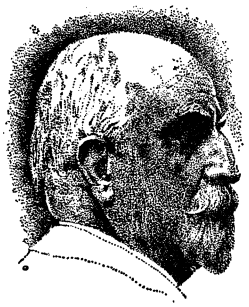
VOLUMEN 34 1981

Microbiología Española

Revista
del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director: Dr. Gonzalo Sierra, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirector: Dr. Angel G. Gancedo, Vicedirector del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

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

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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

Suscripción (volúmen): España, 500 PTA; extranjero, 750 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 margenes 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.

INDICE

Página

Purificación y algunas propiedades de la poligalacturonasa del *Trichoderma lignorum*, por *A. F. Abdel-Fattah, S. S. Mabrouk* and *A.-M. S. Ismail.* 1

Desulfuración microbiana del carbón. II. Estudio tecnológico de cultivos puros y selección de cepas, por *M. C. Ruiz-Alares, B. Iñigo, V. Gómez-Aranda* y *J. M.ª Gavilán* 11

Sensibilidad a la lisis por lisostafina en estafilococos aislados de leche mamítica de oveja, por *L. Gutiérrez, M. L. García* y *B. Moreno* 17

Captura de virus vacunal por *Tetrahymena pyriformis*, por *S. Pérez-Prieto* y *A. García-Gancedo* 29

Dobletes homopolares en *Onychodromus acuminatus*, por *M. A. Jareño.* 45

Evolución de la microflora de levaduras de los mostos de uva de Jumilla, por *D. Bascones, N. Khayyat* y *V. Arroyo* 61

El lipopolisacárido del *Pseudomonas savastanoi* como receptor de un bacteriófago no descrito, por *M. Santaolalla* y *L. Cañas* 71

Octavo Congreso Nacional de Microbiología, por *C. Nombela Cano* 81

Bibliografía, por *L. Vilas, C. González,* y *G. Tejerina* 85

CONTENTS

Page

Purification and some properties of *Trichoderma lignorum* polygalacturonase, by *A. F. Abdel-Fattah, S. S. Mabrouk* and *A.-M. S. Ismail* 1

Microbial desulfurization of coal. II. Strain's selection, by *M. C. Ruiz-Alares, B. Iñigo, V. Gómez-Aranda* and *J. M.ª Gavilán* 11

Lysostaphin sensitivity of staphylococci isolated from ovine mastitic milk, by *L. Gutiérrez, M. L. García* and *B. Moreno* 17

Uptake of vaccinia virus by *Tetrahymena pyriformis*, by *S. Pérez-Prieto* and *A. García-Gancedo* 29

Homopolar doublets in *Onychodromus acuminatus*, by *M. A. Jareño* 45

Evolution of yeast microflora in grape musts from Jumilla (Spain), by *D. Bascones, N. Khayyat* and *V. Arroyo* 61

The LPS from *Pseudomonas savastanoi* receptor of a bacteriophage not yet described, by *M. Santaolalla* and *L. Cañas* 71

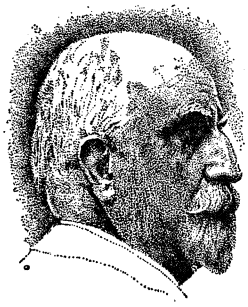
Eighth National Congress of Microbiology, by *C. Nombela Cano* 81

Bibliography, by *L. Vilas, C. González* and *G. Tejerina* 85

VOLUMEN 34 1981

Microbiología Española

Revista
del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director: Dr. Gonzalo Sierra, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirector: Dr. Angel G. Gancedo, Vicedirector del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

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

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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

Suscripción (volúmen): España, 500 PTA; extranjero, 750 PTA

ÍNDICE

Página

Abdel-Fattah, A. F.; *Mabrouk*, S. S., e *Ismail*, A.-M. S.: Purificación y algunas propiedades de la poligalacturonasa del *Trichoderma lignorum* ... 1
Arroyo, V.: véase *Bascones*, D. ... 61
Bascones, D.; *Khayyat*, N., y *Arroyo*, V.: Evolución de la microflora de levaduras de los mostos de uva de Jumilla ... 61
Cañas, L.: véase *Santaolalla*, M. ... 71
García, M. L.: véase *Gutiérrez*, L. ... 17
García-Gancedo, A.: véase *Pérez-Prieto*, S. ... 29
Gavilán, J. M.ª: véase *Ruiz-Alares*, M. C. ... 11
Gómez-Aranda, V.: véase *Ruiz-Alares*, M. C. ... 11
González, C.: véase *Vilas*, L. ... 85
Gutiérrez, L.; *García*, M. L., y *Moreno*, B.: Sensibilidad a la lisis por lisostafina en estafilococos aislados de leche mamítica de oveja ... 17
Iñigo, B.: véase *Ruiz-Alares*, M. C. ... 11
Ismail, A.-M. S.: véase *Abdel-Fattah*, A. F. ... 1
Jareño, M. A.: Dobletes homopolares en *Onychodromus acuminatus* ... 45
Khayyat, N.: véase *Bascones*, D. ... 61
Mabrouk, S. A.: véase *Abdel-Fattah*, A. F. ... 1
Moreno, B.: véase *Gutiérrez*, L. ... 17
Nombela Cano, C.: Octavo Congreso Nacional de Microbiología ... 81
Pérez-Prieto, S., y *García-Gancedo*, A.: Captura de virus vacunal por *Tetrahymena pyriformis* ... 29
Ruiz-Alares, M. C.; *Iñigo*, B.; *Gómez-Aranda*, V., y *Gavilán*, J. M.ª: Desulfuración microbiana del carbón. II. Estudio tecnológico de cultivos puros y selección de cepas ... 11
Santaolalla, M., y *Cañas*, L.: El lipopolisacárido del *Pseudomonas savastanoi* como receptor de un bacteriófago no descrito ... 71
Tejerina, G.: véase *Vilas*, L. ... 85
Vilas, L.; *González*, C., y *Tejerina*, G.: Bibliografía ... 85

CONTENTS

Page

Abdel-Fattah, A. F.; *Mabrouk*, S. S., and *Ismail*, A.-M. S.: Purification and some properties of *Trichoderma lignorum* polygalacturonase ... 1

Page

Arroyo, V.: see *Bascones*, D. 61
Bascones, D.; *Khayyat*, N., and *Arroyo*, V.: Evolution of yeast microflora in grape musts from Jumilla (Spain) ... 61
Cañas, L.: see *Santaolalla*, M. 71
García, M. L.: see *Gutiérrez*, L. 17
García-Gancedo, A.: see *Pérez-Prieto*, S. 29
Gavilán, J. M.ª: see *Ruiz-Alares*, M. C. 11
Gómez-Aranda, V.: see *Ruiz-Alares*, M. C. 11
González, C.: see *Vilas*, L. 85
Gutiérrez, L.; *García*, M. L., and *Moreno*, B.: Lysostaphin sensitivity of staphylococci isolated from ovine mastitic milk 17
Iñigo, B.: see *Ruiz-Alares*, M. C. 11
Ismail, A.-M. S.: see *Abdel-Fattah*, A. F. 1
Jareño, M. A.: Homopolar doublets in *Onychodromus acuminatus* 45
Khayyat, N.: see *Bascones*, D. 61
Mabrouk, S. S.: see *Abdel-Fattah*, A. F. 1
Moreno, B.: see *Gutiérrez*, L. 17
Nombela Cano, C.: Eighth National Congress of Microbiology 81
Pérez-Prieto, S., and *García-Gancedo*, A.: Uptake of vaccinia virus by *Tetrahymena pyriformis* 29
Ruiz-Alares, M. C.; *Iñigo*, B.; *Gómez-Aranda*, V., and *Gavilán*, J. M.ª: Microbial desulfurization of coal. II. Strain's selection 11
Santaolalla, M., and *Cañas*, L.: The LPS from *Pseudomonas savastanoi* receptor of a bacteriophage not yet described 71
Tejerina, G.: see *Vilas*, L. 85
Vilas, L.; *González*, C. and *Tejerina*, G.: Bibliography ... 85

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

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF *TRICHODERMA LIGNORUM* POLYGALACTURONASE

by

A. F. ABDEL-FATTAH, S. S. MABROUK and A.-M. S. ISMAIL

INTRODUCTION

When polygalacturonases are extracted from higher plants and microorganisms, they are usually accompanied by pectinestrases. The methods used for isolation depend on the different properties and behaviour of both types of enzymes. Thus polygalacturonases were concentrated by adsorption on pectic acid gel and ion exchange resins (7, 10). Barash *et al.* (3) fractionated polygalacturonase by using CM-cellulose column or disc electrophoresis. Wang *et al.* (11) purified an endopolygalacturonase 60-fold from the culture fluid of *Verticillium albo-artum* by chromatography on column of CM-cellulose and preparative electrophoresis.

Recently Abdel-Fattah *et al.* (2) reported on the production of polygalacturonase and pectin-methylesterase by various fungi. It was found that with most of the fungal cultures, there was association of both enzymic activities of 28 fungal cultures investigated *Trichoderma lignorum* proved to be the potent in secreting active polygalacturonase and pectin-methylesterase.

The present paper studies the separation of both pectic enzymes produced by *Trichoderma lignorum* by paper electrophoresis, directed towards the electrophoretic pattern of the fungal and some properties of the electrophoretically pure fungal polygalacturonase.

MATERIAL AND METHOD

Microorganisms

Trichoderma lignorum, a local isolate, was used in the present work. It was obtained from the Center of Cultures of the National Research Centre, Cairo.

Cultivation

Transfers were made from the subcultures to Dox's agar plates, which were then incubated at 30 °C for 7 d. The cultivation was made in 250 ml Erlenmeyer flasks, each containing 50 ml of sterile medium composed of (g/l); pectin, 15; KH_2PO_4, 0.5; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5; KNO_3, 2.5. Two discs, each of 1 cm diameter were cut from the 7 d old culture plates and used for inoculating each flask. The culture flashs were agitated on a reciprocal shaker (110 strokes/min, amplitude 7 cm) at 30 °C for 3 d.

Preparation of the fungal polygalacturonase

The culture filtrate was precipitated with 1 volume of ice-cold methanol. The precipitate obtained by centrifugation was then dried under reduced pressure at room temperature.

Fractional precipitation of the fungal polygalacturonase preparation with methanol

This was done using the enzyme solution of the precipitate which had been obtained with 1 volume of methanol. To the cold enzyme solution, ice-cold methanol was added until a final concentration of methanol of 80 % was reached. Six enzyme fractions were thereby obtained at 20, 30, 40, 50, 70 and 80 % methanol (volume percent).

Paper electrophoresis of the fungal polygalacturonase preparation

This was performed, with Elphor apparatus, using the enzyme sample which was precipitated from the culture filtrate with 1 volume methanol and the 6 enzyme fractions obtained by fractional precitation with methanol. The paper used was Whatman No. 1. Tests were made with 22 buffer solutions, including acetate, citrate-phosphate and Sørensen phosphate buffers of different concentrations and at different pH values. A potential of 300 V (0.2 mA/strip) was applied at room temperature. In case of using buffer solution at pH values above 6.0, electrophoresis was done at 10 °C. In each process, one strip was stained with Amino Black 10 B dye and the corresponding separated protein components were cut off from the unstained strips, eluted with distilled water and assayed for polygalacturonase and pectin-methylesterase activities.

Estimation of protein content

This was done according to the method of Lowry *et al.* (6).

Assay for polygalacturonase activity

This was done by measuring the reduction in the viscosity of buffered pectin solution. A mixture of 1.5 ml of the enzyme solution containing different enzyme concentrations and 6.0 ml of 1.0 % pectin solution (0.02 M acetate buffer of pH 4.05) was incubated at 40 °C for 20 min, then 5 ml of the reaction mixture was pipetted into an Ostwald viscometer previously kept in a water bath at 40 °C, and the time of run was recorded. In control tests, heated enzyme solution was employed. Polygalacturonase activity was taken as the percentage reduction in viscosity per mg protein.

Detection of pectin-methylesterase activity

This was made by using the hydroxamate method of McComb and McCready (9).

Properties of the electrophoretically purified polygalacturonase

Electrophoresis was performed with 0.01 M acetate buffer at pH 3.42 using the enyme sample which had been precipitated from the culture filtrate with 1 volume methanol. The area corresponding to the position of polygalacturonase on numerous unstained strips were cut out, eluted with distilled water and filtered through Whatman No. 50 paper. The clear enzyme solution was then lyophilized and investigated.

RESULTS AND DISCUSSION

The paper electrophoretic separation of a solution of the enzyme sample which was precipitated from the culture filtrate of *Trichoderma lignorum* revealed the presence of 2 protein components which moved towards the cathode (*table 1*). With some buffer solutions these 2 components were either close to each or unseparated. Of 22 buffer solutions investigated only 0.01 M, 0.02 M, 0.10 M acetate buffers of either pH 3.42 or 4.05 afforded good separation of both protein components. Other buffer solutions did not provide satisfactory separation.

Examination of each of the electrophorised components showed that the component nearer to the starting line was polygalacturonase, while that nearer to the cathode was pectin-methylesterase. Visual examination of the stained strip indicated that the polygalacturonase component comprised the major portion of the enzyme sample.

The enzyme sample, which was precipitated from the culture filtrate with 1 volume methanol, defied fractionation with methanol. In this case, the 6 methanol fractions gave both polygalacturonase and pectin-methylesterase activities and by electrophoresis each fraction separated into the 2 enzyme components.

Some properties of the electrophoretically pure fungal polygalacturonase were investigated. Enzyme protein concentration of 73 µg/ml, and below, did not bring about reduction in viscosity of the pectin solution at 50 °C, probably due to low enzyme/substrate

Table 1. The electrophoretic pattern of T. lignorum *pectic enzymes with different buffers*

Buffer	pH of buffer	Molarity of buffer	Electrophoretic component
Acetate	3 42	0.20	A + B
		0.10	
		0.02	
		0.01	→ A → B
	4.05	0.10	
		0.02	
		0.01	
	4.99	0.02	
	5.89	0.02	A + B
Sørensen phosphate	5.29	0.0060	AB
		0.0006	
	5.91	0.0006	
	6.98	0.0006	→ A + B
	8.04	0.0060	
		0.0006	
	Dilution of buffer (Fold		
Citrate-phosphate	2.2		
	3.0		→ A + B
	4.0		
	5.0	50	
	6.0		
	7.0		→ AB
	8.0		

A, polygalacturonase component nearer the start. B, pectin methylesterase component nearer the cathode. A + B, the two components unseparated. A → B, the two components separated. A B, the two components adhered to each other.

ratio (*table 2*). The optimum substrate concentration was obtained using 1 % pectin (*table 3*). An enzyme protein concentration of 182.5 μg/ml, was sufficient to bring about maximal activity at pH

Table 2. Effect of protein concentration on the polygalacturonase activity, using pectin (0.8 %), at 50 °C and pH 4.45

Enzyme concentration µg/ml	PG activity, % reduction in viscosity	PG activity/µg protein
36.5		
73.0		
146.0	12.62	0.086
182.5	28.02	0.153
255 5	33.67	0.131
365.0	35.68	0.100

Table 3. Effect of substrate concentration on the activity of purified polygalacturonase (182.5 µg/ml)

Substrate concentration %	PG activity, % reduction in viscosity	PG activity/µg protein
0.4	22.78	0.124
0.6	23 32	0.127
0.8	27.54	0.150
1.0	30.46	0.166
1.2	30 29	0.165

4.05 (acetate buffer) and 40 °C. Under the same conditions at 55 °C, the enzymic activity was about 92 % that at 40 °C, indicating a kind of enzyme stability in presence of substrate. The complete loss of activity brought about by treating the enzyme, in absence of substrate, at pH 4.05 (acetate buffer) and 50 °C for 5 min provided a substantial evidence for the stabilizing effect of the substrate (*table 4*). The enzyme was comparatively more stable at pH 4.99. This result is in agreement with that reported by Haenssler (4).

The results recorded in *table 5* indicated that while incubation of the enzyme with 0.01 M $CaCl_2$ enhanced enzymic activity, higher concentration of the salt had an adverse effect. The latter effect might be due to the reaction of some calcium ions through carboxyl

Table 4. Stability of purified T. lignorum *polygalacturonase at different pH values (acetate buffer) and temperatures*

pH of enzyme solution (a)	Temperature of heating °C	Time of heating min	PG activity/ mg protein	Relative activity %
Contro			180	100.00
3.42	40	30	91	50.55
		60	88	48.88
	45	10	68	37.77
		30	15	8.33
	50	5	0	0.00
4.05	40	30	106	58.88
		60	106	58.88
	45	30	67	37.22
	50	5	0	0.00
4.99	40	10	160	88.88
		30	158	87.77
	45	30	42	23.33
	50	5	8	4.44
5.89	40	30	88	48.88
		60	77	42.77
	45	10	37	20 55
		30	8	4.44
	50	5	0	0.00

(a) After each treatment, the pH of the enzyme solution was readjusted to 4.05 and then added to the pectin solution. PG, polygalacturonase.

groups on some galacturonic acid residues of pectin molecules. Such a reaction may lead to increase in the viscosity of the pectin solution. Calcium chloride and copper sulphate are known as good precipitants for pectic substances (5). Indeed, precipitation of pectin from the reaction mixture occurred on using enzyme solution treated with 0.002 M copper sulphate, which is in support of this view. It seems therefore that calcium chloride or copper sulphate above a certain concentration was a limiting factor for the fungal polygalacturonase activity.

On the other hand, the inhibition of the fungal polygalacturonase brought about by treating the enzyme with p-chloromercuribenzoate, mercuric chloride, iodoacetic acid, and iodine may suggest the presence of reactive sulphhydryl groups in the active site of the enzyme. This together with the stimulating effect brought about by treatment with reduced glutathione may support this view (*table 5*). These results are in agreement with those reported by Martin and Grossmann (8).

Table 5. Effect of some substances on the activity of purified T. lignorum *polygalacturonase*

Substance added	Final molarity of substance M	PG activity/ mg protein	Relative activity %
Control [a]		98	100.0
Sodium chloride	0.01	155	158.1
	0.02	146	148.9
Calcium chloride	0.01	169	172.4
	0.02	78	79.5
Magnesium chloride	0.01	129	131.6
	0.02	176	179.5
Copper sulphate	0.0002	102	104.1
	0.0010	86	87.7
Iodine	0.01	0	0.0
Iodoacetic acid	0.01	75	76.5
	0.02	53	54.1
p-Chloromercuribenzoate	0.001	104	106.1
	0.010	0	0.0
Reduced glutathione	0.01	132	134.6
	0.02	131	133.6

[a] The test substance was incubated with the enzyme solution for 10 min at 40 °C, followed by addition to the pectin solution. PG, polygalacturonase.

SUMMARY

Purification by electrophoresis of a preparation containing polygalacturonase and pectin-methylesterase, produced by *Trichoderma lignorum*, was studied using 22 different buffer solutions. Successful separation of both pectic enzymes was achieved with acetate buffer of either pH 3.42 or pH 4.05 (0.01, 0.02 and 0.10 M). Neither Sørensen phosphate nor McIlvaine citrate-phosphate buffers were suitable for separating the fungal pectic enzymes. The electrophoretically pure fungal polygalacturonase showed a maximal activity at pH 4.05 and 40 °C, and was most stable at pH 4.99. Calcium chloride and copper sulphate, above certain concentration limits, had an adverse effect on polygalacturonase action. The inhibition of polygalacturonase with sulphydryl group reagents indicated the probable presence of sulphydryl groups in the active site of the fungal polygalacturonase.

RESUMEN

Purificación y algunas propiedades de la poligalacturonasa del Trichoderma lignorum

Utilizando 22 distintas soluciones tampón, se ha estudiado la purificación por electroforesis de una preparación que contiene poligalacturonasa y pectin-metilesterasa producidas por *Trichoderma lignorum*. Se ha logrado un buen aislamiento de ambas enzimas pécticas con tampón de acetato a pH 3,42 ó 4,05 (0,01, 0,02 y 0,10 M). Ni el tampón fosfato de Sorensen ni el citrato-fosfato de McIlvaine se mostraron adecuados para lograr el aislamiento de las enzimas pécticas fúngicas. La poligalacturonasa fúngica, purificada electroforéticamente, mostró la mayor actividad a pH 4,05 y 40° C y una estabilidad máxima a pH 4,99. El cloruro cálcico y el sulfato de cobre, por encima de ciertos límites de concentración, presentaron un efecto adverso sobre la actividad de la poligalacturonasa. La inhibición de la poligalacturonasa con reactivos del sulfhidrilo indicaba la presencia probable de grupos sulfhidrilos en la parte activa de la poligalacturonasa fúngica.

REFERENCES

1. ABDEL-FATTAH, A. F. 1969. Polygalacturonase from citric acid producing mycelia. J. Chem. U. A. R., 12, 550-68.
2. ABDEL-FATTAH, A. F.; MABROUK, S. S., and ISMAIL, A. S. 1977. Production of polygalacturonase and pectinmethylesterase by fungi. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm, 5, 38-42.
3. BARASH, I., and ANGEL, E. 1970. Isolation and properties of an exopolygalacturonase produced by *Penicillium digitatum* during infection of lemon fruits. Isr. J. Bot., 19, 599-608.
4. HAENSSLER, G. 1973. Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Cerosparella herpotrichoides* II. Characterisation of pectolytic enzymes and macerating abilities of the culture filtrates. Phytopathol. Z., 77, 138-56.
5. KERTESZ, Z. I. 1951. The pectic substances. Interscience Publ. N. Y.
6. 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, 265-76.
7. MAJOR, J., and ORSI, F. 1960. Purification and concentration of polygalacturonase preparations by adsorption. Chem. Abstr., 55, 8515.
8. MARTIN, J., and GROSSMANN, F. 1972. Inhibition of pectic and cellulolytic enzymes of *Rhizoctonia solani* and the influence of some inhibitors on the disease process. II. Effect of some inhibitors *in vivo*. Phytopathol. Z., 75, 97-110.
9. MCCOMB, E. A., and MCCREADY, R. M. 1958. Use of the hydroxamic acid reaction for determining pectinesterase activity. Stain Technol., 33, 129-31.
10. PHAFF, H. J., and DEMAIN, A. L. 1956. Composition and action of yeast polygalacturonase. J. Biol. Chem., 218, 875-84.
11. WANG, M., and KEEN, N. T. 1970. Purification and characterization of endo-polygalacturonase from *Verticillium albo-artum*. Arch. Biochem. Biophys., 141, 749-57.

INSTITUTO DE CARBOQUIMICA (CSIC). ZARAGOZA

DESULFURACION MICROBIANA DEL CARBON. II. ESTUDIO TECNOLOGICO DE CULTIVOS PUROS Y SELECCION DE CEPAS

por

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

INTRODUCCION

En la última década ha cobrado gran interés mejorar el aprovechamiento de todas las fuentes de energía. En este sentido parece importante que en España, donde se cuenta con abundantes reservas de lignitos, se incrementen los esfuerzos para obtener de ellos un rendimiento máximo.

Un factor que condiciona desfavorablemente la utilización industrial y directa de buena parte de dichos lignitos es su elevado contenido en azufre, elemento que en el carbón contribuye al aumento de la polución atmosférica, es causa de la corrosión de parrillas de hornos y da lugar a coques de elevado contenido en azufre. Todo ello ha motivado que en el mundo industrializado se investigue sobre la eliminación del azufre del carbón (3-6) bien por métodos convencionales físicos, o no convencionales: eléctricos magnéticos, químicos y microbiológicos (7, 11). Con estos últimos se ha conseguido reducir el contenido del azufre pirítico del carbón, que es la forma de azufre más fácilmente eliminable en los carbones a valores inferiores a un 2 %.

Por lo anteriormente expuesto se ha planteado el llevar a cabo un estudio de la desulfuración de los lignitos españoles por medios microbiológicos. En él se utilizaría la capacidad de las bacterias ferrooxidantes y sulfooxidantes *Thiobacillus thiooxidans* y *Th. ferrooxidans* (1-2) de transformar la pirita insoluble en sulfatos férricos solubles y fácilmente separables del carbón.

La primera parte del trabajo (8) consistió en aislar e identificar las bacterias ferrooxidantes y sulfooxidantes presentes en muestras de aguas de mina ácidas y lignitos gallegos y aragoneses.

En el mismo trabajo identificamos cepas correspondientes a las especies *Thiobacillus thiooxidans* y *Th. ferrooxidans*. Dentro del presente trabajo se ha estudiado la eficacia oxidante de dichas cepas con el objeto de seleccionar la más conveniente para lograr la desulfuración de nuestros carbones por vía microbiológica.

MATERIAL Y METODOS

Las cepas estudiadas fueron las siguientes: 1) A3-1, A3-2, A3-3 y A3-4, aisladas de una muestra de agua de mina ácida tomada en la mina Sur, zona acequia lateral, en Utrillas (Teruel); 2) CM-2, CM-3 y CM-4. aisladas a su vez de una muestra de lignito subbituminoso de Minas de Utrillas (Teruel), identificadas ambas como *Thiobacillus ferrooxidans*; y 3) *Ferrobacillus ferrooxidans* (FF), identificada como *Th. ferrooxidans* y suministrada por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) núm. 13.661. La capacidad ferrooxidante se midió por la oxidación del $Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+}$. El ión ferroso era el del propio medio 9K de Silverman (44,22 g/l) y la producción de Fe^{3+} se siguió cualitativa y cuantitativamente en cultivos de 1 semana.

El control cualitativo realizado a título de orientación previa, se llevó a cabo comprobando la existencia de iones Fe^{2+} o/y Fe^{3+} en los cultivos de CM-2, CM-3, CM-4, A3-1, A3-2, A3-3, A3-4 y FF, adicionando a muestras de 1 ml 2 gotas de disoluciones de SCNK y $(Fe(CN)_6)K_3$ (2 ó 3 cristales en 10 ml de agua) en una placa de toques. Las pruebas se realizaron en cultivos de 1 semana.

Cuantitativamente, el contenido en Fe^{2+} en los cultivos a lo largo del tiempo, se determinó por el método colorimétrico de Snell (10). Muestras de los cultivos se diluyeron en la proporción 1/100. Con el fin de mantener el pH ácido, para evitar fenómenos de oxidación y precipitación adicionales, producidos en un principio, se añadió a cada uno de los matraces durante la dilución 0,05 ml de SO_4H_2, permaneciendo de este modo las disoluciones claras y transparentes. A 3 ml de esta disolución se les agregaron 4 ml de hidrocloruro de ortofenantrolina al 0,25 % llevándose la disolución a un volumen final

de 50 ml. Se leyeron las D. O. a 514 mμ en un espectrofotómetro Beckman DU. Se omitió la adición de hidroxilamina, al estar determinando Fe^{2+}. No se adicionó ningún regulador de pH, ya que éste se mantenía dentro de los límites óptimos.

En primer lugar se llevó a cabo una prueba global con todas las cepas y a continuación, según los resultados obtenidos, otra parcial con los cultivos procedentes de agua de mina. Finalmente se comparó la actividad oxidante de la cepa más activa de las aisladas de agua de mina con la más activa de las aisladas de carbones y con la cepa FF: ATCC control.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cualitativamente se observó, a la semana de incubación, que la oxidación $Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+}$ en el medio de cultivo era casi completa para A3-1, A3-2, A3-3 y A3-4 y bastante débil en los cultivos de la serie CM y del patrón FF-ATCC.

Los resultados cuantitativos están representados en el *cuadro 1*, siendo la recta de calibrado $y = 0{,}1936\ x$, donde y = D. O. y x = = concentraciones de Fe^{2+} en mg/ml $\cdot\ 10^{-3}$. Se llevó un control no inoculado.

Cuadro 1. Control global de la evolución del contenido en Fe^{2+} (mg/ml) de cultivos en medio 9K en el transcurso de una semana

Cepas	0 día	1.er día	2.° día	3.er día	4.° día	5.° día
CM-2	9,0335	7,7448	8,2643	8,5656	8,6020	8,6948
CM-3	7,7908	7,9545	7,8340	8,2816	8,6020	8,4534
CM-4	8,2643	8,2643	7,2571	7,5928	7,7915	8,1266
A3-1	8,2988	8,3075	7,9458	7,5240	3,6845	2,3243
A3-2	8,4021	7,7133	8,4106	7,8856	5,0360	2,1522
A3-3	7,8511	8,5[illegible]98	7,9458	7,9371	5,5100	3,2717
A3-4	8,2471	8,1783	8,0921	7,7048	4,4765	3,1852
F. F.	8,3333	8,1095	8,4623	8,6083	8,6948	8,4887
Control	8,2816	8,2471	8,2643	8,5828	8,8240	8,6948

Revitalizados en medio 9K los cultivos de la serie CM y FF, que no evolucionaron positivamente en un principio, se consiguió una mayor velocidad de oxidación en todas las cepas.

Los datos obtenidos en un control de los cultivos de agua de mina se expresan en el *cuadro 2*. La cepa más activa resultó ser la A3-1.

Cuadro 2. Control de la evolución del contenido de Fe (mg/ml) de cultivos de cepas aisladas de aguas de mina en medio 9K

Cepas	0 día	1.er día	2.º día	3.er día	4.º día	5.º día
A3-1	9,2975	8,9528	6,6371	0,8780	0,1172	0,1205
A3-2	9,0821	8,7805	6,0689	2,0917	0,0343	0.1980
A3-3	9,0391	8,6083	6,7404	1,3686	0,0000	0,1118
A3-4	9,2543	8,7805	6,8867	2,2122	0,0172	0,1118
Control	9,4265	8,9613	8,9528	8,7325	0,5314	8,5223

De la serie CM fue seleccionada para los estudios comparativos la cepa CM-4 por su mayor actividad oxidante.

Los resultados de estos estudios comparativos se indican en el *cuadro 3*.

Cuadro 3. Control de la evolución del contenido de Fe^{2+} (mg/ml) en los cultivos de las tres cepas seleccionadas finalmente en medio 9K

Cepas	0 dia	1 er dia	2 º día	3.er día	4.º día
CM-4	9,035	8,776	8,820	8,605	8,278
A3-1	9,035	8,820	8,072	0,430	0,060
F. F.	9,035	8,648	8,582	0,050	0,188
Control	9,121	8,776	8,121	8.518	8,545

Se observa una fase de latencia más larga en la cepa CM-4.

Las cepas A3-1 y FF-ATCC muestran una mayor y casi idéntica capacidad de oxidación, por lo que teniendo en cuenta el carácter

de «autóctona» de la cepa A3-1, condición deseada para una futura aplicación industrial de desulfuración microbiana a pie de mina, se eligió ésta como cepa de trabajo para la siguiente fase del estudio de desulfuración de carbones.

RESUMEN

Se ha seleccionado entre las cepas ferrooxidantes aisladas de carbones y aguas de mina ácidas, la más eficaz para estudiar la desulfuración de lignitos españoles. La cepa A3-1, aislada de una muestra de agua de mina ácida de la cuenca lignitífera de Utrillas (Teruel), presentó la mayor velocidad de oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+}.

SUMMARY

Microbial desulfurization of coal. II. Strain's selection

The most active strain in the oxidation $Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+}$ was selected among pure cultures isolated from coal samples and acid mine waters. This resulted the A3-1 strain isolated from a sample of an acid mine water from Utrillas (Teruel).

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. Ford, W. H.; Roffman, H. K., and Beimborn, W. A. 1977. Bacterial removal of sulfur from coal. Combustion, 49, 36-38.
4. George, T. J., 1979. Chemical desulfurization: a misunderstood technology. Coal Min. Process., 16, 60-63
5. 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.
6. Maxwell, E. 1978. High gradient magnetic separation in coal desulfurization DOE Symp. Ser., 46, 98-112.
7. Ponsford, A. P. 1966. Microbiological activity in relation to coal utilization. Brit. Coal Util. Res. Ass. Mon. Bull., XXX, 2-17.

8. RUIZ ALARES, M.ª C.; IÑIGO, B.; GÓMEZ-ARANDA, V., y GAVILÁN, J. M. 1979-1980. Desulfuración microbiana del carbón. I. Aislamiento e identificación de bacterias ferro y sulfo-oxidantes. Microbiol. Españ., 32-33, 65-74.
9. 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 hihg cells yields. J. Bacteriol., 77, 642-47.
10. SNELL, F. D., and SNELL, C T. 1954. Colorimetrics Methods of Analysis. II, 314. Van Nostrand Co., Toronto, New York, London.
11. TOUVINEN, O. H., and KELLEY, D. P. 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiologycal leaching in sulfide ores. Z. Allg. Mikrobiol., 12, 311-46.

FACULTAD DE VETERINARIA DE LEON
DEPARTAMENTO DE HIGIENE Y MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

SENSIBILIDAD A LA LISIS POR LISOSTAFINA EN ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE LECHE MAMITICA DE OVEJA

por

L. GUTIERREZ, M. L. GARCIA y B. MORENO

INTRODUCCION

La lisostafina es una sustancia extracelular, elaborada por *Staphylococcus staphylolyticus*, con acción lítica sobre los estafilococos. La lisis, que es específica, se debe a la acción de uno de sus componentes, una peptidasa, sobre los enlaces glicilglicina de los puentes interpeptídicos del peptidoglicano de la pared celular. Teniendo en cuenta que sólo los estafilococos poseen puentes constituidos fundamentalmente por unidades de glicina y que existe una elevada correlación entre la sensibilidad a esta enzima y la composición del peptidoglicano (1, 6), la susceptibilidad a la lisostafina puede ser considerada como una prueba de gran valor para diferenciar los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* (2, 9, 12, 14).

Algunos estafilococos muestran, sin embargo, una ligera resistencia a esta enzima. Esta menor sensibilidad se debe a que en estos microorganismos la glicina se encuentra parcialmente sustituida por alanina o serina (10, 13). Existe, además, cierta evidencia de que esta sustitución no se presenta en las cepas coagulasa-positivas y sí de forma frecuente en las coagulasa-negativas (5, 13). Basándose en estas últimas consideraciones, diversos autores han propuesto incluso el grado de sensibilidad a la lisostafina como método útil para diferenciar especies del género *Staphylococcus* (7, 11, 14).

En este trabajo se estudia la sensibilidad a la lisis por lisostafina

de 71 cepas de estafilococos aisladas a partir de leche mamítica de oveja, con la finalidad de determinar el valor de este carácter en la adscripción de cocos gram-positivos catalasa-positivos al género *Staphylococcus* y en la diferenciación de estafilococos coagulasa-positivos y negativos.

MATERIAL Y METODOS

Cepas

La población estudiada estaba constituida por 59 cepas de *Staphylococcus aureus*, 5 de *S. epidermidis*, 1 de *S. simulans*, 1 de *S. haemolyticus* y 5 no clasificadas. Sesenta de estas cepas eran coagulasa-positivas y 11 coagulasa-negativas. Todas ellas habían sido aisladas por nosotros a partir de leche mamítica de oveja.

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 (17). Suspensiones estandarizadas de células, de densidad óptica (D. O.) 0,139 a 0,166, de la cepa a ensayar, lavadas dos veces en tampón tris-ClH 0,05 M, a pH 7,5, conteniendo ClNa 0,145 M, se sometían a la acción de 1 unidad/ml (concentración final) de lisostafina (Schwarz-Mann). La reacción tenía lugar en las propias cubetas, de 10 mm de camino óptico, de un espectrofotómetro Perkin-Elmer mod. 200, termoestabilizadas a 37 °C. Las lecturas de la D. O. a 620 nm se realizaban a los 0, 5, 10, 20, 30 y 60 min. El grado de sensibilidad a la lisostafina se estimó como el porcentaje de descenso en la D. O. a los 20 min de incubación. Las cepas se consideraron como muy sensibles (MS) si el porcentaje de reducción en la D. O. era igual o superior al 80 % y como poco sensibles (PS) cuando este porcentaje era igual o inferior al 20 %. Las cepas que mostraban porcentajes de reducción entre ambos valores fueron consideradas como de sensibilidad intermedia (I).

Como control positivo se incluía diariamente la cepa patrón *Staphylococcus aureus* 209 P y como controles negativos *Micrococcus*

luteus NCTC 2665 y *Sarcina lutea* ATCC 9341. Con el fin de evaluar el posible efecto de la autolisis, se determinó también el porcentaje de reducción en la D. O. de las cepas en condiciones idénticas a las anteriores, pero sin la adición de lisostafina.

RESULTADOS

De las 71 cepas de estafilococos estudiadas, 60 (84,51 %) eran muy sensibles a la lisostafina y 11 (15,49 %) fueron consideradas como de sensibilidad intermedia. A los 20 min, el valor medio del porcentaje de reducción de la D. O. de las cepas muy sensibles fue del 89,46 %, con valores extremos del 81,25 % y del 99,27 %. Las 11 cepas de

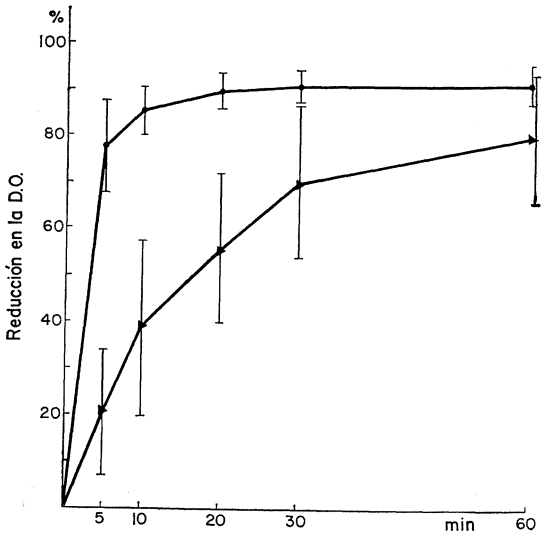


Figura 1. Curvas de sensibilidad a la lisostafina, con representación de las desviaciones estándar. ●, media de las 60 cepas muy sensibles; ▲, media de las 11 cepas de sensibilidad intermedia. Valores a los 20 min. Cepas muy sensibles: media 89,46 %, σ = 4,93. Cepas de sensibilidad intermedia: media 55,54 %, σ = 13,24

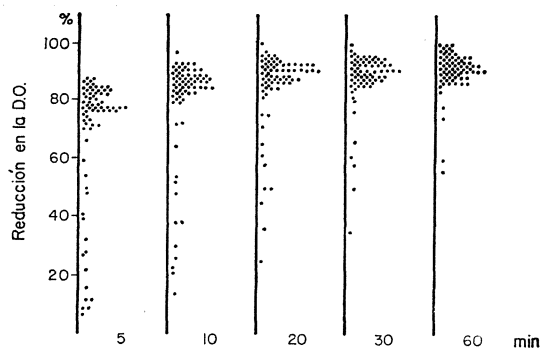


Figura 2. Gráfica de la evolución del proceso de lisis por lisostafina en 71 cepas de estafilococos. Cada punto representa una cepa

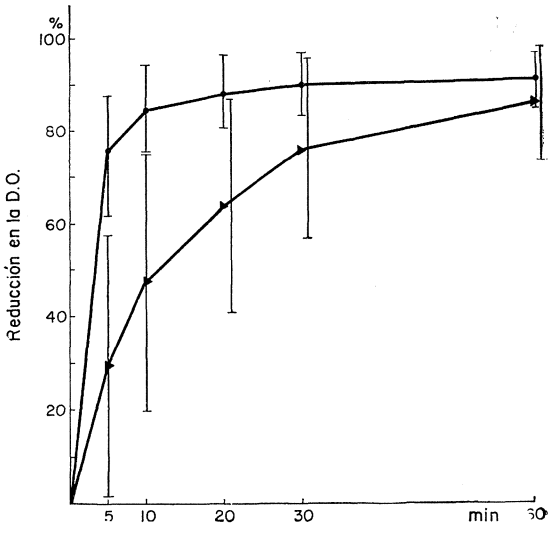


Figura 3. Curvas de sensibilidad a la lisostafina con representación de las desviaciones estándar. ●, media de las 60 cepas coagulasa-positivas; ▲, media de las 11 cepas coagulasa-negativas. Valores a los 20 min. Cepas coagulasa-positivas: media 88,33 %, σ = 7,7. Cepas coagulasa-negativas: media 64,64 %, σ = 23

sensibilidad intermedia presentaron una media del 55,54 % de reducción, con valores que oscilaban entre el 25 % y el 75 %. En la *figura 1* se representan las curvas de sensibilidad de ambos grupos de

Cuadro 1. Relaciones entre el grado de sensibilidad a la lisostafina y la producción de coagulasa y de termonucleasa

Número de cepas	Sensibilidad a la lisostafina	Producción de coagulasa [a]	Producción de ADNasa termoestable
54	51 MS 3 I	54 4 +	54 +
5	5 MS	5 3 +	4 + 1 ±
1	1 MS	1 2 +	1 +
11	3 MS 8 I	11 1 + 6 —	2 ± 9 —

MS = muy sensibles. I = de sensibilidad intermedia. [a] Grados de positividad según Turner y Schwartz. Se consideraron como coagulasa-negativas las cepas que dieron puntuaciones — y 1 +. + = positivas. ± = débilmente positivas. — = negativas.

Cuadro 2. Grado de sensibilidad a la lisostafina de 71 cepas de estafilococos, en relación con las especies en que fueron clasificadas

Especie	Número de cepas	Sensibilidad a la lisostafina	
		MS	I
S. aureus	59	56	3
S. simulans	1	1	
S. epidermidis	5	1	4
S. haemolyticus	1		1
No clasificadas	5	2	3

MS = muy sensibles. I = de sensibilidad intermedia.

cepas con indicación de sus desviaciones estándar. La evolución en el tiempo del proceso de lisis se encuentra recogida gráficamente en la *figura 2*. En la *figura 3* se representan las curvas de sensibilidad correspondientes al grupo de cepas coagulasa-positivas y al de coagulasa-negativas. En el *cuadro 1* se recogen las relaciones existentes entre el grado de sensibilidad a la lisostafina y la producción de coagulasa y de termonucleasa. El *cuadro 2* muestra el grado de sensibilidad de las cepas por especies. Finalmente, los valores medios de reducción en la D. O. a los 5, 10, 20, 30 y 60 min de las cepas agrupadas también por especies se dan en el *cuadro 3*.

Cuadro 3. Valores medios de los porcentajes de reducción en la D. O. a diferentes tiempos de 71 cepas de estafilococos, en relación con las especies en que fueron clasificadas

Especie	Número de cepas	Porcentaje de reducción en la D. O.				
		5 min	10 min	20 min	30 min	60 min
S. aureus	59	75,08	83,9	87,88	89,38	90,9
S. simulans	1	39,8	72,0	86,00	89,00	89,0
S. epidermidis	5	31.6	51,2	70,80	81,80	91,2
S. haemolyticus	1	9,5	38,0	50,00	76,00	86,0
No clasificadas	5	40,18	47,2	60,80	69,60	81.6

DISCUSION

Los resultados obtenidos confirman la inclusión previa de las cepas estudiadas en el género *Staphylococcus* por haber fermentado todas ellas la glucosa, a la vez que demuestran el valor de la prueba de sensibilidad a la lisis por lisostafina en la adscripción de cocos gram-positivos catalasa-positivos al mencionado género. El elevado porcentaje encontrado de cepas muy sensibles a la lisostafina (84,51 %) debe ser interpretado teniendo en cuenta que el 83 % de las cepas estudiadas correspondían a *S. aureus*.

El examen de los datos presentados en el *cuadro 1* permite apreciar la existencia de una relación absoluta entre las puntuaciones 4 +

y 3 + en la prueba de la coagulasa y la producción de termonucleasa. Sin embargo, 3 de las cepas puntuadas como 4 + presentaron sensibilidad intermedia a la lisostafina. Es interesante señalar, por otra parte, que la cepa puntuada como 2 + y 2 cepas coagulasa-negativas, productoras las 3 de termonucleasa, presentaron una elevada sensibilidad a la lisostafina. Las 9 cepas restantes coagulasa-negativas fueron termonucleasa-negativas y mostraron una sensibilidad intermedia a la lisostafina, salvo una que fue muy sensible. Considerando ahora la marcha del fenómeno de lisis en el grupo de cepas coagulasa-positivas y en el de coagulasa-negativas *(figura 3)*, destaca, en primer lugar, que la velocidad del proceso es muy superior inicialmente en el primer grupo que en el segundo, pero que a medida que transcurre el tiempo de incubación las diferencias en los porcentajes de reducción disminuyen considerablemente. Aplicada la prueba de la t de Student a los porcentajes de reducción en la D. O. de ambos grupos de cepas, se observaron diferencias significativas entre las medias a los 5, 10, 20 y 30 min, si bien el nivel de significación fue de $P \leqslant 0{,}001$ a los 5 y 10 min, disminuyó a $P \leqslant 0{,}01$ a los 20 min y a $P \leqslant 0{,}05$ a los 30 min. A los 60 min, las diferencias dejaron de ser estadísticamente significativas.

La adecuación de los 20 min como tiempo para realizar las lecturas en la técnica turbidimétrica por nosotros utilizada, adoptada ya en nuestro laboratorio en estudios previos (3), debe ser juzgada teniendo en cuenta, por un lado, la suficiente diferenciación de los grupos y, por otro, el efecto de autolisis que puede ser importante en algunas cepas a partir de un tiempo determinado. Los datos estadísticos antes mencionados, referidos a los grupos de cepas coagulasa-positivas y negativas, indican que el nivel de significación de las diferencias entre las medias fue mayor antes de los 20 min que a este tiempo, lo que puede ser explicado teniendo en cuenta la gran sensibilidad de la población estudiada. Por otra parte, si consideramos las diferencias entre las medias en los grupos de cepas muy sensibles y de sensibilidad intermedia, el nivel de significación fue de $P \leqslant 0{,}001$ a los 5, 10, 20 y 30 min.

Refiriéndonos ahora a la sensibilidad de las cepas agrupadas en especies, en el *cuadro 2* puede observarse que de las 59 cepas de *Staphylococcus aureus*, 56 eran muy sensibles y 3 de sensibilidad inter-

media. Por lo que se refiere a *S. epidermidis*, 4 de las 5 cepas clasificadas como tales mostraron una sensibilidad intermedia, siendo la restante muy sensible. Esta última cepa poseía caracteres exclusivos de la especie en que fue incluida. La cepa de *S. simulans* fue muy sensible, y de sensibilidad intermedia la clasificada como *S. haemolyticus*. Por lo que se refiere a las 5 cepas no clasificadas, cabe destacar que 2 de ellas fueron muy sensibles y 3 de sensibilidad intermedia. Las 2 cepas muy sensibles presentaban caracteres compartidos por *S. aureus* y *S. intermedius*, mientras que las 3 de sensibilidad intermedia mostraban caracteres propios de las especies coagulasa-negativas. La alta sensibilidad a la lisostafina de las cepas de *S. aureus* y de la clasificada como *S. simulans*, así como la menor sensibilidad de las cepas de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* pueden ser explicadas por el diferente tipo de peptidoglicano de sus paredes celulares (8).

A pesar de que el grado de sensibilidad a la lisostafina es considerado por algunos autores como un carácter útil para diferenciar especies de estafilococos (7, 11, 14), son escasos los trabajos que relacionan de hecho esta propiedad con la adscripción a una especie determinada. En realidad, se refieren fundamentalmente a estafilococos coagulasa-positivos y negativos, como grupos, y a las especies *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*. Además, la utilización de técnicas diversas y de criterios diferentes para expresar el grado de sensibilidad dificulta la comparación de resultados.

Thomas y Schuhardt (16) estudiaron, por un método turbidimétrico, la sensibilidad a 1 unidad/ml de lisostafina de 119 cepas de *Staphylococcus aureus* y de 22 cepas de *S. epidermidis*. Los autores mencionados señalan que la totalidad de las cepas de *S. aureus* mostraban un porcentaje de reducción en la D. O. superior al 80 % en un período de tiempo comprendido entre los 10 y los 60 min, mientras que los valores observados con las cepas de *S. epidermidis* eran del 20 % al 71 % a los 60 min. Con una técnica similar, Schuhardt (14) determina la sensibilidad a la lisostafina de 145 cepas de *S. aureus* y de 50 cepas de estafilococos coagulasa-negativos, observando que el valor medio de los porcentajes de reducción en la D. O. en la población de *S. aureus* era, a los 20 min, del 80 %, con valores extremos del 50 % y del 90 %, y que, a los 60 min, las cepas de estafilo-

cocos coagulasa-negativos daban un porcentaje medio de reducción del 48 %, siendo los valores extremos del 6 % y del 79 %. Al estudiar la sensibilidad a la lisostafina de 57 cepas de estafilococos aisladas de leche mamítica de vaca, García y colaboradores (4) encuentran que todas las cepas de *S. aureus* (en total 46) mostraban, a los 20 min, porcentajes de reducción en su D. O. superiores al 80 %, mientras que de las 6 cepas de *S. epidermidis*, 5 daban porcentajes inferiores al 20 %.

Más difíciles son de comparar con nuestros resultados los datos obtenidos por otros autores que utilizan técnicas distintas y concentraciones diversas de enzima. Así, Lachica y colaboradores (9) estudian, por una técnica cualitativa, la sensibilidad de 373 cepas de *Staphylococcus aureus* y de 68 cepas de *S. epidermidis* a 25 µg/ml de lisostafina, observando que las cepas de *S. aureus* se lisaban instantáneamente, mientras que las de *S. epidermidis* requerían de 1-2 h. Severance y colaboradores (15) investigan la reducción en el número de células de 108 cepas de *S. aureus*, 56 de *S. epidermidis* y 2 de *S. saprophyticus* al ponerlas en presencia de 0,574 unidades/ml de enzima: todas las cepas de *S. aureus* estudiadas, menos 2, mostraban una reducción del 90 % o superior, a los 30 min, siendo inferiores las reducciones correspondientes a las cepas de las otras dos especies.

En líneas generales, y aún teniendo en cuenta las dificultades ya señaladas en la comparación de datos, nuestros resultados coinciden con los anteriormente comentados.

CONCLUSIONES

De todo lo expuesto anteriormente parece posible concluir que la sensibilidad a la lisis por lisostafina es una prueba de gran valor para la adscripción de los cocos gram-positivos catalasa-positivos, aislados de leche mamítica de oveja, al género *Staphylococcus*, que permite, además, a nivel de población, diferenciar los estafilococos coagulasa-positivos y los coagulasa-negativos, tanto por la diferente velocidad del proceso de lisis cuanto por la extensión del mismo en un tiempo determinado.

Como ya se preveía, no ha sido posible estimar el valor de la prueba para la diferenciación de especies de estafilococos, ya que no se ha contado con representación de todas las especies ni con suficiente número de cepas de cada una de ellas. No obstante, se analizan los resultados obtenidos en este sentido.

RESUMEN

En este trabajo se estudia, por un método turbidimétrico, la sensibilidad a la lisis por lisostafina de 71 cepas de estafilococos, aisladas a partir de leche mamítica de oveja: 60 cepas (84,51 %) fueron muy sensibles y las 11 restantes (15,49 %), de sensibilidad intermedia. A los 20 min, el valor medio de los porcentajes de reducción en la D. O. de las cepas muy sensibles fue del 89,46 %. Las cepas de sensibilidad intermedia presentaron una media del 55,54 % de reducción.

Se han establecido las conclusiones que se señalan más arriba y se ha relacionado el grado de sensibilidad a la lisostafina con la producción de coagulasa y de termonucleasa.

SUMMARY

Lysostaphin sensitivity of staphylococci isolated from ovine mastitic milk

A total of 71 strains of staphylococci isolated from ovine mastitic milk were tested for lysostaphin sensitivity (1 unit/ml) using a turbidimetric assay. Fifty nine of these cultures were *Staphylococcus aureus*, 1 *S. simulans*, 5 *S. epidermidis*, 1 *S. haemolyticus* and 5 unclassified. Sixty of these strains (84,51 %) were graded highly sensitive with an average percent reduction in turbidity after 20 min incubation of 89,46 %. The remaining 11 strains (14,49 %) gave a mean value of 55,54 % and were considered as moderately sensitive.

From these results it would appear that lysostaphin sensitivity is a reliable test for the identification of Gram-positive catalase-positive cocci isolated from ovine mastitic milk. On the basis of their degree of sensitivity to this enzyme, it has been possible to appreciate

differences between the groups of coagulase-positive and coagulase-negative strains. In addition, the value of this test for the differentiation of staphylococcal species has been considered. Finally, the relationship between the degree of sensitivity to lysostaphin and coagulase and thermonuclease production has also been established.

BIBLIOGRAFIA

1. BROWDER, H. P.; ZYGMUNT, W. A.; YOUNG, J. R., and TAVORMINA, P. A. 1965. Lysostaphin: Enzymatic mode of action. Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 383-89.
2. BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. (ed.) 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 478-89. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
3. GARCÍA, M. L., y MORENO, B. 1979-80. Capacidad enterotoxigénica y algunas propiedades relacionadas con este carácter en estafilococos aislados de leche mamítica. Microbiol. Españ., 32-33, 53-63.
4. GARCÍA, M. L.; MORENO, B., and BERGDOLL, M. S. 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. Appl. Environ. Microbiol., 39, 548-53.
5. HECZKO, P. B.; GROV, A., and PULVERER, G. 1976. Susceptibility of staphylococci of various cell wall structure to lysostaphin and its separated enzymes. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1, Suppl. 5, 43-48.
6. KLESIUS, P. H., and SCHUHARDT, V. T. 1968. Use of lysostaphin in the isolation of higly polymerized deoxyribonucleic acid and in the taxonomy of aerobic *Micrococcaceae*. J. Bacteriol., 95, 739-43.
7. KLOOS, W. E., and SCHLEIFER, K. H. 1975. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Description of four new species: *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis* and *S. simulans*. Int. J. Syst. Bacteriol., 25, 62-79.
8. KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H., and NOBLE, W. C. 1976. Estimation of character parameters in coagulase negative *Staphylococcus* species. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Suppl. 5, 23-41.
9. 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.
10. SCHLEIFER, K. H., and KANDLER, O. 1972. Peptydoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev., 36, 407-77.
11. 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.

12. SCHLEIFER, K. H., and KLOOS, W. E. 1976. Separation of staphylococci from micrococci. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Suppl. 5, 3-9.

13. SCHLEIFER, K. H., and KOCUR, W. F. 1973. Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. Arch. Mikrobiol., 93, 65-85.

14. SCHUHARDT, V. T. 1965. Staphylococci and their classification. Ann. N. Y. Acad. Sci., 128, 4-25.

15. SEVERANCE, P. J.; KAUFFMAN, C. A., and SHEAGREN, J. N. 1980. Rapid identification of *S. aureus* by using lysostaphin sensitivity. J. Clin. Microbiol., 11, 724-27.

16. THOMAS, E. T., and SCHUHARDT, V. T. 1964. Susceptibility of aerobic Micrococcaceae to lysostaphin. Bacteriol. Proc., 23.

17. 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 «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (CSIC)
UNIDAD DE VIROLOGIA ANIMAL

UPTAKE OF VACCINIA VIRUS BY *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

by

S. PEREZ-PRIETO and A. GARCIA-GANCEDO

INTRODUCTION

Tetrahymena pyriformis is an eukariotic cell, but in addition it is also an organism capable of independent life. To ensure this particular aspect of the cell's life, the cell has many specialized structures. Among the ciliates, members of the genus *Tetrahymena* proved to be the most easily grown under axenic conditions and *T. pyriformis* became the specie of choice. The study of the possible interactions between this ciliate and mammalian viruses may be an interesting subject in virology.

Few authors have studied the possible uptake of mammalian viruses by protozoal populations, and the possible viral inactivation or viral multiplication in these cells. The hemagglutinin and complement fixing antigen of influenza B virus were inactivated by *Tetrahymena pyriformis*, the hemagglutinins of influenza A virus and of Newcastle disease virus were also inactivated by actively growing cultures of this ciliate; inactivation of influenza B virus was inversely related to the increase in protozoal population, and *T. pyriformis* is capable of feeding on a dilution of influenza virus (4, 6). Following experimental inoculation, the acridine orange-labelled encephalomyocarditis virus was visualized in *T. pyriformis* cells as microscopically visible fluorescent spots, and these findings suggest adsorption and uptake of mammalian virus by these Protista (5). Other experiments proved, by quantitative means, the multiplication of encephalomyocarditis virus in *T. pyriformis*, and similar results

were obtained with purified infectious-RNA derived from type I poliovirus (7). However, at the present, there has been no confirmation of the propagation of any mammalian virus in Protista. In the present report we show the uptake of vaccinia virus by *T. pyriformis*, and the possible interaction between the virus and the protozoa.

MATERIALS AND METHODS

Virus, cells and protozoa

The ciliate supplied by the Culture Center for Algae Protozoa, Cambridge, England was grown axenically at 25 °C in flasks with a medium containing 0.5 % (W/V) proteose-peptone (Difco), 0.5 % (W/V) Triptone (Difco) and 0.1 % (W/V) K_2HPO_4 (Mallinckrodt) in distilled water. Other strain of *Tetrahymena pyriformis* adapted to culture at 37 °C was supplied by the same Center and was grown axenically in flasks with a medium composed by proteose-peptone 2 % (W/V) and yeast extract (Difco) 0.25 % (W/V) in distilled water. The stock of vaccinia virus was prepared by infection of chick embryo cell monolayers, propagated in culture medium previously described (3). On the fourth day post-infection the vaccinia infected cells were frozen and thawed three times, the lysate was clarified by centrifugation for 15 min at 900 g and stored frozen (— 70 °C). The infectious titer of vaccinia virus stock was determined by plaque assay as described before (3).

Uptake studies by electron microscopy

A population of *Tetrahymena pyriformis* in logarithmic (24 h) growth phase, incubated at 25 °C, was centrifuged at 900 g for 10 min at 4 °C, in a International refrigerated centrifuge Model PR-2 rotor 269. This temperature of centrifugation, restricted the protozoal mobility. The protozoal cell pellet was resuspended in PBS (phosphate buffered saline) and incubated for 16 h at 25 °C. A second similar centrifugation was then performed, and the soft pellet, resuspended in 2 ml of medium containing 2×10^7 PFU/ml (plaque forming units) of vaccinia virus, was maintained at 25 °C during

25 min. The virus-protozoa mixture was centrifuged at 4 °C, 900 g for 10 min, the supernatant discarded and the pellet fixed for 45 min in 5 % buffered glutaraldahyde (pH 6.9), washed in Palade's buffer, and post-fixed in 2 % (W/V) OsO_4 buffered with Palade's buffer (9). Dehydration was carried out by acetone series (11), embedding was in epoxy araldite resin (8), and stained with lead citrate for 20 min (10). The blocks were sectioned with a Reichert ultratome LKB Mod. B and sections were examined in a Siemens Elmiskop I.

RESULTS

Uptake of vaccinia virus by Tetrahymena pyriformis *observed by electron microscopy*

Figure 1 shows a portion of a cell of *Tetrahymena pyriformis* with a food vacuole in stage II (2), leaving a clear space between the ingested material and the vacuolar membrane and forming a halo. This vacuole located near the surface of the ciliate contains several viral particles and other materials, probably cellular debris. When cells were grown in axenic medium, clear vacuoles appeared (2), and a part of vacuola of this type may be observed in *figure 1*. It is remarkable the presence of several mitochondria associated with the food vacuole containing virus.

An enlarged portion of *figure 1* shows vaccinia virus particles with their characteristic structure *(figure 2)*. An old food vacuole *(figure 3)* contains vaccinia virus particles, and other digested material, and a vacuole associated mitochondrion may be observed. The structure of viral particles is preserved. Similarly, another old food vacuele *(figure 4)* contains three viral particles structurally well defined, with a mitochondrion food vacuole associated.

Action of Tetrahymena pyriformis *incubated at 25 °C on vaccinia virus during a period of 24 h*

A population of *Tetrahymena pyriformis* in logarithmic growth phase (24 h culture), containing 40,000 cells/ml was infected with vaccinia virus at final concentration of 5×10^2 PFU/ml. Samples

were removed from the moisture after 2 h, 4 h, 6 h, 8 h and 24 h of incubation at 25 °C, and centrifuged at 900 g for 15 min in refrigerated centrifuge at 4 °C. The supernantant was removed and contained the extracellular virus. The pellet containing the protozoa, washed with PBS, was centrifuged in the same conditions and resuspended in 1 ml of PBS and frozen and thawed three times, centrifuged at 900 g for 5 min for removing the cell debris and the intracellular virus was obtained. A simultaneous experiment control was performed with an equal dose of vaccinia virus suspended in the protozoa medium and samples were obtained at the same time periods. The samples from both experiments were stored at — 20 °C and the virus titer was determined by plaque assay. The growth curve of infected protozoa was determined by cell counts in Neubauer hematimeter of periodical samples, previously fixed with formaldehide 0,05 %.

The results obtained revealed a progresive decrease of the extracellular and intracellular virus titers, but a detectable level of virus titer was observed after 24 h of incubation. The virus control titer was unafected by experimental conditions. The protozoan growth curve showed a decrease in the number of cells during the first 4 h followed by a progresive multiplication *(figure 5)*.

Action of Tetrahymena pyriformis *incubated at 25 °C on vaccinia virus during a period of 11 d*

A culture of *Tetrahymena pyriformis* aged 24 h containing 76,000 cells/ml, was infected with a final dilution of vaccinia virus of 1.4×10^3 PFU/ml and incubated at 25 °C during 11 d. Samples were obtained after 1 d, 2 d, 4 d, 6 d, 8 d and 11 d of incubation and were been centrifuged at 900 g for 15 min and 4 °C, the pellet washed with PBS, centrifuged in the same conditions, resuspended in 1 ml of PBS, the cells disrupted by freezing and thawing three times and cleared by centrifugation at 900 g for 5 min. The titers of intracellular, extracellular and control virus without protozoa virus were determined by plaque assay. At the same sampling periods the number of protozoa was measured by cell counting.

Intracellular virus titer was progresively reduced during the four first days after which the remaining amount of virus was stabilized

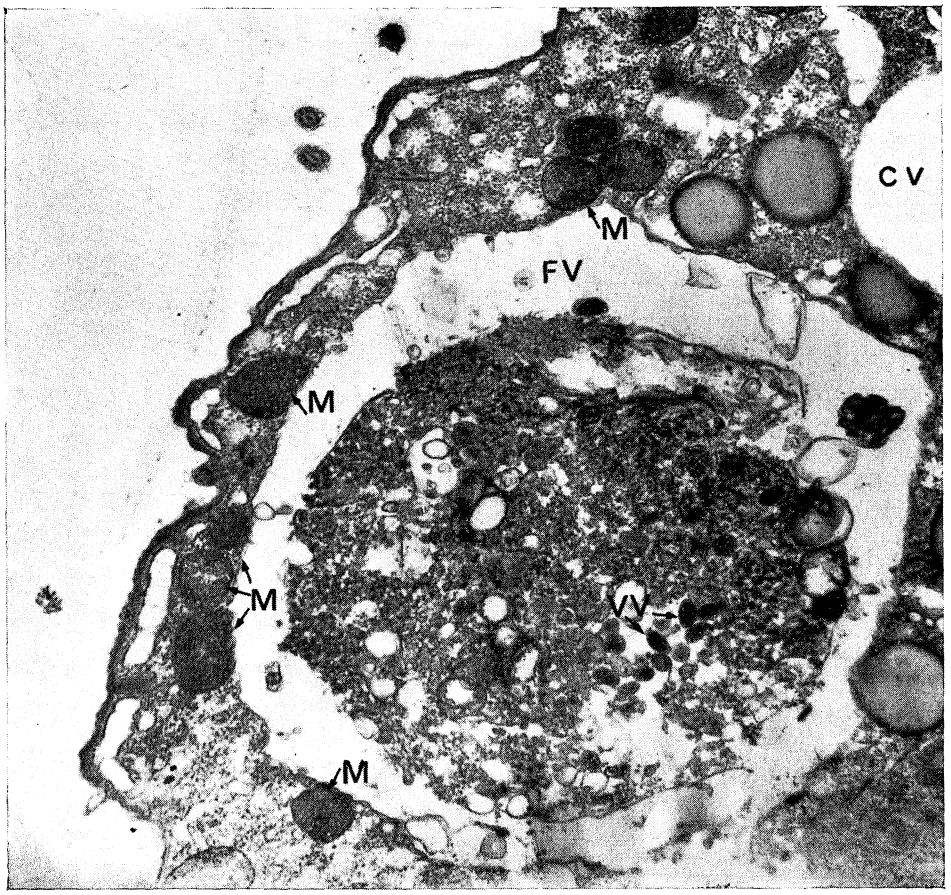


Figure 1. Portion of a cell of Tetrahymena pyriformis *which fed on a suspension of vaccinia virus. The food vacuole (FV) contains cell debris, several viral particles (VV), a clear vacuole (CV) and several mitochondria (M).* × *13,200*

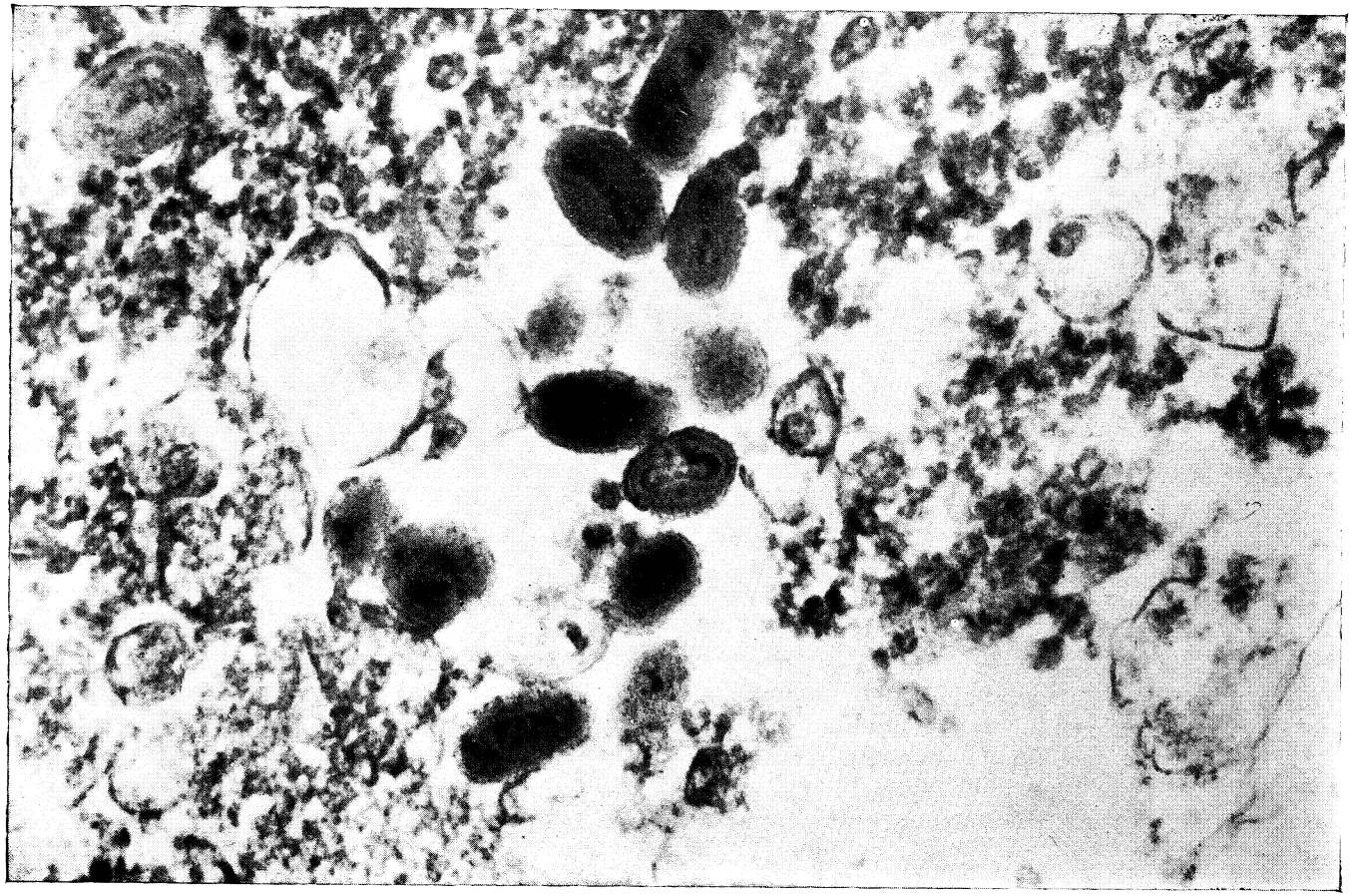


Figure 2. Enlarged portion of figure 1. Virus particles showing the typical characteristics of vaccinia virus ultraestructure are clearly seen. × 66,000

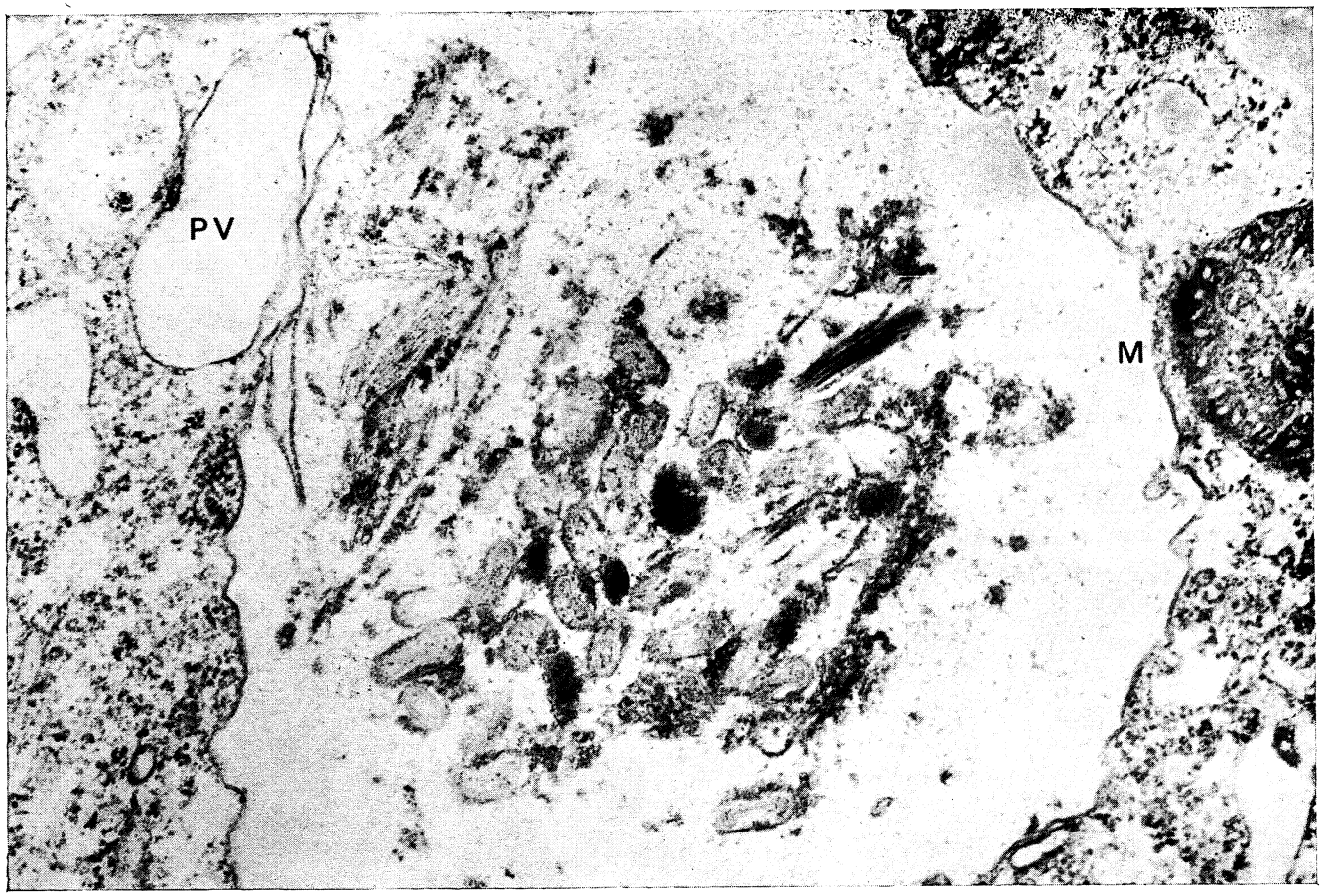


Figure 3. An older food vacuole which contains several viral particles, digested cell debris, associated mitochondrion (M) and pinocytic vacuole (PV). × 44,000

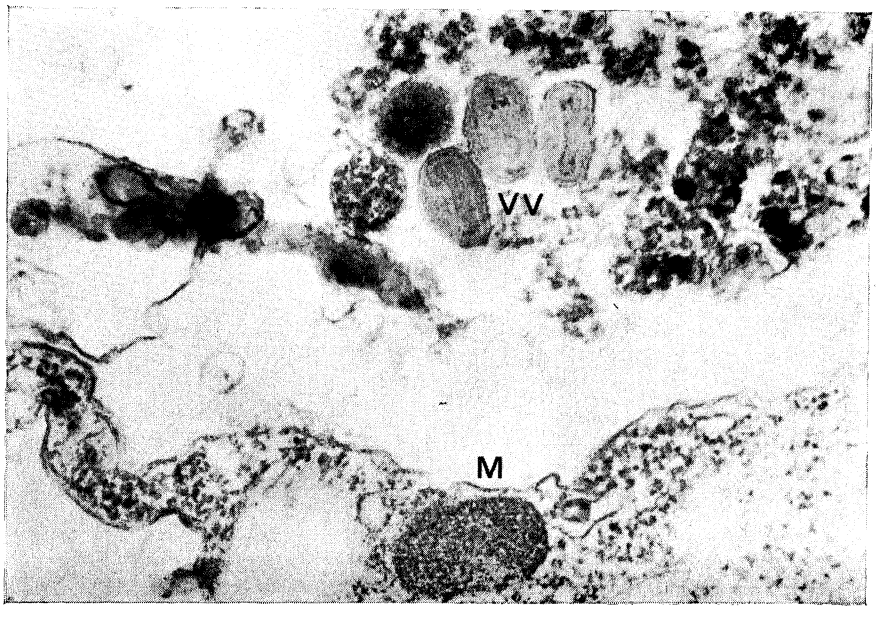


Figure 4. Old vacuole containing three virus particles (VV) and associated mitochondrion (M). × 50,000

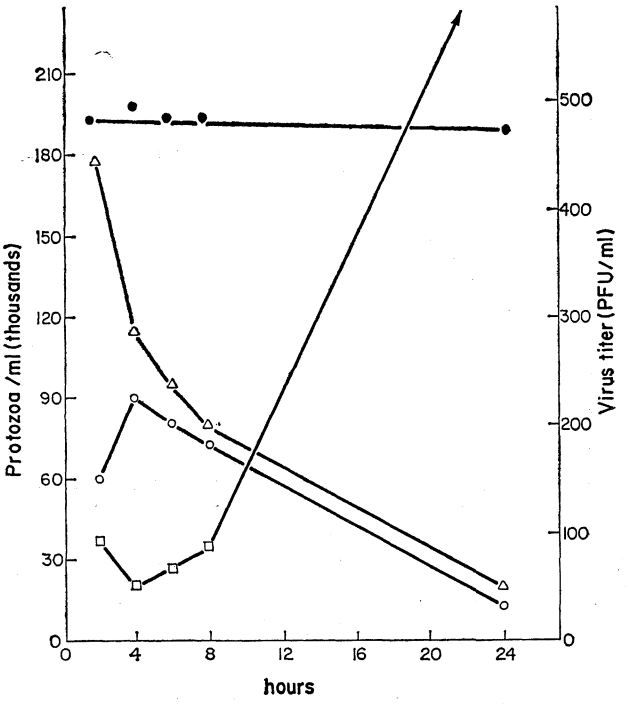


Figure 5. Action of T. pyriformis *incubated at 25 °C on vaccinia virus during a period of 24 h. Extracellular virus* (○), *intracellular virus* (△), *control virus* (●), *protozoa* (□)

for seven more days at least. Extracellular virus decreased rapidly until 2 d period, at this time no virus could be detected. Simultaneously the number of *Tetrahymena pyriformis* cells increased during 6 d, followed by posterior decrease *(figure 6)*. The virus control titer decreased sligthly during the experimental period.

Action of Tetrahymena pyriformis *incubated at 37 °C on vaccinia virus during a period of 10 d*

A culture of *Tetrahymena pyriformis* aged 24 h containing 41,000 cells/ml was infected with a final dilution of vaccinia virus of 4.3×10^3 PFU/ml and incubated at 37 °C during 10 d. Samples

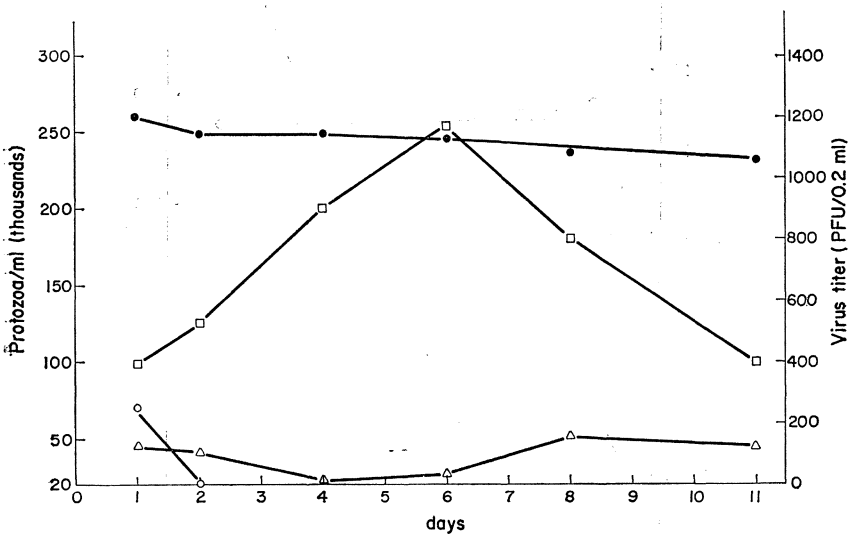


Figure 6. Action of T. pyriformis *incubated at 25 °C on vaccinia virus during a period of 11 d at 25 °C. Extracellular virus* (○), *intracellular virus* (△), *control virus* (●), *protozoa* (□)

were removed after 1 d, 2 d, 3 d, 5 d, 6 d, 8 d and 10 d, and processed in the same conditions performed for experiment at 25 °C. At 37 °C similar results were obtained *(figure 7)* but the rate of control virus inactivation was more accelerated for temperature influence.

Proportionality between the number of protozoa and virus titer decrease

To determine the effect of the number of protozoa on the rate of virus titer decrease, logarithmic dilutions (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}) from a young culture (24 h) of *Tetraphymena pyriformis* containing 1,730,000 cells/ml, were infected with vaccinia virus at final concentration of 4×10^3 PFU/ml. After 90 min of incubation at 25 °C, the samples were frozen and thawed three times, the lysate was clarified by centrifugation for 15 min at 900 g and stored frozen at — 20 °C. The infectivity titer of vaccinia virus was determined by plaque assay. Progressive removal of virus from the virus-

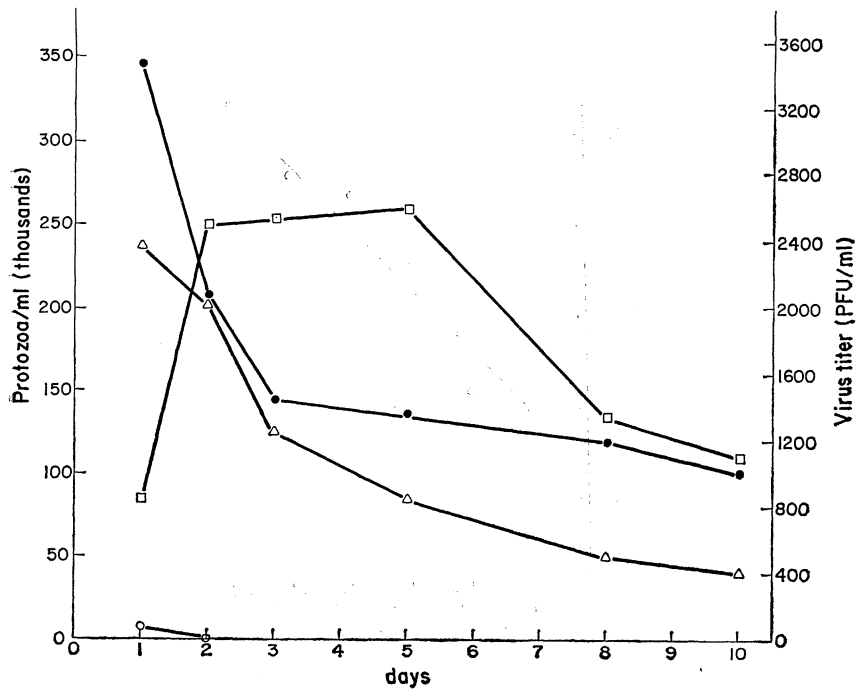


Figure 7. Action of T. pyriformis *incubated at 37 °C on vaccinia virus during a period of 10 d at 37 °C. Extracellular virus* (○), *intracellular virus* (△), *control virus* (●), *protozoa* (□)

protozoa mixture was found to be dependent on the number of the protozoa present in the mixture *(figure 8)*.

Effects of metabolized nutrients and Tetrahymena pyriformis *extract on vaccinia virus*

In this experiment a constant amount of vaccinia virus 8.5×10^2 PFU/ml was added to differents samples of extracts in medium from a culture of *Tetrahymena pyriformis* (frozen and thawed). The protozoal culture used was previously incubated for 24 h at 25 °C and samples were taken at intervals after 24 h, 48 h and 72 h. These samples cleared by centrifugation at 900 g for 5 min were inoculated with the mentioned virus dose and virus titer was deter-

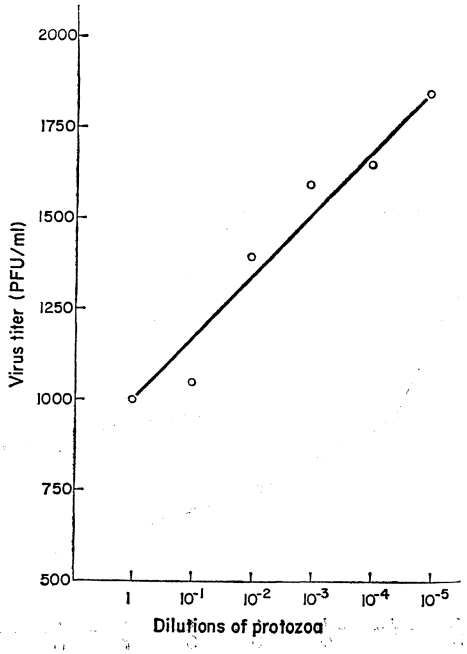


Figure 8. Proportionality between the number of protozoa and virus titer decrease. Intracellular and extracellular virus (○)

mined by plaque assay after 3 h, 24 h and 48 h of incubation at 25 °C. Data presented in *table 1* show that metabolized medium and *T. pyriformis* extract do not affect vaccinia virus infectivity.

Table 1. Effect of metabolized nutrients and T. pyriformis *(Tp) extract on vaccinia virus*

Medium and extract of Tp	Virus + medium + extract		
	Contact time		
Time of culture of Tp	3 h	24 h	48 h
24 h	7.3×10^2	6.8×10^2	7.3×10^2
48 h	5.7×10^2	7.7×10^2	6.5×10^2
78 h	1.0×10^2	7.2×10^2	$5\ 5 \times 10^2$

DISCUSSION

The scope of the present work was limited to the visualization of vaccinia virus uptake by *Tetrahymena pyriformis* and the determination of the effect that the virus and the ciliate might have upon each other. The uptake of vaccinia virus by the ciliate has been found experimentally by means of electron microscopy and the posibility to remove the virus from frozen and thawed infected cells of *T. pyriformis*. This phenomenon is dependent on the number of protozoan cells in accordance with Curds and Cockburn (1) which showed that the rate of feeding on bacteria by *T. pyriformis* was dependent on the ciliate population density and the bacterial population density.

The presence of the virus in food vacuole suggests that the penetration occurs through oral area. These data recall to mind the failure of the flagellates *Euglena* and *Astasia* to remove influenza virus since those protozoa do not posses oral parts (4). The uptake of virus by the ciliate may be simpler because of the very active phagocytosis of this protozoan.

The fact that *Tetrahymena pyriformis* is able to capture vaccinia virus suggests that free living ciliates may play a role in the removal of certain viruses in wastewater, soils and streams. It is also conceivable the possibility of survival of intact virus or the viral genome in the protozoan cells.

These observations demonstrate the presence of vaccinia virus in food vacuoles of *Tetrahymena pyriformis*, but it remains the question of subsequent evolution of the intracellular virus. An extensive interpretation of this phenomenon is that uptake of mammalian viruses by protozoal populations may have ecological and epidemiological implications.

The presence of intracellular infective virus at least during a period of 10 d or 11 d suggest the possibility of viral persistence in the protozoa. The slight inactivation of virus in media without protozoa indicates specificic action of protozoa on viral decontamination.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr. Rubio Huertos for his valuable criticism.

SUMMARY

Uptake of vaccinia virus by *Tetrahymena pyriformis* has been found experimentally. It is related to the number of protozoa. Intracellular virus titer was progresively reduced during the four first days after which the remaining amount of virus was more stabilized for at least seven more days. Vaccinia virus particles were seen by electron microscopy in vacuoles around which were found mitochondria.

RESUMEN

Captura de virus vacunal por Tetrahymena pyriformis

Se ha establecido experimentalmente que *Tetrahymena pyriformis* captura el virus de la vacuna y que dicho fenómeno está relacionado con el número de protozoos. El título del virus intracelular se reduce progresivamente durante los cuatro primeros días, estabilizándose posteriormente durante al menos siete días más. Mediante microscopia electrónica se han observado partículas víricas en vacuolas alrededor de las cuales se suelen observar mitocondrias.

REFERENCES

1 CURDS, C. R., and COCKBURN, A. 1968. Studies on the growth and feeding of *Tetrahymena pyriformis* in axenic and monoaxenic culture. J. Gen. Microbiol., 54, 343-58.

2. ELLIOT, A. M., and CLEMMONS, G. L. 1966. An ultrastructural study of ingestion and digestion in *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 13, 311-23.

3. GIL-FERNÁNDEZ, G.; GARCÍA-GANCEDO, A., and VILAS-MINONDO, P. 1976. Plaque formation by African swine fever virus in chick embryo fibroblasts in the absence of CO_2 atmosphere. Arch. Virol., 52, 207-16.

4. GROUPE, V.; HERRMANN (JR.), E. C., and RAUSCHER, F. J. 1955. Ingestion and destruction of influenza virus by free living ciliate *Tetrahymena pyriformis*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 88, 479-82.
5 GROUPE, V., and PUGH, L. H. 1952. Inactivation of influenza virus and of viral hemagglutinin by the ciliate *Tetrahymena geleii*. Science, 115, 307-8.
6. KOVACS, E., and BUZC, B. 1967. Propagation of mammalian viruses in Protista. II. Isolation of complete virus from yeast and *Tetrahymena* experimentally infected with Picorna viral particles or their infectious RNA. Life Sci., 6, 347-58.
7. KOVACS, E.; BUZC, B., and KOLOMPAR, G. 1966. Propagation of mammalian viruses in Protista. I. Visualization of fluorocrome labelled EMC virus in yeast and *Tetrahymena*. Life Sci., 5, 2117-26.
8 LUFT, J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 409-14.
95, 285-97.
9. PALADE, O. E. 1952. A study of fixation for electron microscopy. J. Exp. Med.,
10. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208-12.
11. RYTER, A., et KELLEMBERGER, E. 1958. L'inclusion on polyester pour l'ultramicrotomie. J. Ultras. Res., 2, 200-14.

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

DOBLETES HOMOPOLARES EN *ONYCHODROMUS ACUMINATUS*

por

M. A. JAREÑO

INTRODUCCION

Las formas dobles en ciliados, los dobletes, están constituidas por dos individuos adosados de diferentes maneras y con diferentes grados de unión, lo que da lugar a la formación de dobletes de tres tipos: homopolares, heteropolares e irregulares.

Dobletes homopolares se han descrito en diversos géneros como *Uroleptus* (3), *Euplotes* (15), *Paramecium* (10, 17), *Stylonychia* (18-20), *Oxytricha* (7), *Urostyla* (1), etc.

La aparición de estas formas puede ser espontánea, sin que los diferentes autores que las nombran conozcan su origen; sin embargo, para los estudios de morfogénesis, en los que se utilizan frecuentemente, se provoca su aparición interrumpiendo la división o la conjugación por medio de diversos agentes físico-químicos. Así, Fauré-Fremiet (4) trata las células en división de *Leucophrys patula* con una solución de formol. Sonneborn (17) utiliza un antisuero para bloquear la conjugación en *Paramecium aurelia*, método también utilizado por Nanney y colaboradores (15) con *Tetrahymena pyriformis*; Totwen-Nowakowska (19) los obtiene por medio de choques térmicos y Altmann y Ruthmann (1) los inducen al tratar cultivos normales de *Urostyla grandis* con antibióticos, los cuales hacen desaparecer unas bacterias simbiontes que alberga esta especie y que parecen tener un cierto papel en el desarrollo normal de la división de este ciliado.

En *Onychodromus acuminatus* los dobletes proceden de quistes

formados mediante el enquistamiento conjunto de dos células. El propósito de este trabajo es examinar sus características morfológicas, división, retorno a la forma simple y anormalidades, así como discutir algunos de los problemas que plantea la existencia de estas formas dobles, que en muchos casos actúan como unidades morfogenéticas.

MATERIAL Y METODOS

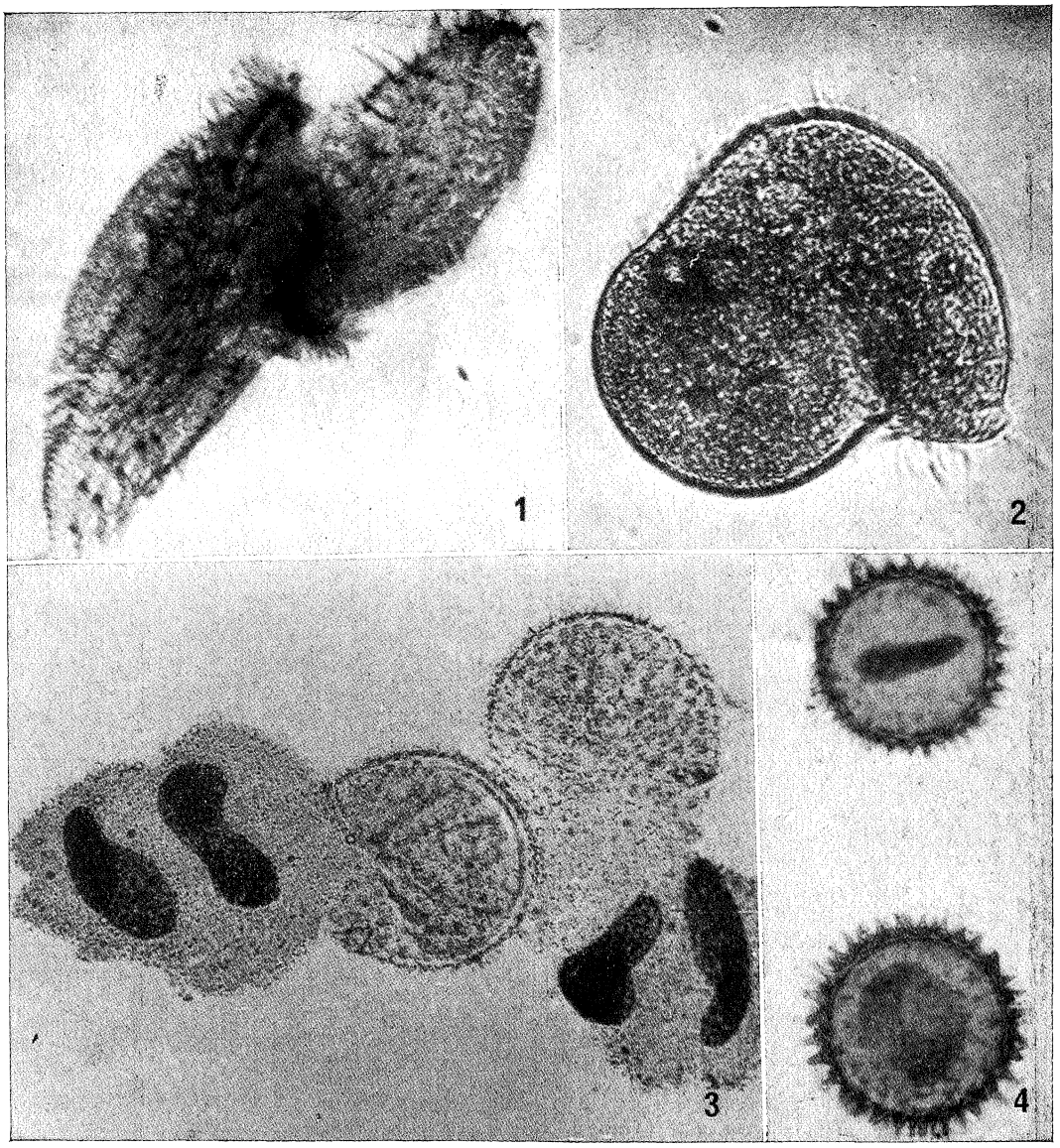
La especie de *Onychodromus acuminatus* utilizada se aisló de una muestra de agua tomada en el Coto Doñana (Huelva), en 1973. El método de cultivo y de inducción del desenquistamiento han sido descritos anteriormente (11).

La mayor parte de las micrografías se han tomado sobre preparaciones hechas según la técnica del protargol puesta a punto por Tuffrau (21), pero muy simplificada, especialmente en lo que se refiere al revelado, para lo que se utilizó un revelador lento (comunicación personal de Fryd-Versavel), cuya fórmula es: 14 g de ácido bórico, 20 g de sulfato sódico anhidro, 3 g de hidroquinona y 150 ml de acetona en 1 l de agua destilada. Después de pasadas por el tiosulfato y deshidratadas se montaron en bálsamo de Canadá. Otras preparaciones se han teñido con orceína acética para destacar más los núcleos.

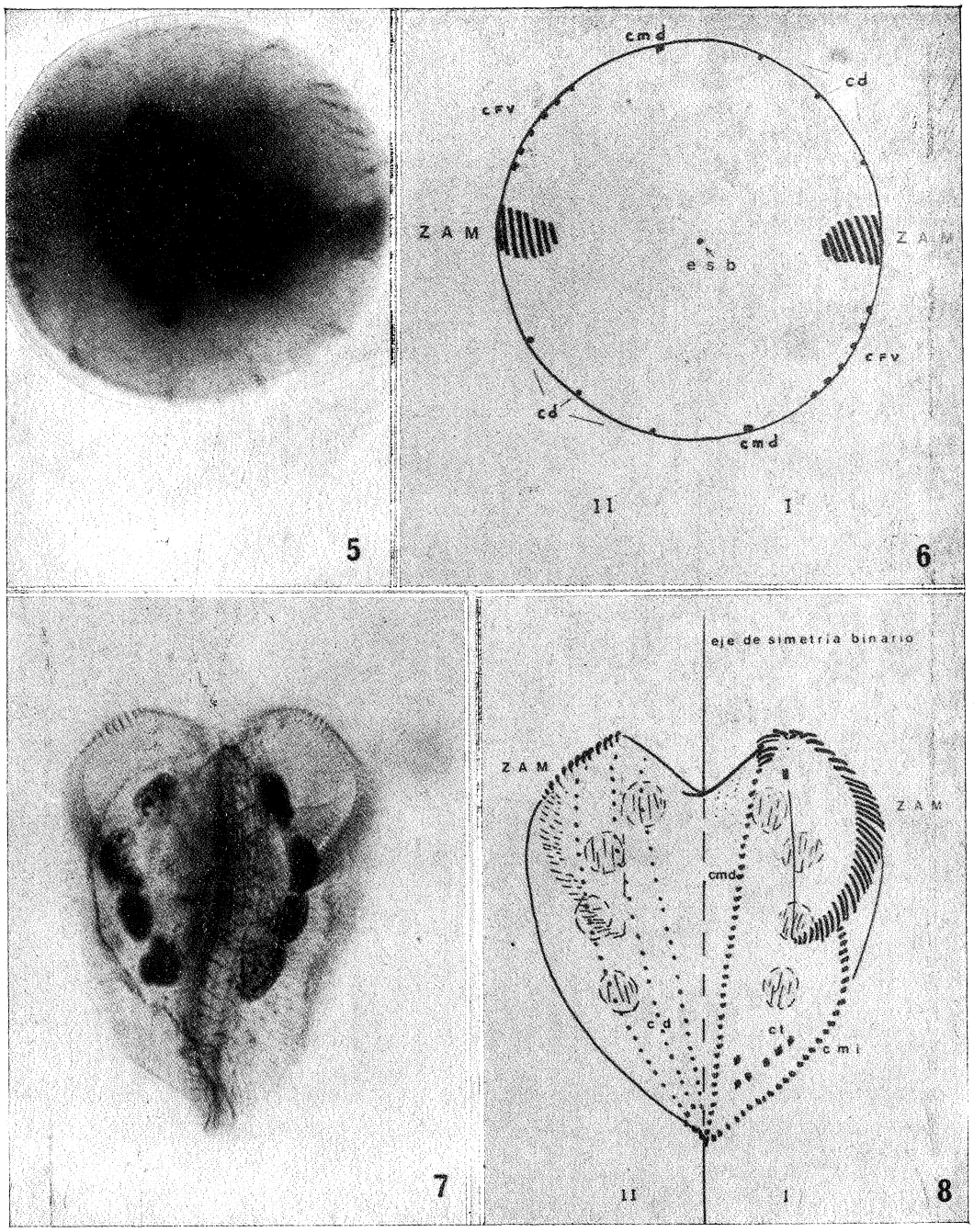
RESULTADOS

Aunque el enquistamiento conjunto en *Onychodromus acuminatus* ya ha sido descrito (11), conviene hacer aquí una descripción sucinta del proceso de la formación de los quistes dobles que darán origen a los dobletes.

Dos células que en principio parece que van a conjugarse se enquistan juntas, sin que se produzcan cambios en los micronúcleos ni desaparezcan los macronúcleos durante todo el proceso, por lo tanto no se trata de una conjugación sino de un enquistamiento conjunto. La zona de contacto es ventral y anterior, dejando en principio las zonas bucales libres. Después, la superficie de contacto aumenta hasta que la unión se hace completa, contribuyendo los dos individuos por igual a la formación del quiste *(figuras 1-2)*. Pierden por completo



Figuras 1-4. 1) Dos células de O. acuminatus *enquistándose. Protargol. 2) Quiste en formación. Se distinguen aún las dos células.* In vivo. *3) Quistes dobles. Se ha presionado la preparación para provocar la salida del citoplasma y los macronúcleos. Orceína acética. 4) Quistes de un solo individuo. Orceína acética*



Figuras 5-8. 5) Micrografía de un doblete dentro del quiste. Protargol. 6) Dibujo esquemático de la figura anterior. Zona adoral de membranelas (ZAM), cirros frontoventrales (CFV), cirros marginales derechos (cmd), cinetias dorsales (cd), eje de simetría binario (esb). 7) Micrografía de un doblete. Protargol. 8) Dibujo esquemático de la figura anterior. Cirros marginales izquierdos (cmi), cirros transversos (ct). Las demás siglas, como en la figura 6

los cilios y los cinetosomas, como se ha observado al microscopio electrónico (12-13), por lo que al desenquistarse tienen que formar de nuevo las dos ciliaturas del doblete. Los cuatro macronúcleos correspondientes de cada célula se unen en uno solo, por lo tanto el quiste doble posee dos grandes macronúcleos y un número variable de micronúcleos *(figura 3)*. Los quistes son esféricos y en un mismo cultivo son más grandes que los formados por un solo individuo. Estos poseen solamente un macronúcleo *(figura 4)*.

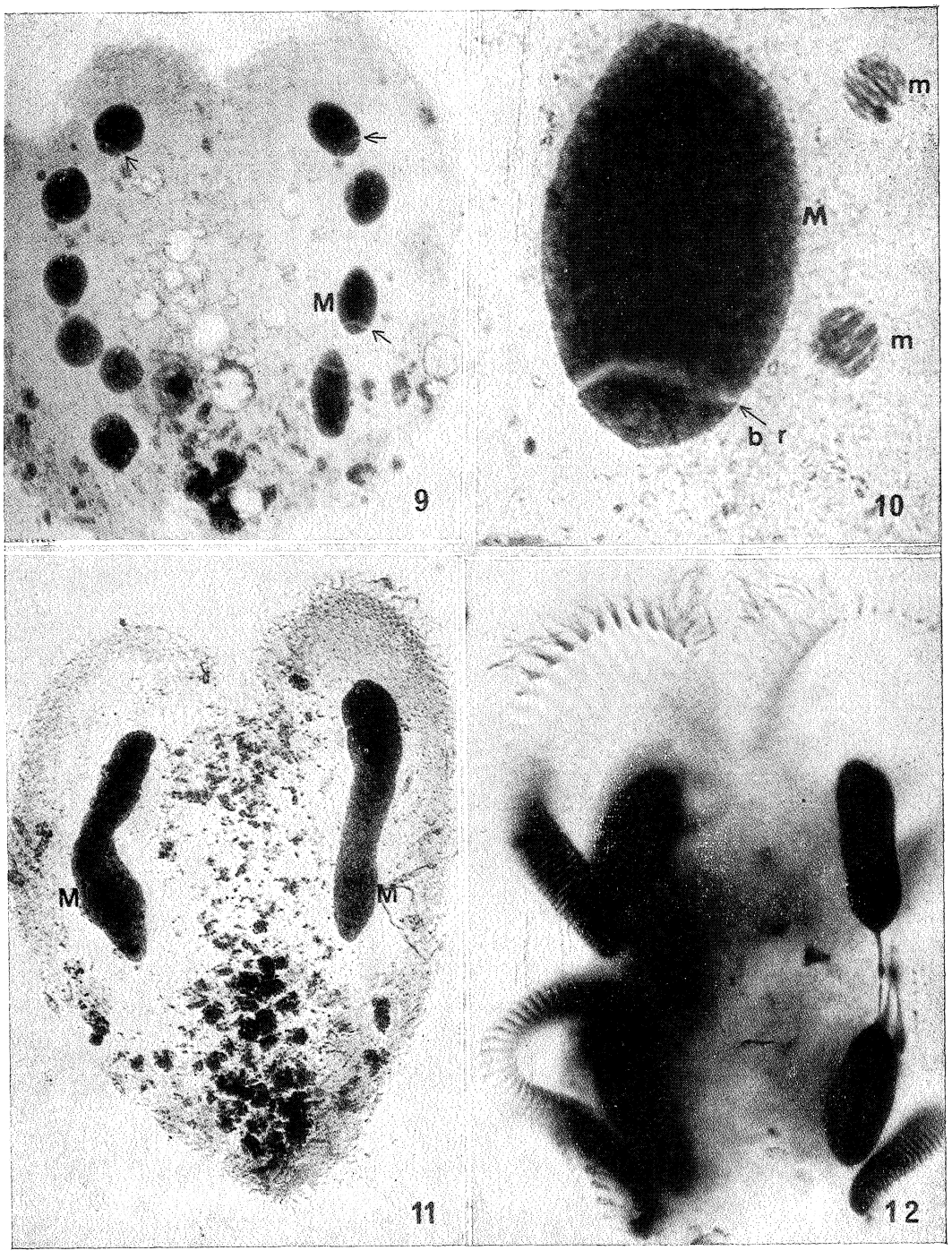
El desenquistamiento se provoca fácilmente añadiendo medio de cultivo limpio y alimento. El doblete se forma por medio de una morfogénesis doble dentro del quiste. Desde los primeros momentos pueden observarse en dos lados opuestos del quiste los dos esbozos de las ciliaturas. El proceso, en líneas generales, se realiza de la misma manera que en el quiste simple, aunque, como es lógico, con distinta distribución de los diferentes orgánulos en la esfera. En la *figura 5* podemos comprobar las posiciones relativas que ocupan los dos componentes dentro del quiste. Debido a que en las preparaciones de protargol se mantiene la forma esférica, la micrografía está tomada en un nivel medio donde se pueden ver, más o menos enfocados según la zona en que se encuentran, los distintos orgánulos, que se detallan y nombran en el dibujo esquemático *(figura 6)*. El doblete posee un eje de simetría binario (esb) que se mantiene después de la salida del quiste. Podemos distinguir en estas dos figuras la zona adoral de membranelas (ZAM), las filas de cirros frontoventrales (CFV), las tres cinetias dorsales (cd) y los cirros marginales derechos (cmd) de cada uno de los dos componentes (I y II). En el centro *(figura 5)* pueden verse los dos macronúcleos que se mantienen en este estado hasta que la morfogénesis cortical está prácticamente terminada.

En las *figuras* 7-8 podemos ver la micrografía y el dibujo esquemático, respectivamente, de un doblete poco después de salir del quiste. Además de los orgánulos reseñados anteriormente podemos ver aquí los cirros transversos (ct) y los cirros marginales izquierdos (cmi). La línea de unión de los dos individuos que forman el doblete va entre las tres cinetias dorsales (cd) del individuo marcado II, y los cirros marginales derechos (cmd) del marcado I, siendo viceversa en el otro lado del doblete.

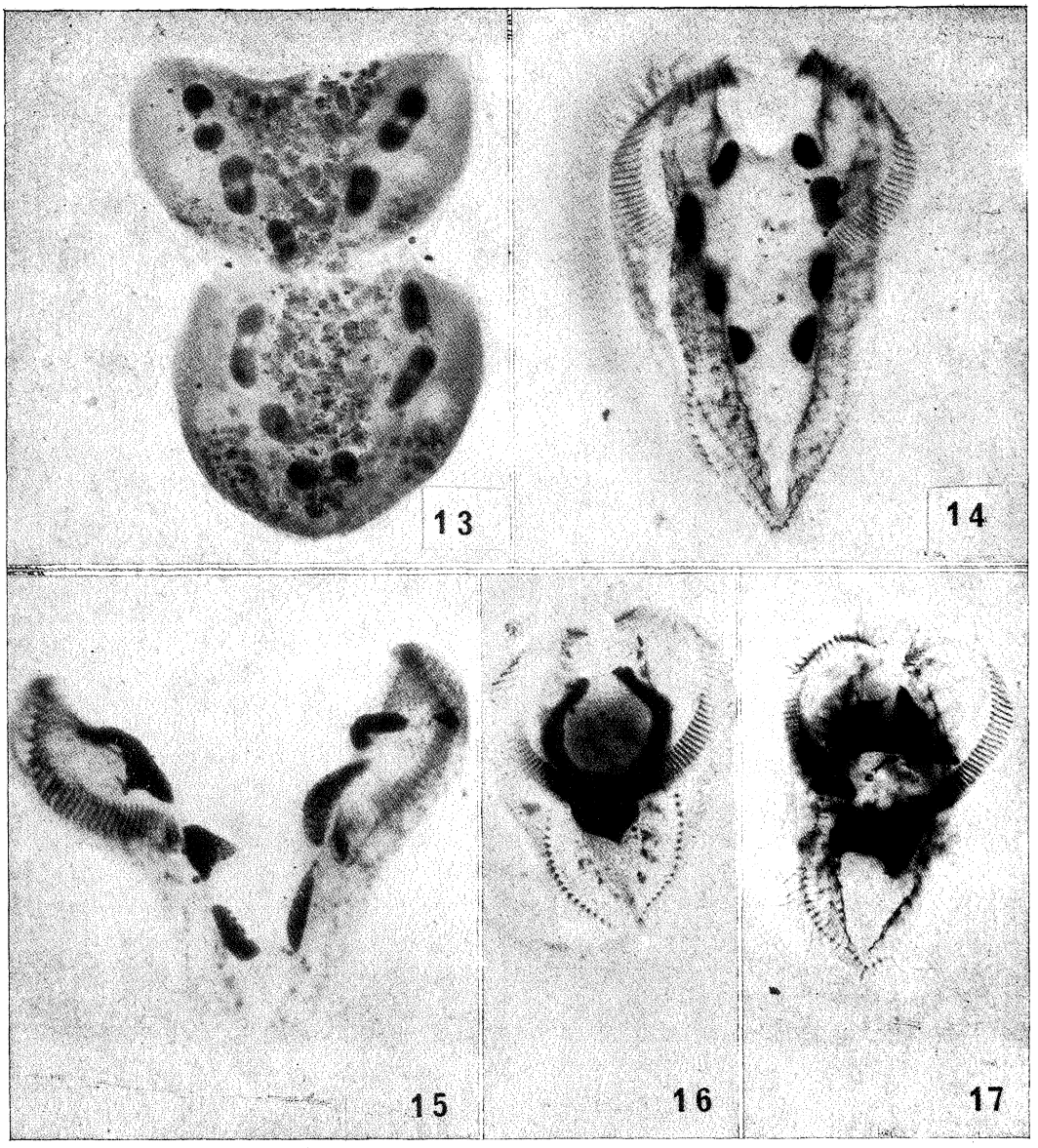
El doblete que sale del quiste está perfectamente formado, es generalmente muy simétrico y tiene los macronúcleos de cada componente separados. En los cortes observados al microscopio electrónico (resultados sin publicar) no se ha encontrado ninguna barrera entre las dos células y aunque las bocas están separadas y son funcionales, las vacuolas digestivas se mezclan en un citoplasma común. Por esta razón pueden eventualmente producirse fusiones de los macronúcleos, lo que desestabiliza la simetría del doblete.

Una vez ha crecido esta forma doble, empiezan a formarse a nivel del primer cirro transverso de cada componente los esbozos de las ZAM de las nuevas células. La morfogénesis de división es igual que la que presentan los individuos aislados. Al mismo tiempo que se van formando las nuevas ciliaturas, los cuatro macronúcleos de cada componente (excepcionalmente pueden tener cinco o más), por los que previamente han pasado las bandas de reorganización *(figuras 9-10)*, se unen en uno solo *(figura 11)*. Más tarde, este gran macronúcleo de cada lado se divide y reparte entre las células hijas. Como vemos en la *figura 13*, el resultado de esta división son dos nuevos dobletes. En otros casos, la parte superior puede dar lugar a dos individuos aislados, cuando el doblete originario tiene ya muy separados sus dos componentes. Los dobletes pueden seguir dividiéndose como dobletes siempre que se mantengan dentro de unos límites de simetría. Las porciones de los macronúcleos de cada individuo suelen mantenerse unidas por un fino tallo *(figura 12)*; esto facilita su unión antes de la división y en el proceso de enquistamiento.

Entre las anormalidades que podemos observar en los dobletes las que más destacan son: fusiones más o menos complejas entre los macronúcleos de los dos componentes y ZAM mal formadas *(figuras 16-19)*, y tienen como consecuencia directa la pérdida del carácter «doblete». Generalmente aparecen estos defectos en dobletes que se han dividido más de una vez, aunque también hemos comprobado malformaciones en el interior del quiste, y en todos estos casos la regresión a la forma simple se realiza por reabsorción de uno de los dos elementos del doblete. Cuando los dobletes son simétricos, la regresión a la forma simple se realiza por separación longitudinal de los individuos que los forman. En las *figuras 7* y *14-15* podemos ver tres dobletes en diferente grado de separación.



Figuras 9-12. 9) Doblete preparándose para empezar la división. Se pueden observar en los macronúcleos (M) las bandas de reorganización (las flechas señalan algunas de ellas). Orceína acética. 10) Ampliación de una parte de la figura anterior. Podemos distinguir, además de la banda de reorganización (br) en el macronúcleo (M), los micronúcleos (m) en metafase. 11) Doblete con dos macronúcleos resultantes de la unión de los cuatro, respectivamente (M). Orceína acética. 12) Doblete presentando la morfogénesis cortical terminada. Los macronúcleos divididos en dos muestran el fino trazo que, en general, les mantiene unidos. Protargol



Figuras 13-17. 13) Doblete con la morfogénesis de división terminada. No se han separado aún los dobletes hijos. Orceína acética. 14-15). Dobletes con diferente grado de separación de los individuos que los forman. Protargol. 16-17) Dobletes anormales. Protargol

Figuras 18-19. Dobletes anormales. Protargol

DISCUSION

Dos problemas se presentan, en principio, al estudiar estos dobletes. En primer lugar tenemos que preguntarnos de qué manera o por medio de qué elementos puede el quiste «recordar» si es un quiste doble, que dará lugar a un doblete, o sencillo, que dará lugar a un individuo aislado; y en segundo lugar, continuar la discusión sobre las posibles causas de la inestabilidad de estas formas dobles.

En cuanto al primer problema, consideramos que es difícil que el quiste pueda «recordar» si está formado por un solo individuo o por dos, por medio de elementos del cortex, puesto que en el enquistamiento de *Onychodromus acuminatus* y de algunas otras especies como *Oxytricha fallax*, desaparecen los orgánulos corticales (21 y 6, respectivamente). Podrían quedar marcas a nivel molecular, posibles «regiones determinativas», como las llama Grimes (7), que en el caso de un solo individuo sería una, y en el caso del enquistamiento conjunto o en el enquistamiento de los dobletes, serían dos. En *O. acuminatus* se presentaría el problema de que, como hemos visto en los resultados, las dos células que se enquistan con las zonas dorsales separadas, aparecen soldadas dorsalmente en forma de dobletes, por lo que habría tenido que producirse una emigración de las «regiones determinativas».

Por otra parte, como hemos indicado en los resultados, la fusión de los macronúcleos de los dos componentes del doblete tiene como consecuencia la desaparición de la forma doble y su transformación en forma simple, lo que hace suponer que el macronúcleo tiene un papel importante en el mantenimiento de la individualidad de las células en el doblete y en el quiste doble. Los macronúcleos de un individuo mantienen una cierta unidad (favorecida seguramente por el fino tallo que les suele unir) a través de todas las vicisitudes de la división y del enquistamiento, y solamente un contacto más o menos fortuito al encontrarse los macronúcleos de los dos componentes en un citoplasma común en el caso de los dobletes, puede provocar fusiones, produciéndose entonces las consiguientes irregularidades. Los macronúcleos de las dos células de un doblete se mantienen separados, tanto en *Stylonychia mytilus* (18) como en *Onychodromus acuminatus*. Cuando se produce fusión de los macro-

núcleos, la regresión a la forma simple, tanto en una especie como en otra, se realiza por reabsorción de uno de los dos componentes a través de un proceso de simplificación de los orgánulos corticales. Por estas razones nos inclinamos a creer que los elementos determinativos para que se formen una o dos ciliaturas dentro de los quistes son los macronúcleos. Con relación a esta consideración, son sugestivos los experimentos en *Oxytricha fallax* realizados por Grimes y Hammersmith (9) con células «gibosas», que son individuos aislados que conservan los cirros marginales del otro componente del doblete eliminado por rayos laser, quedando aquellos en posición dorsal a manera de giba. Cuando estas células se enquistan, se desenquistan más tarde como células normales, indicando que, como era de suponer, el macronúcleo contiene la información necesaria para inducir la formación de una ciliatura completa, pero no de los restos que posee el cortex anormal y que desaparecen junto a todos los orgánulos corticales al enquistarse las células de esta especie; los autores opinan que lo que queda en el cortex es la, por ahora hipotética, «región determinativa», pero este hecho se puede explicar simplemente por la existencia en las células gibosas de los macronúcleos de un solo individuo (del otro solamente quedaban los cirros marginales) y, por lo tanto, solamente había posibilidad de que se formase un solo individuo normal.

Consideramos que sería interesante inutilizar, por medio de los rayos laser, por ejemplo, los macronúcleos de uno de los dos individuos de *Onychodromus acuminatus* que se enquistan juntos, o uno de los dos macronúcleos del quiste doble, para comprobar que, efectivamente y a pesar de que el cortex permanece intacto, no se forma un doblete. Un experimento parecido ha sido llevado a cabo por Totwen-Nowakowska (20) en dobletes de *Stylonychia mytilus*, comprobando que la ablación de los macronúcleos de uno de los dos componentes produce la regresión a la forma simple, aunque las dos ciliaturas se mantienen en principio intactas.

Los experimentos de ablación en *Oxytricha fallax* (7) han demostrado, entre otros casos, que el corte transversal de un doblete da lugar a dos dobletes, mientras que si el corte es longitudinal se producen dos individuos independientes, interpretándose los resultados como pruebas de la existencia de la ya nombrada región determinativa, a la que se concede las propiedades de ser limitada en su exten-

sión y divisible. Esta región sería doble en los dobletes. Las características otorgadas a esta región coinciden en nuestro caso con las que se derivan de la permanencia de macronúcleos separados en los dobletes. Así, el corte transversal de un doblete cuando en cada parte existen macronúcleos o porciones de ellos procedentes de los dos individuos, es equivalente a la división normal de un doblete, que como hemos visto en los resultados da lugar a dos dobletes *(figura 13)*, mientras que un corte longitudinal supone la separación de los macronúcleos de cada componente del doblete, que da lugar a la formación de dos individuos aislados, como ocurre en la separación normal.

En cuanto al segundo problema, la mayoría de los autores coinciden en afirmar que la simetría está asociada a la estabilidad del doblete (4, 15), siendo la asimetría la principal fuerza que conduce a la simplificación del mismo. No hacen hincapié, sin embargo, los diversos autores en la importancia del estado de los macronúcleos en relación con la conservación y división de los dobletes como tales, pero cuando indican el estado de los macronúcleos se ve que se produce reabsorción de uno de los componentes del doblete cuando sus macronúcleos están unidos (4, 18-20). También es significativo el hecho de que en la mayor parte de los dobletes descritos, los macronúcleos de los dos individuos que los forman se mantienen separados al principio de la aparición de los dobletes (2, 15), mientras que en las siguientes divisiones se producen anormalidades de todo tipo, siendo una de las primeras la fusión de los macronúcleos.

En *Onychodromus acuminatus*, la coordinación funcional en el doblete simétrico es estrecha, como hemos visto en la división, comportándose como una unidad morfogenética compleja. Esto ha sido también comprobado en *Stylonychia mytilus*, donde la ablación de parte de uno de los componentes del doblete induce la reorganización del conjunto (20).

RESUMEN

Uno de los problemas más interesantes asociados con el enquistamiento conjunto es la formación de dobletes. El estudio de la morfogénesis del desenquistamiento de quistes dobles muestra la formación de dos primordios de ciliatura en zonas opuestas del quiste,

desde las primeras fases del desarrollo. El proceso comienza por la aparición, sobre un citoplasma desnudo, de dos grupos de cinetosomas, bajo los cuales se pueden distinguir unas fibras que parecen organizar la colocación de estos cinetosomas. Los dobletes de *Onychodromus acuminatus* están formados por dos individuos soldados dorsalmente por una línea situada entre la tercera cinetia dorsal y los cirros marginales derechos de cada componente. No existe ninguna barrera entre los dos individuos. Normalmente poseen 8 macronúcleos (4 de cada componente) y de 7-12 micronúcleos. Presentan dos ciliaturas completas y pueden dividirse y enquistarse sin perder el carácter de dobletes.

Estas formas dobles son bastante inestables y revierten a la forma simple por separación longitudinal y gradual, comenzando por la parte anterior. Esto no ocurre cuando los dobletes son asimétricos y presentan anomalías tales como la fusión de los macronúcleos de los dos componentes, en cuyo caso la reversión a la forma simple se lleva a cabo por reabsorción de uno de los dos individuos. El autor piensa que en esta especie la permanencia de la separación entre los macronúcleos de las dos células es condición fundamental para que se mantenga el carácter de doblete.

Ciliados dobles se conocen desde hace tiempo, pero la originalidad de éstos que presentamos en este trabajo reside en que proceden directamente de un enquistamiento conjunto mediante una morfogénesis doble. En este trabajo se describen las características morfológicas, división, regresión a la forma simple y anormalidades. También se discuten las implicaciones teóricas derivadas de la condición de organismo doble que en ciertos momentos actúa como unidad morfogenética.

SUMMARY

Homopolar doublets in Onychodromus acuminatus

One of the more interesting problems associated with the joint encystment is the generation of doublets. Excysting morphogenesis of the double cyst shows the formation, in opposite sites, of two ciliature primordia from the earliest stages of development. The process begins with the appearance in the naked cytoplasm of two

sets of kinetosomes. Under the we can see the positioning fibres.

The doublets of *Onychodromus acuminatus* consist of two individuals connected on the dorsal side. The union runs between the 3rd dorsal cinetia and the right marginal cirres of each individual. There is no internal barrier dividing the two parts of the doublet. Normally, they have 8 macronuclei (4 from each part) and 7-12 micronuclei. They also have two complete ciliatures. The doublets can divide and encyst as doublets. The douplex form is semistable; it maintains its character during a variable number of cell generations and finally resolves into single units. In symmetrical doblets the return to the single forms occurs by gradual separation wich begins at the anterior part of the body and continues until complete separation. However, if the doublets have some abnormality (generally a fusion between the macronuclei of the two components), the regression to the single form is reached by resorption of one of the two components. I think that, in this species at least, the permanence of the separation between the macronuclei of the two individuals is responsible for the persistence of the «doublet» character within the cyst and is one of the most important factors, together with the cortical symmetry, in the division.

Doublet animals have long been known in ciliates, but the originality of these is that they arise directly from a joint encystment by means of a double morphogenetic process. They are a useful model for morphogenesis and cell autonomy studies.

In this paper we described their morphological characteristics, division, regression to the single form and abnormalities. Also we discuss the theoretical implications proceeding from their double organism condition, which in some ways acts as a morphogenetic entity.

BIBLIOGRAFIA

1. ALTAMANN, G., and RUTHMANN, A. 1979. Doublet formation and cytoplasmic symbionts in the ciliate *Urostyla grandis*. Differentiation, 15, 107-17.
2 BERGER, J. D., and MORTON, G. T. 1980. Studies on the macronuclei of doublet *Paramecium tetraurelia*: Distribution of macronuclei and DNA at fission. J. Protozool., 27, 443-50.

3. CALKINS, G. N. 1925. *Uroleptus mobilis*. V. The history of double organism. J. Exp. Zool., 41, 191-213.
4. FAURE-FREMIET, E. 1945. Symétrie et polarité chez les ciliés di- ou multicomposites. Bull. Biol. Fr. Belg., 79, 106-51.
5 FAURE-FREMIET, E. 1948. Doublets homopolaires et regulation morphogénétique chez le cilié *Leucophrys patula*. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp., 37, 183-203.
6. GRIMES, G. W. 1973a. Morphological discontinuity of kinetosomas during the life cycle of *Oxytricha fallax*. J. Protozool., 20, 92-104.
7. GRIMES, G. W. 1973b. An analysis of determinative difference between singlets and doublets of *Oxytricha fallax*. Genet. Res., 21, 57-66.
8. GRIMES, G. W. 1976. Laser microbeam induction of incomplete doublets of *Oxytricha fallax*. Genet. Res., 27, 213-26.
9 GRIMES, G. W., and HAMMERSMITH, R. L. 1980. The analysis of the effects of encystment and excystment on incomplete doublets of *Oxytricha fallax*. J. Exp. Morphol., 59, 19-26.
10. HANSON, E. D. 1926. Morphogenesis and regeneration of oral structures in *Paramecium aurelia*: An analysis of intracelular development. J. Exp. Zool., 150, 45-65.
11. JAREÑO, M. A. 1977. Enkystement conjoint chez un cilié hypotriche. Protistologica, 13, 187-94.
12. JAREÑO, M. A. 1979. Quelques données ultrastructurales sur l'enkystement d'*Onychodromus acuminatus*. J. Protozool., 26, 63A.
13. JAREÑO, M. A. 1980. Observations sur l'ultrastructure du dékystement che *Onychodromus acuminatus*. J. Protozool., 27, 83 A.
14. JAREÑO, M. A., et TUFFRAU, M. 1979. Le positionnement des primordium cinétosomiens et la morphogenèse sous kyste chez le cilié hypotriche *Onychodromus acuminatus*. Protistologica 15, 597-605.
15. KIMBALL, R. T. 1941. Double animals and amicronucleate animals with particular reference to their conjugation. J. Exp. Zool., 41, 191-213.
16. NANNEY, D. L.; CHOW, M., and WOZENCRAFT, B. 1975. Considerations of the symmetry in the cortical integration of *Tetrahymena* doublets. J. Exp. Zool., 193, 1-14.
17. SONNEBORN, T. M. 1950. Methods in general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. J. Exp. Zool., 113, 87-148.
18. TOTWEN-NOWAKOWSKA, I. 1964. Doublets in a clone of *Stylonychia mytilus* Acta Protozool., 2, 137-46.
19. TOTWEN-NOWAKOWSKA, I. 1965. Doublets of *Stylonychia mytilus* evoked by action of thermic shocks. Acta Protozool., 3, 356-61.
20. TOTWEN-NOWAKOWSKA, I. 1973. Conditions of stability of the double system in post-traumatic regeneration of doublets of *Stylonychia mytilus*. Acta Protozool., 12, 53-70.
21 TUFFRAU, M. 1976. Perfectionnement et pratique de la technique d'impregnation au protargol des infusoires ciliés. Protistologica, 3, 91-98.

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC)

EVOLUCION DE LA MICROFLORA DE LEVADURAS DE LOS MOSTOS DE UVA DE JUMILLA

por

D. BASCONES, N. KHAYYAT y V. ARROYO

INTRODUCCION

Este trabajo amplía los estudios realizados en este Instituto sobre los agentes de fermentación de los mostos de uva de las distintas zonas vitivinícolas de España iniciados por Castelli e Iñigo (3) y continuados por Iñigo y Arroyo (5-6), Somavilla y colaboradores (9-10), y ampliando estos estudios mediante análisis químicos, junto a los microbiológicos realizados habitualmente por Khayyat y colaboradores (7).

La zona vitivinícola de Jumilla posee suelos pardo-calizos sobre material consolidado, o suelos pardos o pardo-rojizos calizos con horizonte de costra caliza. Estos suelos presentan buenas condiciones para el cultivo de la vid.

El máximo porcentaje de portainjertos utilizados es Pie Franco, con el 89 %. Hay que tener en cuenta también que la uva de vinificación Monastrell ocupa el 88,7 % de la superficie cultivada (4).

Es conocido el hecho de que a lo largo de la fermentación la flora microbiana varía paralelamente a los cambios sufridos por el medio en el cual se desarrollan. Entre las transformaciones fundamentales citamos: agotamiento progresivo de los azúcares, oxígeno, vitaminas y factores de crecimiento; aumento simultáneo de la concentración de alcohol, incremento de la acidez del medio y posible excreción de sustancias inhibitorias.

MATERIALES Y METODOS

Se ha realizado el análisis microbiológico de 28 muestras de mosto procedentes de la zona que integra la Denominación de Origen Jumilla.

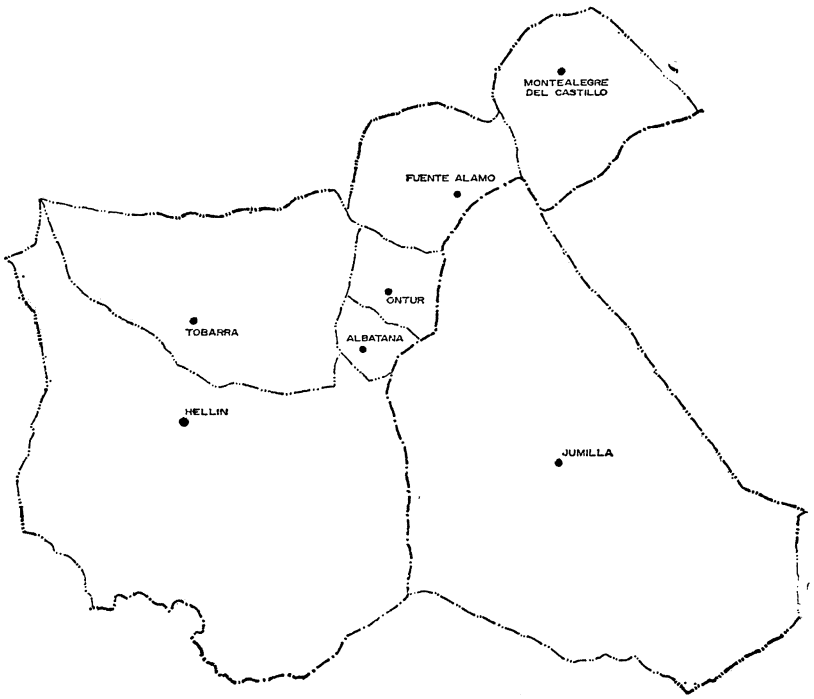


Figura 1. Zona que comprende la Denominación de Origen Jumilla, donde aparecen las localidades que la integran

Tres han sido los aislamientos realizados, coincidiendo con las distintas fases del proceso de fermentación. El primero se llevó a cabo a las 24 h de la toma de muestras, el segundo a los 10 d y el tercero transcurridos 20 d desde el momento del muestreo.

El mosto se recogió en botellas estériles.

Los medios empleados para el aislamiento son los siguientes: mosto estéril de 8° Baumé y agar-mosto.

De cada una de las muestras se aislaron 5 cultivos puros por fase fermentativa.

Para la identificación se utilizó la técnica de la Escuela Holandesa de Kluyver. El procedimiento sistemático se acomoda al propuesto por Lodder (8). En casos especiales se utilizó el sistema de clasificación de Barnett y Pankurst (1) y el de Barnett y colaboradores (2).

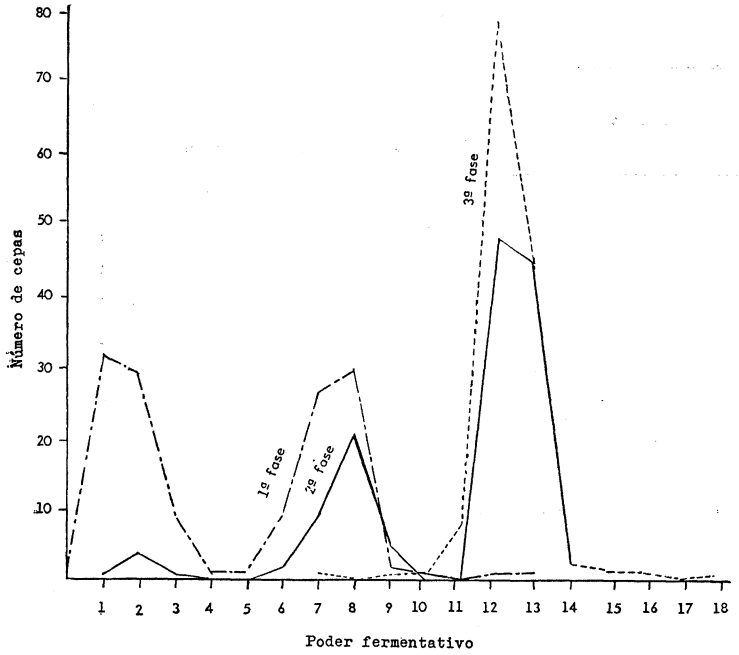


Figura 2. Cepas aisladas en cada fase, respecto a los valores de poder fermentativo alcanzados

RESULTADOS

Se expresan en los *cuadros 1-7* los resultados de la identificación de las cepas aisladas en cada una de las fases fermentativas de las muestras recibidas de cada una de las localidades pertenecientes a la Denominación de Origen Jumilla: Albatana, Fuente-Alamo, Ontur,

Hellín, Tobarra, Montealegre y Jumilla *(figura 1)*. También se expresa el porcentaje de especies aisladas en cada localidad.

En la *figura 2* se representa el número de cepas aisladas en cada fase, respecto a los valores de poder fermentativo alcanzados por ellas.

Cuadro 1. Especies aisladas en las tres fases fermentativas. Mosto procedente de la localidad de Albatana

Especie	Fase			Total	Porcentaje
	Primera	Segunda	Tercera		
Saccharomyces cerevisiae		10	6	16	53,3
S. italicus	1		2	3	10,0
Bretanomyces custersi	3			3	10,0
S. kluyveri	2			2	6,6
S. chevalieri			2	2	6,6
Hanseniaspora occidentalis	2			2	6,6
Dekkera intermedia	1			1	3,3
B. intermedius	1			1	3,3
	10	10	10	30	

Cuadro 2. Especies aisladas en las tres fases fermentativas. Mosto procedente de la localidad de Fuente-Alamo

Especie	Fase			Total	Porcentaje
	Primera	Segunda	Tercera		
Saccharomyces italicus		5	7	12	40,0
Kloeckera apiculata	7			7	23,3
S. cerevisiae		3	3	6	20,0
Saccharomycodes ludwigi	3			3	10,0
Saccharomyces uvarum				2	6,6
	10	10	10	10	

Cuadro 3. Especies aisladas en las tres fases fermentativas. Mosto procedente de la localidad de Ontur

Especie	Fase			Total	Porcentaje
	Primera	Segunda	Tercera		
Saccharomyces cerevisiae		9	5	14	46,6
S. italicus			4	4	13,3
Saccharomycodes ludwigi	4			4	13,3
Hanseniaspora occidentalis	2			2	6,6
Kloeckera apiculata	2			2	6,6
Saccharomyces pretoriensis		1		1	3,3
S. chevalieri			1	1	3,3
K. javanica javanica	1			1	3,3
Bretanomyces clausseni	1			1	3,3
	10	10	10	10	

Cuadro 4. Especies aisladas en las tres fases fermentativas. Mosto procedente de la localidad de Hellín

Especie	Fase			Total	Porcentaje
	Primera	Segunda	Tercera		
Saccharomyces italicus		3	5	8	26,6
S. rouxii		5	1	6	20,0
Kluyveromyces veronae	5			5	16,6
S. exiguus		1	2	3	10,0
S. cerevisiae		1	1	2	6,6
Kloeckera apiculata	2			2	6,6
Klo. javanica javanica	1			1	3,3
Klo. javanica lafarii	1			1	3,3
Torulopsis candida	1			1	3,3
S. aceti			1	1	3,3
	10	10	10	10	

Cuadro 5. Especies aisladas en las tres fases fermentativas. Mosto procedente de la localidad de Tobarra

Especie	Fase			Total	Porcentaje
	Primera	Segunda	Tercera		
Saccharomyces italicus		1	10	11	36,6
Saccharomycopsis guttulata	5			5	16,6
Kluyveromyces veronae	5			5	16,6
Saccharomycodes ludwigii		5		5	16,6
Saccharomyces rouxii		2		2	6,6
S. cerevisiae		1		1	3,3
S. pretoriensis		1		1	3,3
	10	10	10	30	

Cuadro 6. Especies aisladas en las tres fases fermentativas. Mosto procedente de la localidad de Montealegre

Especie	Fase			Total	Porcentaje
	Primera	Segunda	Tercera		
Saccharomyces cerevisiae	2	10	7	19	31,6
S. italicus		2	13	15	25,0
Kloeckera apiculata	5	1		6	10,0
Hanseniaspora occidentalis	5			5	8,3
S. rouxii	1	3		4	6,6
Saccharomycodes ludwigii	2	1		3	5,0
Saccharomyces chevalieri		1		1	1,6
Klo. javanica javanica	1			1	1,6
Pichia strasburgensis	1			1	1,6
Torulopsis colliculosa	1			1	1,6
S. pretoriensis		1		1	1,6
Criptococcus hungaricus	1			1	1,6
Kluyveromyces veronae	1			1	1,6
S. montanus		1		1	1,6
	20	20	20	60	

Cuadro 7. Especies aisladas en las tres fases fermentativas. Mosto procedente de la localidad de Jumilla

Especie	Fase			Total	Porcentaje
	Primera	Segunda	Tercera		
Saccharomyces cerevisiae	6	25	32	63	30,0
S. italicus	3	9	26	38	18,0
Kluyveromyces veronae	23	3		26	12.3
Kloeckera apiculata	10	1		11	5,2
S. rouxii	1	7	2	10	4,7
Saccharomycodes ludwigii	6	4		10	4,7
Saccharomyces chevalierii		4	5	9	4,2
S. pretoriensis		3	4	[illegible]	3,3
Torulopsis candida	6			6	2.8
Kloeckera javanica javanica	5	1		6	2.8
Klo. javanica lafarii	4			4	1,9
Saccharomyces bayanus		3	1	4	1,9
Endomycopsis vini	1	2		3	1,4
Pichia etchellsi		3		3	1,4
Saccharomyces montanus	1	2		3	1,4
Hanseniaspora occidentalis	1	1		2	0,9
H. valbyensis	1			1	0,4
Criptococcus hungaricus	1			1	0,4
Saccharomyces inconspicuus	1			1	0,4
S. exiguus		1		1	0,4
S. capensis		1		1	0,4
	70	70	70	210	

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se han identificado 31 especies diferentes tras el análisis de las 420 cepas aisladas.

En la primera fase fermentativa encontramos 23 especies distintas, 17 en la segunda y 8 en la última.

Las especies aisladas predominantes son: *Saccharomyces cerevisiae* y *S. italicus*, representando, respectivamente, el 28,8 % y el 21,6 % del total de cepas aisladas; *Kluyveromyces veronae*, que se aisla en la primera y segunda fase, representa el 8,8 % del total; *Kloeckera apiculata*, que ocupa el cuarto lugar en relación con el predominio, representando el 6,6 %, se aisla en la primera y segunda fase y posee un bajo poder fermentativo.

El poder fermentativo de las cepas aisladas en la primera fase está comprendido entre los valores 0° y 8°.

En la segunda fase, la mayor parte de la población registra, en poder fermentativo, unos valores de 12° a 13°.

En la tercera fase, prácticamente la totalidad de las cepas aisladas presentan valores entre 12° y 13° alcohólicos, siendo escaso el número de cepas que los superan. La cepa de más alto poder fermentativo, identificada como *Saccharomyces cerevisiae*, alcanza 17° alcohólicos.

Comprobamos la amplia variedad de especies aisladas como corresponde a mostos no tratados. La variedad disminuye conforme avanza el proceso fermentativo; así, en la tercera fase se aislan, únicamente, especies del género *Saccharomyces*.

El poder fermentativo de las cepas aisladas va en aumento a lo largo de la fermentación.

RESUMEN

Como continuación de los estudios desarrollados en este Instituto sobre las características y distribución ecológica de los agentes de fermentación de los mostos de uva españoles, se lleva a cabo en este trabajo el aislamiento y caracterización de las levaduras presentes en los mostos de uva de Jumilla, analizando muestras pertenecientes a siete localidades de la Denominación de Origen de Jumilla.

En la primera fase de la fermentación encontramos 23 especies distintas, 17 en la segunda fase y 8 en la tercera.

Saccharomyces cerevisiae y *S. italicus* son las especies principales en el curso de la fermentación.

SUMMARY

Evolution of yeast microflora in grape musts from Jumilla (Spain)

As a continuation of some studies developed previously in this Institute about the characteristics and ecological distribution of wine yeasts of Spanish grape must, the isolation and characterization of wine yeasts from 7 localities of Jumilla was carried out. 23 species of yeast have been identified in the first stage of fermentation, 17 in the second and 8 in the third. *Saccharomyces cerevisiae* and *S. italicus* are principal species in the fermentation course.

BIBLIOGRAFIA

1. BARNETT, J. A., and PANKHURST, R. J. 1974. Key to the Yeasts. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
2. BARNETT, J. A.; PAYNE, E. W., and YARROW, D. 1979. A Guide to Ydentifying and Classifying Yeasts. Cambridge University Press.
3. CASTELLI, T., e IÑIGO, B. 1958. Los agentes de la fermentación vínica de La Rioja. Ann. Fac. Agr. Univ. Studi Perugia, **13**, 1-14.
4. Catastro Vitícola y Vinícola. 1978. Denominación de Origen Jumilla. Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Denominaciones de Origen.
5. IÑIGO, B., y ARROYO, V. 1960. Los agentes de fermentación vínica en la zona de Moriles-Montilla. Rev. Cienc. Apl., **72**, 18-29.
6. IÑIGO, B., y ARROYO, V. 1969. Agentes de fermentación de mostos de uva del Panadés. Agricultura, **451**, 638-40.
7. KHAYYAT, N.; SOMAVILLA, J. F.; ARROYO, V., y MARECA, J. 1981. Estudio microbiológico y análisis químico de los mostos de uva y vinos de Campo de Borja, Agricultura, **583**, 75-77.
8. LODDER, J. 1970. The Yeasts. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
9. SOMAVILLA, J. F.; ARROYO, V., e IÑIGO, B. 1975. Los agentes de fermentación vínica de la zona de Valladolid. An. Bromatol., XXVII, 277-80.
10. SOMAVILLA, J. F.; TIENDA, P.; ARROYO, V., e IÑIGO, B. 1971 Agentes de fermentación de los mostos de uva de la Región Levantina. Agricultura, **476**, 771-74.

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

EL LIPOPOLISACARIDO DEL *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* COMO RECEPTOR DE UN BACTERIOFAGO NO DESCRITO

por

M. SANTAOLALLA y L. CAÑAS

INTRODUCCION

La susceptibilidad de un microorganismo a la infección de un bacteriófago depende, en primer lugar, de que éste pueda unirse a un sitio receptor del huésped para la posterior penetración del ácido nucleico viral y replicación.

Es bien conocido el hecho de que los bacteriófagos tienen como receptores los polímeros de la pared bacteriana; en los microorganismos gram-negativos, el receptor más estudiado ha sido el lipopolisacárido (LPS); no obstante, también se han encontrado lugares aceptores en la proteína de la membrana externa y en las lipoproteínas. En los microorganismos gram-positivos se fijan sobre los ácidos teicóicos, polisacáridos y proteínas de la pared microbiana.

Durante el estudio del lipopolisacárido de la pared celular del *Pseudomonas savastanoi*, aislamos un bacteriófago, cuyo receptor resultó ser el LPS estudiado por nosotros. A continuación señalamos algunas de las principales características tanto del receptor como del bacteriófago.

MATERIALES Y METODOS

Empleamos el *Pseudomonas savastanoi* aislado de tumores de ramas jóvenes de olivos situados en El Molar (Madrid), y cultivado en caldo común, con agitación, a la temperatura de 28 °C, duran

te 24 h. Separamos por centrifugación los microorganismos y los lavamos tres veces consecutivas con agua destilada estéril; caracterizamos el *P. savastanoi* por los métodos taxonómicos habituales.

Extraemos el LPS por el método de Westphal y Jann (18) y lo purificamos por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa (14).

La ausencia de ácidos nucleicos la comprobamos midiendo la absorción a 260 nm con el espectrofotómetro Unicam S. P. 500.

Observamos el LPS en suspensión acuosa mediante tinciones positivas y negativas, de la misma forma indicada en trabajos anteriores (14-15). Las microfotografías electrónicas fueron realizadas con el microscopio Siemens Elmiskop I.

Aislamos el virus de un cultivo de *Pseudomonas savastanoi* que presentaba lisis, siguiendo el método clásico de Adams (1), y lo purificamos por sucesivas ultracentrifugaciones alternativas a pequeña y gran velocidad.

Para la fijación del bacteriófago al LPS extraído por nosotros, empleamos el medio M 9 sin glucosa de Adams (1), siguiendo las técnicas empleadas por Lindberg (11-12), que a continuación indicamos.

Suspendemos el LPS purificado y liofilizado en el medio M 9 sin glucosa, a una concentración de 1 mg/ml y lo sometemos a sonicación muy breve, durante 30 s, solamente para dispersarlo; 1 ml de esta suspensión se mezcla con 1 ml de una suspensión del bacteriófago purificado, a concentraciones aproximadas de 2×10^3 unidades formadoras de placa, y las incubamos en baño de agua a 37 °C sin agitación, durante 60 min.

Identificamos el bacteriófago siguiendo la clasificación expuesta por Bradley (4).

Identificamos el ácido desoxirribonucleico del bacteriófago con el reactivo de Dische (6), de la misma forma que en trabajos anteriores (17).

RESULTADOS

El LPS del *Pseudomonas savastanoi* extraído por el método de Westphal y Jann (18), es un lipopolisacárido desprovisto de heptosas. Su estructura submicroscópica es la típica de estas macromoléculas.

Bajo la forma de tinción positiva se observa una cinta trilaminar, las dos capas externas más densas al paso de los electrones, y la interior, de mayor espesor, menos densa *(figura 1 A)*. Observado en tinción negativa aparece en forma de cuerpos ovales, cuerdas, esferoides en los cuales la estructura trilaminar apenas es manifiesta *(figura 1 B)*.

El bacteriófago aislado y purificado, como indicamos en la parte correspondiente a materiales y métodos, resultó pertenecer al grupo A, según la clasificación de Bradley.

El bacteriófago, cuando se observa al microscopio en forma de tinción negativa, teñido con acetato de uranilo al 2 %, aparece formado por una cabeza icosaédrica de un diámetro medio de unos 45 nm; su cola es contráctil. La cola, cuando no está contraída, presenta una longitud media aproximada de unos 60 nm y una anchura de 14 nm; contraída, sus medidas son de 30 nm de larga por 18 nm de ancha. Esta cola está unida a la cabeza mediante un cuello de unos 5 nm de longitud; en el otro extremo, la cola sin contraer presenta una placa basal con 6 espículas y contraída parece observarse una estructura en forma punzante, de unos 20 nm *(figuras 2-3)*.

El ácido nucleico del virus, investigado por el método de Dische (6), resultó ser el ácido desoxirribonucleico.

Suspendido el lipopolisacárido purificado y liofilizado en el medio M 9 de Adams (1), sin glucosa, a una concentración de 1 mg/ml y sometido a sonicación, lo mezclamos con distintas concentraciones del bacteriófago purificado, según indicamos en la parte correspondiente a materiales y métodos. De este modo, creemos demostrar la fijación del bacteriófago al lipopolisacárido de la pared del *Pseudomonas savastanoi*, como se aprecia en las *figuras 2-3*.

DISCUSION

Son muchos los bacteriófagos que se fijan a la macromolécula que constituye el LPS de los microorganismos gram-negativos. Existen numerosos trabajos que demuestran que los LPS de distintas especies de los géneros *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella* son receptores de distintos bacteriófagos.

Concretándonos a los LPS de distintas especies del género *Pseudomonas*, Bradley (3), ya en 1966, observó que existían muchos tipos de bacteriófagos, cuya célula huésped era el *P. aeruginosa*; los había con cola contráctil, con cola no contráctil, con ácido desoxirribonucleico, o con ácido ribonucleico, con cabeza de distintas formas, etc. En años posteriores, Jarrell y Kropinski (8) demostraron que el LPS del *P. aeruginosa* estirpe PAO, fijaba el bacteriófago E 79; también trabajos de Kropinski y colaboradores (10) demostraron, por ensayos de neutralización, que los bacteriófagos 16,44, F8 y PB1 eran específicos del LPS del mismo microorganismo.

En 1981, Jarrel y Kropinski (9) estudiaron un LPS procedente de un mutante rugoso de *Pseudomonas aeruginosa* PAO que resultó desprovisto de cadenas laterales antigénicas y de fucosamina, glucosa y ramnosa en «el core» y que era capaz de fijar al fago Ø PLS 27. Los mismos autores (7), en 1976, aislaron del *P. aeruginosa* estirpe I-IA el bacteriófago Ø PLS-I, el cual lograron inactivar con el LPS extraído del microorganismo por el mismo método empleado por nosotros, lo que demostraba sin lugar a dudas que el lugar de fijación era el LPS. Este bacteriófago, lo mismo que el encontrado por nosotros, pertenece, según la clasificación de Bradley, al tipo A, el más complejo, y la distinción principal respecto al aislado por nosotros es su mayor tamaño; los autores indican que posee una cabeza de 70 nm de diámetro, y una cola no contraída de 120 nm de longitud por 11 de anchura. Castillo (5), en 1980, señala y parece demostrar que determinados mono y disacáridos del LPS de *P. aeruginosa* estirpe BI son los receptores del bacteriófago *Pseudomonas* 2.

Los bacteriófagos de *Pseudomonas* patógenos de plantas, que tienen como aceptor LPS, han sido mucho menos estudiados.

Quirk y colaboradores (13), en 1976, estudiaron especies virulentas de *Pseudomonas morsprunorum* que producen chancro del cerezo y demostraron que el LPS extraído y purificado de dichas estirpes tiene un alto poder de inactivación específica del fago A 7, mientras que los LPS de mutantes de *P. morsprunorum* avirulentos no eran capaces de inactivar dicho fago, quedando claramente establecida una correlación entre la capacidad específica del germen virulento de fijar el fago y no sus mutantes.

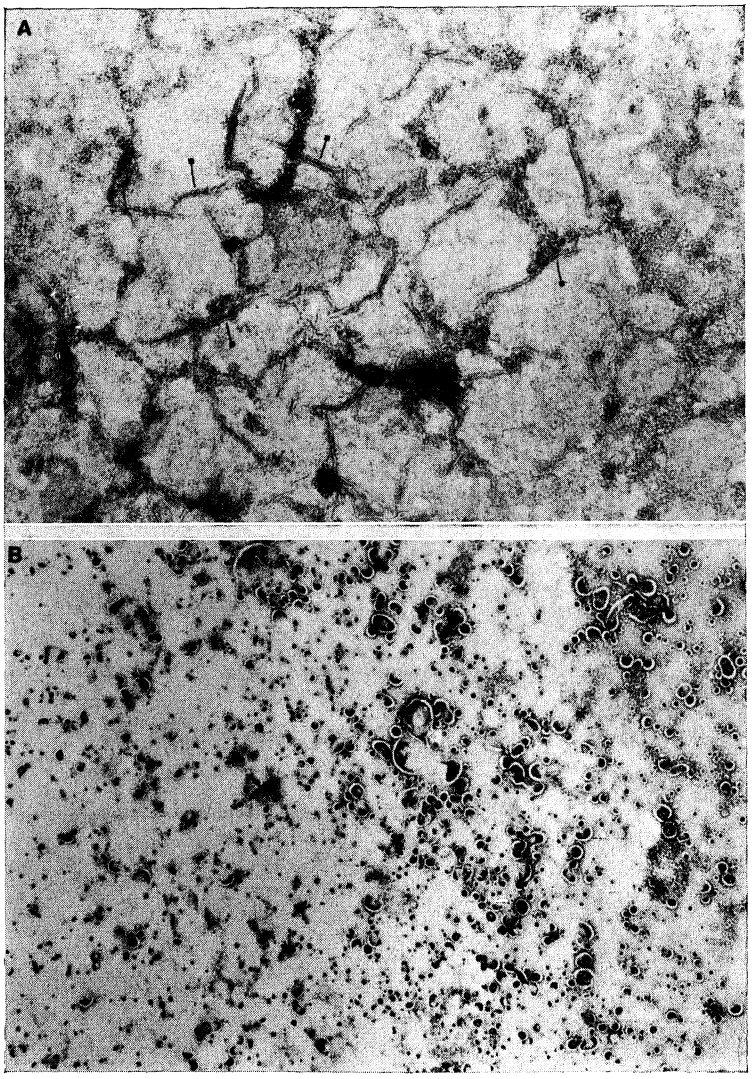


Figura 1. A) Tinción positiva del LPS de P. savastanoi. *Se observa su estructura trilaminar (flechas). × 51.600. B) Tinción negativa del LPS. Formas esferoidales y ovoidales. × 13.500*

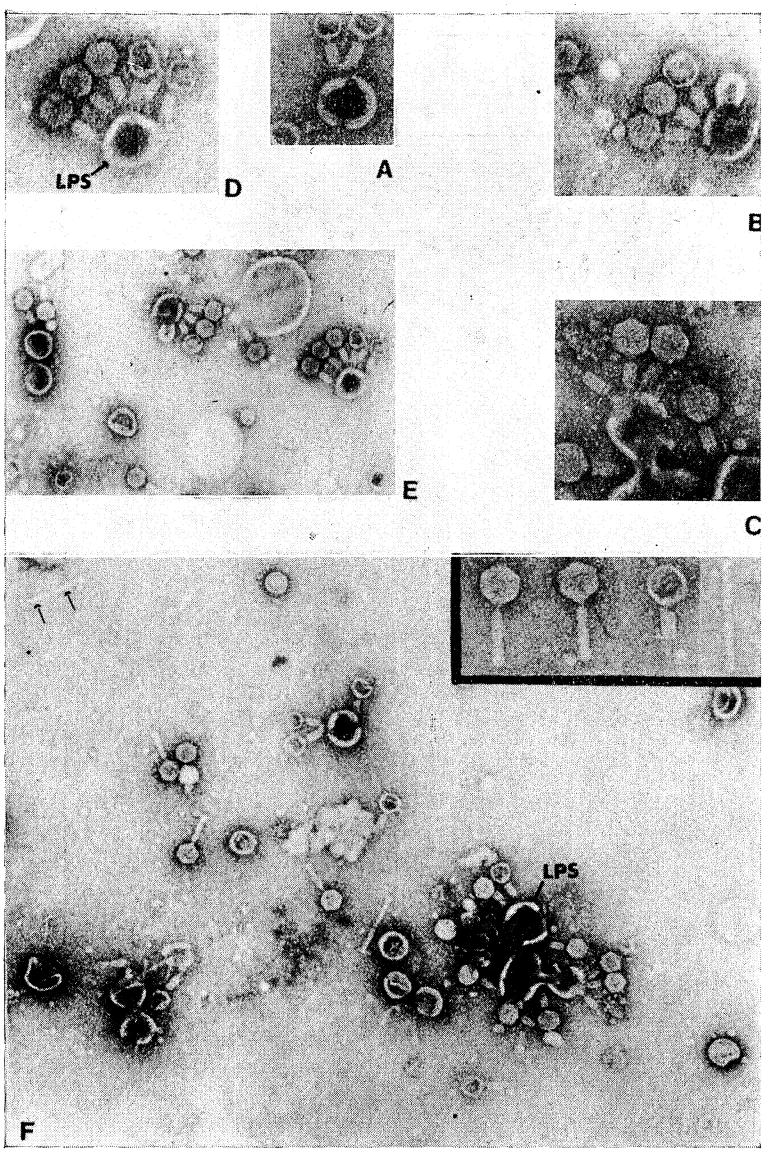


Figura 2. Bacteriófagos inactivados por moléculas de LPS (tinción negativa). Algunos se encuentran contraídos y sus cápsidas vacías de ADN. En el recuadro de F) se aprecian las distintas fases del fago (contraído y sin contraer), así como dos colas enfrentadas por la zona del cuello. DB) × 76.000. A) × 74.500. C) × 92.000. E) × 47.000. F) × 50.600; recuadro × 92.000

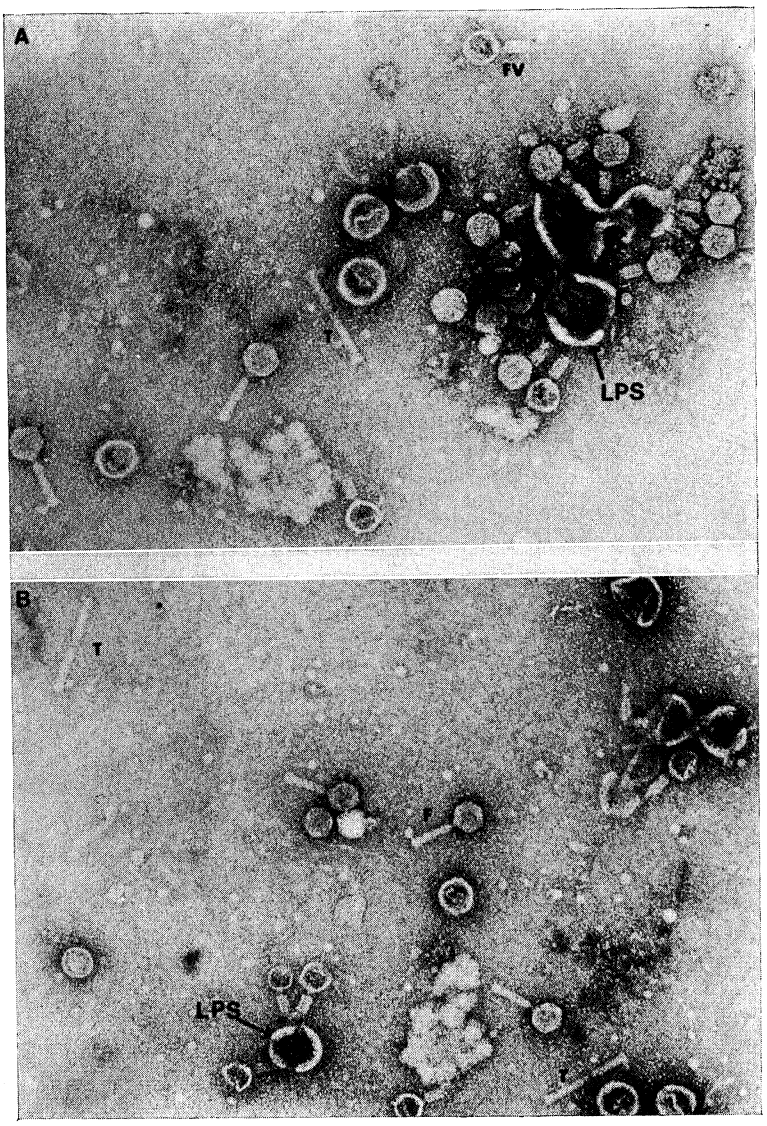


Figura 3. Tinciones negativas de bacteriófagos inactivados por moléculas de LPS. FV = fago inactivado y contraído, F = fago activo, T = colas enfrentadas por el cuello, LPS = lipopolisacárido. A) × 86.000. B) × 74.500

También Anderson (2), en 1980, demuestra la especifidad del bacteriófago 12 P para el *Pseudomonas phaseolicola*: este bacteriófago lisa cultivos del referido *Pseudomonas* patógeno de plantas, pero no de otros *Pseudomonas* saprofitos. Sus aceptores se encuentran localizados en sus exopolisacáridos y lipopolisacárido, como demuestra el autor por la inhibición que éstos producen.

En 1978 (17) nosotros aislamos un bacteriófago de tipo B (clasificación de Bradley) con ADN como material genético, a partir de un *Pseudomonas* patógeno para el olivo, pero no bien determinado. Pero hasta la fecha no se había aislado ningún bacteriófago de *P. savastanoi*, por lo que consideramos de interés esta primera descripción.

RESUMEN

El LPS del *Pseudomonas savastanoi* resultó ser receptor de un bacteriófago no descrito. Este LPS está desprovisto de heptosas. La morfología y la ultraestructura del LPS observadas al microscopio electrónico resultaron similares a las de otros LPS extraídos de bacterias gram-negativas patógenas para animales.

SUMMARY

The LPS from Pseudomonas savastanoi *receptor of a bacteriophage not yet described*

The LPS isolated from an strain of *Pseudomonas savastanoi* was devoived of heptoses. The morphology and ultrastructure of the LPS at the electron microscope showed to be similar to those obtained from gram-negative bacteria of animal pathogens.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, M. H. 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, New York.
2. ANDERSON, A. J. 1980. Unique aspects of cell surface polysaccharide of *Pseudomonas phaseolicola* as demostrated by bacteriophage specificity. Can. J. Microbiol., 26, 1422-27.

3. BRADLEY, D. E. 1966. The structure and infective process of a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage containing ribonucleic acid. J. Gen. Microbiol., 45, 83-96.
4. BRADLEY, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev., 31, 230-314.
5. CASTILLO, F. J., and BARTELL, P. F. 1975. Localization and functional role of the *Pseudomonas bacteriophage* 2 depolymerase. J. Virol., 18, 701-8.
6. DISCHEZ, Z. 1955. Color reactions of nucleic acid component. En E. CHARGAFF and J. N. DAVISON (ed). Nucleic Acid, 1, 285-305. Academic Press. Inc., New York.
7. JARREL, K., and KROPINSKI, A. M. 1976. The isolation and characterization of a lipopolysaccharide specific *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Virol., 33, 99-106.
8. JARREL, K., and KROPINSKI, A. M. 1977. Identification of cell wall receptor for bacteriophage E 79 in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. J. Virol., 23, 461-66.
9. JARREL. K. F., and KROPINSKI, A. M. 1981. Isolation and characterization of a bacteriophage specific for the lipopolysaccharide of rough derivatives of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. J. Virol., 38, 529-38.
10. KROPINSKI, A. M.; CHAN, L.; JARREL, K., and MILAZZC, F. H. 1977. The nature of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO bacteriophage receptor. Can. J. Microbiol., 23, 653-58.
11. LINDBERG, A. A. 1967. Studies of a receptor for Felix O-1 phage in *Salmonella minesota*. J. Gen. Microbiol., 48, 225-33.
12. LINDBERG, A. A. 1973. Bacteriophage receptor. Ann. Rev. Microbiol., 27, 205-41.
13. QIRK, A. V.; SLETTEN, A., and HIGNETT, R. C. 1976. Properties of phage-receptor lipopolysaccharide from *Pseudomonas morsprunorum*. J. Gen. Microbiol., 96, 375-81.
14. SANTAOLALLA, M. 1971. Estructura y composición química del lipopolisacárido de la forma L fija del *Agrobacterium tumefaciens*. Microbiol. Españ., 26, 1-20.
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. 1979-1980. El lipopolisacárido y la endotoxina del *Pseudomonas viridiflava*. Microbiol. Españ., 32-33, 27-41.
17. SANTAOLALLA, M., y CAÑAS, L. 1977-78. Aislamiento de un bacteriófago procedente de un *Pseudomonas* tumorígeno de plantas. Microbiol. Españ., 30-31, 9-21.
18. WESTPHAL, O., and JANN, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods Carbohyd. Chem., 5, 83-91.

OCTAVO CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Durante los días 28 de septiembre a 1 de octubre de 1981, organizado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, se celebró, en los locales de dicha Facultad, el 8º Congreso Nacional de Microbiología de la Sociedad Española de esta disciplina. Resulta muy difícil condensar todo lo que ha dado de sí esta Reunión Científica, que convocaba, por octava vez, a todos los microbiólogos españoles y un buen número de extranjeros. A la hora de mencionar cifras podemos indicar que participaron unos 1.300 congresistas, que presentaron y discutieron más de 600 Comunicaciones Libres (orales y en paneles), más de 100 Ponencias Invitadas y dos Conferencias Plenarias (inaugural y de clausura). Todo esto se agrupó en tres Simposios, trece Mesas Redondas y cincuenta sesiones de Comunicaciones.

Se puede decir que, prácticamente, todos los grupos de Microbiología básica y aplicada que trabajan en nuestro país estuvieron representados. Además, de los Ponentes invitados, unos treinta procedían de centros extranjeros, siendo muy de destacar, entre ellos, un grupo muy grande de científicos mejicanos de gran categoría, que estuvieron presentes en el Congreso con las miras puestas en llegar a una colaboración e intercambio más continuado con los microbiólogos españoles.

En cuanto al contenido del Congreso, fue preocupación principal de los Comités Organizador y Científico el diseño de un programa variado, que cubriera las áreas más importantes del trabajo microbiológico y que ofreciera planteamientos amplios con análisis de los problemas desde puntos de vista diversos.

SIMPOSIOS

Los Simposios, que se celebraron en dos sesiones de mañana, incluyeron Ponencias de destacados investigadores en las áreas de virus («Mecanismos moleculares de la infección vírica»), bacterias («Bases genéticas y fisiológicas de la resistencia y patogenicidad bacteriana») y hongos («Bases de la morfogénesis y patogenicidad de hongos»). En todos ellos se pretendió articular trabajos de investigación básica con otros, más aplicados, orientados al conocimiento de los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos. De manera especial se ponía de manifiesto que esto es posible, en el área de las bacterias, en donde la investigación actual permite dirigirse, con profundidad, a la caracterización de lo que es la base del poder patógeno. Más difícil resulta lograr esto, hoy día, en los estudios de Micología, pero los caminos por los que va la investigación pueden permitir llegar a ese punto que articule los estudios sobre la biología por un lado, y sobre la patogenicidad, por otro, de algunos hongos; ambos planteamientos podrán beneficiarse mutuamente de esta interacción.

MESAS REDONDAS

Las Mesas Redondas recogieron, asímismo, una temática variada, con la idea de discutir avances recientes o perspectivas de futuro.

Tres de ellas abordaban una temática de interés especial en nuestro país: I) La ya tradicional en nuestros Congresos sobre «Enseñanza de la Microbiología», que este año presentaba la novedad de una Ponencia proponiendo la creacción de una Licenciatura en Microbiología, a impartir en alguna (s) Universidad (es) española (s). Con diversas matizaciones, la propuesta tuvo muy buena acogida, si bien se duda de que la actual estructura de nuestra Universidad pueda facilitar algo que rompe el esquema clásico de división en Facultades, amén de las dificultades que habría que vencer en el terreno de los intereses de grupos profesionales. II) En otra Mesa Redonda, de este grupo, se abordaba «El control de calidad en Microbiología» y las diversas facetas que puede plantear. III) Asimismo, de especial interés en nuestro país resultaba el estudio de la «Patología de

plantas hortícolas en España», que organizó la Sección de Fitopatología de la S. E. M.

Otros dos grupos especializados, Microbiología Industrial y Microbiología de los Alimentos, organizaron Mesas Redondas sobre los temas generales que constituyen el interés dentro de esos grupos.

Finalmente, el contenido de las demás Mesas Redondas respondía a temas de gran actualidad. La de «Ingeniería Genética» presentaba a un panel de científicos españoles y extranjeros, que están (algunos desde el inicio) en la primera línea de la metodología del ADN recombinante y sus aplicaciones. La de «Taxonomía bacteriana» discutía las nuevas propuestas en este campo, de interés para todos. La de «Quimioterapia» se centraba en áreas a desarrollar, como son los antifúngicos, antivíricos y bases farmacocinéticas de la quimioterapia. Los demás títulos de Mesas Redondas resumen por sí solos su contenido: «Avances en ecología microbiana», «Diagnóstico microbiológico de enfermedades de transmisión sexual», «Nuevos avances en la detección y diagnóstico de virus» y «Antibioterapia y su incidencia en la ecología microbiana hospitalaria».

CONCLUSIONES

Para nosotros, y para otros muchos, este Congreso consagra, sobre todo, el valor de la Microbiología multidisciplinaria en nuestro país. A nuestra materia, nos acercamos desde muchas titulaciones y llegamos a cultivarla desde distintos puntos de vista. Nosotros hemos querido organizar un Congreso verdaderamente científico, en donde quede realzada, de manera especial, la creatividad de la labor del hombre de ciencia. Creemos que éste es el camino por el que podemos prestar un mejor servicio a la Sociedad, ya sea como investigadores o como profesionales microbiológicos.

Para terminar, es preciso reiterar nuestro agradecimiento a la Sociedad Española de Microbiología y a cuantos organismos, entidades y personas nos han ayudado, prestado su apoyo y otorgado el privilegio de poder reunir, en nuestro entorno más directo, a toda la Microbiología Española.

C. NOMBELA CANO
Presidente del Comité Organizador

BIBLIOGRAFIA

VIROLOGISCHE ARBEITSMETHODEN. II. SEROLOGIE, por *A. Mayr, P. A. Bachmann, B. Bibrack* y *G. Wittmann*, con la colaboración de *O. R. Kaaden*. 1977. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 626 páginas.

Este segundo tomo del tratado de los métodos de trabajo en virología se dedica a la serología en un sentido restringido, pues, si la ciencia de la serología se ocupa de todas las reacciones biológicas que en el suero de la sangre se realizan, aquí sólo se estudian los anticuerpos y los otros componentes del suero (complemento, properdina, opsonina, interferón, inhibidores y los llamados anticuerpos naturales), que influyen en las reacciones de los anticuerpos con los antígenos. La busca de los anticuerpos en los laboratorios de virología puede apuntar a diversos objetivos: diagnóstico de infecciones virales, determinación del estado de inmunidad de un individuo, investigación sero-epidemiológica, diferenciación de antígenos virales, determinación de una inmunidad humoral antivírica, comprobación de la eficacia de vacunas y valoración de hiperinmunosueros, caracterización de las especies, tipos y subtipos de virus y, finalmente, el análisis de la estructura antigénica de las partículas de virus.

El propósito del libro ha sido la exposición detalladísima de las técnicas de comprobación de anticuerpos, de manera que, con su sola ayuda, las pueda realizar cualquier tipo de personal técnico en las investigaciones de rutina. También se describen las mejores técnicas de preparación y purificación de los protagonistas de la reacción, el antígeno y el anticuerpo, así como el modo de evitar o redu-

cir al mínimo la acción nociva de tantos componentes y procesos inespecíficos como suelen complicar las reacciones serológicas.

El libro tiene dos partes: general y especial. Sus contenidos podrán colegirse de la lectura de la sucinta relación que daremos, más adelante, del índice.

Los autores son cinco profesores y doctores veterinarios de Alemania oriental, que han tenido la clara visión de no limitar la obra a la medicina animal, siendo utilizable para la humana y para estudios biológicos generales. Los temas están desarrollados hasta el más nimio detalle. Los encabezamientos fundamentales del índice son los siguientes:

Parte general

1. Fundamentos de inmunología y serología.
2. Aplicaciones de las reacciones serológicas a la virología.
3. Preparación de antígenos virales para las reacciones serológicas.
4. Conservación de los antígenos y del suero.
5. Factores inespecíficos del suero.
6. Obtención de fracciones de globulina y gamma-globulina.

Parte especial

1. Precipitación e inmunodifusión.
2. Reacción de inhibición de la hemaglutinación.
3. Hemaglutinación pasiva (indirecta).
4. Inmunohemolisis pasiva.
5. Reacción de fijación de complemento.
6. Prueba de neutralización.
7. Técnicas de inmunofluorescencia.
8. Técnica de la inmunoperoxidasa.
9. Radioinmunoensayo.
10. Soluciones amortiguadoras y nomogramas.

Como es lógico, dada la fecha de la edición, la bibliografía sólo llega hasta el año 1976; es abundantísima y va al final de cada capítulo. Como ejemplo, podemos citar la del capítulo séptimo de la

parte especial, que aporta 764 citas. Aunque la doctrina de la inmunología varía con gran rapidez, las técnicas de laboratorio no lo hacen con tanta prisa y el colosal archivo bibliográfico de esta obra es suficiente para justificar su presencia en los laboratorios de virología.

L. VILAS

MICROBIOLOGIE APLIQUÉE, por *H. Leclerc, R. Buttiaux, J. Guillaume* y *P. Wattre*. 1977. Doin Editeurs, Paris. 288 páginas.

Es una obra de gran utilidad para los estudiantes de Microbiología interesados en los aspectos aplicados de esta ciencia. Los autores, en el primer capítulo, hacen una descripción concisa de los microorganismos, agrupados en base a caracteres estructurales y fisiológicos afines. En los capítulos siguientes se recogen los aspectos generales de la microbiología del suelo, agua, aire y alimentos; las características del substrato y las modificaciones debidas a la acción de estos microorganismos, las técnicas para el control de la polución y procedimientos de estabilización y conservación de alimentos. En el capítulo sexto, dedicado a algunos aspectos de la microbiología industrial, tienen su lugar las fermentaciones clásicas, producción de antibióticos y biomasas, sin olvidar la tecnología destinada a la conservación de las estirpes útiles. Un último capítulo referido a las interacciones microorganismo-huésped con especial referencia a los microorganismos patógenos y a las toxiinfecciones bacterianas, virales y parasitarias transmitidas por vía digestiva, respiratoria, contacto y picadura, son también resumidas en este manual.

La fotomicroscopia electrónica que se incluye, los dibujos, esquemas y cuadros de clasificación atraen el interés del lector, ayudando al estudiante a establecer una clara relación entre el fenómeno biológico y su origen.

Los autores, destacados investigadores en este campo, con gran experiencia en la formación de microbiólogos especializados, han

seleccionado magistralmente los criterios esenciales para la identificación de los microorganismos, así como los procesos biológicos por éstos desarrollados.

C. GONZALEZ

SOIL BIOLOGY AND CONSERVATION OF THE BIOSPHERE. Director: *J. Szegi.* 1977. Akadémiai Kiadó, Budapest. 424 páginas.

Bajo el título apuntado se recogen las cincuenta y cuatro comunicaciones que fueron presentadas a la 7.ª Reunión de Biología del Suelo, que organizó en 1975 la Sociedad de Ciencia del Suelo de Hungría y que se celebró en la Universidad de Keszthely.

La mayor parte de los comunicantes pertenecen a los países del Este europeo, cuya tradición en investigaciones sobre el suelo es bien conocida, siendo, por el contrario, más limitada la aportación de especialistas de otros países, tanto europeos como americanos y africanos.

A lo largo de sus seis capítulos se mantiene la idea formulada por Omeliansky, que acepta a los microorganismos del suelo como indicadores, muy sensibles, del propio substrato en el que se reproducen, y como responsables principales, a su vez, de las transformaciones químicas que conducen a los diferentes tipos de suelo. Esta población corre el riesgo de verse alterada, no sólo en su densidad, sino también en su función específica, como consecuencia del uso y abuso de productos químicos, que hoy se emplean, de manera rutinaria, en la práctica agraria, principalmente en forma de fertilizantes y herbicidas.

Un número notable de comunicaciones resalta la participación de la población microbiana del suelo en el sistema ecológico global, así como su función en la formación del suelo agrícola y en la desintoxicación de la que son responsables los aditivos químicos. Entre todos los grupos de microorganismos merecen atención especial las nódulo-bacterias, a las que se dedica un capítulo completo, que apor-

ta, desde técnicas específicas de identificación, hasta preparados especiales para comercialización de las estirpes de mayor actividad.

La persistencia en el suelo de fertilizantes y pesticidas, y su efecto sobre la población microbiana, se comparan con la posible mejora que su presencia puede determinar sobre la nutrición vegetal y sobre el grado de protección que llegan a desarrollar distintos tipos de plantaciones. Las conclusiones, en general, son favorables a la incorporación de sustancias químicas al suelo, aunque siempre se aporta la posibilidad de que el hombre, con las nuevas prácticas de mejora agrícola, menosprecie la función de la población microbiana del suelo, frente a la que no hay competencia posible, puesto que la evolución ha hecho de ella el eslabón más importante del ciclo mineral, necesario para la conservación de la biosfera. Como control de la actividad biológica se sugiere el seguimiento de constantes significativas de la vida microbiana, tales como respiración, recuento de organismos representativos, actividad enzimática, proteína soluble, etcétera.

También se considera la acción inhibidora que sobre la población microbiana del suelo ejercen determinados fertilizantes y herbicidas, concluyendo que esta acción es estrictamente selectiva y en dependencia de múltiples factores externos. Por otra parte, se presentan experiencias que demuestran cómo la fertilización puede disminuir el efecto de los herbicidas sobre los microorganismos y acelerar la desintoxicación del suelo.

La obra, en conjunto, refleja una gran inquietud y un esfuerzo notable por parte de todos sus autores, especialmente de los investigadores de aquellos países que, como consecuencia de la socialización de cultivos, se enfrentan con innovaciones en las técnicas agrarias, que pueden conducir a resultados no siempre previsibles, sobre el desarrollo biológico del suelo.

La edición resulta clara y sencilla. Incluye, al principio, una relación de los trabajos presentados y sus autores, por orden de exposición en las diferentes secciones, y, al final, figura una lista alfabética de todos los autores a los que se hace referencia en la exposición de cada una de las comunicaciones.

G. TEJERINA

METODOS DE LABORATORIO EN MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS Y PRODUCTOS LACTEOS, por *W. F. Harrigan* y *M. E. Mc Cance* (versión española: *G. Suárez* y *A. Rodríguez-Burgos*). 1979. Editorial Academia, León. XII + 420 páginas.

En este manual los autores recopilan la tecnología básica de la práctica microbiológica y la aplicada al análisis microbiológico de alimentos. La publicación conjunta de esta metodología y en español, es de gran ayuda para los estudiantes de microbiología y bromatología que aspiran a puestos claves en los laboratorios de control microbiológico y de la industria de la alimentación; en él hallarán los principios básicos de su actividad diaria.

La primera parte recoge las técnicas fundamentales de tinción bacteriológica, cultivos, cálculos de población, pruebas bioquímicas de rutina y procedimientos de esterilización. Con una somera descripción de las técnicas serológicas indispensables en microbiología de alimentos, de los métodos de aislamiento y cultivo de mohos y fagos, finaliza esta introducción.

En la segunda parte, el lector interesado hallará las bases de los procedimientos de muestreo, del aislamiento selectivo de microorganismos indicadores, patógenos y tóxicos transmisibles por alimentos deteriorados; las pautas microbiológicas para el análisis de alimentos específicos, así como del equipo y utillaje. Algunos esquemas simplificados que facilitan la identificación de estos microorganismos, completan el manual.

La bibliografía que se incluye, la recomendación de los autores en cuanto a la necesidad absoluta de consultar la normativa elaborada por los expertos de la ICMSF, hacen de esta obra una guía útil para el futuro técnico-microbiólogo.

C. GONZALEZ

ISSN: 0026-2595

Depósito Legal M. 702 - 1958

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