our *in vitro* experiments. The *Trichomonas* were using a nutrition compound according to Feinberg and Whittington (Oxoid L 27, pH 6.4). We carried out the investigation using the antagonists berolase, rhizopterin and arachidonic acid in concentrations of 0.01, 0.05 — 6.0 mg/ml. From each concentration, 10 sets of control tubes were prepared in a nutrition compound to Feinberg and Whittington. From each tube, one drop (0.01 ml) of the precipitate was taken every 24 h and examined microscopically and statistically evaluated. When an inhibiting effect took place samples of the last positive tubes and the first negative tubes were placed in subcultures. Evaluations were taken daily until the cultures died.

RESULTS

1. The test series using berolase and rhizopterin demonstrated influence on the *Trichomonas* culture.

2. The development of the *Trichomonas* to which arachidonic acid in concentrations up to 0.25 mg/ml had been added was comparable to the development of *Trichomonas* in the control tubes. In higher concentrations an inhibiting reaction was indicated as a result of the concentration level.

The course of the inhibiting reaction is shown in *figure 1*. The control culture has grown well (*figure 2*).

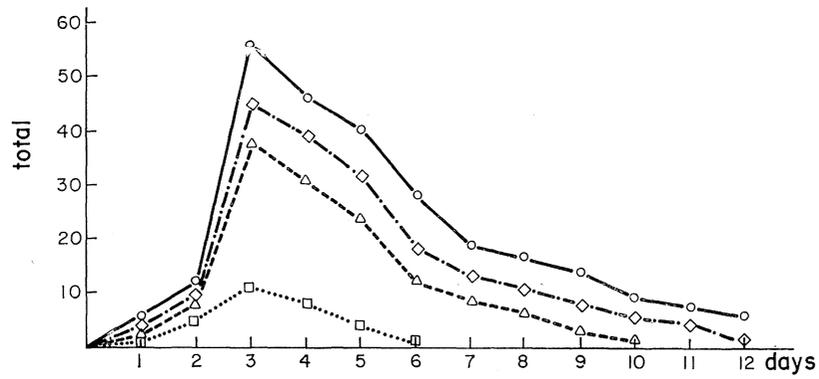


Figure 1. Influence of arachidonic acid on the growth of the *T. foetus*. —, control; ---◇---, 0.25 mg/ml; ---△---, 0.80 mg/ml;□...., 1.60 mg/ml

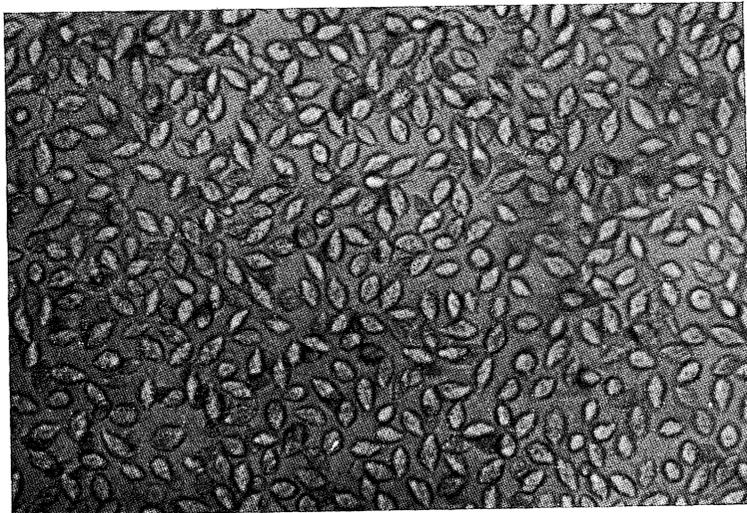


Figure 2. *T. foetus*. 250 ×

DISCUSSION

In view of the results, polyen acids (unsaturated acids) are of special interest. Fungistatic (6) and bacteriostatic (5) properties of the fatty acids have frequently been detected. Weitzel (7) held the view that it is not the number of the double linkages that is responsible for the tuberculostatic and fungistatic effect, but the length of the chain. In this series, earlier tests, too, showed that linolic acid and linoleic acid obstruct the increase of *Trichomonas vaginalis* (3). In the present examinations an obstructive effect of arachidonic acid of *Trichomonas foetus* could also be proved in a similar way. Further tests in combination with obstructive metabolites seem to be expedient.

SUMMARY

The vitamine-like substances used in our experiments showed various relationships to the pathogenic protozoa *Trichomonas foetus*. Berolase and rhizopterin exercised no recognizable influence on the *T. foetus*. Arachidonic acid had a suppressive effect on the growth of *Trichomonas*.

RESUMEN

Investigaciones sobre Trichomonas foetus, in vitro

De las tres sustancias empleadas, la berolasa y la rizopterina mostraron cierto efecto sobre *T. foetus*, y el ácido araquidónico, en concentraciones elevadas, produjo una acción inhibitoria del crecimiento.

REFERENCES

1. CHRISTOW, P. C. 1971. Zum Problem der protozoischen individuellen Disposition. Zool. Beitr., 17, 151
2. CHRISTOW, P. C. 1971. Experimentelle Studien mit Metaboliten und Antimetaboliten. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg., 217, 381.

3. CHRISTOW, P. C. 1971. Versuche mit Polyensäuren. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg., 218, 128.
4. CHRISTOW, P. C. 1973. Betrachtungen über die reaktionskinetischen Wachstumsvorgänge bei Trichomonaden. Arch. Vet. Ital., 24, 155.
5. DUBOS, R. I. 1950. The effect of organic acids on mammalian tubercle bacilli. J. Exp. Med., 92, 319.
6. ROTMAN, S.; SMILJANIC, A. M., and WEITKAMP, A. W. 1946. Mechanism spontaneous of the *Microsporon auduini*. Science, 104, 201.
7. WEITZEL, G. 1950. Die biologische Sonderstellung der Fettsäuren mittlerer Kettenlänge. Deut. Med. Wochenschr., 75, 1616.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (CSIC)
UNIDAD DE VIROLOGIA VEGETAL

EL LIPOPOLISACARIDO Y LA ENDOTOXINA DEL *PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA*

por

M. SANTAOLALLA

INTRODUCCION

Continuando el estudio del lipopolisacárido de microorganismos patógenos de plantas, en la actualidad estudiamos la endoxina (antígeno de Boivin) y el lipopolisacárido del *Pseudomonas viridiflava*.

El objeto de haber escogido un *Pseudomonas* patógeno de plantas para el estudio de su endotoxina y lipopolisacárido resulta, principalmente, de la existencia de muchos trabajos sobre el lipopolisacárido de *Ps. aeruginosa*, especialmente los realizados por los grupos de Wilkinson y de Eagon, y así poder comparar las diferencias en cuanto a los lipopolisacáridos de microorganismos patógenos del hombre y animales superiores y otro mismo género causante de enfermedades en plantas.

MATERIALES Y METODOS

Empleamos el *Pseudomonas viridiflava* 2012 procedente de la Colección de Bacterias Fitopatógenas, de Harpenden (Inglaterra). Se comprobó su virulencia por inoculación a *Phaseolus vulgaris*.

El lipopolisacárido lo extraemos por el método de Westphal y Jann (20); hacemos la purificación por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa, como indicamos en trabajos anteriores (14-15).

Extraemos la endotoxina total según el procedimiento de Boivin

y colaboradores (5) modificado en 1974 por Tsang y colaboradores (18).

Los cortes ultrafinos del *Pseudomonas viridiflava* los realizamos fijando las células con tetraóxido de osmio el 2 %, en tampón de palade, adicionado de 0,01 % de cloruro cálcico, deshidratando en acetona e incluyendo en durcupan. Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo LKB y se tiñeron con citrato de plomo.

Las observaciones de la suspensión acuosa del lipopolisacárido al microscopio electrónico fueron hechas en forma de tinciones positivas y negativas, de la forma indicada en anteriores trabajos (15). La endotoxina se observó después de sombreada con oro-paladio. Las microfotografías electrónicas fueron realizadas con el Microscopio Siemens Elmiskop I, del Centro de Investigaciones Biológicas.

El espectro infrarrojo del lipopolisacárido, después de prolongada desecación sobre P_2O_5 , fue realizado a una concentración del 3 % en comprimido de BrK, en un espectrómetro de Beckman del Departamento «J. C. Mutis», del Instituto «A. J. Cavanilles». Agradecemos al Dr. Carreras su colaboración.

Las constantes de sedimentación del lipopolisacárido se realizaron en la ultracentrifuga analítica Beckman-Spinco modelo E., del Centro de Investigaciones Biológicas. Agradecemos al Sr. Albendea su valiosa colaboración.

La ausencia de ácidos nucleicos la comprobamos mediante curvas de absorción en la zona correspondiente con el espectrofotómetro Unicam S.P.500.

El nitrógeno lo determinamos usando el método de Micro-Kjeldhal; el fósforo, según el método de Fiske y Subbarow (6).

Los carbohidratos se determinaron por el método de la antrona, de Morris modificado por Trevelyan y Harrisón (17).

Las cromatografías sobre papel y placa fina fueron realizadas por distintos métodos como indicamos en trabajos anteriores (13-14).

RESULTADOS

Acción sobre el huésped-bacteria normal

El *Pseudomonas viridiflava* 2012 empleado en nuestros estudios tiene forma bacilar, es móvil y está provisto de 1 ó 2 flagelos polares; sus principales huéspedes son distintas especies de *Phaseolus*.

El microorganismo inoculado en el tallo de una planta joven de *Phaseolus vulgaris* se desarrolla rápidamente e invade todos los tejidos, destruyéndolos a su paso y originando una lesión necrótica del tamaño de 2 a 3 cm, alrededor del punto de inoculación, observándose una fina línea de demarcación entre el tejido muerto y sano; sin embargo, el tejido sano empieza a formar una agalla que a menudo alcanza doble tamaño que el tallo original. En el sitio de la inoculación produce una zona ligeramente hundida de color castaño.

Ultraestructura

Las figuras 1-2 muestran microfotografías electrónicas en forma de tinción negativa de *Pseudomonas viridiflava* antes y después de separada la endotoxina, en las que se aprecian diferencias manifiestas.

Los cortes ultrafinos del *Pseudomonas viridiflava* antes y después de la extracción de la endotoxina muestran que después de la eliminación de la endotoxina, la capa más externa ondulada y con algunas protuberancias de forma vesicular, desaparece (figuras 3-4).

La endotoxina observada al microscopio electrónico después de sombreada con oro-paladio (figura 5) aparece en forma de esferillas y filamentos longitudinales.

En el lipopolisacárido sin purificar, observado en forma de tinción positiva, se aprecian superficies subredondeadas en las cuales la estructura trilaminar es perfectamente visible. Una vez purificado, según indicamos en la parte correspondiente a materiales y métodos, el lipopolisacárido del *Pseudomonas viridiflava*, cuando se observa al microscopio electrónico en forma de tinción positiva, aparece en general en forma de filamentos y en ocasiones se aprecian cintas más largas, en las cuales y sobre todo en determinados sitios, se ve perfec-

tamente una estructura trilaminar formada por tres capas, las dos exteriores más densas al paso de los electrones, y una interior de mayor espesor y menos densa a los electrones (*figura 6*).

El mismo lipopolisacárido observado en tinción negativa, aparece en forma de vesículas de distintos tamaños, donde la estructura trilaminar sólo se puede observar en muy escasos fragmentos.

Cuando el lipopolisacárido purificado y a la concentración de 5 mg/ml en solución tampón de ClNa 0,15 M y ácido cítrico 0,015 M, pH 7,2-7,3, lo tratamos con EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético) en caliente, aparece, al ser observado al microscopio electrónico en tinción positiva, en forma de pequeños fragmentos con estructura trilaminar muy marcada, que corresponde, como a continuación veremos, a la subunidad S_{20} 0,5 S (*figura 7*).

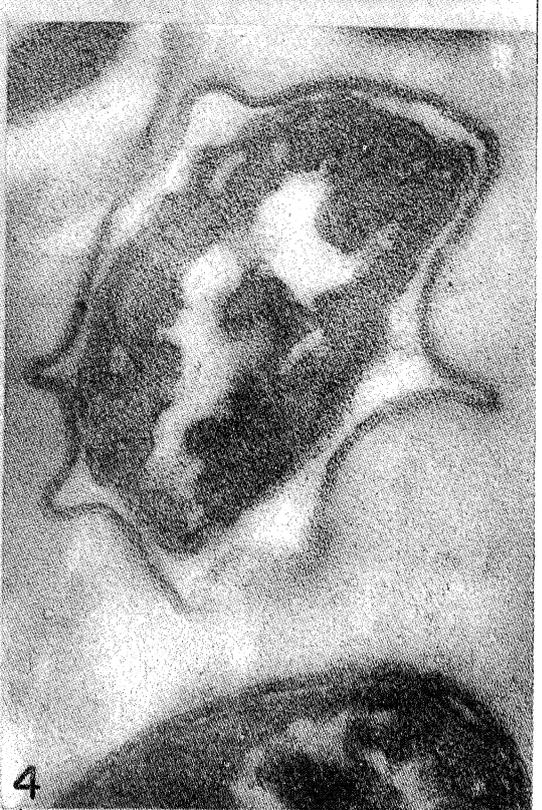
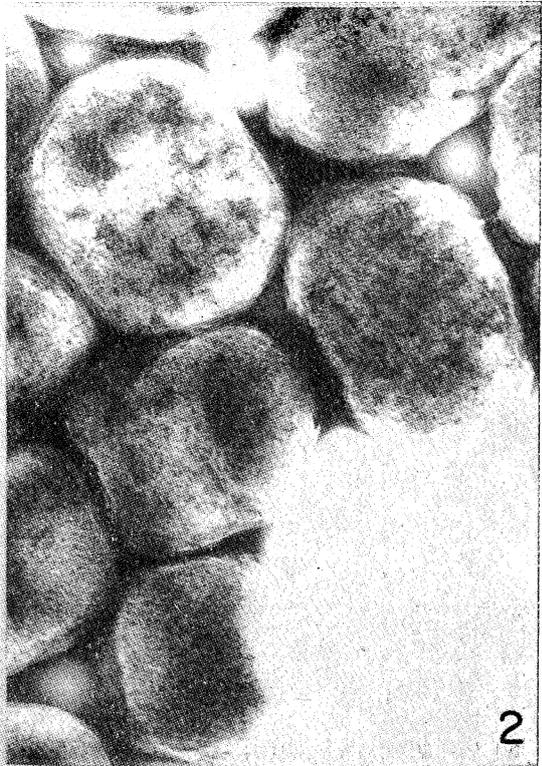
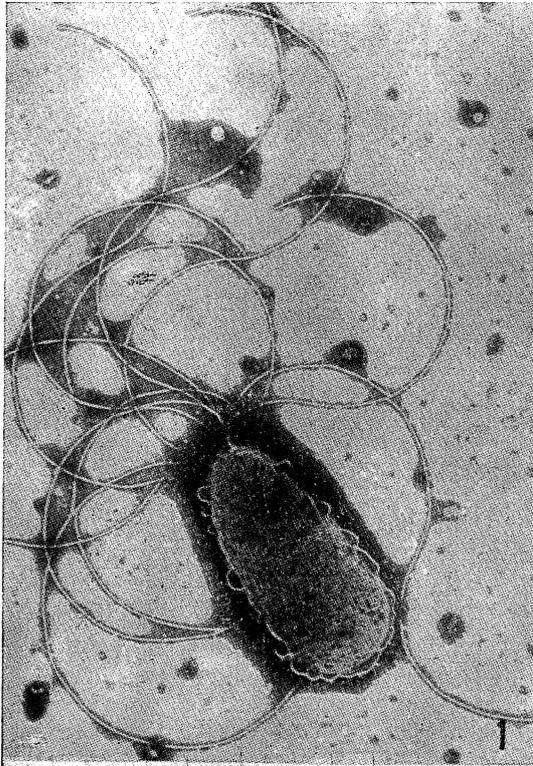
Constantes de sedimentación del lipopolisacárido

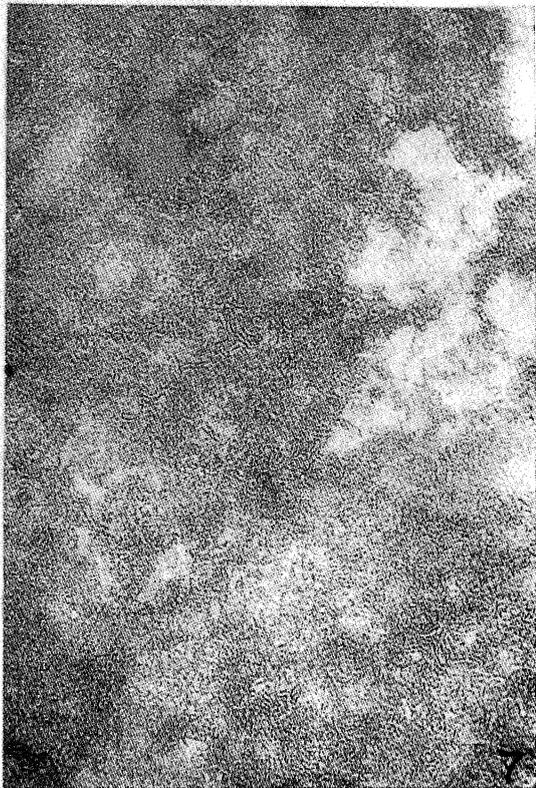
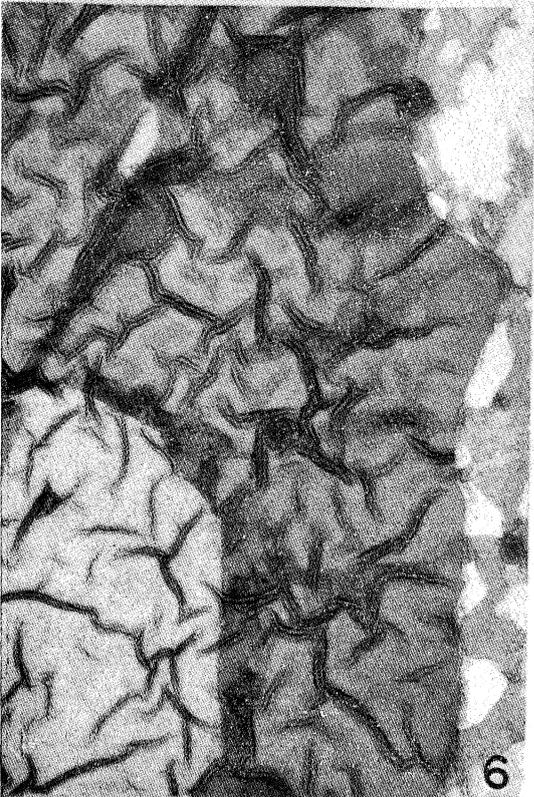
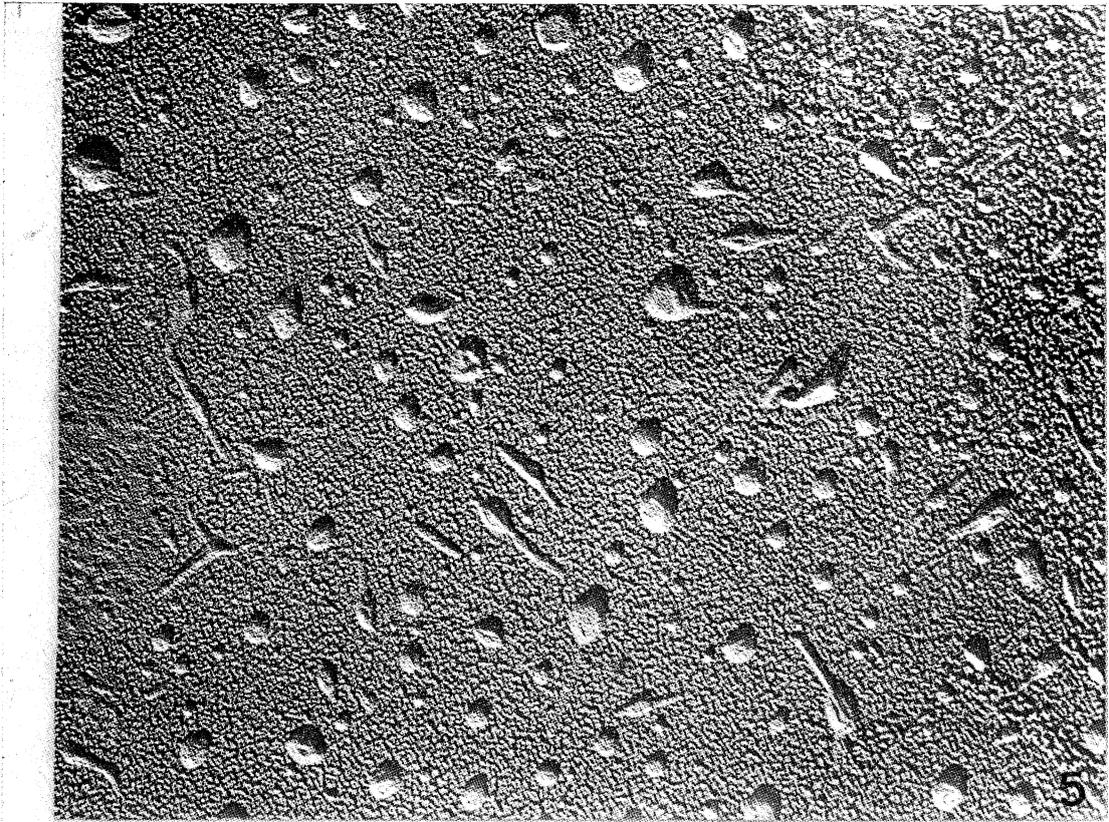
Realizamos distintas pruebas en la ultracentrífuga analítica con el fin de determinar el coeficiente de sedimentación del lipopolisacárido, empleando concentraciones diferentes del mismo, también el calentamiento previo, diversos tampones y finalmente EDTA y calor. En las primeras pruebas siempre encontramos dos picos en la ultracentrifugación y solamente después del empleo del EDTA logramos obtener un solo pico. A continuación reseñamos las condiciones experimentales y resultados.

Determinación núm. 1 (carrera 129); solución acuosa a la concentración de 3 mg/ml... S_{20w} 81,8 S y 402 S.

Determinación núm. 2 (carrera 130); solución acuosa a la concentración de 5 mg/ml... S_{20w} 77,8 S y 426 S.

Figura 1. Microfotografía electrónica del Pseudomonas viridiflava, tinción negativa. $\times 25.500$ (cortesía de la Dra. Cabezas de Herrera). Figura 2. Microfotografía electrónica del P. viridiflava después de extraída la endotoxina, tinción negativa. $\times 45.900$. Figura 3. Corte ultrafino de P. viridiflava. $\times 42.636$. Figura 4. Corte ultrafino del P. viridiflava después de extraída la endotoxina. $\times 122.400$





Después de calentarlo en solución acuosa, en estufa, desde 25° a 90 °C paulatinamente, durante 43 min y manteniéndolo a 90 °C durante 5 min.

Determinación núm. 3 (carrera 131), concentración 3 mg/ml... S_{20W} 46,7 S y 404 S.

Determinación núm. 4 (carrera 132), concentración 5 mg/ml... S_{20W} 48,6 S y 420 S.

Determinación núm. 5 (carrera 136), tampón de ClNa 0,15 M, concentración de 7,5 mg/ml... 71 S y 410 S.

Determinación núm. 6 (carrera 137), tampón de ClNa 0,15 M y ácido cítrico 0,015 M, concentración de 7,5 mg/ml... 65 S y 307 S.

Determinación núm. 7 (carrera 138), la determinación igual al núm. 6, NaOH hasta pH 7,2... 23,7 S y 176 S.

Determinación núm. 8 (carrera 150), tampón de ClNa 0,015 EDTA (20 mg) y calentando a 125 °C... S_{20W} y 0,5 S.

En la determinación núm. 4 (carrera 132) se determinaron las áreas de los picos con objeto de conocer la proporción correspondiente a cada uno de los coeficientes de sedimentación que aparecen, resultando un 66,6 % para el correspondiente a S_{20W} 48,6 S y un 33,3 % para el S_{20W} 420 S.

Las figuras 8-9 muestran los más significativos de los picos obtenidos según las condiciones empleadas.

Espectrofotometría ultravioleta e infrarroja

Sometemos la endotoxina total purificada y el lipopolisacárido también purificado al análisis espectrofotométrico en la zona ultravioleta, principalmente para demostrar la ausencia de ácidos nucleicos detectables. Empleamos soluciones acuosas diluidas obteniéndose la curva que recoge la figura 10, que demuestra la ausencia de ácidos nucleicos.

Figura 5. Microfotografía electrónica de la endotoxina total purificada extraída del P. viridiflava sombreada con oro-paladio. × 43.200. Figura 6. El lipopolisacárido purificado del P. viridiflava, tinción positiva. × 68.000. Figura 7. El mismo lipopolisacárido tratado con EDTA en caliente, subunidad S_{20W} y 0,5 S, tinción positiva. × 102.000

El espectro de absorción infrarrojo del lipopolisacárido en BrK al 3 % aparece como un espectro pobre (*figura 11*); la banda ancha a 3.400 cm^{-1} la podemos interpretar como resultado de la recíproca asociación a través de enlace de hidrógeno, de los respectivos grupos —NH , y O—H y C = O . La ausencia de bandas de absorción a lo

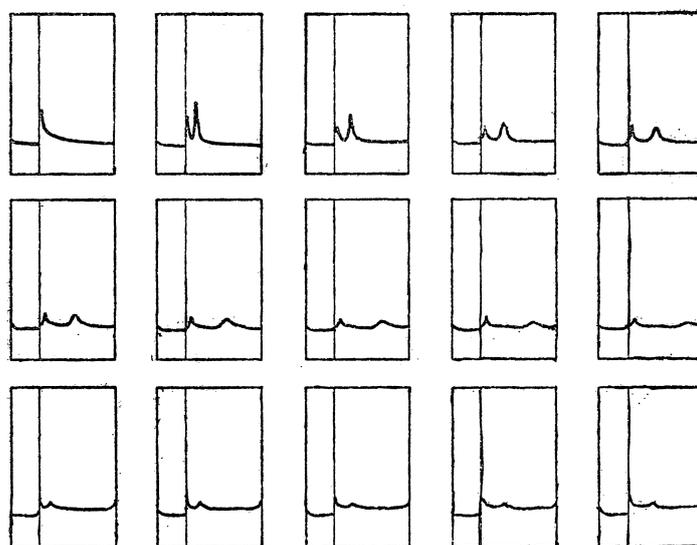


Figura 8. Carrera 132

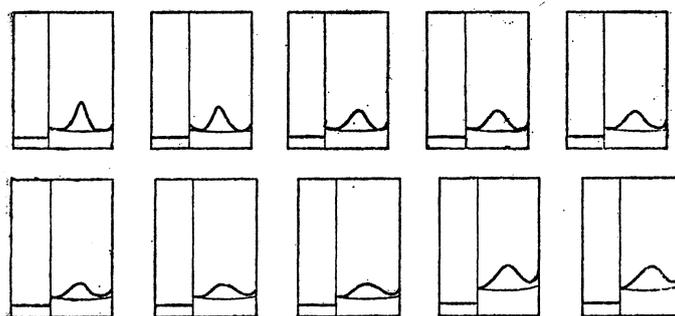


Figura 9. Carrera 150

largo del intervalo de 3.100 a 3.000 cm^{-1} , señala la ausencia de grupos aromáticos; tal ausencia viene confirmada por la carencia de bandas en la zona 870 a 670 cm^{-1} . (Absorción de las vibraciones de deformación fuera del plano del C—H aromático.) El grupo de bandas

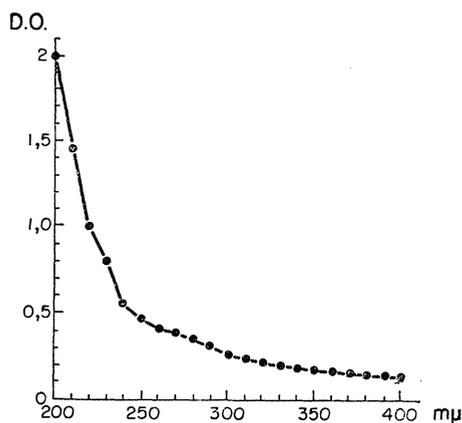


Figura 10

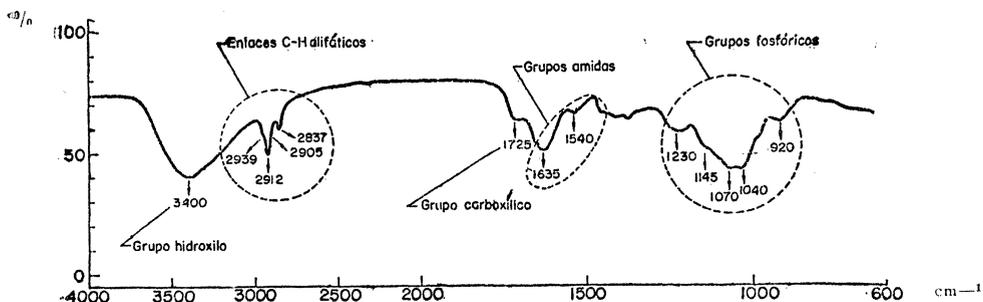


Figura 11

2.935 a 2.837 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de tensión, simétricas y asimétricas de los enlaces C—H alifáticos. A nuestro entender, la banda 1.725 cm^{-1} corresponde al grupo carboxilo —COO— y se superpone parcialmente a la banda I de las amidas (correspondiente al enlace peptídico); la banda II de las amidas (mezcla de las vibraciones de deformación del plano del grupo —N—H y de las tensiones del

grupo —C—N) debe asignarse a 1.635 y 1.540 cm^{-1} , respectivamente. Las bandas 1.230, 1.145, 1.070 y 920 cm^{-1} pueden interpretarse en función de la existencia de grupos fosfóricos.

Resultados químicos previos y porcentajes

Los resultados obtenidos en cuanto a porcentajes de endotoxina y lipopolisacárido de *Pseudomonas viridiflava*, referidos a peso seco, del microorganismo fueron los que se exponen a continuación.

Para la extracción de la endotoxina partimos de 15 g de microorganismos liofilizados, obteniendo 0,55 g de endotoxina total purificada, equivalente a un 3,66 %.

Obtenemos el lipopolisacárido por el método de Westphal y Jann, partiendo de 5,48 g de microorganismos liofilizados, obteniendo 0,798 g de lipopolisacárido bruto seco, equivalente a un 14,56 %, que después de purificado y liofilizado quedó reducido a un peso de 0,0962 g, equivalente a un 1,73 % de lipopolisacárido puro.

Actualmente estamos tratando de determinar la estructura química y composición de ambas sustancias, por lo que nuestros resultados en este aspecto son, hasta la fecha, muy escasos.

En cuanto a la endotoxina, hemos encontrado un contenido en proteínas solubles en álcalis, del 7,13 %. Los azúcares totales, según el método de la antrona, correspondieron al 29,7 %; los monosacáridos identificados actualmente son glucosa, galactosa, ramnosa y glucosamina; aparecen otras dos manchas sensitivas al revelar el cromatograma sobre papel con plata alcalina, con unos Rf respecto a la glucosa, de 0,46 y 1,86, que todavía no hemos logrado identificar con seguridad.

El lipopolisacárido tiene un contenido en nitrógeno del 2,35 %, y en fósforo, del 3,9 %; sus azúcares totales corresponden a un 26,2 % y los identificados hasta el momento se corresponden exactamente con los encontrados en la endotoxina.

DISCUSION

En los cortes ultrafinos de *Pseudomonas viridiflava* se aprecia perfectamente una doble unidad de membrana que, antes de extraer la

endotoxina, está recubierta en su parte externa por una fina capa exterior ondulada y con vesículas proyectadas hacia el exterior; esta capa más externa es la que desaparece durante la extracción de la endotoxina (figuras 2-4). La membrana citoplasmática también se aprecia perfectamente en determinadas zonas.

No conocemos ningún trabajo sobre la pared celular del *Pseudomonas viridiflava*; sin embargo, ya Salton (12), en el año 1964 indica la complejidad que presenta en algunas especies de *Pseudomonas* y la gran proporción que representa en cuanto a peso seco del *Ps. aeruginosa*. Estudios más modernos realizados en el año 1973 sobre la ultraestructura de la pared celular del *Ps. aeruginosa* L 24 por Weiss y Fraser (19), revelan la existencia de dos capas convexas en la pared celular y partículas dentro de la capa interior hidrofóbica; en las áreas de la capa libre de partículas aparecen a veces estructuras elevadas en forma de cúpula. El grupo de Eagon (8), en el mismo año, en estudios sobre la pared celular del *Ps. aeruginosa* estirpe OSU 64, que es precisamente donde se encuentra localizada la endotoxina, señala la existencia de una capa, la más externa, cóncava, formada a su vez por dos capas distintas; a continuación, una convexa, el mucopéptido responsable de la rigidez celular y, por último, la membrana citoplasmática, también compuesta por varias capas. El mismo grupo de Eagon, en 1974 (7), trabajando con el mismo *Pseudomonas*, comprueba la eliminación de parte de la capa más externa, cóncava, por tratamiento de las células con EDTA que, como sabemos, también elimina parte del lipopolisacárido de muchos microorganismos gram-negativos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por nosotros al comparar la ultraestructura de los cortes del *Ps. viridiflava* antes y después de la extracción de la endotoxina, donde se aprecia la eliminación de la capa más exterior de la pared celular del microorganismo. La ultraestructura de la endotoxina (también denominada antígeno de Boivin) resultó semejante a la encontrada por nosotros en trabajos anteriores sobre las endotoxinas del *Agrobacterium tumefaciens*, formas normal y L y *Erwinia carotovora* (16). Estructuras similares en forma de partículas redondas y bastoncillos fueron identificados por Beer y colaboradores (4) en la endotoxina obtenida por el método de Boivin del *Escherichia coli* 0:113, quienes señalaron distinta actividad biológica para cada una de los tipos de partículas,

resultando mucho más tóxicas las de mayor peso molecular. Marsh y Walker (10) estudian la ultraestructura de la endotoxina libre de *E. coli* 078 K 80, y encuentran una serie de partículas iguales orientadas en forma de bastoncillos semejantes a los que consideraron como la endotoxina nativa, no degradada, formada por un complejo proteína-lipopolisacárido. En el año 1968, Rogers y colaboradores (11) estudian la morfología al microscopio electrónico de un complejo proteína-lipopolisacárido extraído de las paredes del *Ps. aeruginosa* encontrando las referidas formas de esferillas y bastoncillos, sugiriendo que éstos estaban formados por las partículas esféricas alineadas en formas rectilíneas. (Cosa que nosotros no creemos, pues no aparece prueba alguna de ello; estimamos que son dos componentes distintos.)

De lo anteriormente expuesto, podemos intuir fácilmente que la endotoxina estudiada por nosotros no presenta diferencias ultraestructurales manifiestas al ser comparada con otras endotoxinas de microorganismos gram-negativos.

En cuanto a la ultraestructura del lipopolisacárido extraído por el método de Westphal y Jann y purificado según señalamos en la parte correspondiente a materiales y métodos, su estructura trilaminar es perfectamente manifiesta cuando se observa bajo la forma de tinción positiva; por no repetir diversas consideraciones señaladas en otros trabajos, suprimimos esta parte de la discusión; y solamente queremos llamar la atención sobre las microfotografías que exponemos.

La *figura 6* representa una tinción positiva del lipopolisacárido de *Pseudomonas viridiflava*: este lipopolisacárido presenta dos picos distintos sometido a la ultracentrifugación analítica en distintos disolventes (véanse resultados); la *figura 7* corresponde a la ultraestructura que presenta el mismo lipopolisacárido del *Ps. viridiflava* sometido al tratamiento de calor y EDTA y que ya presenta en la ultracentrifugación analítica un solo pico con un coeficiente de sedimentación de $S_{20} 0,5 S$. La impresión es como si la macromolécula hubiese sido descompuesta en subunidades menores y ya semejantes, las cuales mientras se encontraban agregadas en mayor o menor cantidad darían lugar a la heterogeneidad típica del lipopolisacárido, que ya señalamos en otro trabajo.

El lipopolisacárido purificado lo sometemos al análisis en la ultra-

centrífuga con objeto de estudiar la homogeneidad del complejo macromolecular, nuestros resultados muestran la presencia de dos picos, más o menos simétricos, de distinto tamaño, que parecen confirmar la existencia de dos estados distintos de agregación molecular.

Empleando distintos tampones tampoco conseguimos lograr un solo coeficiente de sedimentación, lo cual solamente fue obtenido mediante la fuerte degradación de la macromolécula empleando el calor y EDTA. Este pico, con una constante de sedimentación el S 0,5 S, pudiera representar la sub-unidad de la macromolécula compleja del lipopolisacárido del *Pseudomonas viridiflava*.

Hannecart-Pokorni y colaboradores (9) encuentran por degradación del lipopolisacárido de *Shigella flexneri* F 65 serotipo 5 con dodecilsulfato sódico al 4 %, una subunidad con un coeficiente de sedimentación de 10,2 S y con un peso molecular de 25.000.

En el año 1974, el grupo Tsang (18) somete a la ultracentrifugación analítica la parte soluble en agua del lipopolisacárido de *Serratia marcescens*, extraído de su endotoxina total con fenol-agua, consiguiendo un solo pico simétrico con un coeficiente de sedimentación de S_{20w} 1,4. Al mismo tiempo, los autores confirman la acción degradativa de las soluciones de fenol al 45 % en caliente, debida principalmente a la acción sobre un enlace entre la mitad lipídica y la proteína, aunque la acción degradativa también se manifiesta en la parte polisacárida.

Rogers y colaboradores (11) estudian mediante la ultracentrifugación analítica un complejo proteína-lipopolisacárido liberado de las paredes celulares de *Pseudomonas aeruginosa* por incubación con EDTA, obteniendo un pico asimétrico incorrecto con un coeficiente de sedimentación de 4,1 S.

Lo anteriormente expuesto parece indicar la dificultad de determinar el coeficiente de sedimentación del lipopolisacárido de los microorganismos gram-negativos, sobre todo, cuando se encuentra en forma de macromolécula compleja, que nosotros creemos sea debido a su heterogeneidad y a su poca solubilidad en agua u otros disolventes no degradantes.

Los espectros de absorción en la zona ultravioleta de la endotoxina y lipopolisacáridos del *Pseudomonas viridiflava* son semejantes (véanse resultados); ambos ponen de manifiesto la ausencia de áci-

dos nucleicos; también son análogos a otros encontrados por nosotros correspondientes a los lipopolisacáridos de *Agrobacterium tumefaciens* formas normal y L, y de la *Erwinia carotovora*.

El análisis infrarrojo del lipopolisacárido purificado del *Pseudomonas viridiflava* corresponde a un espectro pobre en el que se descubren algunos grupos típicos de los lipopolisacáridos de microorganismos gram-negativos.

Existen pocos datos sobre estudios infrarrojos del lipopolisacárido, pero comparando la curva que proporciona nuestro espectro de infrarrojos con las obtenidas por Adams y colaboradores (1-3) para espectros infrarrojos del lipopolisacárido de diversas especies de *Neisseria*, se encuentran, como era de esperar, semejanzas muy notables. Lo mismo sucede cuando se compara con el espectro del infrarrojo del lipopolisacárido de *Serratia marcescens*, estudiado por Tsang y colaboradores (18).

El porcentaje de endotoxina del *Pseudomonas viridiflava* fue del 3,66; en anteriores trabajos, nosotros hemos encontrado porcentajes de 3,40 para la endotoxina del *Agrobacterium tumefaciens* y de 4 para la *Erwinia carotovora* (15). En cuanto al lipopolisacárido purificado, hallamos un 1,73 %, y el de los otros microorganismos, también patógenos de plantas, correspondió a 1,39 y 0,92, respectivamente; tanto los porcentajes de endotoxina como de lipopolisacárido son referidos a peso seco del microorganismo.

El grupo de Wilkinson (21) estudia el lipopolisacárido de distintas especies de *Pseudomonas* y da distintos porcentajes del lipopolisacárido, comprendido entre el 9,3 y 23,2, pero referidos a la pared del microorganismo.

En cuanto a la composición química del lipopolisacárido de *Pseudomonas viridiflava*, nuestros estudios se encuentran actualmente en período inicial; los hasta ahora encontrados (véanse resultados), podemos considerarlos similares a todos los lipopolisacáridos de microorganismos gram-negativos, por lo que hasta la obtención de mayor número de datos experimentales, consideramos no significativa cualquier discusión.

RESUMEN

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la morfología al microscopio electrónico de LPS y endotoxina procedentes de *Pseudomonas viridiflava* es semejante a la de los de otros microorganismos gram-negativos; lo mismo sucede respecto a su espectro infrarrojo. Que su estado de agregación no homogéneo nos impide determinar un coeficiente de sedimentación que permitiese calcular su peso molecular aproximado.

SUMMARY

The lipopolysaccharide and endotoxin from Pseudomonas viridiflava

The morphology and ultrastructure of the LPS as well as the endotoxin obtained from *Pseudomonas viridiflava* was studied by electron microscopy and infrared spectra; both morphology and spectra were similar to those obtained for other Gram-negative animal pathogens.

The sedimentation coefficient of LPS was not determined due to its aggregation state.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, G. A. 1971. Structural investigations on a cell-wall lipopolysaccharide from *Neisseria sicca*. Can. J. Biochem., **49**, 243-50.
2. ADAMS, G. A.; KARTER, M.; SHAW, D. H., and YAGUCHI, M. 1968. Studies on the chemical constitution of cell-wall lipopolysaccharides from *Neisseria perflava*. Can. J. Biochem., **46**, 1175-84.
3. ADAMS, G. A.; TORNABENE, T. G., and YAGUCHI, M. 1969. Cell wall lipopolysaccharides from *Neisseria catarrhalis*. Can. J. Microbiol., **15**, 365-74.
4. BEER, H.; BRUDE, A. J., and BRINTON (Jr.), C. C. 1966. A study of particle size, shapes and toxicities in a Boivin-type endotoxic preparation. Ann. N. Y. Acad. Sci., **133**, 450-75.
5. BOIVIN, A.; MESROBEANU, I., et MESROBEANU, L. 1933. Technique pour la preparation des polysaccharides microbiens specifiques. C. R. Soc. Biol., **133**, 490-92.
6. FISKE, C. H., and SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., **66**, 375-400.

7. GILLELAND (Jr.), H. E.; STINNETT, J. D., and EAGON, R. G. 1974. Ultrastructural and chemical alteration of the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa*. Associated with resistance to ethylenediaminetetraacetate resulting from growth in a Mg²⁺-deficient medium. *J. Bacteriol.*, **117**, 302-11.
8. GILLELAND (Jr.), H. E.; STINNETT, J. D.; ROTH, I. L., and EAGON, R. G. cell wall of an ethylenediaminetetraacetate-extractable component. *J. Bacteriol.*, **113**, 417-32.
9. HANNECART-POKORNI, E.; DEKEJEL, D.; DEPUYDT, F., and DIRK, J. 1970. Study of the structure of *Shigella flexneri* O antigen. I. Chemical degradation. II. Physicochemical aspect. *Biochim. Biophys. Acta*, **201**, 155-78.
10. MARSH, D. G., and WALKER, P. D. 1968. Free endotoxin and non-toxic material from Gram-negative bacteria: Electron microscopy of fractions from *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **52**, 125-30.
11. ROGERS, S. W.; GILLELAND (Jr.), H. E., and EAGON, R. G. 1968. Characterization of a protein-LPS complex released from cell walls *Pseudomonas aeruginosa* by ethylenediaminetetraacetic acid. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 743-48.
12. SALTON, M. R. J. 1964. *The Bacterial Cell Wall*. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, London, New York.
13. SANTAOLALLA, M. 1971. Estructura y composición química del lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, **24**, 243-56.
14. SANTAOLALLA, M. 1972. Estructura y composición química del lipopolisacárido de la forma L fija del *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, **25**, 179-94.
15. SANTAOLALLA, M. 1974. El lipopolisacárido de los microorganismos gram-negativos y patógenos de plantas. *Rev. Real Acad. Cienc. Exactas Fis. Natur. Madrid*, **78**, 357-94.
16. SANTAOLALLA, M., y ESPLÁ, M. D. 1973. Ultraestructura y composición química del antígeno de Boivin (endotoxina). *Microbiol. Españ.*, **26**, 1-20.
17. TREVELYAN, W. E., and HARRISON, J. S. 1952. Studies on yeast metabolism. I. Fraction and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.*, **50**, 298-403.
18. TSANG, J. C.; WANG, C. S., and ALAUPOVIC, P. 1974. Degradative effect of phenol on endotoxin and lipopolysaccharide preparations from *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, **117**, 786-95.
19. WEISS, R. L., and FRASER, D. 1973. Surface structure of intact cells and spheroplast of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **113**, 963-68.
20. WESTPHAL, O., and JANN, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 83-91.
21. WILKINSON, S. F.; GALGRAITH, L., and LIGHTFOOT, G. A. 1973. Cell walls: lipids and lipopolysaccharides of *Pseudomonas* species. *Eur. J. Biochem.*, **33**, 158-74.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTÓ DE MICROBIOLOGIA

DESARROLLO CON EPICILINA DE *CITROBACTER INTERMEDIUS* C3 Y DE UNA MUTANTE NO EXCRETORA DE GLUTAMATO

por

J. RIPOLL, J. VIVES-REGO, A. JUAREZ, J. IMPERIAL y R. PARÉS

INTRODUCCION

Citrobacter intermedius C3 es una bacteria previamente descrita, caracterizada por excretar ácido glutámico cuando el crecimiento tiene lugar en un medio mineral con glucosa. El control de esta excreción y su variabilidad entre elementos excretores y no excretores en la población silvestre, está asociada a un factor extracromosómico (factor S) transmisible por conjugación. Se dispone en la actualidad de diversas mutantes que difieren en el *status* episómico y en el modelo de excreción de ácido glutámico, posibilitando de este modo estudios genéticos, bioquímicos y morfológicos en relación con el factor S (5, 7-8).

En el presente trabajo se expone el efecto de varias β -lactamas sobre el crecimiento de la cepa silvestre C3 y una mutante curada del factor S, estableciéndose un comportamiento diferencial entre ambas. La epicilina produce cambios morfológicos semejantes a los descritos por otros antibióticos a concentraciones subinhibitorias (2-3, 6). Sin embargo, el efecto diferencial ocasionado sobre la cepa mutante con respecto a la silvestre puede estar relacionado con el carácter no excretor de la primera.

MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas

Citrobacter intermedius C3 es la cepa silvestre cuyas características de aislamiento, sistemáticas, genéticas y de excreción de ácido glutámico se han descrito previamente. Presenta una banda de ácido desoxirribonucleico plasmídico por centrifugación en cloruro de cesio y bromuro de etidio. La mutante CBC 315 se ha obtenido por tratamiento con N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina, requiere prolina para su crecimiento y no presenta la banda de ácido desoxirribonucleico plasmídico característica de la cepa silvestre, no excretando glutamato ni a nivel colonial ni en medio líquido (1, 5, 7-8).

Medios y condiciones de crecimiento

La determinación del crecimiento se efectúa por absorción a 500 nm empleando un aparato Coleman Junior mod. 6/20 en tubos de 25/150 mm con 15 ml de medio y 1 ml de inóculo. La incubación se efectúa a 30 °C en un baño de Gallemkamp con agitación (80 oscilaciones/min y 4 cm de recorrido) durante 4 h en el caso de la cepa silvestre y 6 h con la cepa CBC 315. El medio utilizado tiene la siguiente composición en g/l: glucosa, 20; CINH₄, 7; PO₄H₂K, 1; SO₄Mg, 0,5; tris (hidroximetil)-aminometano-HCl 0,05 M, pH 7,2. Epicilina (Squibb), ampicilina (Britapen) y penicilina G sódica (Sigma) se utilizan a concentraciones finales que oscilan entre 5 y 1.000 µg/ml.

La inhibición producida por los antibióticos utilizados se expresa como porcentaje de inhibición obtenida a la concentración del antibiótico de ensayo, considerando el 100 % del crecimiento al desarrollo obtenido sin antibiótico.

Observaciones microscópicas

Se utiliza un microscopio Wild M20 dotado con un equipo completo de contraste de fases y un equipo fotográfico automático Wild

MKa5. Las observaciones a campo claro se realizan con un microscopio Leitz Dialux, dotado con una cámara fotográfica Leica y un fotómetro Leitz Microsix L. La película utilizada para las fotografías a contraste de fases es Kodak Tri-X (27 DIN) y para campo claro Kodak Panatomic (16 DIN). Las observaciones a campo claro se efectúan previa tinción con cristal violeta (según Hucker) durante 2 min y lugol 30 s.

RESULTADOS

a) Efecto de β -lactamas en el crecimiento

Se ha estudiado la inhibición del crecimiento provocada por la epicilina, ampicilina y penicilina G sódica, a través del desarrollo del cultivo medido por densidad óptica. El antibiótico ya se ha incorporado al medio de cultivo cuando se efectúa la inoculación. La *figura 1* refleja el comportamiento diferencial de la cepa silvestre C3 y la cepa CBC 315 frente a las tres β -lactamas utilizadas. La epicilina es la droga que produce una inhibición diferencial más notable entre las dos cepas, debido a la mayor resistencia que exhibe la cepa CBC 315 a este antibiótico. Por este motivo la epicilina ha sido la β -lactama elegida para acometer los estudios de morfología diferencial entre la cepa silvestre C3 y la cepa CBC 315. El tiempo de incubación empleado representa el 50-80 % de la fase logarítmica del crecimiento, con lo que ha tenido lugar un número suficiente de generaciones para asegurar la acción del antibiótico.

b) Efecto de la epicilina en la morfología

Citrobacter intermedius C3 presenta una gama variable de modificaciones morfológicas como respuesta al efecto de la epicilina (*figura 2*). Utilizando concentraciones bajas del antibiótico (5-10 μ g/ml) en la fase exponencial del crecimiento (2-6 h) se detecta una notable filamentosidad. Las células son más largas y los filamentos adquieren dimensiones mucho mayores, apreciándose en algún caso zonas transparentes que sugieren ausencia de sustancia intracitoplasmática. A

concentraciones superiores (25-50 $\mu\text{g/ml}$) la filamentación va acompañada de formas globosas o hinchamientos de tamaño variable localizados en zonas intermedias generalmente y con menos frecuencia en zonas polares y subpolares.

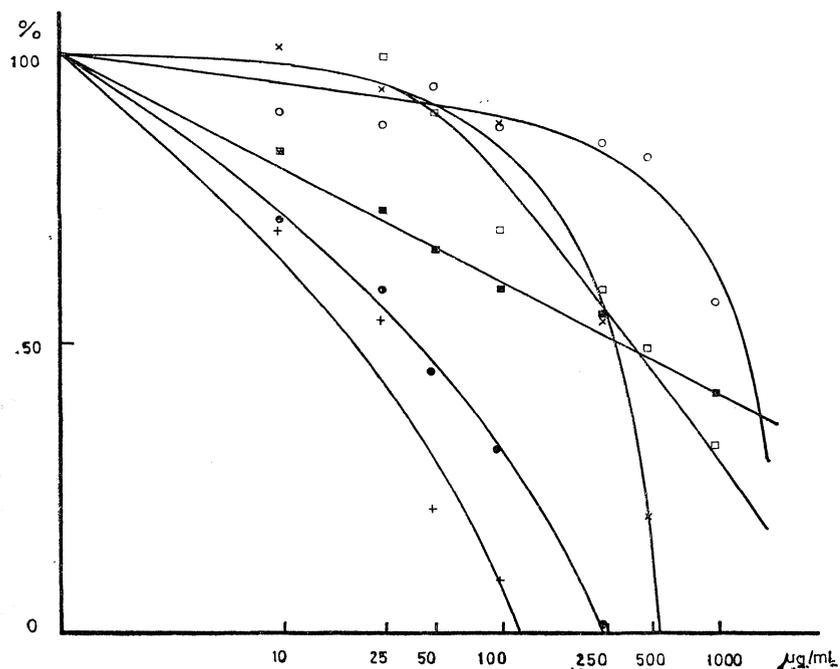


Figura 1. Inhibición del crecimiento por β -lactamas en las condiciones expresadas en el apartado de material y métodos. ●, C3 epicilina; ■, C3 penicilina; +, C3 ampicilina; ○, CBC315 epicilina; □, CBC315 penicilina; ×, CBC315 ampicilina

El desarrollo celular obtenido a concentraciones superiores a 100 $\mu\text{g/ml}$ reduce notablemente la filamentación y los hinchamientos característicos de la fase anterior. En estas condiciones los esferoplastos son muy abundantes y emergen de las escasas formas filamentosas o incluso de algunas formas bacilares normales.

La respuesta morfológica de la cepa CBC 315 es diferente a la cepa silvestre C3. La filamentación se induce ligeramente a concentraciones de 5-50 $\mu\text{g/ml}$ y en todos los casos la longitud de los fila-

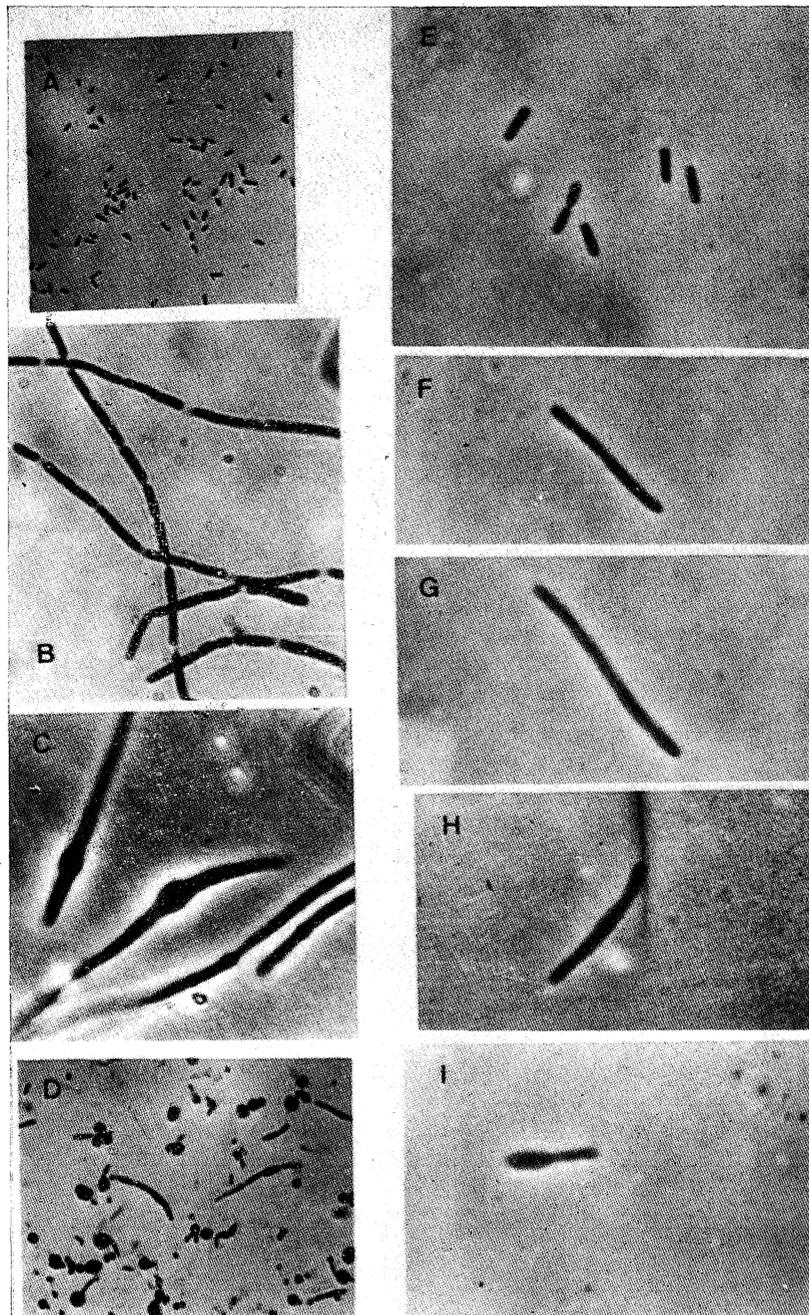


Figura 2. Efecto de la epicilina en la morfología. A. *C. intermedium* 0 µg/ml, tinción con cristal violeta $\times 2.100$. B. *C3*, 10 µg/ml, tinción con cristal violeta $\times 2.750$. C. *C3*, 25 µg/ml, contraste de fases $\times 2.750$. D. *C3*, 100 µg/ml, tinción con cristal violeta $\times 2.100$. E. *CBC315*, 0 µg/ml, contraste de fases $\times 3.250$. F. *CBC315*, 10 µg/ml, contraste de fases $\times 3.250$. G. *CBC315*, 25 µg/ml, contraste de fases $\times 3.250$. H. *CBC315*, 50 µg/ml, contraste de fases $\times 3.250$. I. *CBC315*, 100 µg/ml, contraste de fases $\times 3.250$

mentos es menor. Las formas hinchadas o globosas son inexistentes y la formación de esferoplastos es mínima. La concentración efectiva en la cepa CBC 315 para inducir los esferoplastos es superior a los 100 $\mu\text{g/ml}$ (figura 2).

DISCUSION

La inducción de formas elongadas, globosas y esferoplastos en gram-negativos por antibióticos que actúan a nivel de pared celular ha sido descrita previamente (3, 6). La presencia de estas formas anómalas es explicable por la acción específica del antibiótico sobre la pared. Sin embargo, otros autores sugieren que el proceso de filamentación inducido por β -lactamas se debe a una inhibición de las endopeptidasas implicadas en el proceso de división celular (4). La formación de formas globosas y esferoplastos sería consecuencia de la inhibición de las transpeptidasas, mecanismo conocido como responsable de la lisis de las células en división.

Las diferencias morfológicas en el efecto de la epicilina entre la cepa silvestre C3 y la cepa CBC 315 sugieren posiblemente la diferente respuesta morfológica sea debida a una acción diferencial en las dos cepas. La epicilina actuaría inhibiendo transpeptidasas y endopeptidasas en la cepa silvestre C3, mientras que, por motivos desconocidos, en la cepa CBC 315 solamente inhibiría la acción de las endopeptidasas. La acción a nivel de las transpeptidasas tendría lugar cuando la concentración de antibiótico fuese mucho más elevada que en la cepa silvestre.

Dado que el tiempo de duplicación de la cepa CBC 315 es mayor que el de la cepa silvestre C3 y que la población final es menor en la cepa mutante, debe considerarse que la proporción de antibiótico con respecto al número de células siempre es mayor en la cepa CBC 315 que en la cepa C3. Por este motivo, la superior resistencia y la morfología diferencial de CBC 315 es más significativa de lo que los resultados reseñados expresan. Por otro lado, la mayor resistencia a β -lactamas va relacionada con la incapacidad de excretar glutamato. Este fenómeno también se hace extensivo a la acción de la estreptomycin (J. Imperial, datos no publicados) y al cloranfenicol (A. Juárez, datos no publicados). Este tipo de fenómeno sería cohe-

rente con una menor permeabilidad de la cepa CBC 315 con respecto a la cepa silvestre C3 que afectaría tanto al glutamato como a las β -lactamas, estreptomicina y cloranfenicol.

Esta posibilidad, actualmente en estudio, está favorecida por el hecho de que niveles bajos de biotina reducen el porcentaje de colonias excretoras en medio sólido y la cantidad de ácido glutámico excretado en medio líquido (8).

RESUMEN

Se estudia el comportamiento de *Citrobacter intermedius* C3 y la cepa CBC 315 frente a varias β -lactamas. Se estudia la inhibición del crecimiento por seguimiento del desarrollo turbidimétricamente y se estudian los cambios morfológicos inducidos. La cepa CBC 315 se muestra más resistente que la cepa silvestre C3. Los resultados obtenidos muestran una acción diferente en estas cepas a nivel de desarrollo en medio líquido y morfológicamente. Se propone un modelo explicativo basado en la permeabilidad diferencial de estas cepas y en la acción de las β -lactamas a dos niveles.

SUMMARY

Growth with epicillin of Citrobacter intermedius C3 and a non glutamate-excreting mutant

The behaviour of *Citrobacter intermedius* C3 and strain CBC 315 is examined when exposed to various β -lactams. Turbidimetric assays and morphological response show that CBC 315 is more resistant than wild strain C3. Epicillin produces different morphologic effect in CBC 315 than in wild strain C3. This result shows a different action of the β -lactam antibiotics in such strains. A differential permeability model is suggested to explain such behaviour together with the possibility of these β -lactam antibiotics having two sites of action in the studied strains.

BIBLIOGRAFIA

1. CLOTET, R.; GUINEA, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1968. Segregación de aminoácidos por una cepa de *C. intermedius*. Microbiol. Españ., 21, 155-73.
2. CHUNG, K. L. 1968. Autorradiographic and immunofluorescent studies of cytological changes induced in *Bacillus cereus* by cloramphenicol. Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 34, 263-69.
3. GREWOOD, D., and O'GRADY, F. 1973. Comparison of the responses of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* to seven β -lactam antibiotics. J. Infec. Dis., 128, 211-22.
4. HARTMANN, R.; HÖLTJE, J. V., and SCHWAEZ, U. 1972. Targets of penicillin action in *Escherichia coli*. Nature, London, 235, 426-29.
5. JOFRE, J.; PRIETO, M.-J.; TOMAS, J., and PARÉS, R. 1979. Excretion of glutamic acid in *Citrobacter intermedius* C3 associate with plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., 138, 721-25.
6. LORIAN, V. 1975. Some effects of subinhibitory concentrations on bacteria. Bull. N. Y. Acad. Med., 51, 1.046-55.
7. PARÉS, R.; GUINEA, J.; HERNÁNDEZ, S.; VALOIX, J., and JOFRE, J. 1974. A new episomic element controlling fermentative metabolism and excretion of amino acids by *Citrobacter intermedius* C3. J. Bacteriol., 119, 9-18.
8. VIVES-REGO, J.; JOFRE, J.; IMPERIAL, J.; RIPOLL, J., and PARÉS, R. 1979. The effect of 2-oxoglutarate and biotin in the release of amino acids by *Citrobacter intermedius* C3. Rev. Españ. Fisiol., 35, 473-78.

CAPACIDAD ENTEROTOXIGENICA Y ALGUNAS
PROPIEDADES RELACIONADAS CON ESTE CA-
RACTER EN ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE
LECHE MAMITICA

por

M. L. GARCIA y B. MORENO

INTRODUCCION

Las enterotoxinas estafilocócicas son metabolitos extracelulares producidos por algunas cepas de estafilococos en ciertos alimentos y medios de cultivo. La ingestión de estas sustancias por el hombre determina una de las formas más comunes de intoxicación alimentaria (6, 19). El procedimiento ideal para el diagnóstico de la intoxicación estafilocócica sería la puesta en evidencia de las toxinas en el alimento sospechoso. Sin embargo, los métodos propuestos para este tipo de diagnóstico se basan o en un elaborado proceso de concentración y purificación del extracto del alimento (4, 16) o en el empleo de técnicas y aparatos propios únicamente de un laboratorio de investigación (17). Por ello, en la práctica se recurre al recuento en el alimento sospechoso de células viables de *Staphylococcus aureus* y, consiguientemente, potencialmente enterotoxigénicas.

La producción de coagulasa es generalmente aceptada como una propiedad estrechamente relacionada con la virulencia y el poder enterotoxigénico de los estafilococos. A pesar de ello, en los últimos años, la interpretación de la prueba utilizada para detectar la producción de esta enzima está siendo objeto de controversia. Así, mientras que la técnica aconsejada por la AOAC (1) para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* a partir de alimentos considera cualquier grado de coagulación como evidencia positiva de la producción de coagulasa, algunos autores (15, 22) mantienen que cuando el grado de coagulación es débil conviene someter las cepas a pruebas adicio-

nales de identificación. Entre estas pruebas destacan la producción de termónucleasa, la fermentación del manitol y la sensibilidad a la lisis por lisostafina.

La producción de nucleasa termoestable es un carácter propio de *Staphylococcus aureus*, existiendo una buena correlación entre la producción de esta enzima y la capacidad de coagular el plasma en grado máximo (5, 12). Aunque la producción de ácido a partir del manitol anaeróbicamente es considerada de utilidad para la identificación de *S. aureus* (3), existe evidencia de que las cepas de origen animal no presentan este carácter de forma uniforme, por lo que su utilidad es de valor limitado cuando se trata de diferenciar estafilococos coagulasa-positivos y negativos del mencionado origen (8). La sensibilidad a la lisis por la lisostafina es un carácter específico de los miembros del género *Staphylococcus*. Por otra parte, algunos investigadores han señalado que el grado de sensibilidad a esta enzima puede ser utilizado en la diferenciación de especies (10, 20) y que el porcentaje y la velocidad de lisis de las cepas de estafilococos coagulasa-negativas son mucho más variables que los de las cepas coagulasa-positivas (21).

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido estudiar la capacidad enterotoxigénica de los estafilococos presentes en muestras de leche procedentes de animales afectados de mastitis clínicas y subclínicas, así como la producción de coagulasa y de ADNasa termoestable, la fermentación del manitol y la sensibilidad a la lisis por lisostafina, y establecer relaciones entre todas estas propiedades.

MATERIAL Y METODOS

Cepas

Las 57 cepas de estafilococos estudiadas fueron aisladas por nosotros a partir de muestras de leche de ganado bovino afecto de mastitis clínicas y subclínicas (7).

Producción de coagulasa

Esta prueba se llevó a cabo empleando una técnica en tubo. A 0,3 ml de coagulasa plasma EDTA (Difco) se añadía 0,1 ml de un

cultivo de 18 h en caldo BHI (Difco). Después de agitar suavemente, los tubos fueron incubados a 37 °C. Las lecturas se efectuaron a los 30 min, a las 2 h, a las 4 h y a las 24 h. El grado de coagulación del plasma fue puntuado de 1+ a 4+, de acuerdo con el esquema propuesto por Turner y Schwartz (24).

Producción de termonucleasa

La puesta en evidencia de la producción de ADNasa termoestable se llevó a cabo en el medio azul de toluidina 0-ácido desoxirribonucleico de Lachica y colaboradores (11), por la técnica en placa descrita por Barry y colaboradores (2). La incubación se realizó a 35 °C y las lecturas se hicieron a las 4 h y 24 h. Las cepas fueron clasificadas como positivas cuando a las 4 h de incubación mostraban halos cuyo diámetro era igual o superior a 9 mm. Paralelamente, se ensayó la actividad ADNasa en cultivos sin calentar.

Fermentación anaeróbica del manitol

La capacidad de las cepas para utilizar el manitol aeróbica y anaeróbicamente se estudió por la técnica recomendada por el Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci (23). Con el fin de determinar el pH final del medio, paralelamente se incubó un juego de tubos durante 5 d en una jarra Gas Pak (BBL). Las cepas fueron consideradas como positivas (+) cuando el pH final del medio era inferior a 6,1 y como negativas (—) cuando este valor era superior a 6,5. En las cepas fermentadoras débiles (\pm), el pH oscilaba entre 6,2 y 6,5.

Sensibilidad a la lisostafina

El estudio de la sensibilidad de las cepas a la lisis por lisostafina se llevó a cabo utilizando una modificación de la técnica descrita por Zygmunt y colaboradores (28), modificación que se refiere fundamentalmente a que la incubación era efectuada en las propias cubetas, de 10 mm de camino óptico, de un espectrofotómetro Perkin

Elmer mod. 200, termoestabilizadas a 37 °C, y a que el grado de lisis se midió como porcentaje de reducción en la densidad óptica (D. O.) a 620 nm, con lecturas finales a los 20 min. Las células se lavaron dos veces en tampón tris-ClH 0,05 M, a pH 7,5, conteniendo ClNa 0,145 M. Suspensiones estandarizadas (de D. O., 0,139 a 0,166) de las cepas a ensayar y de un cultivo patrón (*Staphylococcus aureus* FDA 209P) se sometieron a la acción de 1 unidad/ml (concentración final) de lisostafina (Schwarz-Mann, Orangeburg, N. Y.). Las lecturas se hicieron a los 5 min, 10 min y 20 min. Se consideraron como muy sensibles a la lisostafina las cepas que a los 20 min mostraban una reducción en la D. O. mayor del 85 %, y como poco sensibles las que no superaban el 20 %.

Producción de enterotoxinas

Se investigó la capacidad de las cepas para producir enterotoxinas A, B, C, D y E. La detección e identificación de las toxinas se llevó a cabo por la técnica de difusión en placa denominada «optimal sensitivity plate» (OSP), de Robbins y colaboradores (18). Para la producción de enterotoxinas, las cepas se incubaron en medio sólido sobre membrana en la forma descrita por Robbins y colaboradores (18).

RESULTADOS

Producción de coagulasa

Los resultados obtenidos en la prueba de producción de coagulasa se encuentran recogidos en el *cuadro 1*: 40 cepas fueron puntuadas 4+, 7 cepas 3+, otras 7 cepas 2+ y 3 cepas 1+.

Producción de termonucleasa

Los datos referentes a la producción de ADNasa termoestable se presentan asimismo en el *cuadro 1*: el número de cepas positivas fue de 48 y el de negativas de 9. Con cultivos no sometidos a tratamien-

to térmico, los resultados fueron los siguientes: 50 cepas positivas y 7 negativas.

Cuadro 1. Comparación de la producción de coagulasa con la producción de termónucleasa, la fermentación del manitol y la sensibilidad a la lisis por lisostafina

Producción de coagulasa	Número de cepas	Termónucleasa		Fermentación anaeróbica del manitol			Sensibilidad a la lisostafina		
		+	-	+	±	-	MS	I	PS
4 +	40	40		36	2	2	40		
3 +	7	6	1	4	1	2	7		
2 +	7	2	5			7	2	1	4
1 +	3		3			3		1	2

+ = cepas positivas. ± = cepas fermentadoras débiles. - = cepas negativas. MS = muy sensibles. I = de sensibilidad intermedia. PS = poco sensibles.

Fermentación anaeróbica del manitol

El *cuadro 1* contiene también los resultados de las pruebas de utilización anaeróbica del manitol: 40 cepas fueron clasificadas como positivas, 14 como negativas y 3 como fermentadoras débiles. En aerobiosis, 46 cepas utilizaban el manitol, 8 no lo utilizaban y 3 lo hacían parcialmente.

Sensibilidad a la lisis por lisostafina

Los resultados de las pruebas de sensibilidad a la lisis por lisostafina de las cepas estudiadas se recogen igualmente en el *cuadro 1*. El número de cepas muy sensibles fue de 49, el de poco sensibles 6, clasificándose las 2 restantes como de sensibilidad intermedia. En la *figura 1* se representa la marcha del proceso de lisis de las cepas clasificadas como muy sensibles, poco sensibles y de sensibilidad intermedia.

Producción de enterotoxinas

Únicamente en cuatro de las cepas estudiadas fue posible detectar la producción de enterotoxinas. Tres de ellas produjeron toxina C y una, toxina D.

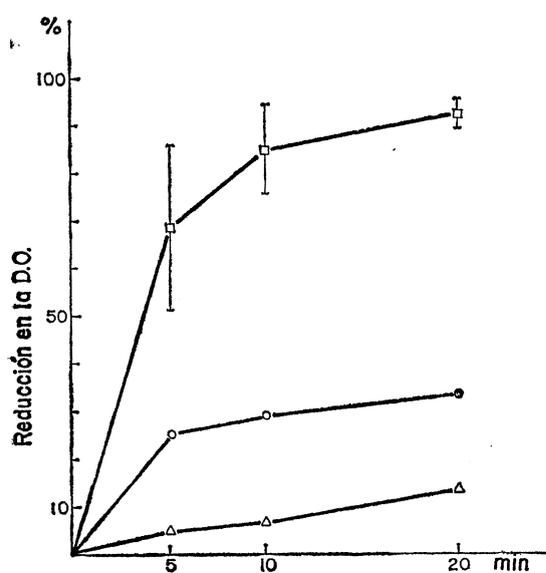


Figura 1. Curvas de sensibilidad a la lisostafina, con representación de las desviaciones estándar, de 57 cepas de estafilococos aisladas de leche mamética. □, media de las cepas muy sensibles; ○, media de las cepas de sensibilidad intermedia; △, media de las cepas poco sensibles

DISCUSION

Aunque la producción de coagulasa es el criterio más utilizado para identificar *Staphylococcus aureus* y, consiguientemente, para predecir la patogenicidad y enterotoxigenicidad de las cepas de estafilococos, nuestros resultados indican que generalmente sólo las cepas que coagulan el plasma completa o casi completamente presen-

tan otras propiedades características de esta especie. Así, mientras que las 47 cepas puntuadas con 3+ y 4+ en la prueba de la coagulasa fueron muy sensibles a la lisis por lisostafina y, con excepción de una cepa, produjeron termonucleasa, únicamente 2 de las 10 cepas puntuadas 1+ y 2+ presentaban estas mismas propiedades. Datos y observaciones similares han sido publicados por Rayman y colaboradores (15), Sperber y Tatini (22) y Rayman (14), quienes proponen el empleo de pruebas adicionales de identificación en el caso de cepas incapaces de coagular el plasma en grado máximo.

La capacidad de producir nucleasa es una propiedad del *Staphylococcus aureus* compartida por otras especies de estafilococos. Sin embargo, su resistencia al tratamiento térmico parece ser única y propia de la mencionada especie. Del análisis de los datos del *cuadro 1* se puede concluir que existe una correlación estrecha entre la producción de termonucleasa y otras propiedades consideradas específicas de *S. aureus*, por un lado, y la incapacidad de producir esta enzima y la ausencia de dichas propiedades, por otro. Nuestros resultados coinciden con los de otros investigadores que consideran que la prueba de la termonucleasa tiene un valor similar al de la coagulasa, siendo especialmente útil para la identificación de cepas débilmente productoras de coagulasa (2, 14).

A pesar de que la fermentación del manitol ha venido siendo considerada como un carácter útil para la diferenciación de *Staphylococcus aureus*, los resultados por nosotros obtenidos, que ponen de manifiesto la existencia de un porcentaje importante de cepas no fermentadoras, coinciden con los de otros autores que investigan esta propiedad en estafilococos de origen animal (26-27). En efecto, 6 de las 14 cepas no fermentadoras del manitol presentaban otros caracteres propios de *S. aureus*. La capacidad de las cepas estudiadas para utilizar el manitol aeróbicamente fue considerablemente mayor.

Como ya se señaló en la introducción de este trabajo, la sensibilidad a la lisis por lisostafina puede tener una doble utilidad. Por un lado permite la adscripción de las cepas de cocos gram-positivos catalasa-positivos al género *Staphylococcus*, al proporcionar una información indirecta sobre la composición de su pared celular, y por otro, se ha sugerido que puede facilitar la diferenciación de cepas de estafilococos coagulasa-positivas y negativas. El estudio de los datos

del *cuadro 1* permite observar que todas las cepas que mostraron una elevada sensibilidad a esta enzima poseían una o más propiedades de *S. aureus* y que las cepas poco sensibles y de sensibilidad intermedia carecían de ellas. Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por Hajek y Marsalek (8) y Heczko y colaboradores (9). Nuestra experiencia con otras poblaciones de estafilococos de origen animal (datos no publicados), nos ha permitido concluir también el escaso valor de esta prueba en la diferenciación de estafilococos coagulasa-positivos y negativos.

El escaso número de cepas enterotoxigénicas y el tipo de enterotoxinas producidas coinciden con los resultados publicados por otros autores que estudian la capacidad enterotoxigénica de cepas de estafilococos aisladas de leches mamíticas (13, 25). Aunque uno de los objetivos iniciales de este trabajo era el establecer la relación existente entre la capacidad de producir enterotoxinas y las propiedades consideradas como índices de enterotoxigenicidad, el escaso número de cepas positivas no ha permitido el establecimiento de las citadas relaciones. De nuestros resultados, es posible concluir, no obstante, que el papel de los estafilococos aislados de leche de animales afectos de mamitis clínicas y subclínicas como agentes de intoxicaciones alimentarias humanas no parece muy importante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Prof. M. S. Bergdoll, del Food Research Institute, de la Universidad de Wisconsin, por la donación de las enterotoxinas estafilocócicas y de los antisueros correspondientes.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la capacidad enterotoxigénica de 57 cepas de estafilococos aisladas de muestras de leche de ganado bovino afecto de mamitis clínicas y subclínicas, así como la producción de coagulasa y de ADNasa termoestable, la fermentación del manitol y la sensibilidad a la lisis por lisostafina, estableciéndose relaciones entre estas propiedades.

Todas las cepas estudiadas coagularon el plasma de conejo, aunque en grado diferente: 40 cepas fueron puntuadas con 4+, 7 con 3+, otras 7 con 2+ y 3 con 1+. Mientras que todas las cepas 4+ y 3+ mostraron una elevada sensibilidad a la lisis por lisostafina y, con una excepción, produjeron termonucleasa, sólo 2 de las puntuadas con 2+ y 1+ presentaron estas mismas propiedades. Por lo que se refiere a la fermentación del manitol en anaerobiosis, no se observó una buena correlación entre esta propiedad y la capacidad de coagular el plasma completa o casi completamente.

Únicamente 4 cepas mostraron carácter enterotoxigénico: 3 de ellas produjeron toxina C y una, toxina D.

SUMMARY

Enterotoxigenicity and some related properties of staphylococci isolated from mastitic milk

A total of 57 staphylococcal strains isolated from clinical and sub-clinical bovine mastitis were tested for enterotoxigenicity, coagulase and thermonuclease production, mannitol fermentation and lysostaphin sensitivity. The relationship among these tests has been established.

All tested strains were coagulase positive, but they did not show the same degree of clotting of plasma. Forty cultures were scored as 4+, 7 as 3+, 7 as 2+ and 3 as 1+. All strains which gave 4+ and 3+ coagulase reactions showed high sensitivity to lysostaphin and, with only one exception, produced thermonuclease. On the other hand, only two of the strains yielding 2+ and 1+ coagulase reactions possessed these properties. A good correlation was not observed between mannitol fermentation and 4+ and 3+ coagulase reactions.

Only 4 strains were found to be toxigenic and the enterotoxins produced were C and D.

BIBLIOGRAFIA

1. Association of Official Analytical Chemists. 1975. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 916-17. A. O. A. C., Washington.
2. BARRY, A. L.; LACHICA, R. V. F., and ATCHINSON, F. W. 1973. Identification of *S. aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. Appl. Microbiol., 25, 496-97.
3. BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 483-89. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
4. CASMAN, E. P., and BENNETT, R. W. 1965. Detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Microbiol., 13, 181-89.
5. CHESBRO, W. R., and AUBORN, K. 1967. Enzymatic detection of the growth of *S. aureus* in foods. Appl. Microbiol., 15, 1150-59.
6. F. R. I. 1978. Annual Report of the F. R. I., 16-20. Univ. of Wisconsin.
7. GARCÍA, M. L., y MORENO, B. 1978. Los estafilococos como agentes de mastitis en el ganado vacuno. An. Fac. Vet. León, 24, 83-93.
8. HAJEK, V., and MARSALEK, E. 1976. Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. Proc. III Int. Symp. Staphylococci Staphylococcal Infec. 11-21.
9. HECZKO, P. B.; GROV, A., and PULVERER, G. 1976. Susceptibility of staphylococci of various cell wall structure to lysostaphin and its separated enzymes. Proc. III Int. Symp. Staphylococci Staphylococcal Infec., 43-48.
10. KLOOS, W. E., and SCHLEIFER, K. H. 1975. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis* and *S. simulans*. Int. J. Syst. Bacteriol., 25, 62-79.
11. LACHICA, R. V. F.; GENIGEORGIS, C., and HOEPRICH, P. O. 1971. Metachromatic agar-diffusion method for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl. Microbiol., 21, 585-87.
12. LACHICA, R. V. F.; HOEPRICH, P. O., and GENIGEORGIS, C. 1971. Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *S. aureus* and other catalase-positive cocci. Appl. Microbiol., 21, 823-26.
13. OLSON, J. C.; CASMAN, E. P.; BAER, E. F., and STONE, J. E. 1970. Enterotoxigenicity of *S. aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. Appl. Microbiol., 20, 605-7.
14. RAYMAN, M. K. 1976. Current concepts in the identification of *S. aureus* in foods. J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment., 9, 477-78.
15. RAYMAN, M. K.; PARK, C. E.; PHILPOTT, J., and TOOD, E. C. O. 1975. Reassessment of the coagulase and thermonuclease tests as means of identifying *S. aureus*. Appl. Microbiol., 29, 451-54.
16. REISER, R.; CONAWAY, D., and BERGDOLL, M. S. 1974. Detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Microbiol., 27, 83-85.

17. REISER, R.; MILLER, B. A., and BERGDOLL, M. S. 1978. Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 421-26.
18. ROBBINS, R.; GOULD, S., and BERGDOLL, M. S. 1974. Detecting the enterotoxigenicity of *S. aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, **28**, 946-50.
19. ROSSET, O. J. 1978. Les toxiinfections alimentaires collectives en France de 1970 a 1977. Thèse de Doctorat en Médecine. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie.
20. SCHLEIFER, K. H., and KLOOS, W. E. 1975. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended description of *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* and descriptions of three new species: *S. cohnii*, *S. haemolyticus* and *S. xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **25**, 50-61.
21. SCHUHAROT, V. T. 1965. Staphylococci and their classification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **128**, 4-25.
22. SPERBER, W. H., and TATINI, S. R. 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *S. aureus*. *Appl. Microbiol.*, **29**, 502-5.
23. Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci. 1965. Minutes of first meeting. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Tax.*, **15**, 107-8.
24. TURNER, F. J., and SCHWARTZ, B. S. 1958. The use of a lyophilized human plasma standardized for blood coagulation factors in the coagulase and fibrinolytic tests. *J. Lab. Clin. Med.*, **52**, 888-94.
25. UNTERMANN, F.; KUSCH, D., und LUPKE, H. 1973. Zur bedeutung der mastitis-staphylokokken als ursache von lebensmittelvergiftungen. *Milchwissenschaft*, **28**, 686-88.
26. WECKBACH, L. S., and LANGLOIS, B. G. 1976. Classification by numerical taxonomy of staphylococci isolated from the bovine udder. *J. Milk Food Technol.*, **39**, 246-49.
27. WHITE, F.; RATTRAY, E. A. S., and DAVIDSON, D. J. 1963. Sensitivity to antibiotics and biochemical activities of serotypes of bovine staphylococci. *J. Comp. Pathol.*, **73**, 21-26.
28. ZYGMUNT, W. A.; BROWDER, H. P., and TAVORMINA, P. A. 1968. Susceptibility of coagulase-negative staphylococci to lysostaphin and other antibiotics. *Appl. Microbiol.*, **16**, 1168-73.

INSTITUTO DE CARBOQUIMICA (CSIC). ZARAGOZA

DESULFURACION MICROBIANA DEL CARBON. I. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS FERRO- Y SULFO-OXIDANTES

por

M. C. RUIZ-ALARES, B. INIGO, V. GOMEZ-ARANDA y J. M. GAVILAN

INTRODUCCION

En España se encuentran lignitos de avanzado estado de carbonificación muy ricos en azufre. Este elemento, presente en forma de compuestos orgánicos de naturaleza poco conocida, e inorgánicos, principalmente sulfuros de hierro, plantea graves problemas (contaminación atmosférica, corrosión de parrillas de hornos, coques de un elevado contenido en azufre) en la utilización industrial del carbón. En la eliminación del azufre del carbón antes de su aprovechamiento (10) adquiere especial importancia el azufre pirítico, ya que su separación presenta menos inconvenientes que la de las otras formas de azufre existentes en los mismos.

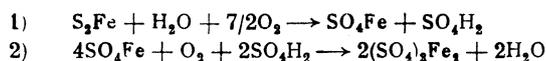
Utilizando los medios convencionales de desulfuración, estratificación por pesos específicos y flotación, en la mayoría de los carbones, no se puede reducir el contenido en azufre a valores inferiores al 2%.

Los medios no convencionales que permiten reducir el contenido en azufre a valores más aceptables, se han clasificado en eléctricos, térmicos y químicos. Dentro de estos últimos se encuentran los bioquímicos (10, 12, 14, 20). En ellos se utiliza la acción de bacterias: *Thiobacillus ferrooxidans* (1, 6-7) y *Th. thiooxidans* (21-22) que oxidan y eliminan la pirita presente transformándola en sulfatos férricos solubles.

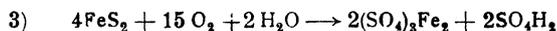
Ambas bacterias se encuentran en las aguas ácidas de mina de

carbones, aunque todavía no está muy claro el papel que juega el *Thiobacillus thiooxidans* en este habitat (15, 19).

Por otra parte, se considera que el *Thiobacillus ferrooxidans* actúa en la lixiviación de sulfuros de hierro de modo simultáneo directa e indirectamente.



proceso total



Teniendo en cuenta la urgencia de un mayor y mejor aprovechamiento de los recursos energéticos, el carbón entre ellos, se planteó llevar a cabo un estudio sobre la desulfuración de los lignitos españoles por vía microbiológica. Puesto que las experiencias deberían realizarse en condiciones lo más próximas posibles a las adecuadas para una posterior aplicación a gran escala, se pensó estudiar los procesos de oxidación del azufre pirítico de carbones no tratados previamente (17), con cultivos sumergidos de bacterias ferrooxidantes y sulfooxidantes que pudieran aislarse de las aguas ácidas de mina de los propios carbones. Por ello, la primera fase de trabajo consistió en el aislamiento e identificación de dichas bacterias.

MATERIAL Y METODOS

Carbones (lignitos)

A) Puentes de García-Rodríguez. B) subbituminoso de Luengo (Utrillas, Teruel). C) Minas de Utrillas. D) Mina Sur, capa 4.^a. E) Mina Sur, capa 6.^a. F) Pozo Sta. Bárbara, capa 1.^a (Utrillas). G) Pozo Sta. Bárbara, capa 3.^a (Utrillas).

Las muestras D, E, F y G correspondían a las cuatro capas actualmente en exploración de las seis existentes; se tomaron de frentes en exploración sin meteorizar, en condiciones asépticas. Las muestras A, B y C, procedían de nuestro laboratorio, estaban preparadas para análisis según los métodos convencionales y tenían un tamaño de grano inferior a 0,25 mm de Ø.

Los carbones D, E, F y G se molieron en morteros de cristal en condiciones asépticas para obtener un tamaño de grano aproximado de 0,25 mm de Ø.

Aguas de mina

A3) escurrideros de Mina Sur, zona acequial lateral. A4) escurrideros de Mina Sur, zona de pozos. A7) manantial en galería general de Pozo Sta. Bárbara.

Dichas aguas presentaban las características siguientes:

A3) Presentaba precipitado color naranja muy abundante, siendo su pH = 2,5. Al microscopio se apreció una elevada población, generalmente, de bacilos cortos y gruesos, y algunos micelios de mohos.

A4) Aspecto casi completamente transparente, con un ligerísimo precipitado terroso, pH = 6,9. Al microscopio presentó población abundante de bacilos cortos, no muy finos, en parejas, micelios y algún conidio.

A7) Prácticamente incolora, transparente, sin sedimento apreciable. Alcalina, pH = 8,18. Al microscopio se observó una población escasa formada por cocobacilos muy pequeños, diplobacilos gruesos y cortos, cocos gruesos en tétradas y micelios.

Todas las muestras se tomaron en condiciones asépticas, se introdujeron en recipientes estériles y se llevaron rápidamente al laboratorio.

Como cultivo tipo se utilizó la cepa *Ferrobacillus ferrooxidans* 13.661, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Los medios de enriquecimiento se eligieron atendiendo a la fuente energética. Con azufre elemental, como fuente de energía, se ensayó el de Waksman y Joffe (21). De aquellos en los que tiene lugar la oxidación del tiosulfato se seleccionaron el medio tiosulfato de Starkey, modificado por Difco (18) y el de Colmer (4), y de entre los que contienen hierro ferroso se eligieron el 9K de Silverman y Lundgren (16) y el de Leathen y colaboradores (9).

Los cultivos se llevaron a cabo en ampollas de 250 ml de capacidad diseñadas para desarrollo sumergido, con 100 ml de medio. Se inocularon dichas ampollas con 1 g de carbón o con 5 ml de agua de mina.

Se incubaron a 28 °C durante períodos de 8-15 d. El control de los crecimientos se siguió por microscopia óptica y evolución del pH de los cultivos.

Como medios de aislamiento se eligieron los ya citados en el enriquecimiento de cultivos, a los que se adicionaron como agentes solidificantes: bacto-agar Difco, en una proporción del 2 al 1,5 %, lavado con agua destilada, durante 48 h, para eliminar impurezas que impedirían el crecimiento de los *Thiobacillus*, y ácido silícico, obtenido según las técnicas de Pochon y Tardieux (13) y Leathen y colaboradores (7).

Los agentes solidificantes se mezclaron volumen a volumen con los medios base.

Los sistemas de aislamiento se hicieron siguiendo las técnicas de expansión y agotamiento en placa. Como inóculo se empleó la dilución 1/1.000 de los cultivos enriquecidos.

Las placas sembradas se incubaron a 28 °C durante 5-7 d, manteniendo la estufa en ambiente húmedo.

Para efectuar el estudio taxonómico se siguieron las técnicas usuales citadas en el Manual de Bergéy (1-2) y las propuestas por Hutchinson y colaboradores (5).

En el estudio morfológico se consideraron los caracteres macro y microscópico del cultivo, tanto en medio sólido como en medio líquido. Asimismo se realizaron las tinciones de Gram, modificación de Kopeloff y Beerman (11) para formadores de ácidos y tinción de esporas tradicionales.

En el estudio fisiológico se realizaron las siguientes pruebas: 1) *Crecimiento*, en medios de tiosulfato de Colmer (3) y 9KT de Silverman (15), azufre-9KS de Silverman (15) y ferroso-9K de Silverman (16). 2) *Aerofilia*, en medio sólido, incubando en presencia de ácido pirogálico. 3) *Asimilación de diversas fuentes nitrogenadas*. Se llevó a cabo este estudio sustituyendo en los medios de Waksman y 9K la fuente habitual de nitrógeno, el sulfato amónico, por nitrato potásico, urea o peptona, de forma que la cantidad de nitrógeno aportada fuese la misma. Los crecimientos se siguieron mediante la variación del pH y la observación microscópica. 4) *Estudio de carácter del crecimiento* en medio de tiosulfato-agar. 5) *Valoración de la acidez total* con NaOH 0,1 N y fenoftaleína como indicador.

RESULTADOS Y DISCUSION

Solamente resultaron positivos los crecimientos indicados en el cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados de los crecimientos en la etapa final de enriquecimiento

Medios	Muestras		
	C	A 3	<i>F. ferrooxidans</i>
Waksman	N	MB	N
9 K	MB	MB	MB
Tiosulfato Difco	D	D	D

MB = muy bueno. N = negativo. D = discreto, cesa al segundo o tercer pase.

La variación del pH en los cultivos que presentaron definitivamente una evolución positiva fue la suficiente: en medio de Waksman, muestra A3, pH inicial = 3,5, pH final = 0,7; en medio de Silverman, dicha variación se representa en la figura 1.

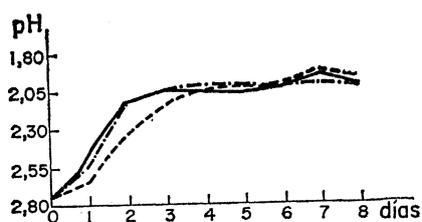


Figura 1. Variaciones del pH a lo largo del tiempo en medio de Silverman. —, F.f. (ATCC). —, A3-1; —, CM

Las poblaciones observadas al microscopio presentan las siguientes características morfológicas: bacilos cortos, densos, de bordes redondeados, en pocas ocasiones aislados, normalmente en parejas y

ocasionalmente formando cadenas ; móviles en cultivos jóvenes. Comparados entre sí, resultaron algo mayores los procedentes de A3 en medio de Waksman y más delgados los crecidos del carbón en medio 9K. Por observación se comprobó la oxidación del azufre elemental por su desaparición paulatina y el aumento de turbidez uniforme. En las ampollas de medio 9K fue ostensible el cambio de la coloración inicial azul-verdosa a naranja, con aparición de un precipitado del mismo color.

En los aislamientos realizados solamente aparecieron colonias en las placas inoculadas con un cultivo procedente de A3 y sembradas en tiosulfato Difco-agar, y en placas silícico-9K sembradas con cultivos procedentes de A3 y CM (muestra C de minas y ferrocarriles) enriquecidos en medio 9K. Dichas colonias aparecen en ambos casos a los 5 días de inoculación.

Los caracteres morfológicos que presentaron las colonias crecidas en medio de tiosulfato-agar Difco fueron los siguientes: colonias de 2 mm de \varnothing , planas, redondas, de borde irregular, casi transparentes en un principio, al envejecer produjeron un precipitado amarillo de azufre en su interior. Este precipitado comenzó a aparecer en el centro y se extendió después de un modo concéntrico.

Las colonias aparecidas en placas silícico-9K, redondeadas, de borde irregular, tamaño variable (2 mm-0,5 mm \varnothing) y color ambar; con un centro elevado oscuro de color marrón-rojizo que se extendió en el transcurso de su crecimiento. Este centro oscuro puede cubrirse posteriormente por otro precipitado cristalino marrón claro, visible a la lupa.

A partir de las colonias crecidas en los medios ya citados se obtuvieron los siguientes cultivos puros: cepas crecidas en tiosulfato-agar, procedentes de A3; AWA3 y BWA3; cepas crecidas en medio 9K-silícico procedentes de A3: A3-1, A3-2, A3-3 y A3-4; procedentes de CM: CM2, CM3 y CM4.

Los resultados obtenidos de su estudio morfológico realizado en medio líquido se resumen en el *cuadro 2*.

De los que se concluye que los distintos microorganismos unicelulares aislados de los carbones y aguas ácidas de mina, sin diferenciación celular, ni pigmentos fotosintéticos, que se reproducen por escisión binaria transversal, de los que algunos depositan granos de

azufre libre y otros hidróxido férrico, se engloban en la clase II, Schizomycetes, de la división I, Protophita, en el suborden II, Pseudomonadinae, del orden 1, Pseudomonadales y dentro de aquél, en la familia III, Rhobacteriaceae, y en el género *Thiobacillus*.

De este modo quedaron establecidos la familia y el género a que pertenecen estas bacterias, resultados que ya eran de esperar por el proceso de enriquecimiento realizado en medios selectivos.

Cuadro 2. Resultados del estudio morfológico en medio acuoso

Cepa	Crecimiento macroscópico	Crecimiento microscópico	Gram	Esporas
AWA3	t	b	—	—
BWA3	t	b	—	—
A3-1	rp	b	—	nt
A3-2	rp	b	—	nt
A3-3	rp	b	—	nt
A3-4	rp	b	—	nt
CM2	rp	b1	—	nt
CM3	rp	b1	—	nt
CM4	rp	b1	—	nt
<i>F. ferrooxidans</i>	rp	b	—	nt

t = turbidez creciente, con desaparición paulatina del azufre sin formación de velo, en medio de Waksman. rp = color rojo anaranjado, con abundante precipitado de $(OH)_3Fe$ y sales férricas del mismo color, en medio 9K. b = bacilos cortos, gruesos, móviles, aislados, en parejas, pocas veces en cadenas. b1 = bacilos más largos que los anteriores, no tan gruesos, móviles, aislados, en parejas y rara vez en cadenas. nt = prueba no realizada.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el estudio fisiológico, que se presentan en la figura 2 y cuadro 3, permitieron identificar a la cepa AWA3 como *Thiobacillus thiooxidans*, a las A3-1, A3-2, A3-3, A3-4, CM2, CM3, CM4 y *Ferrobacillus ferrooxidans* ATCC como *Th. ferrooxidans*.

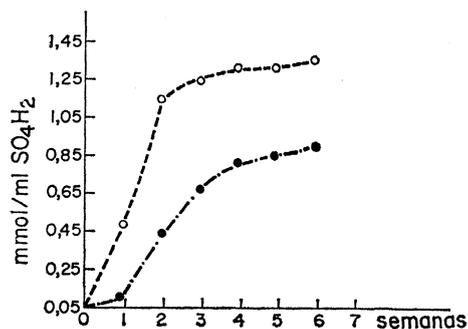


Figura 2. Acidez total producida por las cepas AWA3 (---) y A3-2 (---) en medio 9KS

Cuadro 3. Resumen del estudio fisiológico

Medio	Criterio	AWA3	A3-1	A3-2	A3-3	A3-4	CM2	CM3	CM4	<i>F. ferrooxidans</i>
Waksman	pH final	2,0	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
9KS	pH final	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
9KT	Crecimiento	d	d	d	d	d	—	—	—	d
Colmer	Crecimiento	d	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
9K	pH final	No crece	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Cond. anaerobias	Crecimiento	—	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Cond. autótrofas	Crecimiento	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SO ₄ (NH ₄) ₂	Crecimiento	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	Crecimiento	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Peptona	Crecimiento	+	D	D	D	D	D	D	D	D
NO ₃ K	Crecimiento	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Colonias	Crecimiento	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Tiosulfato-agar	Precip. azufre	+	—	—	—	—	—	—	—	—

d = débilmente positivo. D = discreto. nt = prueba no realizada.

No aparecen colonias de *Ferrobacillus ferrooxidans*, ni de CM2, CM3 y CM4 en tiosulfato-agar, lo que puede ser debido a que las

siembras se realizaron con cultivos mantenidos en medio 9K y no en medio 9KS, condición requerida para el crecimiento en tiosulfato de cepas que se mantienen en medio ferroso.

Los cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* se conservaron en medio líquido 9K y los de *Th. thiooxidans* en medio líquido 9KS.

Las cepas se mantuvieron activas durante más de 3 años, período de tiempo en el que se ha desarrollado el presente trabajo de desulfuración.

RESUMEN

Se enriquecen cultivos y se aíslan y clasifican cepas de bacterias ferro-y sulfo-oxidantes, a partir de muestras de carbón y aguas ácidas de mina.

Se identificaron como *Thiobacillus ferrooxidans* y *Th. thiooxidans*.

SUMMARY

Microbial desulfurization of coal. I. Isolation and identification of iron oxidizing and sulfur oxidizing bacteria

Pure cultures of sulfur oxidizing and iron oxidizing bacteria were obtained from coal samples and acid mine waters. The microorganisms were identified as *Thiobacillus ferrooxidans* and *Th. thiooxidans*.

BIBLIOGRAFIA

1. BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 460. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 459. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
3. COLMER, A. R. 1962. Relation of the iron oxidizer *Thiobacillus ferrooxidans* to thiosulfate. *J. Bacteriol.*, 83, 761-65.
4. COLMER, A. R.; TEMPLE, K. L., and HINKLE, M. Z. 1950. An iron oxidizing bacterium from the acid drainage from some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.*, 59, 317-28.
5. HUTCHINSON, M.; JHONSTONE, K. I., and WHITE, D. 1969. Taxonomy of the genus *Thiobacillus*: The outcome of numerical taxonomy applied to the group as a whole. *J. Gen. Microbiol.*, 57, 397.

6. KINSEL, N. A. 1960. New sulfur oxidizing iron bacterium: *Ferrobacillus sulfooxidans*. J. Bacteriol., 80, 628-32.
7. LEATHEN, W. W.; KINSEL, N. A., and BRALEY, S. A. 1955. A solid medium for the study of *Ferrobacillus ferrooxidans*. Bacteriol. Proc., 1955, 46.
8. LEATHEN, W. W.; KINSEL, N. A., and BRALEY, S. A. 1956. *Ferrobacillus ferrooxidans*: a chemosynthetic autotrophic. J. Bacteriol., 72, 700-4.
9. LEATHEN, W. W.; MCINTYRE, L. D., and BRALEY, S. A. 1951. A medium for the study of the bacterial oxidation of ferrous iron. Science, 114, 280-81.
10. LEONARD, J. W., and COCKRELL, CH. F. 1970. Basic methods of removing sulfur from coal. Rep. W. V. Univ. Coal. Res. Bur., 61, 1-16.
11. PELCZAR, M. J. 1957. Manual of Microbiological Methods S. A. B., 16-17. McGraw-Hill Book Co., New York.
12. PINGS, W. B. 1968. Bacterial leaching. Colo. Sch. Mines Miner. Ind. Bull., II, 1-16.
13. POCHON, J. et TARDIEUX, P. 1962. Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol, 17-19. Editions de la Tourelle, St. Mandé (Seine).
14. PONSFORD, A. P. 1966. Microbiological activity in relation to coal utilization. Brit. Coal. Util. Res. Ass. Mon. Bull., XXX, 2-17.
15. ROGOFF, M. H.; SILVERMAN, M. P., and WENDER, S. I. 1960. Elimination of sulfur from coal by microbiological action. Amer. Chem. Soc. Div., Fuel Chem. Prepr., 2, 25-36.
16. SILVERMAN, M. P., and LUNDGREN, D. G. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cells yields. J. Bacteriol., 77, 642-47.
17. SILVERMAN, M. P.; ROGOFF, M. H., and WENDER, S. I. 1963. Removal of pyritic sulfur from coal by bacterial action. Fuel, 42, 113-24.
18. STARKEY, R. L. 1935. Isolation of some bacteria which oxidize thiosulfate. Soil Sci., 39, 197-219.
19. TEMPLE, K. L., and KOEHLER, W. A. 1954. Drainage from bituminous coal mines. West. V. Univ. Eng. Exp. Sta. Res. Bull., 25, 1-35.
20. TUOVINEN, O. H., and KELLEY, D. P. 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulfide ores. Z. Allg. Mikrobiol., 12, 311-46.
21. WAKSMAN, S. A., and JOFFE, J. S. 1922. Microorganism concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. The *Thiobacillus thiooxidans* a new sulfur oxidizing organisms isolated from the soil. J. Bacteriol., 7, 239-56.

IDENTIFICATION OF DENSE BODIES APPEAR-
ING IN *CHLORELLA* CULTURED IN A MEDIUM
WITH AN AMMONIACAL SALT AS A SOURCE
OF NITROGEN

by

M. VILLARROYA-SANCHEZ, M. RODRIGUEZ-LOPEZ
and M.^a L. MUNOZ-CALVO

INTRODUCTION

The influence of the ammoniacal nitrogen on the nutrition of microalgae has been studied for some years by several authors. Syrett and Morris (17) and Morris and Syrett (12), have studied the inhibition by ammonia of the nitrate assimilation in *Chlorella*, concluding that ammonia acts on the nitrate reductase, which is stimulated by the nitrate ion, and repressed by the ammonium ion or by a product resulting from its assimilation. Latter, other authors, such as Losada et al. (8-9), Solomonson (16) and Maldonado et al. (11), have shown that ammonia is the nutritional repressor of the enzymes of the nitrate-reducing system and that it promotes the inactivation of the nitrate reductase. This process is reversible and the inactivated enzyme can be reactivated if we replace the ammonia in the medium with nitrate. *Figure 1* shows a normal controll cell of *Chlorella* grown in a culture medium with nitrate-N as the sole source of nitrogen.

Moreover, we had previously observed in our laboratory that when *Chlorella* was grown autotrophically in a medium containing ammonia as the sole source of nitrogen, the culture did not grow; the cells discolored, increased their size; and when they were transferred to a fresh medium with the same characteristics, cell lysis took place.

On the basis of the forementioned data, we examined in two previous papers (14-15), the effects of the ammonium ion on *Chlorella* by both biochemical and electron microscopy methods.

One of the main results that was appreciated was that, when the cells of the alga were grown in a medium with ammonium-N as the sole source of nitrogen, some dense bodies that we thought could be signs of cellular degeneration were observed under the electron microscope (*figure 2*).

In this work, we study the nature of the forementioned dense bodies.

MATERIALS AND METHODS

The microorganism that we used was the microalga *Chlorella pyrenoidosa* Chick 211/8h Emerson of the Culture Collection of Algae and Protozoa (The Botany School, University of Cambridge, England), acclimatized in our laboratory and cultured autotrophically in medium A of Rodríguez-López (13), in which we substituted KNO_3 with 1.321 g/l of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The cells were exposed to permanent light and aerated with air containing 2 % of CO_2 .

For study under the electron microscope, the cells were harvested by centrifugation, washed two times with 0.1 M sodium cacodylate buffer, and fixed in 3 % glutaraldehyde following the method of Fahimi and Drochmans (4). Postfixation was carried out in 2 % osmium tetroxide. The algae were suspended in 4 % agar and then the agar pieces containing the algae were dehydrated through a graded ethanol series, from 30 to 100 %. The 70 % ethanol contained 2 % of uranyl acetate as a contrast. After passing through propylene oxide (10), the agar blocks were embedded in Epon, following the method of Cayrac et al. (1) with some variations. The cells were observed in a Philips EM 300, or in a JEOL Jem-100 M, electron microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

According to their appearance under the electron microscope, the forementioned dense bodies could be lipids. Although these com-

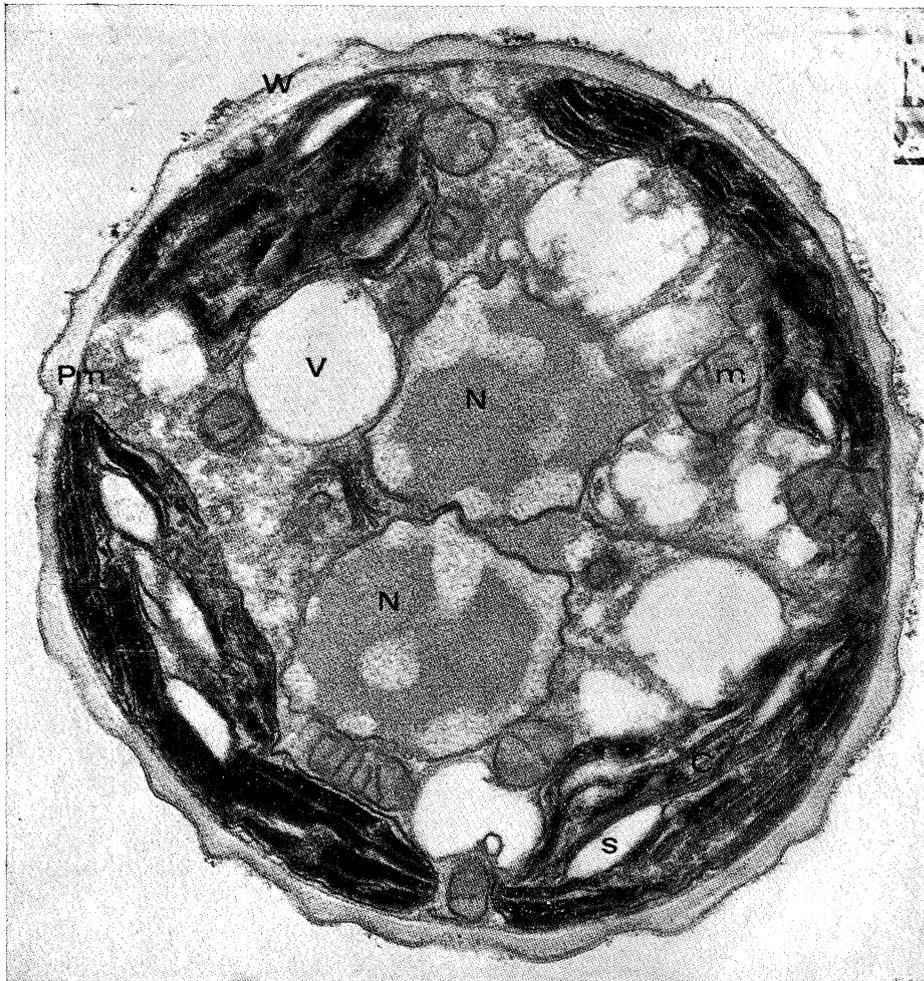


Figure 1. Normal cell of *Chlorella* grown in a culture medium with nitrate-N as the sole source of nitrogen. N, nucleus; V, vacuole; W, cell wall; Pm, plasma membrane; m, mitochondria; C, chloroplast; s, starch. $\times 27,588$

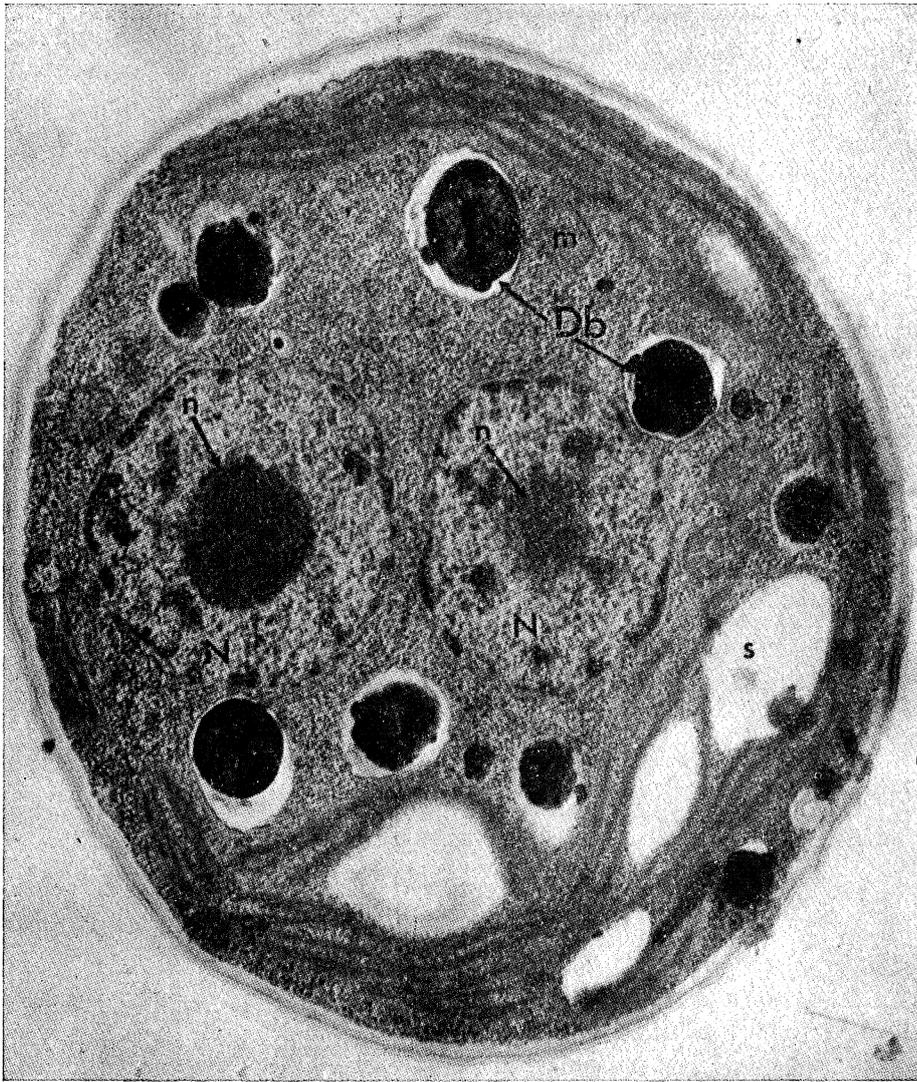


Figure 2. Cell of Chlorella grown in a culture medium with ammonium-N as the sole source of nitrogen. n, nucleolus; Db, dense bodies. $\times 29,080$

pounds usually appear in the cytoplasm as greyish vacuoles, there are other electron dense lipids located generally in the chloroplast with a darker appearance.

However, we could not eliminate the slight possibility that the dense bodies could be polyphosphates. In fact, according to Harold (6-7), polyphosphate granules can appear in the plant cells as a consequence of the exhaustion of an essential nourishment or in unfavorable conditions for growth.

In order to find out whether the dense bodies were polyphosphates or not, we carried out a number of experiments. First, we measured the incorporation into the cells of ^{32}P , which was previously supplied as $^{32}\text{PO}_4\text{Na}_3$, to a medium containing KNO_3 and to another containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The results are expressed in *table 1*.

Table 1. Incorporation of ^{32}P into cells. Expressed in percent of the total content in the medium

Cells cultured	Hours				
	0	2	6	24	48
In a medium with NO_3^-	1.11	1.28	1.69	3.06	3.87
In a medium with NH_4^+	0.44	0.65	0.91	2.21	3.63

The differences between the two media for ^{32}P incorporation are not significant; being even less so in the cells cultured in the medium with ammonium-N than in those cultured in the medium with nitrate-N. These results confirmed our idea that the dense bodies probably were not polyphosphates.

In addition, we performed some other experiments. We extracted inorganic phosphorus from both types of the forementioned cells following the method of Harold (6), and then we evaluated it following the method of Eibl and Lands (3). In *table 2* we can see that the results for the algae cultured in a medium with nitrate-N are similar to those cultured in a medium with ammonium-N.

Finally, we carried out two other tests: one that was cytochemical and one of electron microscopy. First, we embedded in Epon the cells cultured in a medium with ammonium-N and containing the dense bodies. Sections of the blocks were incubated for 24 h in a solution of 100 units of pyrophosphatase (Sigma) in 2.5 ml of tris HCl buffer, pH 7.2. After this period of time, the sections were observed under the electron microscope and it was noted that the dense bodies persisted.

Table 2. Evaluation of inorganic phosphorus. Expressed in $\mu\text{mol/mg}$ of dry weight of the alga

Cells cultured	$\mu\text{mol/mg}$
In a medium with NO_3^-	107.40
In a medium with NH_4^+	112.14

According to Drews (2), granules of polyphosphate in plant cells show a characteristic opaque appearance under the electron microscope, volatilizing at high electron intensity and leaving characteristic holes. This method was applied without any positive results. Therefore, the hypothesis of the polyphosphates was eliminated.

Finally, we considered that the dense bodies could be accumulations of lipids, although they would be, perhaps, of a different nature and composition from those which the cells usually contain. The cells of *Chlorella* were subjected to the action of a series of lipid dissolvents. We divided them into two groups: cells which were cultured in a normal medium with nitrate-N, and those which were cultured in a medium with ammonium-N. Each type of cell was treated for three days with lipid dissolvents following the method of Folch et al. (5), with some variations. After this treatment, cells were embedded in Epon and the sections were observed under the electron microscope. In *figures 3-4* it can be seen that none of the cells showed in the cytoplasm the forementioned dense bodies, regardless of their origin (with nitrate-N or with ammonium-N).

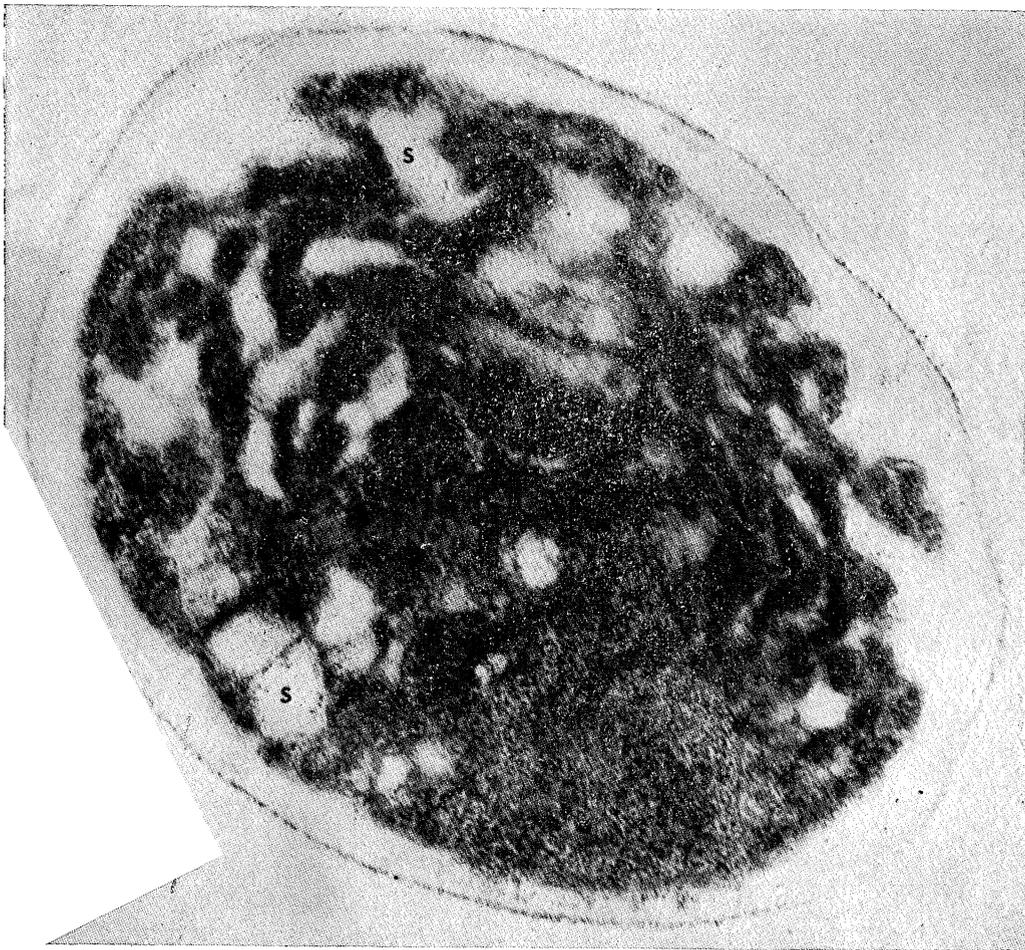


Figure 3. Cell of Chlorella grown in a culture medium with nitrate-N and subjected to a series of lipid solvents. $\times 42,872$

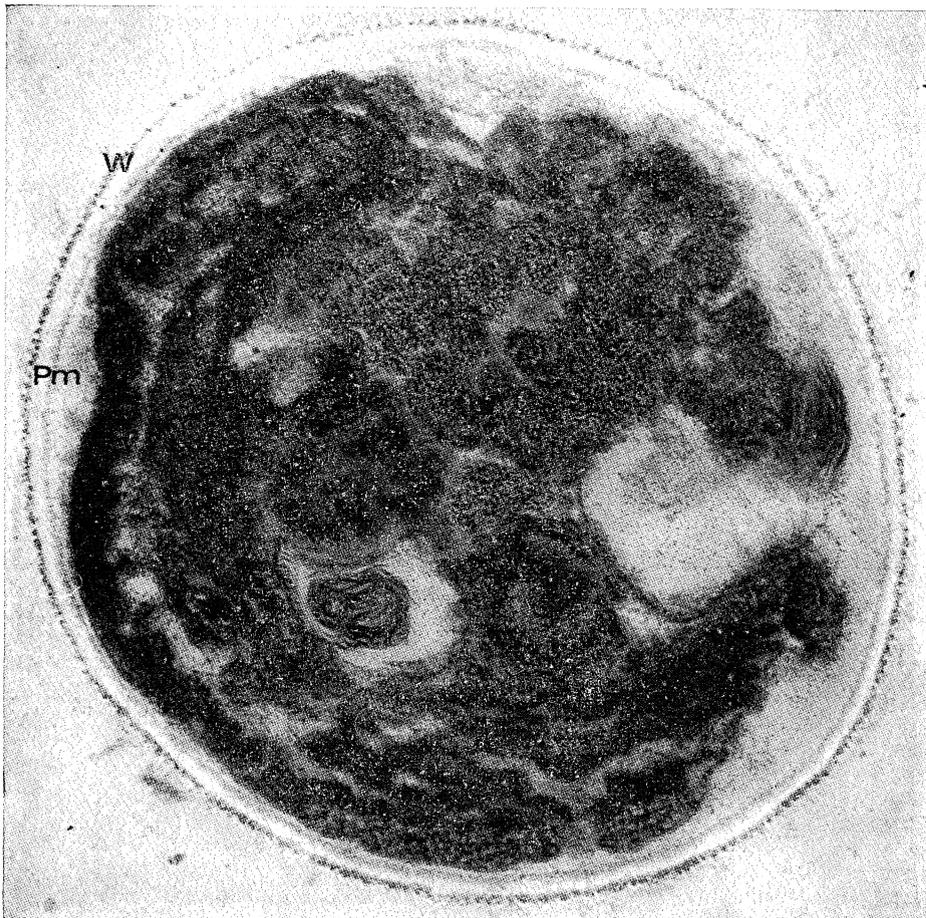


Figure 4. Cell of Chlorella grown in a culture medium with ammonium-N and subjected to a series of lipid solvents. $\times 52,800$

Therefore, we concluded that the dense bodies are lipids, their nature probably being different from normal lipids (or grey colour under the electron microscope). They are specific and originate exclusively when *Chlorella* is subjected to the action of any ammoniacal salt, although they appear more profusely when the salt is $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Ms. V. Azorín López for technical assistance throughout this work.

SUMMARY

Cells of *Chlorella pyrenoidosa* grown in a medium with ammonium-N showed, under the electron microscope, some characteristic dense bodies which were identified as being of lipidic nature.

RESUMEN

Identificación de cuerpos densos que aparecen en Chlorella cultivada en un medio con una sal amoniacal como fuente de nitrógeno

Células de *Chlorella pyrenoidosa* cultivadas en un medio con N amónico mostraban, al microscopio electrónico, unos característicos cuerpos densos que se identificaron como de naturaleza lipídica.

REFERENCES

1. CAYRAC, J. C.; PRATZ, A., and BALAS, D. 1973. Techniques de fixation et d'inclusion rapides pour la microscopie électronique. *J. Microsc.*, **18**, 401-6.
2. DREWS, G. 1960. Elektronenmikroskopische untersuchungen an *Mycobacterium phlei*. *Arch. Mikrobiol.*, **35**, 53-62.
3. EIBL, H., and LANDS, W. E. 1969. A new, sensitive determination of phosphate. *Ann. Biochem., Exp. Med.*, **30**, 51-57.

4. FAHIMI, H. D., and DROCHMANS, P. 1965. Essais de standardisation de la fixation au glutaraldéhyde. I. Purification et détermination de la concentration du glutaraldéhyde. *J. Microsc.*, 4, 725-36.
5. FOLCH, J.; LEES, M., and SLOANE STANLEY, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
6. HAROLD, F. M. 1963. Accumulation of inorganic polyphosphate in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.*, 86, 216-21.
7. HAROLD, F. M. 1966. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriol. Rev.*, 30, 772-94.
8. LOSADA, M.; HERRERA, J.; MALDONADO, J. M., and PANEQUE, A. 1973. Mechanism of nitrate reductase reversible inactivation by ammonia in *Chlamydomonas*. *Plant Sci. Lett.*, 1, 31-37.
9. LOSADA, M.; PANEQUE, A.; APARICIO, P. J.; VEGA, J. M.; CÁRDENAS, J., and HERRERA, J. 1970. Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system in *Chlorella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 1009-15.
10. LUFT, J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 409-14.
11. MALDONADO, J. M.; PUEYO, M. C., and CHAPARRO, A. 1974. Propiedades reguladoras de la nitrato-reductasa del alga *Chlorella*. *Rev. Real Acad. Cienc. Exactas, Fís. Natur.*, 68.
12. MORRIS, J., and SYRETT, P. J. 1963. The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. *Arch. Mikrobiol.*, 47, 32-41.
13. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. 1964. Formas gigantes de *Chlorella pyrenoidosa*, su inducción por azúcares y su utilidad para el crecimiento de cultivos. *Bol. Real Soc. Españ. Hist. Natur. Secc. Biol.*, 62, 49-57.
14. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M.; MUÑOZ, M. L., and VILLARROYA, M. 1974. Micrographic study of *Chlorella* grown in a culture medium without nitrogen or with ammonium-N. *Microbiol. Españ.*, 27, 213-24.
15. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M.; VILLARROYA-SÁNCHEZ, M., and MUÑOZ-CALVO, M. L. 1975. Estudio sobre *Chlorella* en orden a su utilización en la alimentación humana y/o animal. *An. Bromatol.*, XXVII, 275-86.
16. SOLOMONSON, L. P. 1974. Regulation of nitrate reductase activity by NADH⁺ and cyanide. *Biochim. Biophys. Acta.* 334, 297-308.
17. SYRETT, P. J., and MORRIS, J. 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta.* 67, 566-75.

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LEVADURAS DE VELO. I

por

N. KHAYYAT, M. C. ESTEBAN y V. ARROYO

INTRODUCCION

La variabilidad de las características fisico-químicas de un vino a lo largo del tiempo y de una a otra cosecha plantea la necesidad de buscar un medio sintético que, salvando las dificultades anteriores, favorezca al máximo la aparición y desarrollo del velo, permitiendo el estudio del metabolismo de las levaduras que lo producen.

Estudiando la influencia que poseen diversas fuentes nutritivas en dicho desarrollo, tratamos en el presente trabajo de sentar las bases para el diseño de un medio mínimo, fijando además las condiciones que permitan el desarrollo del velo en el menor tiempo posible y observando los factores que supongan un posible control sobre la evolución del velo.

MATERIALES Y METODOS

La cepa empleada pertenece a la Colección del Instituto y ha sido aislada directamente del velo.

Los medios ensayados están en función del compuesto sometido a estudio, seleccionado previamente tras las consultas bibliográficas necesarias (1, 3-5). Hemos de distinguir dos modalidades:

La primera afecta al estudio de las fuentes hidrocarbonada y nitrogenada. En ella el medio está constituido por Y. N. B. (2) o Y. C. B. (2), respectivamente, y la fuente ensayada, realizándose

simultáneamente el estudio en presencia y en ausencia de etanol. Las composiciones así como las condiciones fisico-químicas del medio aparecen en los cuadros 1-2.

La segunda afecta, por su parte, al estudio de la influencia que aminoácidos y vitaminas poseen sobre la formación del velo. Partiendo de la composición total del medio y entendiendo como tal aquella que incluye todas las posibles variantes, se retira en cada experiencia únicamente el compuesto cuya influencia quiere observarse. Los cuadros 3-4 muestran la composición de estos medios completos.

Cuadro 1. Medio utilizado para estudiar la influencia de las fuentes hidrocarbonadas en la formación del velo

Yeast nitrogen base	6,7 g
Fuente de carbono	5,0 g
Agua destilada	1.000 ml
pH, ± 5	
Temperatura, $20^{\circ} \text{C} \pm 1$	
Concentración microbiana en el tiempo cero, 2×10^6 microbios/ml	
Concentración de etanol, 12 % (v/v)	
Esterilización, por filtración amicrobica	

Cuadro 2. Medio utilizado para estudiar la influencia de las fuentes nitrogenadas en la formación del velo

Yeast carbon base	11,7 g
Fuente de nitrógeno	1,0 g
Agua destilada	1.000 ml
pH, ± 5	
Temperatura, $20^{\circ} \text{C} \pm 1$	
Concentración microbiana en el tiempo cero, 2×10^6 microbios/ml	
Concentración de etanol, 12 % (v/v)	
Se ha usado otro medio con una concentración de la fuente de nitrógeno de 2,0 g/l	

Cuadro 3. Medio utilizado para estudiar la influencia de los aminoácidos en la formación del velo

Yeast nitrogen base	6,7 g		
Glucosa	10,0 g		
Alanina	1 g	Treonina	1 g
Valina	1 g	Cisteína	1 g
Leucina	1 g	Tirosina	1 g
Isoleucina	1 g	Asparagina	1 g
Prolina	1 g	Glutamina	1 g
Fenilalanina	1 g	Acido aspártico	1 g
Triptófano	1 g	Acido glutámico	1 g
Metionina	1 g	Lisina HCl	1 g
Glicocola	1 g	Arginina HCl	1 g
Serina	1 g	Histidina HCl	1 g
Agua destilada	1.000 ml		

Todos los aminoácidos usados son forma «L».

En cada medio se añade 19 aminoácidos, con la ausencia de uno distinto en los 20 medios.

pH, ± 5

Temperatura, $20^{\circ}\text{C} \pm 1$

Concentración microbiana en el tiempo cero, 2×10^6 microbios/ml

Concentración de etanol, 12% (v/v).

Esterilización por filtración amicrobica.

Cuadro 4. Medio utilizado para estudiar la influencia de las vitaminas en la formación del velo

Vitamin free yeast base	16,7
Biotina	2,0 μg
Pantotenato cálcico	400,0 μg
Acido fólico	2,0 μg
Inositol	2.000,0 μg
Niacina	400,0 μg
Acido p-amino-benzoico	200,0 μg
Clorhidrato de piridoxina	400,0 μg
Riboflavina	200,0 μg
Tiamina	400,0 μg
Agua destilada	1 000 ml

En cada medio se añade 8 vitaminas, con la ausencia de uno distinto en los 9 medios a preparar.

pH, ± 5

Temperatura, $20^{\circ}\text{C} \pm 1$

Concentración microbiana en el tiempo cero, 2×10^6 microbios/ml

Concentración de etanol, 12% (v/v)

Esterilización por filtración amicrobica.

El procedimiento fue el siguiente: la levadura, una vez crecida en Y. E. P. D. (yeast extract peptone dextrose) sólido (6), durante 48 h, a 28 °C, se siembra en matraces con el medio en estudio, que se mantienen en agitación 48 h, a 28 °C. Con la suspensión obtenida se siembran los tubos de ensayo estériles, que contienen el mismo medio esterilizado por filtración amicróbica. El conjunto se mantiene a 20-21 °C, observando el momento de aparición del velo, así como su durabilidad y consistencia.

RESULTADOS

Influencia de la fuente hidrocarbonada

Los resultados obtenidos, que aparecen en el *cuadro 5*, permiten la distinción de tres grupos entre las fuentes ensayadas:

El primero, constituido por aquellas que presentan desarrollo normal del velo en mínimo tiempo y tanto en presencia como en ausencia de etanol: glucosa y fructosa.

El segundo, integrado por aquellas que sólo presentan desarrollo del velo en ausencia de etanol: maltosa, celobiosa, melibiosa, sorbosa, galactitol, etc.

El tercero, muy amplio y en el que se incluyen todas aquellas fuentes hidrocarbonadas que permiten el desarrollo del velo en ausencia y presencia de etanol, variando entre ellas el momento de aparición y la intensidad del crecimiento.

Influencia de la fuente nitrogenada

En el *cuadro 6*, donde quedan reflejados los resultados obtenidos, podemos observar que el empleo de dos concentraciones distintas de la fuente nitrogenada no supone alteración en el resultado final.

Es importante, asimismo, destacar la ausencia del velo cuando en el medio existe etanol.

En los medios no alcohólicos, solamente el ácido 4-amino-n-butírico parece favorecer el desarrollo del velo, mientras que la urea

Cuadro 5. Influencia de las fuentes hidrocarbonadas en la formación del velo

Fuente de carbono	5	10	15	20	25	35	50
L-arabinosa	—	I	I	+	+	+	+
L-arabinosa + etanol	—	—	—	—	—	—	—
D-arabinosa	I	+	+	+	+	+	+
D-arabinosa + etanol	—	—	—	—	—	—	+
Celobiosa	I	+	+	+	+	+	+
Celobiosa + etanol	—	—	—	—	—	—	+
Eritritol	I	+	+	+	+	+	+
Eritritol + etanol	—	—	—	—	—	—	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa + etanol	—	+	+	+	+	+	+
Galactitol	I	+	+	+	+	+	+
Galactitol + etanol	—	—	—	—	—	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa + etanol	—	—	—	—	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol + etanol	—	I	I	+	+	+	+
D-glucitol	—	I	I	+	+	+	+
D-glucitol + etanol	—	—	—	—	—	—	—
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa + etanol	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	I	+	+	+	+	+	+
Inositol + etanol	—	—	—	—	—	—	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+
Inulina + etanol	—	—	—	—	+	+	+
Lactosa	I	+	+	+	+	+	+
Lactosa + etanol	—	—	—	—	—	—	—
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa + etanol	—	—	—	—	—	—	—
Melecitosa	+	+	+	+	+	+	+
Melecitosa + etanol	—	—	—	—	—	+	+
Melibiosa	I	+	+	+	+	+	+
Melibiosa + etanol	—	—	—	—	—	—	+
Alfa-metil-D-glucósido	—	I	I	+	+	+	+
Alfa-metil-D-glucosido + etanol	—	—	—	—	—	—	—

Cuadro 5 (conclusión)

Fuente de carbono	5	10	15	20	25	35	50
D-manitol	—	I	I	+	+	+	+
D-manitol + etanol	—	—	—	—	—	—	—
Rafinosa	+	—	+	+	+	+	+
Rafinosa + etanol	—	—	—	I	+	+	+
L-ramnosa	I	+	+	+	+	+	+
L-ramnosa + etanol	—	—	—	—	—	—	+
Ribitol	I	+	+	+	+	+	+
Ribitol + etanol	—	—	—	—	—	—	—
D-ribosa	—	I	I	+	+	+	+
D-ribosa + etanol	—	—	—	—	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa + etanol	—	I	+	+	+	+	+
Salicina	I	+	+	+	+	+	+
Salicina + etanol	—	—	—	—	—	—	—
L-sorbosa	I	+	+	+	+	+	+
L-sorbosa + etanol	—	—	—	—	—	—	+
Trehalosa	I	+	+	+	+	+	+
Trehalosa + etanol	—	—	—	—	—	—	+
D-xilosa	I	+	+	+	+	+	+
D-xilosa + etanol	—	—	—	—	—	—	+
Acido cítrico	—	—	I	+	+	+	+
Acido cítrico + etanol	—	+	+	+	+	+	+
Acido-DL-láctico	—	I	I	+	+	+	+
Acido-DL-láctico + etanol	—	—	—	—	—	—	—
Acido succínico	+	+	+	+	+	+	+
Acido succínico + etanol	—	+	+	+	+	+	+
Acido tartárico	—	I	I	+	+	+	+
Acido tartárico + etanol	—	—	—	—	—	—	—

— = ausencia de velo. + = presencia de velo. I = islotes.

y el sulfato amónico permiten un desarrollo normal, no apareciendo velo en el resto de las fuentes ensayadas.

Con respecto a la influencia de los aminoácidos (*cuadro 7*), se observa que ésta se manifiesta sobre la permanencia del velo en superficie y no sobre su aparición.

Cuadro 6. Influencia de las fuentes nitrogenadas en la formación del velo

Fuente de nitrógeno	Días							
	5		10		15		20	
	1 g/l	2 g/l						
Acido 4-amino-n-butírico	++	++	++	++	++	++	++	++
Acido 4-amino-n-butírico + etanol	-	-	-	-	-	-	C	C
ClH de D (+)-glucosamina	-	-	-	-	-	-	-	-
ClH de D (+)-glucosamina + etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato potásico	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato potásico + etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito potásico	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito potásico + etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato amónico	I	I	+	+	+	+	+	+
Sulfato amónico + etanol	-	-	-	-	-	-	C	C
Sulfato de guanidina	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de guanidina + etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
1, 4, 7, 10-tetraamino-decano	-	-	-	-	-	-	-	-
1, 4, 7, 10-tetraaminodecano + etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
1, 4, 7-triaminoheptano	-	-	-	-	-	-	-	-
1, 4, 7-triaminoheptano + etanol	-	-	-	-	-	-	-	-

- = ausencia de velo. + = presencia de velo. ++ = velo muy desarrollado
C = crecimiento sin velo.

Finalmente, los resultados obtenidos con las diversas vitaminas (*cuadro 8*), indican, en general, una formación deficiente o tardía del velo cuando falta cualquiera de las vitaminas ensayadas, resultando el pantotenato cálcico la única, al parecer, imprescindible, pues en su ausencia el velo no aparece.

Cuadro 7. Influencia de los aminoácidos en la formación del velo

Aminoácido ausente del medio	Días			
	5	15	20	30
Acido aspártico	+	-	-	-
Acido glutámico	+	-	-	-
Alanina	+	-	-	-
Arginina ClH	+	-	-	-
Asparagina	+	-	-	-
Cisteína	+	-	-	-
Fenilalanina	+	-	-	-
Glicocola	+	-	-	-
Glutamina	+	-	-	-
Histidina ClH	+	-	-	-
Isoleucina	+	-	-	-
Leucina	+	-	-	-
Lisina ClH	+	-	-	-
Metionina	+	-	-	-
Prolina	+	-	-	-
Serina	+	-	-	-
Tirosina	+	-	-	-
Treonina	+	-	-	-
Triptófano	++	-	-	-
Valina	+	-	-	-

- = ausencia de velo. + = presencia de velo.
++ = velo muy desarrollado.

Cuadro 8. Influencia de las vitaminas en la formación del velo

Vitamina ausente del medio	Días				
	5	10	15	20	25
Clorhidrato de piridoxina	I	I	I	I	I
Riboflavina	I	I	I	I	I
Acido p-amino-benzoico	-	I	I	I	I
Niacina	-	I	I	I	I
Tiamina	-	I	I	I	I
Acido fólico	-	-	I	I	I
Inositol	-	-	I	I	I
Biotina	-	-	-	I	I
Pantotenato cálcico	-	-	-	-	-
Vitamin free yeast base (2)	-	-	-	-	-
Yeast nitrogen base + glucosa	I	+	+	+	+

- = ausencia de velo. + = presencia de velo. I = islotes.

CONCLUSIONES

La observación conjunta de los resultados obtenidos nos permite concluir que, de las variables nutritivas ensayadas, solamente los aminoácidos poseen influencia directa sobre la evolución y permanencia del velo en superficie, ya que su aparición se produce en todos los casos independientemente del aminoácido ausente del medio.

Por su parte, las diversas fuentes hidrocarbonadas y nitrogenadas, así como las vitaminas, son factores decisivos en la aparición del velo, pero cuando ésta se produce, el velo se mantiene en superficie, presentando mayor o menor consistencia.

La presencia o ausencia de etanol es factor determinante de resultados en los ensayos de las fuentes nitrogenadas, resultando variable su influencia en el caso de las fuentes hidrocarbonadas.

RESUMEN

Con objeto de definir las bases de un medio sintético mínimo, en condiciones físico-químicas fijas y adecuadas al estudio del metabolismo de la levadura del velo, se llevan a cabo experiencias sobre la influencia que, en presencia o ausencia de etanol, poseen diversas fuentes nutritivas en la aparición del velo y su evolución.

Los resultados obtenidos indican que la variación en la fuente nitrogenada o hidrocarbonada determina la aparición o no del velo.

La ausencia del medio de cualquiera de las vitaminas ensayadas supone la formación deficiente, tardía o incluso nula del velo.

Los aminoácidos parecen no tener influencia en la aparición del velo, afectando, sin embargo, a la permanencia de éste en la superficie.

SUMMARY

Contribution to the study of wine-film yeasts. I

Some experiences have been carried out to know the influence of several nutritive elements on the film growth and its evolution,

with or without ethanol, in order to define a minimum synthetic medium under controlled physical and chemical conditions with the aim of studying the film yeast metabolism.

The results state that according to the carbon or nitrogen source used can or cannot appear the film.

The absence of vitamins can retard and even make impossible the apparition of the film.

Although the aminoacids seem not to have an influence on the film growth, their absence shorten the remaining-phase of the film on the surface of the medium.

BIBLIOGRAFIA

1. BARNETT, J. A., and PANKURST, R. J. 1974. A New Key to the Yeast. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
2. Difco Laboratories. 1966. Difco Manual Supplementary, 374.
3. GIBBS, B. M., and SHAPTON, D. A. 1968. Identification Methods for Microbiologists, part B. Academic Press, London.
4. LODDER, J. 1970. The Yeast. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
5. LODDER, J., and KREGER VAN RIJ, N. J. W. 1967. The Yeast. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
6. MACKAY, V., and MANNEY, T. 1974. Mutations affecting sexual conjugations and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and phenotypic characterization of nonmating mutants. *Genetics*, 76, 255-71.

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LEVADURAS DE VELO. II

por

M. C. ESTEBAN, N. KHAYYAT y V. ARROYO

INTRODUCCION

La determinación de la curva de crecimiento (7) de un microorganismo es requisito imprescindible, en la mayoría de los casos, para lograr un conocimiento más profundo del comportamiento de éste.

Se han determinado en el presente trabajo las curvas de crecimiento de una capa de levadura de velo, perteneciente a la Colección del Instituto, en dos medios sintéticos y en un medio natural.

MATERIALES Y METODOS

La cepa estudiada procede de Jerez de la Frontera y ha sido aislada directamente de velo.

La composición de los medios sintéticos empleados queda reflejada en el *cuadro 1*, en el que puede apreciarse la mayor simplicidad del denominado medio A, cuya aportación de: fuente nitrogenada, aminoácidos esenciales, oligoelementos, vitaminas y sales minerales la efectúa el Y. N. B. (yeast nitrogen base) (2) utilizado, mientras en el medio B se emplea Y. N. B. sin sulfato amónico ni aminoácidos (3), con objeto de incorporar estos compuestos en las concentraciones previamente fijadas, tras las consultas bibliográficas necesarias (1, 5-6, 9), para su equiparación a las presentes en vino.

El medio natural es un vino «sobretablas» de Jerez, con 14,7° de alcohol.

El procedimiento seguido fue el siguiente: la levadura, una vez

crecida en Y. E. P. D. (yeast extract peptone dextrose) sólido (4), durante 48 h a 28 °C, se siembra en matraces con el medio en estudio que se mantienen 48 h en agitación a 28 °C. Con la suspensión obtenida se siembran los tubos de ensayo que contienen 10 ml de medio esterilizado por filtración amicrobica. Se parte de concentraciones comprendidas entre 10^5 y 10^6 microorganismos/ml. El conjunto se mantiene a 22 °C, extrayéndose 5 tubos en cada muestreo.

Cuadro 1. Composición de los medios sintéticos empleados

Componentes	Medio A	Medio B
Etanol	13 % v: v	14 % v: v
Glicerina	12,5 g/l	10 g/l
Glucosa		0,5 g/l
Acetaldehído		78 mg/l
Acido acético	0,15 g/l	
Acido tartárico	4 g/l	3,5 g/l
Alcoholes superiores		195 mg/l
Sulfato amónico	5 g/l	1 g/l
Histidina (a)	10 mg/l	20 mg/l
Metionina (a)	20 mg/l	40 mg/l
Triptófano (a)	20 mg/l	50 mg/l
Prolina		260 mg/l
Leucina		150 mg/l
Isoleucina		100 mg/l
Treonina		100 mg/l
Tirosina		80 mg/l
Arginina		70 mg/l
Lisina		70 mg/l
Valina		175 mg/l
Acido glutámico		100 mg/l
Vitaminas (a)	4,004 mg/l	
Oligoelementos (a)	1,840 mg/l	
Sales minerales (a)	1,7 mg/l	
pH	3,5	
Temperatura	20-22° C	
Conc. microbiana t. ^o = 0	10 10 g/ml	
Vol. medio/tubo	10 ml	

(a) integrados en Y. N. B. (2) y/o Y. N. B. (3).

La determinación del número de microorganismos vivos presentes en el medio, en cada momento, se lleva a cabo por recuento en placa utilizando un contador de colonias Gallenkamp.

RESULTADOS

En el estudio del desarrollo del velo se atendió a dos tipos de observaciones: 1) la apreciación *visual* que nos indica un mayor desarrollo y duración del velo en el medio natural, constituyendo solamente una fina película de escasa consistencia y permanencia en superficie el velo obtenido en ambos medios sintéticos, y 2) *las curvas de crecimiento* (figuras 1-3), en las que una flecha sobre el eje de abscisas

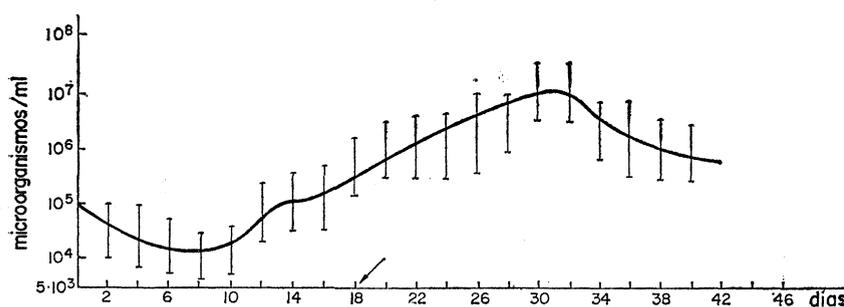


Figura 1. Medio sintético A

indica el momento de aparición del velo; en los tres casos parecen existir las siguientes características comunes: a) una fase de adaptación al medio más o menos pronunciada y que se traduce en una disminución en el número de microorganismos vivos presentes en el medio, b) un primer desarrollo, anterior al velo, constituido por una fase exponencial y una fase estacionaria, c) una segunda fase exponencial, más intensa que la primera, y en cuyo inicio se produce la aparición de los primeros islotes de velo, d) una fase estacionaria más o menos larga, y e) una fase final nuevamente descendente en cuanto al número de microorganismos vivos presentes en el medio; presenta pues el microorganismo crecimiento diaúxico (8) en los tres medios ensayados.

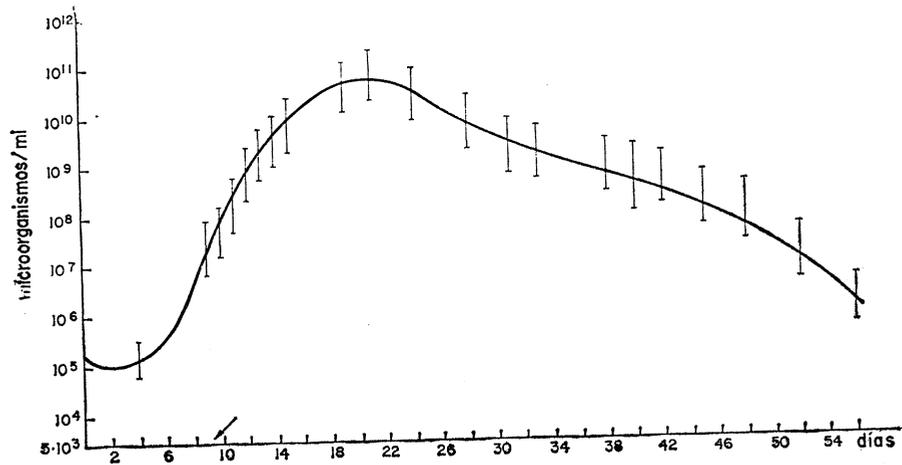


Figura 2. Medio sintético B

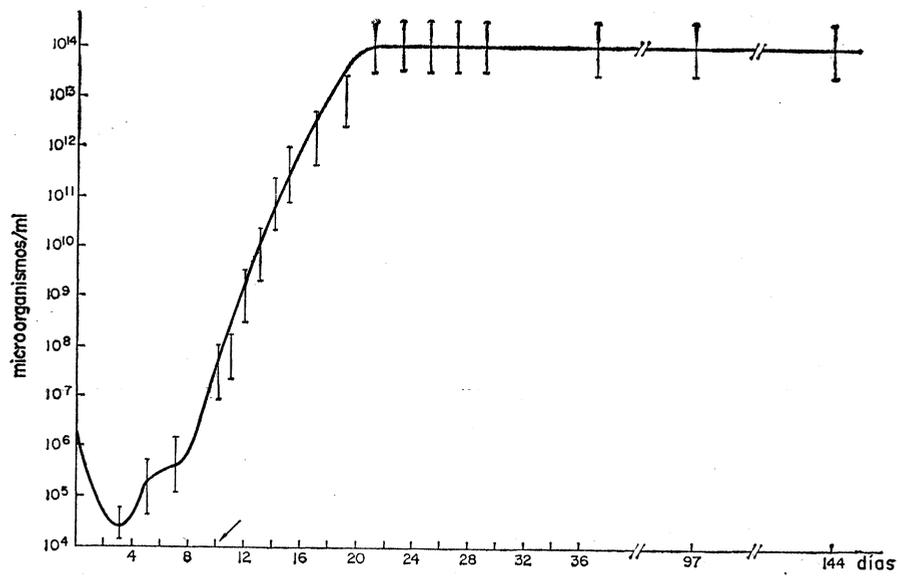


Figura 3. Vino «sobretablas»

Si recurrimos a la comparación entre las curvas (*figura 4*), obtenemos la confirmación de las observaciones visuales realizadas, pues tanto el número de microorganismos vivos presentes durante la segunda fase estacionaria como la duración de la misma son claramente superiores en el medio natural. Resulta asimismo destacable el resultado intermedio obtenido con el medio sintético más complejo, B, si nos referimos al número de microorganismos vivos presentes en el medio durante la fase estacionaria principal, pero no en cuanto a la duración de la misma.

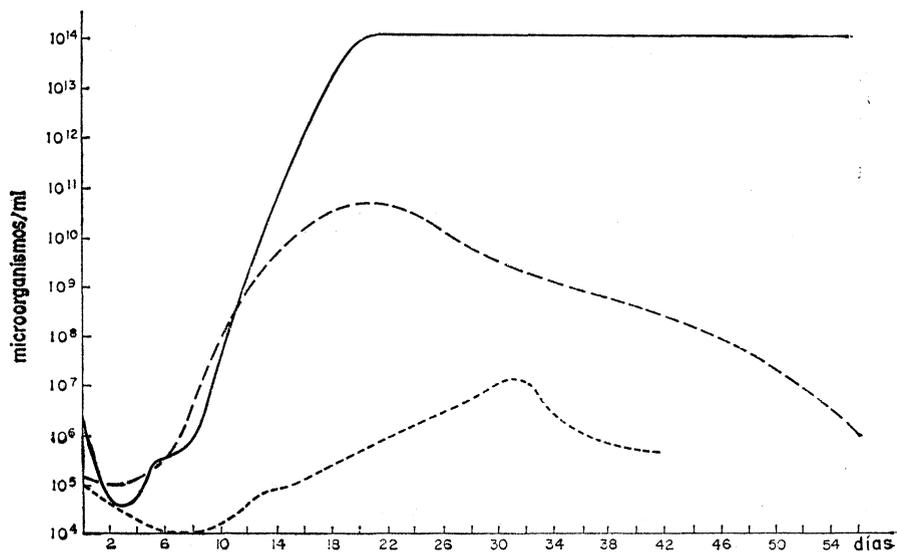


Figura 4. ---, medio sintético A. — — —, medio sintético B. —, vino «sobretablas»

CONCLUSIONES

La escasa permanencia del velo en la superficie en ambos medios sintéticos puede indicar la presencia en el vino de un compuesto O, factor determinante de la aglutinación de células durante dicha fase.

La analogía de comportamiento por parte del microorganismo que parece desprenderse de la similitud de las curvas de crecimiento.

queda limitada en cuanto a la posible utilización de medios sintéticos en el estudio de fenómenos debidos al velo, por la escasa duración de la segunda fase estacionaria en la que, una vez superado el período de crecimiento y reproducción predominantes, el microorganismo adquiere su verdadera identidad como consumidor y productor de los compuestos que confieren características especiales al producto final.

RESUMEN

Se estudian las «curvas de crecimiento» de una cepa de levadura de velo aislada en Jerez de la Frontera, en diversos medios: un medio natural, vino «sobretablas», y dos medios sintéticos, A y B, de distinta complejidad.

Dichas curvas nos indican un «crecimiento diaúxico» en los tres casos. Sin embargo, la composición del medio es factor decisivo en la intensidad y duración del velo formado.

SUMMARY

Contribution to the study of wine-film yeasts. II

The growth curves of one specie of yeast isolated from wine-film of Spanish wines (Jerez de la Frontera), has been determinated in wine and two synthetic media A and B.

Diauxic curves have been obtained from three media. With respect to the duration and intensity of the film, medium composition is a decisive factor.

BIBLIOGRAFIA

1. BIDAN, P., et LUCETTE, A. 1958. Sur la composition en acides amines de quelques vins. *Ann. Technol. Agr.*, IV, 403.
2. Difco Laboratories. 1966. *Difco Manual Supplementary*, 374.
3. Difco Laboratories. 1966. *Difco Manual Supplementary*, 377.
4. MACKAY, V., and MANNEY, T. 1974. Mutations affecting sexual conjugations and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and phenotypic characterization of nonmating mutants. *Genetics*, 76, 255-71.

-
5. POLO, M. C. 1973. Evolución de los aminoácidos libres en mosto y en vinos por la acción de las levaduras de «flor». Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.
 6. RIBEREAU-GAYON, J. ; PEYNAUD, E. ; SUDRAUD, P., and RIBEREAU-GAYON, P. 1976. *Traité d'Oenologie. Sciences et Techniques du Vin*, 1. Ed. Dunod, Paris.
 7. SENEZ, J. C. 1976. *Microbiología General*, 177-89. Ed. Alhambra, Madrid.
 8. SENEZ, J. C. 1976. *Microbiología General*, 443-45. Ed. Alhambra, Madrid.
 9. VOGT, E. 1972. *Fabricación de Vinos*, 189-97. Ed. Acribia, Zaragoza.

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

CHARACTERIZATION OF RENNIN - LIKE ENZYME PRODUCED IN SUBMERGED CULTURES OF *ASPERGILLUS NIGER*

by

M. S FODA

INTRODUCTION

Within the last few decades, it was established that the enzymatic transformation of milk casein into insoluble calcium paracaseinate could be carried out via large number of enzymes widely distributed among microorganisms and higher plants (2, 10, 13). According to Sternberg (12) the microbial milk-clotting enzymes may be favored because of the convenience of their mass production in addition to their versatile properties which allow the selection of the suitable enzyme for the particular type of cheese desired. These properties of microbial enzymes, in addition to the increasing scarcity of calf rennet, have resulted in an upsurge in researches aiming at the feasibility evaluation of various milk-coagulation enzymes from fungi and bacteria. Among bacteria the genus *Bacillus* has been thoroughly investigated (4, 6). On the other hand, numerous species of fungi belonging to different genera, with special reference to those species belonging to *Mucor* (2), *Aspergillus* (7, 9), and *Penicillium* (8), were reported to produce active milk-clotting enzymes under certain conditions. Some of these enzymes are now produced on industrial scale particularly, those from *Mucor miehei* (12) and *Endothia parasitica* (11). Abdel-Fattah and Mabrouk (1) reported some properties of rennin-like enzyme from *Aspergillus niger*. However, their studies were highly academic with very little attention to those information necessary for the practical evaluation of

such an enzyme with respect to feasibility as an actual substitute of calf rennet. Thus the present work was carried out to illustrate the biochemical properties pertinent to the milk-clotting process for the enzyme produced by *A. niger* in submerged cultures. In addition, we report the successful use of sweet rennet buffalo whey as a complete medium for the production of this enzyme. Such a byproduct medium would certainly enhance the prospectives of feasibility with respect to industrial applications.

MATERIALS AND METHODS

Organism, media and conditions of growth

A strain of *Aspergillus niger* No. 66, obtained from the collection of the NRC, was employed. In a previous screening process, this strain proved to be capable of producing milk-clotting activity on whey media. Thus, sweet rennet buffalo whey, for the purpose of feasibility evaluation, was used as such (after sterilization) as a complete medium for growth and production of the milk-clotting enzyme by the tested strain of *Aspergillus niger*. Hence, 300 ml conical flasks containing 70 ml of the sterile media were inoculated heavily with the spores of the organism and placed on rotary shaker at $30^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ for the period of incubation desired. The cultures were then harvested by centrifugation at 3,000 r/m for 15 min in a Jantezki K-26 type cooling centrifuge. The pellet was discarded and the resulting supernatant was used as a source of the enzyme.

Enzyme assay and analytical procedures

For the assay of milk-clotting enzyme the standard procedures of Berridge (3) was carried out. The results were expressed in term of milk-clotting time (MCT) and also as milk-clotting activity (MCA) using the equation of Kawai and Mukai (10).

For protein determination 1 ml of the supernatant was treated with an equal volume of 15 % trichloroacetic acid, then centrifuged

undercooling for 15 min at 3,000 r/m. The precipitated proteins were dissolved in 1 ml of 1M sodium hydroxide and protein determination was carried out using Biuret method as described by Chykin (5) with bovine serum albumin as a reference protein.

RESULTS AND DISCUSSION

Formation pattern of milk-clotting activity in sweet-rennet and salted buffalo whey media

In Egypt, in addition to sweet rennet buffalo whey, huge amounts of salted whey are produced as a by-product resulting during the manufacture of the salty Domiati cheese. This salted whey differs from the sweet rennet buffalo whey mainly in the presence in the former of a significant amounts of sodium chloride ranging between 5 % to 15 % as final concentrations in the liquor. Thus, this ex-

Table 1. Formation pattern of milk-clotting activity and pH changes during aerobic incubation of cultures of A. niger in sweet rennet and salted buffalo wheys. The salted whey was prepared by addition of sodium chloride to sweet whey in 10 % final concentration

Incubation period days	Sweet whey			Salted whey		
	MCT min	MCA	pH	MCT min	MCA	pH
0 time	∞	0.0	5.5	∞	0.0	5.0
1	∞	0.0	5.5	∞	0.0	5.0
2	25	1.6	8.0	∞	0.0	5.0
3	9	4.5	8.5	50	0.8	5.5
4	5	8.0	9.0	50	0.8	6.8
5	3	13.3	9.0	29	1.4	6.8
6	3	13.3	9.0	27	1.4	
9	2	20.0	9.0	9	4.4	6.5

periment was designed to compare between the ability of these two types of whey to support the formation of milk-clotting activity by *Aspergillus niger*. To eliminate variations in results due to fluctuations in chemical composition, other than the presence of the salt, the sweet rennet buffalo whey was used as complete media as such and also after supplementation with sodium chloride at 10 % final concentration. Samples were with drawn periodically from shake cultures, grown in these two media, and the formation of milk-clotting activity and pH changes were followed for a period of nine days. Results are shown in *table 1*. The formation of milk-clotting activity was faster in sweet whey than in case of the salted whey media. Under growth conditions tested the highest activity was obtained after six days of aerobic incubation of the submerged cultures. It could also be noted that a rapid uprise in pH of the culture has occurred with the release of the milk clotting activity in the medium.

Influence of substrate concentration on the rate of the milk-clotting reaction

The substrate, skim milk powder was incorporated in the reaction mixture in final concentrations ranging between 2.3 % and 23 % and both MCT and MCA were estimated under the standard conditions. Results are presented in *table 2*. The milk-clotting time (MCT) exhibited a remarkable proportionality with the substrate concentrations within the tested range. On the other hand, an inverse relationship could be noted between the substrate concentration and the milk-clotting activith (MCA) calculated according to the equation of Kawai and Mukai (10).

Effect of enzyme concentration on the rate of the milk-clotting reaction

The following experiment was designed to investigate the feasibility of controlling the milk-clotting time as desired through the manipulation of enzyme protein concentration in the reaction mixture.

Table 2. Influence of substrate concentration on the milk-clotting activity for enzyme preparation from *A. niger*. Reaction was carried out under standard conditions as reported in the text but with varying skim milk concentrations

Substrate concentration skim milk powder, %	MCT min	MCA
2.3	1.5	26.7
4.6	2.5	16.0
6.9	4.5	8.9
9.2	5.0	8.0
11.5	6.5	6.2
17.3	10.0	4.0
23.0	13.5	3.0

Table 3. Effect of enzyme concentration on the milk-clotting activity of enzyme preparation from *A. niger*. Reaction was carried out with 6% skim milk solution in 0.01 M Ca Cl₂

Protein concentration in reaction mixture mg/ml	Dilution coefficient	MCT min	MCA
0.03	8.00	20.0	16.0
0.06	4.00	10.0	16.0
0.12	2.00	5.0	16.0
0.18	1.33	4.0	13.3
0.36	0.80	33.0	10.6
0.48	0.50	3.0	6.7
0.60	0.40	3.5	4.6
0.90	0.27	9.0	1.2
1.20	0.20	∞	0.0

For this purpose different protein concentration of the enzyme preparations in the range 0.03 mg to 1.2 mg/ml were incorporated in the reaction mixture and both MCT and MCA were estimated. The results are shown in *table 3*. The milk-clotting time was inversely proportional to the enzyme amount within the highly diluted concentrations. On the other hand, this inverse function gradually disappeared as the enzyme concentration was increased, followed by total inhibition of the clotting reaction at very high enzyme concentrations in the reaction mixture. In the mean time, the calculations of the milk-clotting activity (MCA), according to Kawai and Mukai (10), showed value constancy at low enzyme concentrations followed by progressive decrease at higher concentrations and finally approaching zero when the enzyme amounts reached large values in the reaction mixture. These results are explained by the fact that the milk-clotting enzyme possess proteolytic activities which are enhanced at high enzyme concentrations (13).

Response of the milk-clotting activity to varying concentrations of calcium and sodium chlorides in the reaction mixture

The role of calcium ion in the microbial milk-clotting process, through formation of calcium paracaseinate, has been well established. On the other hand the incorporation of sodium chloride is a common practice during the manufacture of certain kinds of cheese in oriental countries. Hence this experiment was set to find out the response to incorporation of different concentrations of calcium chloride and sodium chloride in the reaction mixture. To simulate those conditions prevailing in the industrial processes, calcium chloride was added in concentration range between 0.005 M to 0.2 M, whereas sodium chloride was incorporated in the reaction mixture at final concentrations up to 10 % (1.7 M) in the reaction mixture. Results obtained are presented in *table 4*. The enzyme exhibited significant inhibition progressively increasing with the elevation of sodium chloride concentration in the reaction mixture. On the other hand, marked stimulation of the clotting activity was evident for calcium chloride up to about 0.08 M final concentration followed by notable inhibitory effects at higher concentrations. The great enhancement

of the milk-clotting reaction by calcium ions seems to be the common theme for those enzymes from microbial sources (7-9).

Table 4. Response of milk-clotting activity to increasing concentration of calcium and sodium chlorides in the reaction mixture

Sodium chloride			Calcium chloride		
Concentration %	MCT min	MCA	Concentration M	MCT min	MCA
0.0	6.0	6.7	0.005	10.0	4.0
0.5	7.0	5.7	0.010	6.0	6.7
1.0	8.5	4.7	0.020	5.0	8.0
3.0	10.0	4.0	0.040	4.0	10.0
5.0	12.0	3.3	0.080	2.0	20.0
8.0	17.0	2.4	0.100	2.5	16.0
10.0	21.0	1.9	0.200	4.0	10.0

Effect of temperature on both enzyme stability and rate of the milk-clotting reaction

In this study two experiments were carried out to examine the influence of temperature on enzyme stability and rate of the clotting reaction. In the first experiment small aliquots of the enzyme preparation were placed in thin-walled glass tubes and immersed in water baths set at various temperatures ranging between 30° to 100 °C for periods of 10 min. After cooling, those aliquots were assayed for milk-clotting activity under standard conditions. In the other experiment, enzyme samples were assayed for activity by incubation of the reaction mixtures at the same range of temperatures as in the former experiment in order to assess its influence on the milk-clotting rate. Results of both experiments are recorded in *table 5*. With respect to heat stability, the enzyme exhibited notable thermotolerance at least up to a temperature of 60 °C after which marked loss of activity was observed. On the other hand the rate of milk-clotting

reaction was favored by increasing the incubation temperature reaching optimal temperature at values between 70° and 80 °C whereas total failure of the clotting process was evident at 100 °C.

Table 5. Effect of temperature on both enzyme stability and milk-clotting reaction for enzyme from A. niger. In experiment: (a) the enzyme preparation was heated for 10 min at the indicated temperature, then cooled and the milk clotting reaction was carried out at 40 °C. (b) non-heated enzyme was used with reaction carried out at specified temperatures

Temperature °C	Experiment (a)		Experiment (b)	
	MCT, min	MCA	MCT, min	MCA
30	3.5	11.4	7.0	5.7
40	3.5	11.4	3.5	11.4
50	3.5	11.4	2.5	16.0
60	3.5	11.4	1.5	26.7
70	4.5	8.9	1.0	40.0
80	∞	0.0	1.0	40.0
100	∞	0.0	∞	0.0

In the present studies, characterization of an active milk-clotting enzyme produced by *Aspergillus niger* was carried out in the hope of find out possible avenues for its application as a calf-rennet substitute. Although numerous milk-coagulating enzymes have been reported in literature from various microbial origins, yet only a few have found their way to industrial application. The major problem limiting the use of such enzymes from microbial sources are their high proteolytic nature which results in the formation of curds with soft texture, off-flavor and bitter taste (10). The milk-clotting enzyme of *A. niger* has exhibited some properties of significant values with respect to the application feasibility. For instance the enzyme could be produced on whey, without extraneous supplementations which would appreciably reduce production costs in case of

industrial application. Meanwhile the enzyme has exhibited some desirable biochemical properties, in this regard, particularly with respect to heat stability, linear response of the milk-clotting activity to enzyme concentration, and enhancement of activity with increasing the calcium ion concentration. Nevertheless further characterization ought to be carried out before drawing decisive conclusions.

SUMMARY

Aspergillus niger produced powerful milk-clotting activity when it was grown aerobically in submerged cultures. The enzyme could be produced in sweet rennet buffalo whey and in salted whey media without extraneous supplementation with other nutrients. Characterization studies on the activity produced in sweet whey media have revealed that the enzyme activity responded to dilution in a linear manner, thus permitting the prior adjustment of the milk-clotting time as desired. The addition of calcium chloride increased the milk-clotting activity many folds up to 0.08 M as final concentration, whereas the incorporation of sodium chloride in the reaction mixture resulted in significant inhibition of the clotting reaction particularly at high concentrations. The enzyme was heat-tolerant up to 60 °C. On the other hand, the milk-clotting reaction catalyzed by this enzyme had an optimum temperature range between 70 °C to 80 °C, thus suggesting, possible activity protection by the presence of the substrate. The results obtained are discussed in the light of the application feasibility of this enzyme as a substitute for animal rennet.

RESUMEN

Caracterización de una enzima de tipo rennina en cultivos sumergidos de Aspergillus niger

El *Aspergillus niger*, crecido aeróbicamente en cultivos sumergidos, origina una intensa actividad coagulante de la leche. La enzima se obtiene en medio de suero de leche sin o con adición de sal, sin ningún otro nutriente. Los estudios sobre la actividad enzimática en el

suero muestran que esa actividad guarda una relación lineal con la dilución, permitiendo un previo ajuste del tiempo de coagulación de la leche. La adición de cloruro cálcico, hasta una concentración de 0,08 M multiplica la actividad coagulante, mientras que la incorporación de cloruro sódico, especialmente a altas concentraciones, inhibe notablemente la coagulación. La enzima tolera temperaturas de hasta 60 °C. Por otra parte, la reacción de coagulación de la leche catalizada por la enzima de que se trata, alcanza el grado óptimo de temperatura entre 70° y 80 °C, lo que sugiere una posible protección de la actividad enzimática por el substrato. Se discuten los resultados obtenidos, considerando la posibilidad de aplicación de la enzima como sustituto del cuajo animal.

BIBLIOGRAPHY

1. ABDEL-FATTAH, A. F. and MABROUK, S. S. 1971. Investigations on the electrophoresis and the activity of the rennin-like enzyme from *Aspergillus niger*. J. Gen. Appl. Microbiol., 17, 509.
2. ARIMA, K.; IWASAKI, S., and TAMURA, G. 1967. Milk-clotting enzyme from microorganisms. Part I. Agr. Biol. Chem., 31, 540.
3. BERRIDGE, N. J. 1957. Methods Enzymol., 2, 69.
4. CHAKRAVORTY, S. C.; SRINIVASAN, R. A.; BABBAR, I. J.; DUDANI, A. T.; BURDE, S. D., and IYA, K. K. 1966. Comparative study of proteolysis during ripening of cheddar cheese by bacterial milk-clotting enzymes and rennet extract, Dairy Sci. Abstr., 28, 3750.
5. CHYKIN, S. 1966. Biochemistry Laboratory Techniques. John Wiley and Sons Inc., New York.
6. EL-SADEK, G. M.; KALAFALLA, S. M.; ABDEL-AL, A. T., and EL-NAWAMY, M. A. 1973. Studies on the production of milk-clotting enzymes by aerobic spore formes. Egypt. J. Dairy Sci., 1, 21.
7. FODA, M. S.; ISMAIL, A. A., and KHORSHID, M. A. 1975. Production of a new rennin-like enzyme by *Aspergillus ochraceus*. Milchwissenschaft, 30, 598.
8. FODA, M. S.; ISMAIL, A. A., and EL-NAGGAR, M. R. 1978. Formation of properties of a new milk-clotting enzyme by *Penicillium variable*. Milchwissenschaft. 33, 31.
9. FODA, M. S.; ISMAIL, A. A.; KHORSHID, M. A., and EL-NAGGAR, M. R. 1976. Physiology and characterization of a fungal milk-clotting enzyme from *Aspergillus flavus*. Acta Microbiol. Pol., 25, 337.
10. KAWAI, M., and MUKAI, N. 1970. Studies on milk-clotting enzymes production by basidiomycetes. Part I. Agr. Biol. Chem., 34, 159.

-
11. SARDINAS, J. L. 1968. Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. Appl. Microbiol., 16, 248.
 12. STERNBERG, M. Z. 1971. Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. J. Dairy Sci., 54, 159.
 13. VERINGA, H. A. 1961. Rennet substitutes. Dairy Sci. Abstr., 23, 197.

8.ª REUNION NACIONAL DE ESPECTROSCOPIA

El Grupo Español de Espectroscopia organiza esta Reunión, del 20 al 26 de septiembre de 1981, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba.

La correspondencia debe dirigirse a 8.ª Reunión Nacional de Espectroscopia, Serrano, 121, Madrid-6.

REUNIONES INTERNACIONALES EN BOGOTA

Del 16 al 21 del mes de noviembre de 1981 tendrán lugar, en Bogotá, el 5.º Congreso Latinoamericano de Microscopia Electrónica, el 2.º Congreso Iberoamericano de Biología Celular y el 3.º Curso Internacional de Biología Tumoral. El idioma oficial será el español, con traducción simultánea al francés e inglés.

Información: Laboratorio de Biología Experimental, Instituto Nacional de Cancerología, Apartado Aéreo 17158, Bogotá (Colombia).

8.ª REUNION NACIONAL DE ESPECTROSCOPIA

El Grupo Español de Espectroscopia organiza esta Reunión, del 20 al 26 de septiembre de 1981, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba.

La correspondencia debe dirigirse a 8.ª Reunión Nacional de Espectroscopia, Serrano, 121, Madrid-6.

REUNIONES INTERNACIONALES EN BOGOTA

Del 16 al 21 del mes de noviembre de 1981 tendrán lugar, en Bogotá, el 5.º Congreso Latinoamericano de Microscopia Electrónica, el 2.º Congreso Iberoamericano de Biología Celular y el 3.º Curso Internacional de Biología Tumoral. El idioma oficial será el español, con traducción simultánea al francés e inglés.

Información: Laboratorio de Biología Experimental, Instituto Nacional de Cancerología, Apartado Aéreo 17158, Bogotá (Colombia).

BIBLIOGRAFIA

MICROBIAL ULTRASTRUCTURE. THE USE OF THE ELECTRON MICROSCOPE. Directores: *R. Fuller* y *D. W. Lovelock*. 1976. Academic Press, Londres, Nueva York, San Francisco. XVI + 340 páginas.

Este libro recoge los trabajos presentados a una reunión de la «Society for Applied Bacteriology», en octubre de 1974, sobre la aplicación de la microscopía electrónica a diversos tipos de microorganismos, empleando técnicas diferentes, para estudiar su ultraestructura.

El empleo de, prácticamente, todas las técnicas que se conocen hasta la fecha, tanto en microscopía de transmisión como en microscopía de barrido, aplicadas a tan diversos tipos de microorganismos como bacterias, hongos, levaduras, algas y protozoos, hace que esta obra sea de interés para aquellos que trabajan en la ultraestructura microbiana y sus diferentes orgánulos.

Tratándose de una obra de compilación de trabajos de diferentes autores, está bastante bien unificada, para lo que suele ser este tipo de libros.

La gran cantidad de ilustraciones que ayudan a la interpretación de los resultados contribuye a la utilidad de esta obra.

M. RUBIO

MICROBIOLOGICAL METHODS. Directores: *C. H. Collins* y *Patricia M Lyne*. 1976. Butterworths, Londres. X + 521 páginas.

Este manual es un magnífico ejemplo de lo que debe ser un texto eminentemente práctico, con un énfasis especial en los detalles téc-

nicos que tan pocas veces son tenidos en cuenta por muchos autores, pero que resultan cruciales a la hora de introducir con éxito una nueva metodología. Fundamentalmente, este libro se ocupa del examen y la identificación de las bacterias y hongos y más concretamente de las bacterias patógenas en los más diversos medios (sanitario, alimentario, etc.). Debido a su cuidada y ordenada exposición, este manual permite, tanto a los microbiólogos experimentados como a los estudiantes que posean unos mínimos conocimientos microbiológicos, el adentrarse en el mundo de los microorganismos patógenos con relativa facilidad.

Dentro de sus treinta y tres capítulos dedicados a todos los aspectos diversos de la metodología microbiológica, se incluyen temas de inmunología, bioquímica, medios de cultivo, sistemática, etc. Nos parece de gran interés la descripción de la preparación de medios de cultivos y reactivos, detallando incluso las casas comerciales que los suministran.

En resumen, opinamos que el presente libro será de gran utilidad para todos aquellos que se dedican al estudio de los microorganismos patógenos y la manera de combatirlos.

E. GARCIA

INHIBITION AND INACTIVATION OF VEGETATIVE MICROBES. Directores: *F. A. Skinner* y *W. B. Hugo.* 1976. Academic Press, Londres, Nueva York, San Francisco, XIV + 378 páginas.

Corresponde a la quinta publicación de la llamada «Symposium Series», que edita periódicamente la «Society for Applied Bacteriology», y recoge las comunicaciones presentadas en 1975 a la reunión que tuvo lugar en Nottingham, en la que participaron 23 especialistas, en su mayoría del Reino Unido, entre los que figura uno de sus editores.

El título responde al tema del simposio y surge como una necesidad ante la gran evolución de la Industria Alimentaria, que se ve forzada a manufacturar y distribuir a gran escala productos de muy diferente naturaleza que deben llegar en perfecto estado al consumidor.

Su interés se centra en las formas vegetativas de las principales bacterias contaminantes, que pueden ser destruidas por tratamientos más suaves que los exigidos por las formas esporuladas, con lo que se garantiza la estabilidad del valor nutritivo del producto. Con menos extensión, se hacen algunos comentarios sobre la inactivación de hongos filamentosos y de levaduras.

Comienza con una concreta revisión de los mecanismos de inhibición química de la célula bacteriana, prestando especial atención a la actividad a nivel de membrana, de acuerdo con los más recientes conocimientos sobre sus características estructurales y enzimáticas.

En los siguientes capítulos, que alcanzan el número de quince, se distingue claramente entre la desinfección de equipos, utensilios y envases utilizados durante las manipulaciones, y la esterilización del producto a conservar y consumir. Hay una exposición detallada sobre la elección y las técnicas de empleo de los desinfectantes líquidos y de los gaseosos, en dependencia con su estabilidad y su poder de penetración, con la naturaleza del producto que se desea proteger y con el tipo de agente contaminante que se intenta inactivar.

Resultan muy completas las consideraciones sobre los métodos de inactivación físicos, que incluyen el frío, calor, radiaciones, presión hidrostática, etc. Sobre ellos aparecen comentarios de gran valor práctico, como pueden ser la reversibilidad de la inactivación, por descongelación del alimento; la posibilidad de mutaciones microbianas, con mayores niveles de virulencia, por efecto de ciertas radiaciones, las alteraciones morfológicas, con disminución de movilidad, en microorganismos contaminantes sometidos a alta presión hidrostática, etc., etc.

Resalta la atención que se concede a la conservación de productos como la leche, bebidas alcohólicas y zumos de frutas, lo que se justifica como consecuencia de las formas nuevas de su preparación y la gran difusión de las mismas en el mercado mundial. Asimismo, es interesante el hecho de haber incluido un estudio sobre los productos de tocador y cosméticos, como portadores de bacterias y, por tanto, como posibles agentes contaminantes y perturbadores de la higiene.

A lo largo de la obra se manifiesta una gran preocupación por unificar las técnicas de inactivación microbiana y los controles necesarios para la conservación de la esterilización, y esta preocupación

se recoge en el capítulo final, que está dedicado concretamente a los preceptos legales, en diferentes países, sobre la conservación de alimentos, no sólo bajo el punto de vista sanitario, sino de sus condiciones organolépticas y en defensa de su calidad.

Se trata, pues, de una recopilación de gran utilidad práctica para los dedicados a evitar contaminación e infecciones a través de preparados alimenticios, material hospitalario, productos de higiene, etc. Además, justifica cada uno de los métodos y materiales que recomienda en cada caso, con razonamientos científicos que supone, en sus autores, un conocimiento multidisciplinario de alto nivel.

No es, por tanto, una aportación más al tema, sino una puesta al día de las técnicas más avanzadas y eficaces, realizada por personas competentes y especializadas en problemas de protección microbiana.

La obra presenta una abundante y actualizada bibliografía. Su papel, impresión y encuadernación han sido muy cuidados por Academic Press.

G. TEJERINA

ASPECTOS ACTUALES DE LAS RELACIONES HUESPED-PARASITO E INTERMICROBIANAS. Directores de edición: A. Portolés y F. Baquero. Monografías Básicas de la Sociedad Española de Microbiología, núm. 2. Madrid, 1977. X + 360 páginas. No venal.

Este tomo es el segundo de una serie que viene publicando la Sociedad Española de Microbiología, bajo la denominación de «Monografías Básicas de la Sociedad Española de Microbiología». En él se recogen las ponencias presentadas en el simposio que la Sociedad organizó en Madrid, en octubre de 1976, con motivo de la celebración del 1.º Congreso de la Federación Española de Sociedades de Biología Experimental (FESBE - 1).

La presente monografía, de acuerdo con el contenido de las ponencias presentadas, queda dividida en tres partes: I) Interacciones huésped-parásito en Biología Animal. II) Interacciones microbianas, y III) Interacciones huésped-parásito en Biología Vegetal.

En la parte I se exponen diferentes aspectos en torno a las rela-

ciones entre virus y animales vertebrados, significación biológica de los interferones y su papel en la infección vírica, acción de algunas toxinas que bloquean selectivamente el proceso de biosíntesis de proteínas en células superiores, modo de acción de las aflatoxinas y toxinas tricotecénicas, y por último la supresión de la respuesta inmune y sus significados biológicos, teniendo en cuenta cómo se produce esta respuesta inmune y en qué momento puede ser interferida.

En la parte II se presentan estudios sobre bacteriocinas y efecto de plásmidos R sobre pirocinogénesis, microcinas: su aislamiento, purificación, propiedades y naturaleza química, etc... e interacciones microbianas en el medio marino, tales como comensalismo, antagonismo y parasitismo.

Por último, en la parte III se agrupan estudios sobre relaciones huésped-parásito en virus ARN de plantas, multiplicación de picornavirus, rhabdovirus, formación de proteínas extrañas en la infección por virus, etc..., cancerización vegetal por bacterias e implicación en la misma de fitohormonas y ácidos nucleicos bacterianos, algunos aspectos bioquímicos de la infección bacteriana en plantas, así como los cambios que experimentan los principales compuestos biológicos en los sistemas planta-bacteria, estudio de las características que se manifiestan en la asociación *Rhizobium*-leguminosa, tales como especificidad e infectividad, citología y fisiología de la interacción huésped-parásito en sistema compatible hongo-planta, comportamiento de nemátodos frente a las plantas e interrelaciones de los mismos con otros microorganismos.

Resumiendo, esta monografía nos presenta una visión muy heterogénea de las relaciones huésped-parásito en diferentes sistemas. Un libro muy útil para los especialistas en los temas expuestos, ya que los trabajos que recoge han sido realizados por investigadores plenamente conocedores de los temas tratados. Es de destacar también, que en esta monografía se observa una extensa y valiosa recopilación de citas bibliográficas de gran utilidad para el investigador o especialista que consulte esta obra.

Deseamos animar a la Sociedad Española de Microbiología para que no rompa la continuidad en la publicación de estas Monografías Básicas, de las que ya tenemos los volúmenes 1 y 2. Este último ha sido publicado bajo los auspicios de la FESBE y con el patrocinio

del CSIC, habiéndose contado con la generosa y desinteresada aportación de una firma farmacéutica.

Los investigadores que han colaborado con sus trabajos en la elaboración de esta monografía fueron: L. Valenciano, E. Ronda y M. L. Alonso, D. Vázquez, A. Jiménez, I. Barasoain J. M. Rojo y A. Portolés, R. Gómez Lus y M. C. Rubio, F. Baquero y C. Asensio, B. Regueiro Varela, M. Rubio Huertos, R. Beltrá, G. Tejerina, J. Olivares, F. Laborda, y F. Jiménez Millán y A. Gómez Barcina.

R. BELTRÁ

INTERFERON AND INTERFERON INDUCERS. CLINICAL APPLICATIONS. Director: Dale A. Stringfellow. 1980. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Basilea. XII + 329 páginas.

Esta publicación está dividida en los capítulos que a continuación se relacionan:

1) Interferones: perspectiva general. 2) Producción, purificación y propiedades de interferones humanos. 3) Interferón exógeno: estabilidad y farmacocinética. 4) Interferón exógeno: su uso en el tratamiento de cánceres humanos. 5) Uso clínico de los interferones en infecciones víricas. 6) Inductores de interferón: teoría y aplicación experimental. 7) Inducción de interferón por polinucleótidos. 8) Clorhidrato de tilorona y moléculas derivadas. 9) Inductores de interferón: propanodiaminas y moléculas relacionadas. 10) Inductores de interferón: polianiones y otros. 11) Interferón e inductores de interferón: inmunomodulación.

Cada uno de estos capítulos ha sido escrito por especialistas en la materia estudiada, consiguiendo una recopilación y puesta al día muy apreciable, debiendo hacer resaltar la abundante bibliografía reseñada al final de cada capítulo. Consideramos muy interesantes las páginas dedicadas al tratamiento y profilaxis de enfermedades producidas por virus, utilización en cuadros tumorales e inmunomodulación por interferón.

En este momento, en que asistimos a un redescubrimiento del in-

terferón gracias a una futura producción masiva por técnicas de ingeniería genética sobre plásmidos de *Escherichia coli*, la publicación que comentamos puede servir de guía para todos cuantos se interesan en el estudio de esta sustancia biológica. Hemos de destacar la cuidada impresión por el nuevo método rápido y la buena presentación y encuadernación de la publicación que nos ocupa.

E. RONDA.

ISSN: 0026-2595

Depósito Legal M. 702 - 1958

TALLERES GRÁFICOS VDA. DE C. BERMEJO - SANTA ENGRACIA, 122 - MADRID