MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Editada por el Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán" y la Sociedad Española de Microbiología

VOLUMEN 36
NUMEROS 1-2
ENERO-JUNIO, 1983

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director

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

Vicedirector

Dr. César Nombela, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Consejo de Redacción

Dra. Ramona Beltrá, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC

Dr. Miguel Gobernado, Servicio de Microbiología, Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social «La Fe», Valencia.

Dr. Carlos Hardisson, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Dr. Juan Francisco Martín, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de León.

Dra. Fuensanta Reyes, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Rubio, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez.

Redacción

«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
Madrid-6 (España)

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
Madrid-6 (España)

NORMAS PARA LOS AUTORES

«Microbiología Española» publicará trabajos y notas de investigación originales dentro del campo de la Microbiología y ocasionalmente artículos de revisión. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquier otra revista. Los artículos publicados en «Microbiología Española» podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, estarán escritos a máquina, a doble espacio, en hojas UNE A-4 por una sola cara, numeradas correlativamente y con márgenes de 2,5 cm como mínimo; no deberán exceder de doce páginas en total, *incluyendo* el espacio necesario para figuras y tablas.

Las fotografías deberán limitarse a las estrictamente necesarias para la comprensión del trabajo, y serán de calidad suficiente para asegurar una buena reproducción. Deberán estar numeradas al dorso, indicando el apellido del primer autor, a lápiz. Los textos de las mismas irán mecanografiados a doble espacio y en hoja aparte.

Los dibujos y gráficas, con tinta china negra y en papel vegetal, o bien fotografías de los mismos. Para su presentación se seguirán las normas dadas para las fotografías. Fotografías, dibujos y gráficas irán numerados de forma conjunta y correlativamente.

Las tablas se presentarán en hoja aparte, numeradas independientemente de las figuras, con números romanos y el correspondiente título explicativo.

En la cabecera de la primera página se indicará, por este orden: título del trabajo, nombre y apellidos del autor o autores, centro en que se ha realizado el trabajo y dirección completa del mismo.

Los trabajos constarán de: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Resumen, Agradecimientos (en su caso) y Bibliografía.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. 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 en español e inglés, de un máximo de doscientas palabras cada uno, deberán contener un esquema del trabajo y las conclusiones abreviadas, y serán redactados para que sea posible su comprensión sin necesidad de leer total o parcialmente el trabajo. No deberán incluir material o datos no citados en el texto.

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.

Las notas, que no deberán exceder de cuatro páginas, tienen por objeto la presentación de observaciones experimentales, descripción de técnicas o modificaciones metodológicas de interés. Su redacción se efectuará ateniéndose a las normas previamente descritas para los trabajos, pero suprimiendo las divisiones con encabezamiento, y con resúmenes no superiores a cincuenta palabras. Las ilustraciones y tablas se reducirán a las mínimas indispensables.

Los artículos de revisión versarán sobre temas de Microbiología de amplio interés, y su redacción se solicitará a especialistas. Incluirán, en lugar de resumen, un índice del contenido.

Los autores recibirán en un plazo no superior a tres meses desde la recepción del manuscrito, notificación del Consejo de Redacción sobre la aceptación, rechazo o necesidad de modificación del mismo. En este último caso, el manuscrito modificado deberá devolverse al Consejo de Redacción en un plazo no superior a un mes.

Los autores recibirán pruebas (galeradas) de los trabajos aceptados, que deberán devolver en plazo no superior a una semana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha del envío, se anulará. Las correcciones se limitarán a errores tipográficos, gramaticales o de datos incorrectos. Modificaciones más importantes, que impliquen recomposición del texto, deberán ser abonadas por el autor.

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.

Los trabajos se enviarán a «Microbiología Española», Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo de Redacción de la Revista.

INDICE

Página

Estudios sobre la micoflora de la rizosfera y rizoplano del *Cajanus cajan* (L.) Millsp. en períodos anteriores y posteriores a la cosecha, *I. J. Joshi* (**) 1

Actividad *in vitro* de quimioterápicos, sulfamidas y antifúngicos frente a *Prototheca stagnora*, *M. Casal*, *J. Gutiérrez-Aroca* y *J. Clemente* (*) 9

Acumulación de lisina a partir de hidrocarburos por el *Micrococcus varians* 2 FA bajo diferentes condiciones de cultivo, *S. K. Sen*, *Manika Chatterjee* y *S. P. Chatterjee* (**) 15

Transposición de Tn10 a la región xyl-mtl (minuto 78) del cromosoma de *Salmonella typhimurium*, *A. Contreras* y *J. Casadesús* (*) 23

Estudios epidemiológicos en estafilococos coagulasa-positivos aislados de manipuladores de alimentos, *J. J. Francisco-Polledo*, *L. M. Gutiérrez*, *M. L. García* y *B. Moreno* (*) 35

Autolisinas bacterianas, *R. López*, *P. García* y *E. García* (*) 45

(*) En español. (**) En inglés.

INDEX

Page

Studies on rhizosphere and rhizoplane mycoflora of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. during pre-harvest and post-harvest periods, *I. J. Joshi* (**) 1

In vitro activity of antimicrobial agents, sulphonamides and antifungal agents against *Prototheca stagnora*, *M. Casal*, *J. Gutiérrez-Aroca* and *J. Clemente* (*) 9

Lysine accumulation from hydrocarbon by *Micrococcus varians* 2 FA, under different cultural conditions, *S. K. Sen*, *Manika Chatterjee* and *S. P. Chatterjee* (**) 15

Tn10 transposition to xyl-mtl region (78 minute) of *Salmonella typhimurium* chromosome, *A. Contreras* and *J. Casadesús* (*) 23

Epidemiological studies of coagulase positive staphylococci isolated from the noses of food handlers, *J. J. Francisco-Polledo*, *L. M. Gutiérrez*, *M. L. García* and *B. Moreno* (*) 35

Bacterial autolysines, *R. López*, *P. García* and *E. García* (*) 45

(*) In spanish. (**) In english.

STUDIES ON RHIZOSPHERE AND RHIZOPLANE MYCOFLORA OF *CAJANUS CAJAN* (L.) MILLSP. DURING PRE-HARVEST AND POST-HARVEST PERIODS

I. J. JOSHI

School of Studies in Botany, Jiwaji University, Gwalior-474011 (India)

SUMMARY

Mycoflora associated with the non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane of *Cajanus cajan* varied qualitatively as well as quantitatively during pre-harvest and post-harvest periods. Non-rhizosphere soil mycoflora was influenced by the edaphic factors. A quantitative increase in the fungal population of rhizosphere soil and rhizoplane was noted at senescent stage whereas the diversity of the species decreased. During pre-harvest period, rhizosphere soil and rhizoplane fungal flora showed much less similarity whereas very higher extent of similarity was observed during post-harvest period.

RESUMEN

La micoflora asociada con las zonas del suelo, la no-rizosfera, la rizosfera y el rizoplano de *Cajanus cajan* varían cuantitativamente y cualitativamente antes y después de la cosecha. La micoflora de la no-rizosfera estaba influida por factores edáficos. Se encontró un incremento cuantitativo de la población de hongos de la rizosfera y rizoplano en etapas de envejecimiento, mientras que la diversidad de especies decrecía. En períodos anteriores a la cosecha, la micoflora en la rizosfera y rizoplano era muy diversa; después de la cosecha se observó una semejanza mayor.

INTRODUCTION

The soil root interfaces is a zone increased microbial activity where important associations of soil microorganisms and plant roots have been described. Of the various factors affecting microbial growth in the rhizosphere soil and rhizoplane, the exudation of organic compounds by the

roots and cast-off root cell debris play a major role which is affected by environmental conditions (11). Several reports are available on the activities of microorganisms in the rhizosphere soil and rhizoplane of various plant species (1, 4, 12-13). Rouatt *et al.* (10) and Parkinson and Thomas (9) have shown an increase in the rhizosphere/soil ratio with the age of the plant which reaches a maximum coincident with its greatest vegetative development while at senescens the ratio decreases. Then the microbial composition increases in diversity in order to carry out decomposition of dead and dying root tissues. Some workers have noted a continuous decline in the rhizosphere microorganisms with the age of the plant (14), some noted a decline during post-flowering stages (6, 15) whereas some recorded maximum level at the senescent stage (7, 18). In view of these diverse opinions, the present investigation was performed to evaluate changes in the mycoflora living in non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. during pre-harvest period when the plant growth was at its maximum and at the post-harvest period or senescent stage, when the roots, which are left over in soil for green manuring, start dying.

Materials and methods

These investigations were carried out in the crop fields of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. situated in Chambal ravines of Bhind district (M. P.), India. The crop was sown in July 1976 and harvested during March 1977. Harvesting was done by cutting the aerial portions of the plants and the roots were left over in soil for green manuring. The sampling for non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane mycoflora was done during two periods: pre-harvest period i.e., during February 1977 when the plant was at its peak period of vegetative growth; and post-harvest period i.e., during September 1977 when the plant roots were at senescent stage.

For estimating the non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane mycoflora, sampling was done at 6 sites in the field and 5 replicates were kept for each of the sample collected from each site.

The samples were collected by digging the soil upto 20 cm to expose the root system. For non-rhizosphere soil mycoflora, soil samples were collected in sterile glass vials with a sterilized trowel from the top 20 cm from places 15 cm away from the roots. Suspension dilutions of the soil were prepared and plated on Martin's medium (8).

For studying the rhizosphere soil mycoflora, plant roots were carefully removed from the soil with a sterilized trowel, kept in sterilized polythene bags and brought to the laboratory. For the rhizosphere soil mycoflora, roots were tapped gently to loosen excess soil, cut off with a sterile scissor and collected in a 250 ml conical flask containing 100 ml sterilized distilled water. They were shaken vigorously for 10-15 min until much of the closely adhering rhizosphere soil dislodged from the root system. Roots were then removed and 1 ml of this suspension was plated on Martin's medium (8). The rhizosphere suspension left out after inoculation was evaporated separately on a water bath and the soil residue was dried to constant weight in an oven at 105 °C. The flask containing dry soil was weighed

and the dilution factors were calculated, allowance being made for the amount of soil removed in preparing the dilutions. Rhizosphere soil fungi per gram of dry soil was calculated by estimating the soil present in 1 ml of suspension.

After removing the roots from dilution flask for studying the rhizosphere fungi, same roots were subjected to a series of 30-40 washings in sterilized distilled water to remove the soil particles. Maximum removal of fungal spores and mycelial fragments was determined by plating any number of washings on agar plates. After washing, excess surface moisture was removed from the roots by blotting with sterilized filter paper. The roots were then weighed, cut into segments (2 mm long) teased with the help of sterile needle and knife. They were then transferred to nutrient agar plates (5 pieces/plate) containing Dox+yeast extract medium (17). Quantitative estimation of rhizoplane fungi was made by counting the number of colonies on all the plates and were expressed as rhizoplane fungi per gram of wet root.

The percentage abundance of each fungal species occurring in non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane was calculated by counting the total number of colonies of each species occurring on all the plates of their corresponding samples and dividing it by total number of colonies of all the species and then representing it on percentage basis.

For comparing the non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane mycoflora, similarity index (SI) was calculated as follows:

$$SI = \frac{2C}{A + B} \times 100$$

Where:

C = Number of species common to the two samples.

A = Number of species present in one sample.

B = Number of species present in another sample.

Among the edaphic factors, soil moisture was determined by oven-drying soil at 105 °C for 24 h. Organic carbon and total nitrogen in the soil were determined by methods suggested by Jackson (3). C/N ratio was calculated by dividing carbon (%) by nitrogen (%).

Results and discussion

Results of the present investigation on mycoflora associated with the non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane of *Cajanus cajan* during pre-harvest and post-harvest periods are given in *tables 1-3* —*table 1* showing the percentage abundance of individual fungal species, *table 2* showing fungal population and certain edaphic factors, and *table 3* showing similarity indices among their mycoflora.

The decline in the non-rhizosphere soil fungal population during post-harvest period can be attributed to a fall in the nitrogen contents (19) and anerobic conditions caused by excessive soil moisture (16). However, an increase in the carbon contents and C/N ratio during post-harvest period may be responsible for a wider species spectrum during this period (2, 5).

The qualitative and quantitative variations in the mycoflora associated with non-rhizosphere soil, rhizosphere

Table 1. Percentage abundance of mycoflora in the non-rhizosphere soil (NRs), rhizosphere soil (Rs) and rhizoplane (Rp) of Cajanus cajan

Fungal species	Pre-harvest period			Post-harvest period		
	NRs	Rs	Rp	NRs	Rs	Rp
Phycomycetes						
Cunninghamella echinulata	—	—	1.11	—	—	—
Mortierella camargensis	—	--	—	0.13	—	—
Mucor hiemalis	1.26	4.86	3.33	0.13	—	—
Rhizopus oryzae	2.52	—	6.67	11.34	—	—
Ascomycetes						
Chaetomium sp.	—	—	—	0.17	—	—
C. jodhpurense	2.02	—	—	0.25	—	—
Cochliobolus carbonus	—	—	—	1.26	—	—
Khuskia oryzae	1.93	—	—	1.76	—	—
Neocosmospora vesinfecta	—	—	—	0.17	—	—
Fungi imperfecti						
Acrophialophora fusispora	1.09	—	—	3.40	—	—
Alternaria alternata	3.87	—	—	—	2.10	31.37
Aristatoma sp.	—	—	—	0.13	—	—
Aspergillus flavipes	—	4.86	—	—	—	—
A. flavus strain I (conidial heads green)	0.59	1.39	4 44	26.83	0.57	—
A. flavus strain II (conidial heads yellow)	—	0.69	—	—	—	—
A. flavus strain III (black sclerotia abundant)	—	—	5.56	—	—	—
A. fumigatus strain I (conidial heads green)	4.79	—	1.11	7.05	—	—
A. fumigatus strain II (conidial heads blue)	2.19	—	—	2.27	—	—
A. fumigatus strain III (conidial heads rare, vegetative mycelium abundant)	0.17	—	—	—	—	—
A. nidulans	20.02	11.80	15.55	8.06	—	—
A. niger strain I (conidial heads dark black)	4.54	—	—	5.02	—	—
A. niger strain II (conidial heads buff)	3.36	0.69	15.56	0.33	—	—
A. niveus strain I (conidial heads white)	0.42	67.36	—	0.25	—	—
A. niveus strain II (conidial heads cream coloured with numerous perithecia and hulle cells)	—	7.64	—	—	—	—

Table 1 (conclusion)

Fungal species	Pre-harvest period			Post-harvest period		
	NRs	Rs	Rp	NRs	Rs	Rp
A. stellatus	10.17	—	—	15.67	—	—
A. terreus	24.05	—	2.22	4.53	—	—
A. ustus	—	—	—	0.38	—	—
Cladosporium oxysporum	—	—	1.11	4.53	13.58	5.88
Curvularia clavata	—	—	—	—	—	5.88
C. geniculata	—	—	—	0.17	—	—
C. lunata	5.21	—	—	0.63	—	—
Drechslera pedicellata	—	—	—	0.17	—	—
Fusarium fusarioides	0.25	—	—	—	—	—
F. oxysporum strain I (colony white; reverse light yellow)	2.94	—	—	1.64	—	—
F. oxysporum strain II (colony shining white; reverse pink)	0.59	—	—	—	—	—
F. solani	1.18	0.69	21.11	1.64	—	—
F. tabacinum	—	—	—	1.26	—	—
Helminthosporium sativum	0.34	—	1.11	0.13	—	—
Humicola sp.	—	—	—	0.17	—	—
H. fusco-atra	—	—	—	0.17	—	—
Macrophomina phaseolina	—	—	18.89	0.13	—	—
Monocillium constrictum	7.57	—	—	0.38	—	—
Monodictys fluctuata	1.43	—	—	0.38	—	—
Myrothecium leucotrichum	0.08	—	—	—	—	—
M. verrucaria	0.34	—	—	0.13	—	—
Nigrospora oryzae	0.25	—	—	—	—	—
Paecilomyces sp.	0.08	—	—	—	—	—
P. lilocinus	1.01	—	—	0.88	—	—
Penicillium canescens	—	—	—	1.64	—	—
P. chrysogenum	—	—	—	3.40	67.69	21.57
P. funiculosum	6.22	—	—	1.26	—	—
P. implicatum	—	—	—	0.63	—	—
P. lapidosum	0.25	—	—	—	—	—
P. oxalicum	0.25	—	—	—	—	—
Periconia saraswatipurensis	—	—	—	—	0.19	—
Phoma macrostoma	—	—	—	—	0.19	1.96
P. multirostrata	0.42	—	—	1.01	—	—
Polyschema sp.	—	—	—	0.13	—	—
Scolecobasidium terreus	—	—	—	0.17	—	—
Stachybotrys atra	0.17	—	—	0.13	—	—
Ulocladium chartarum	—	—	—	—	15.49	31.37
Sterile colony	—	—	—	—	—	1.96
Total number of species	34	9	13	43	7	7

— Indicates absence.

soil and rhizoplane (*tables 1-2*) point towards the differences in their respective microenvironment. Higher nutritional level due to root exudation and cast-off cell debris may be responsible for higher population in the rhizosphere soil whereas specificity in the nutrients may be responsible for restricting the number of species in this region. On the other hand maximum number of species in the non-rhizosphere soil may be due to wide heterogenous nature, both in nutrition and habitat, of the non-rhizosphere soil.

response to the microenvironment conducive for their proliferation.

Present investigation revealed a quantitative increase in the fungal population of rhizosphere soil and rhizoplane at senescent stage during post-harvest period (*table 2*), whilst the species diversity decreased. A significantly higher extent of similarity between the rhizosphere soil and rhizoplane fungal flora (*table 3*) suggests that at senescent stage, there starts disruption of demarcating zones between rhizosphere and rhizoplane micro-

Table 2. Non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane fungal population and some edaphic factors during pre-harvest and post-harvest periods

Factors (*)	Pre-harvest period	Post-harvest period
Non-rhizosphere soil:		
Population/g dry soil	$707 \times 10^2 \pm 167.45$	$323 \times 10^2 \pm 84.45$
Moisture (%)	4.00 ± 0.79	14.68 ± 2.95
Carbon (%)	0.357 ± 0.089	0.405 ± 0.059
Nitrogen (%)	0.054 ± 0.022	0.036 ± 0.018
C/N ratio	7.05 ± 1.14	11.18 ± 2.52
Rhizosphere soil:		
Population/g dry soil	$167 \times 10^4 \pm 47.06$	$363 \times 10^4 \pm 61.42$
Rhizoplane:		
Population/g wet root	112 ± 12.30	161 ± 35.73

(*) Each factor an average of 30 replicates ± SD.

The condition in rhizoplane appears to be more specialized due to root leakage and composition of the substrate (root) thus inviting only host «specific» forms. The specificity of various fungal species to the non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane may, therefore, be attributed to the differences in the nutritional requirements of various fungal species and their

environments and they could become more homogenous from the point of view of nutrition. The sloughed-off root tissues during senescence might have invited greated number of fungal species and consequently leading to an increase in the rhizosphere and rhizoplane fungal population during senescent stage.

Amongst various genera isolated,

Aspergillus dominated the non-rhizosphere soil. Higher abundance shown by *Aspergillus* in the rhizosphere soil (84.03 %) and rhizoplane (44.44 %) during pre-harvest period suggests it as a typical rhizosphere inhabitant (6-7). In spite of the dominance of *Aspergillus* in the non-rhizosphere soil during post-harvest period, however, remarkably poor abundance shown by *Aspergillus* in the rhizosphere soil (0.57 %) and its complete absence from the rhizoplane suggests, that, at senescent stage, the rhizosphere and rhizoplane microenvironment was not conclusive for the growth of *Aspergillus* which, therefore, was replaced by *Penicillium* and dictyosporum hyphomycetous genera which dominated rhizosphere and rhizoplane respectively.

Table 3. Similarity indices (SI) between mycoflora of non-rhizosphere soil (NRs), rhizosphere soil (Rs) and rhizoplane (Rp) during pre-harvest (Prh) and post-harvest (Poh) periods

Combinations	Similarity index (%)
Prh : NRs *vs* Rs	27.90
NRs *vs* Rp	38.29
Rs *vs* Rp	22.00
Poh : NRs *vs* Rs	12.00
NRs *vs* Rp	8.00
Rs *vs* Rp	62.99
NRs : Prh *vs* Poh	64.93
Rs Prh *vs* Poh	12.50
Rp Prh *vs* Poh	10.00

From the present investigation it is confirmed that changes occur in the mycoflora associated with the non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane with respect to the age of the plant and at a senescent stage of the root, the rhizosphere and rhizoplane microenvironment become more homogenous with respect to their fungal flora. Absence of any fungal species common to non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane during pre-harvest and post-harvest periods; differences in the fungal species common to non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane during pre-harvest and post-harvest periods; absence or very poor growth of certain dominant fungal species of rhizosphere soil and rhizoplane; and variations in the abundance of dominant fungal species in non-rhizosphere soil, rhizosphere soil and rhizoplane during pre-harvest and post-harvest periods suggest the diversity and complexity of the nutritional requirements of their respective microenvironments in which qualitative and quantitative variations in fungal flora occur in different manners with the senescence of roots.

ACKNOWLEDGEMENTS

Author is thankful to Prof. S. B. Saksena and Dr. R. K. S. Chauhan, School of Studies in Botany, Jiwaji University, Gwalior for helpful suggestions, Dr. A. Johnston, Director, CMI, England for identification of fungi and Head, School of Studies in Botany, Jiwaji University, Gwalior, India for providing laboratory facilities.

References

1. Bowen, G. D., and Theodorou, C. 1973. Growth of ectomycorrhizal fungi around seeds and roots. In G. C. Marks and T. T. Kozlowski (eds.). Ectomycorrhizae. Their Ecology and Physiology, 107-50. Academic Press, London.
2. Jabbar Miah, M. A.; Varshney, J. L., and Sarbhoy, A. K. 1980. Soil fungi of South India. Proc. Indian Nat. Sci. Acad., 46, 593-602.
3. Jackson, M. L. 1967. Soil Chemical Analysis. Prentice — Hall of India Ltd., New Delhi.
4. Joshi, I. J. 1982. Studies on rhizosphere mycoflora of certain trees. Acta Soc. Bot. Pol., 51 (In Press).
5. Manoharachary, C. 1977. Microbial ecology of scrub jungle and dry waste-land soils from Hyderabad district, A. P. (India). Proc. Indian Nat. Sci. Acad., 43, 6-18.
6. Mishra, R. R. 1979. Root decomposition. Proc. Indian Nat. Sci. Acad., 45, 648-59.
7. Odunfa, V. S. A., and Oso, B. A. 1979. Fungal populations in the rhizosphere and rhizoplane of cowpea. Trans. Brit. Mycol. Soc., 73, 21-26.
8. Papavizas, G. C., and Davey, C. B. 1959. Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of soil fungi. Soil Sci., 88, 112-17.
9. Parkinson, D., and Thomas, A. 1969. Quantitative study of fungi in the rhizosphere. Can. J. Microbiol., 15, 875.
10. Rouatt, J. W.; Peterson, E. A.; Katznelson, H., and Henderson, E. 1963. Microorganisms in the root zone in relation to temperature. Can. J. Microbiol., 9, 227-336.
11. Rovira, A. D. 1965. Interaction between plant roots and soil microorganisms. Annu. Rev. Microbiol., 19, 241-66.
12. Rovira, A. D.; Newman, E. I.; Bowen, H. J., and Campbell, R. 1974. Quantitative assessment of the rhizoplane microflora by direct microscopy. Soil Biol. Biochem., 6, 211-16.
13. Shukla, S. N., and Dwivedi, R. S. 1981. Qualitative and quantitative studies on rhizosphere and rhizoplane microflora of *Trifolium alexandrium* Linn. Proc. Indian Nat. Sci. Acad., 47, 899-906.
14. Sivasithamparam, K.; Parker, C. A., and Edwards, C. S. 1979. Rhizosphere microorganisms of seminal and nodal roots of wheat grown in pots. Soil Biol. Biochem., 11, 155-60.
15. Srivastava, V. B. 1973. Investigations into rhizosphere microflora IV. Fungal association in different root regions of some rainy-season crops. Acta Soc. Bot. Pol., XLII, 409-22.
16. Stover, R. H. 1955. Flood following for eradication of *Fusarium oxysporum* f. cubense III. Effect of oxygen on fungus survival. Soil Sci., 80, 397-412.
17. Stover, R. H., and Waite, B. H. 1953. An improved method for isolating *Fusarium* spp. from plant tissue. Phytopathology, 43, 700-01.
18. Sullia, S. B. 1973. Soil moisture contents and root exudates in relation to rhizosphere effect in leguminous weeds. Proc. Indian Acad. Sci., LXXVII, 264-75.
19. Zoberi, M. H. 1979. Ecology of some fungi in a Termite hill. Mycologia, 71, 537-45.

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE QUIMIOTERAPICOS, SULFAMIDAS Y ANTIFUNGICOS FRENTE A *PROTOTHECA STAGNORA*

M. CASAL, J. GUTIERREZ-AROCA y M.ª J. CLEMENTE
Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba

RESUMEN

Se investigó la posible acción inhibitoria *in vitro* de los quimioterápicos, sulfamidas y antifúngicos sobre las algas del género *Prototheca* y la especie. *P. stagnora*.

Se utilizó el método de disco-placa en medio de agar de Sabouraud.

Resultaron ser inhibidas por la mandelamina y la nitro-5-hidroxi-8-quinoleína, anfotericina B, nistatina, clotrimazol, econazol y miconazol.

SUMMARY

The possible *in vitro* inhibitory action of the antimicrobial agents, sulphonamides and antifungal agents against algae of the genus *Prototheca* was investigated.

The disk-plate method in Sabouraud glucose agar medium was used. The *Prototheca* sp. strains were inhibited by the mandelamine and the nitro-5-hydroxy-8-quinolein, anphotericine B, nistatine, clotrimazole, econazole and miconazole.

INTRODUCCIÓN

El género *Prototheca* está constituido por algas microscópicas aclorofílicas, con grandes semejanzas con las algas del género *Chlorella*, del que en principio se pensaba fuesen mutantes aclorofílicas. Asimismo, alguna de sus especies primitivas ha sido posteriormente considerada como *Fisuricella* (1) con quien puede también prestarse a confusión.

Estas algas fueron descritas por primera vez en 1894 por Kruguer (8), aunque no es hasta recientemente cuando han adquirido importancia, a raíz de que en 1964 Davies y cols. (7) describieran el primer caso de enfermedad

humana debida a estos microorganismos.

De estos microorganismos, algunas especies son consideradas como oportunistas, como *Prototheca wickerhamii* y *P. zopfii*, pudiendo originar enfermedad humana en ciertas condiciones todavía no bien concretadas (2). No obstante, *P. stagnora*, hasta el momento, no se considera patógeno humano.

De las tres especies antes citadas *Prototheca wickerhamii*, *P. zopfii* y *P. stagnora*, que son las especies actualmente aceptadas como válidas, *P. stagnora* es sin duda la especie menos aislada normalmente y también la menos estudiada por los autores que investigan estos problemas.

De los diferentes aspectos que pueden investigarse en estos organismos, nos interesó la posible actividad que pudieran tener sobre ellos los diferentes compuestos antimicrobianos, antibióticos, antifúngicos, quimioterápicos de síntesis o sulfamidas, dado que era el aspecto peor estudiado y prácticamente desconocido hasta el momento, dada la escasa literatura a este respecto existente en el mundo.

Por ello, en anteriores trabajos, ya investigamos la actividad de antibióticos (3-4) frente a estas algas.

Ahora, en este estudio, hemos investigado la sensibilidad de esta especie de *Prototheca stagnora* frente a sulfamidas, quimioterápicos de síntesis y antifúngicos.

Material y métodos

El material lo componen 10 cepas de *Prototheca stagnora*, pertenecientes a la Colección de Cultivos de nuestro Departamento y provenientes de Colecciones Internacionales de diversos investigadores, tales como: Ajello, L. Mycology Division, CDC. Public Health Service, Atlanta, Georgia 30.333, USA; Ball, E. H., Medical Mycology Section, University of Glasgow, G 11. Scotland, así como cepas salvajes aisladas por nosotros en nuestro propio laboratorio (3-5).

Los quimioterápicos, sulfamidas y antifúngicos utilizados, se detallan con su carga y casa comercial en las *tablas 1-3*.

Tabla 1. Quimioterápicos de síntesis

Antimicrobianos	Carga del disco mcg	Casa comercial
Flumequina	30	Bio-Merieux
Mandelamina	3	Difco
Acido nalidíxico	30	Difco
Nitrofurantoína	300	Difco
Nitrofurazolidona	50	Oxoid
Nitro-5-hydroxi-8-quinoleína	20	Bio-Merieux
Acido oxolínico	2	Difco
Acido pipemídico	20	Pasteur
Acido piromídico	25	Pasteur
Trimetoprim	1,25	Oxoid

Tabla 2. Sulfamidas

Antimicrobianos	Carga del disco mcg	Casa comercial
Sulfadiacina	300	Difco
Sulfaiurazol	100	Oxoid
Sulfametisol	50	Pasteur
Sulfametoxazol	25	Oxoid
Sulfametoxi-piridacina	100	Pasteur
Sulfatiazol	300	Difco
Sulfixosazol	300	Difco
Trimetoprim-sulfametoxazol	25	Difco
Triple sulfa	300	Difco

Tabla 3. Antifúngicos

Antimicrobianos	Carga del disco	Casa comercial
Anfotericina-B	100 mcg	Pasteur
Clotrimazol	50 mcg	Pasteur
Econazol	50 mcg	Pasteur
5-fluorcitosina	1 mcg	Pasteur
Miconazol	50 mcg	Pasteur
Nistatina	100 UI	Difco

Todas las cepas se mantienen en agar glucosado de Sabouraud a 25 °C hasta el momento de su utilización.

El método de estudio de sensibilidad *in vitro* es el de disco-placa en agar de Sabouraud, ya usado anteriormente por nosotros en otros estudios (3-4, 6).

Resultados

Las sulfamidas, como sulfadiacina, sulfafurazol, sulfametisol, sulfametoxazol, sulfametoxi-piridacina, sulfatiazol, sulfixosazol, trimetoprim-sulfametoxazol y la triple sulfa, se mostraron totalmente ineficaces respecto a *Prototheca stagnora*.

De los quimioterápicos de síntesis, observamos en la *tabla 4*, la escasa susceptibilidad de esta especie de *Prototheca*, ya que sólo se inhibe por la mandelamina, con un rango de 8-30 mm, y por la nitro-5-hidroxi-8-quinoleína, con un rango de 14-54 mm, mientras que el resto de los quimioterápicos probados no presentaron actividad alguna (flumequina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, nitrofurazolidona, ácido oxolínico, ácido pipemídico, ácido piromídico y trimetoprim).

Tabla 4. Susceptibilidad de la P. stagnora *a 10 quimioterápicos de síntesis*

Antibiótico	Porcentaje de cepas inhibidas	Diámetro del halo de inhibición mm	
		Rango	Media
Flumequina	0	0	0
Mandelamina	100	8-30	19
Ac. Nalidíxico	0	0	0
Nitrofurantoina	0	0	0
Nitrofurazolidona	0	0	0
Nitro-5-hydroxi-8-quinoleina	100	14-54	34
Acido oxolínico	0	0	0
Acido pipemídico	0	0	0
Acido piromídico	0	0	0
Trimetoprim	0	0	0

Tabla 5. Susceptibilidad de la P. stagnora *a 6 antifúngicos*

Antibiótico	Porcentaje de cepas inhibidas	Diámetro del halo de inhibición mm	
		Rango	Media
Anfotericina B	100	8-20	14
Clotrimazol	100	10-30	20
Econazol	100	18-40	29
5-fluorcitosina	0	0	0
Miconazol	100	8-40	24
Nistatina	100	11-36	23,5

Con respecto a los antifúngicos, podemos observar (*tabla 5*), la casi global susceptibilidad de la *Prototheca stagnora* frente a estas drogas, salvo para la 5-fluorcitosina. Y así, el diámetro mayor lo dio el econazol, con un rango de 8-40 mm, la histatina, con

un rango de 11-36 mm, y el clotrimazol, con un rango de 10-30 mm, y algo menor para la anfotericina B, con un rango de 8-20 mm.

Discusión

De la *Prototheca stagnora* no ha sido tan estudiada la sensibilidad a las drogas como en las otras especies del género *Prototheca*. Con respecto a las sulfamidas y quimioterápicos, sólo Musacchio (9) da como resistentes a 2 cepas de *P. stagnora* frente al ácido nalidíxico.

Según lo encontrado en nuestro estudio, estamos de acuerdo con Musacchio (9), ya que el ácido nalidíxico también resultó ineficaz frente a las cepas de *Prototheca stagnora* por nosotros probadas, así como frente a la mayoría de los quimioterápicos, ya que sólo la mandelamina y la nitro-5-hidroxi-8-quimoleína dieron actividad *in vitro*. Las sulfamidas también se mostraron ineficaces en nuestro estudio.

En este sentido, parece deducirse, de los estudios de Musacchio y nuestros, la ineficacia total de sulfamidas frente a estas algas y la escasa actividad de los quimioterápicos de síntesis, ya que no fueron activos los nitrofuranos (nitrofurantoína, nitrofurazolidona) ni los derivados tipo quinolonas (ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido piromídico, ácido pipemídico y flumequina), al igual que tampoco el trimetoprim.

Tan sólo la mandelamina y la quinoleína han resultado activos *in vitro*.

Segal (10) encuentra que los antifúngicos poliénicos, nistatina y anfotericina B, son activos frente a la *Prototheca stagnora*, y los imidazólicos tienen una actividad variable, dando como resistente al miconazol. No tienen asimismo, ninguna actividad la 5-fluorcitosina y la griseofulvina.

Nuestros resultados, en este sentido, pueden considerarse equiparables a los comentados.

En relación con otros antifúngicos, ya existe mayor actividad, pues, a excepción de la resistencia a la 5-fluorcitosina y la griseofulvina, los demás presentaron cierta actividad, lo que hace que sean estos antifúngicos las drogas con las que habrá que proseguir las investigaciones junto con nuevos compuestos que vayan apareciendo, ya que parece ser el campo más prometedor de todos los ensayados.

Agradecimientos

A los Dres. Ajello, L., Mycology Division, CDC, Public Health Service, Atlanta, Georgia 30.333, USA y Ball, E. H., Medical Mycology Section, University of Glasgow, G 11, Scotland, por las cepas que nos facilitaron para este estudio.

Al Dr. Kaplan, Mycology Division, CDC, Public Health Service, Atlanta, Georgia 30.333, USA, por la amable confirmación que hizo de nuestras cepas por fluorescencia.

Bibliografía

1. Casal, M. 1979. Contribución al estudio y diagnóstico microbiológico de las algas patógenas para el hombre del género *Prototheca*. Laboratorio, 401. 421-29.
2. Casal, M. 1979. La prototecosis como nuevo cuadro clínico. Med. Clin., 5, 215-17.
3. Casal, M., y Gutiérrez, J. 1981. Investigación preliminar de la acción inhibidora *in vitro* de los antibióticos frente

a las algas del género *Prototheca*. Mycopathologia, 75, 45-59.

4. CASAL, M., y GUTIÉRREZ-AROCA, J. 1981. Estudio de la acción inhibitoria *in vitro* de los antibióticos frente a las algas potencialmente patógenas de la especie *Prototheca zopfii*. Laboratorio, 72, 449-59.

5 CASAL, M., and SOLÍS, F. 1981. Firts isolation of *Prototheca* species in Spain. Mycopathologia, 74, 55-56.

6. CASAL, M.; SOLÍS, F.; LINARES, M.ª J., y GUTIÉRREZ, J. 1981. Contribución al estudio de la presencia en España de las algas potencialmente patógenas para el hombre del género *Prototheca*. Aspectos diagnósticos y de resistencia. Laboratorio, 72, 511-23.

7. DAVIES, R. R.; SPENCER, H., and WAKELIN, P. O. 1964. A case of human prototheco sis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg., 5, 448-51.

8. KRUGER, W. 1894. Kurz characteristik einiger niederen organismen in saftflüsse de laubbaume. I. Über einen neven pitz-typus reprasentieert durch die Gattung *Prototheca* (*P. moriformis, P. zopfii*). II. Über zwei aus saftflusses rein gezüchtet algen. Hedwigia, 33, 241.

9. MUSACCHIO, A.; VIOLANTE, V., e VUOTTO, M. L. 1976-1977. Prove preliminari di sensibilità agli antibiotici di alcuni ceppi di alghe del genere *Prototheca*. Estratto da Delpinoa, 18-19.

10. SEGAL, E.; PADINE, A. A., and AJELLO, L. 1976. Susceptibility of *Prototheca* species to antifungal agents. Antimicrob. Ag. Chemother., 10, 75-79.

LYSINE ACCUMULATION FROM HYDROCARBON BY *MICROCOCCUS VARIANS* 2FA, UNDER DIFFERENT CULTURAL CONDITIONS

S. K. SEN, MANIKA CHATTERJEE and S. P. CHATTERJEE
Microbiology Laboratory, Department of Botany, Burdwan University, Burdwan-713104 (India)

SUMMARY

A lysine producing hydrocarbon utilizer isolated from soil was identified to be a strain of *Micrococcus varians*. The strain is able to grow and accumulate lysine in purely synthetic medium though supplementation of the synthetic medium stimulates growth and lysine yield. The fermentation period could be prolonged by adjustment of pH to the neutral range. Among the different hydrocarbon and nitrogen sources tested straight run gas oil (4 %) and ammonium sulphate (0.4 %), respectively, were found most suitable. Neomycin at 0.1 μg ml^{-1} inhibited growth but stimulated lysine excretion and an inoculum level of 10 % (v/v) of the medium was found to be optimal. The yield of lysine under optimal condition was found to be 2.6 g l^{-1} of the medium. Lysine has been isolated in crystalline form and found to be pure sample of l-isomer.

RESUMEN

Se ha aislado del suelo un microorganismo identificado como *Micrococcus varians*. Esta cepa acumulaba lisina cuando crecía en un medio sintético sobre hidrocarburos. Cuando este medio sintético se enriquecía, se conseguía estimular el crecimiento y aumentar el rendimiento de lisina. El período de fermentación se podía prolongar ajustando el pH al rango neutro de la escala. Entre las diferentes fuentes hidrocarbonadas y nitrogenadas ensayadas, se hallaron como las mejores el gasóleo (4 %) y el sulfato amónico (4,4 %), respectivamente. La neomicina, a una concentración de 0,1 μg ml^{-1}, inhibía el crecimiento, pero estimulada la excreción de lisina. El inóculo se ha empleado en la proporción de 10 % (v/v) en relación con el medio, proporción óptima. El rendimiento en lisina en condiciones óptimas era de 2,6 g l^{-1} de medio. La lisina ha sido aislada en forma cristalina y consiste en el l-isómero en forma pura.

Introduction

Lysine possess the distinction of being one of the earliest amino acids to be produced by microbial fermentation. Since Kinoshita et al. (1958) observed that homoserine auxotroph of *Micrococcus glutamicus* accumulates lysine in the medium, a large number of *M. glutamicus* auxotrophs having block in lysine pathway or even in unrelated pathway have been reported to accumulate lysine in medium (11). Extracellular production of lysine is not confined to any particular group of microorganisms, though the high yielding strains are mostly species of *Corynebacterium* and *Brevibacterium* (7). Lysine production from hydrocarbons has been reported with *Mycobacterium smegmatis* (15), *C. hydrocarboclastus* (12), *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *A. paraffineus* and *B. ketoglutamicum* (10) *Nocardia* sp. (8) and *M. luteus* (6). Present communication reports extracellular lysine accumulation by *M. varians* 2Fa, under different cultural conditions.

Materials and methods

The lysine producing organism used in the present investigation was isolated from local soil (13). The basal medium used in the experiments was a solution of inorganic salts (9). Hydrocarbons, sterilised by filtration (Jena G5) was added to the medium as the C-source. The stock culture of the organism was maintained on agar slants of the same medium.

Inoculum for the experiments was prepared from 24-h old slant culture. In order to study the effect of different cultural conditions, the organism was grown in triplicates in 50 ml medium contained in 250 ml Erlenmeyer flasks and incubated at 30 ± 1 °C on a rotary shaker (3 cm amplitude and 120 rpm^{-1}). Growth was measured by dry weight of the thoroughly washed bacterial cells. For this purpose suitable volume of bacterial culture was centrifuged at 8000 × g for 20 min. To remove the residual hydrocarbon from the bacterial cells, the cells were washed twice with ether and acetone (1:3, v/v) and centrifuged as earlier. The sediment so obtained was dried to a constant weight in an oven at 60 °C. Lysine produced in the culture medium was estimated by the colorimetric method of Work (16) and by the microbiological assay using lysine auxotroph of *Candida guilliermondii* (5).

Results and discussion

Effect of pH on lysine yield

To find out the suitable pH for lysine excretion, an experiment was designed with 3 sets of flasks in which pH was unregulated in the first, 0.1 % $CaCO_3$ was used in the medium for neutralizing the acid in the second, and in the third, pH was kept near neutrality by adding 6N NaOH as indicated by the colour change of bromothymol blue incorporated in the medium. From the *table 1* it is evident that by regulating the pH of the medium by periodic neutralization, the active growth period of the strain could be prolonged upto 84 h, whereas, in the unregulated culture this lasted for about 48 h. Moreover, in the culture where the pH was effectively regulated it was possible to achieve an increase of 51 % in the yield of lysine above the control.

Table 1. Effect of regulation of pH of the medium on growth (*) *and lysine* (**) *production*

pH regulation	Parameter	Incubation period, h								
		0	12	24	36	48	60	72	84	96
Unregulated	Growth	0.8	19	51	92	108	114	113	113	113
	Lysine				0.19	0.27	0.57	0.64	0.63	0.63
+ 0.1 % $CaCO_3$	Growth	0.8	21	49	92	116	128	131	131	131
	Lysine				0.18	3.32	0.62	0.80	0.80	0.80
+ 0.1 % $CaCO_3$	Growth	0.8	24	69	112	121	130	139	144	144
+ 6 N NaOH	Lysine				0.18	0.39	0.63	0.83	0.95	0.95

(*) Dry mass mg/100 ml. (**) mg/ml.

Table 2. Effect of different hydrocarbon (*) *sources for growth* (**) *and lysine* (***) *production*

Hydrocarbon source	High speed diesel	Kerosene	Petrol	Straight run gas oil	Hexane	Hexadecane
Growth	99	54	25	110	17	32
Lysine	0.57	0.29	0.13	0.61	0.08	0.53

(*) 2 % (v/v). (**) Dry mass, mg/100 ml. (***) mg/ml.

Table 3. Effect of different nitrogen (*) *sources on growth* (**) *and lysine* (***) *production*

Nitrogen source	Ammonium sulphate	Ammonium chloride	Ammonium nitrate	Potassium nitrate	Urea
Growth	105	92	86	58	64
Lysine	0.59	0.53	0.47	0.30	0.44

(*) 0.42 g N l^{-1} (≡ 0.2 % ammonium sulphate). (**) Dry mass, mg/100 ml. (***) mg/ml.

Effect of C and N sources

In order to find out a suitable hydrocarbon source for growth and lysine production, a number of hydrocarbons high speed diesel, straight run gas oil, hexane and hexadecane were tested at 2 % (v/v) level. All the hydrocarbon sources were utilized (*table 2*) for growth. Straight run gas oil was found to be the best C-source. High speed diesel and hexadecane were also found to be good substrates. Hexane was poorly utilized.

To study the suitability of different nitrogen sources the basal medium without ammonium sulphate was supplemented with different nitrogen sources to reach a final nitrogen concentration of 0.42 g l^{-1} (≡ 0.2 % ammonium sulphate). Straight run gas oil at 2 % (v/v) was used as carbon source. Ammonium sulphate was found (*table 3*) to be the best for lysine production. Potassium nitrate was proved to be a poor nitrogen source though the strain is able to reduce nitrate (13). Ammonium sulphate was shown to be a good nitrogen source also for a lysine producing auxotroph of *Micrococcus glutamicus* hydrocarbon utilizing *M. luteus* (6).

For testing whether lysine accumulation could be increased by varying the concentration of these hydrocarbons and nitrogen sources experiments were done by keeping the conditions such as pH at the optimum level.

By increasing the hydrocarbon and nitrogen concentration growth and lysine production could be increased (*table 4*). Straight run gas oil at 4 % level and high speed diesel at 2 % level are optimal for lysine production. In both the cases further increase in hydrocarbon concentration does not stimulate production. Similarly, the optimal concentration of

Table 4. Effect of different concentrations of carbon (*) *and nitrogen* (**) *sources on growth* (***) *and lysine* (****) *production*

Concentrations %	Hydrocarbon source				Concentrations g N l^{-1}	Nitrogen source			
	High speed diesel		Straight run gas oil			Ammouium sulphate		Ammonium chloride	
	Growth	lysine	Growth	lysine		Growth	lysine	Growth	lysine
1	104	0.59	109	0.61	0.42	187	1.19	159	1.01
2	121	0.79	131	0.86	0.84	218	1.85	174	1.09
4	119	0.74	176	1.19	1.26	225	1.71	175	0.98
6	107	0.63	181	1.17	1.86	221	1.59	172	0.91

(*) % (v/v). (**) g N 1^{-1}. (***) Dry mass, mg/100 ml. (****) mg/ml.

ammonium sulphate was found to be 0.84 g N l^{-1} (0.4 %, v/v). In all the levels ammonium sulphate proved to have a distinct superiority over ammonium chloride.

Effect of antibiotics

A number of different antibiotics, which are known to affect the permeability of the bacterial cell wall were tested, with the hope that at sublethal concentrations they might enhance the accumulation of lysine. Basal medium, containing optimal concentration of carbon and nitrogen, was used keeping pH at the neutral range of antibiotics. The flasks in triplicates were inoculated as earlier and incubated for 90 h on a rotary shaker. All the antibiotics tested (*table 5*) inhibited growth and stimulated lysine excretion to varying extent. The optimal concentrations were for penicillin at 1 IU ml^{-1} and for bacitracin, neomycin and for erythromycin at 0.1 µg ml^{-1}. Under the optimal concentration of neomycin lysine production was increased to 26.4 % over the control.

Table 5. Effect of antibiotics on growth (*) *and lysine* (**) *production*

Antibiotie	Concentration	Growth	Lysine
Bacitracin (µg ml^{-1})	0.1	203	2.09
	1.0	195	1.91
	10.0	186	1.70
Erythromycin (µg ml^{-1})	0.1	205	2.32
	1.0	197	2.23
	10.0	191	1.88
Neomycin (µg ml^{-1})	0.1	208	2.39
	1.0	201	2.21
	10.0	189	1.78
Penicillin (IU ml^{-1}	1.0	198	2.27
	10.0	198	2.22
	50	92	0.80
Control	—	196	1.89

(*) Dry mass, mg/100 ml. (**) mg/ml.

Several kinds of antibiotics have been used in lysine fermentation for increasing yield. Shigato (14) used erythromycin and oleandomycin with *Micrococcus glutamicus*. Higher yields were obtained also by Bucko *et al.* (3) with an auxotroph of *M. glutamicus* by using mycelial extracts of *Penicillium chrysogenum* and *Streptomyces aureofaciens* for penicillin and streptomycin, respectively. Chatterjee and Banerjee (4) reported stimulation of lysine production by *Bacillus megaterium* and *B. coagulans* using neomycin and erythromycin. Ajinomoto Co. Inc. (1) reported increase of lysine production by *Brevibacterium, Corynebacterium* and *Microbacterium* by incorporating antibiotics in the fermentation medium. Chatterjee and Chatterjee (6) reported that erythromycin could increase yield with *M. luteus*. The exact role played by antibiotics in obtaining increased lysine yield is not well understood, although some workers (2) ascribed this increased excretion due to the alteration of cell membrane permeability by the antibiotics.

Optimal dose of inoculum

For determination of optimal dose different amounts of inoculum were tried. It was observed (*table 6*) that increase in the inoculum does resulted in the increase of growth and lysine production with an optimum level of

10 % (v/v). Further increase of the inoculum size did not improve lysine yield.

Table 6. Effect of different levels of inoculum (*) *on growth* (**) *and lysine* (***) *production*

Inoculum	2	5	7	10	15
Growth	192	208	223	244	256
Lysine	2.22	2.39	2.47	2.60	2.45

(*) % (v/v), 24 h old cell suspensión. (**) Dry mass, mg/100 ml. (***) mg/ml.

It was observed in the experiment in general, that the optimal levels of different factors, both lysine accumulation and growth of the organism went in parallel. This indicated that the lysine production was a function of total biomass in the culture. By adjustment of various cultural conditions, the strain producing lysine (13) 510 mg l^{-1} was induced to yield 2.60 g l^{-1}. Thus it was possible to achieve an increase of about 500 %. A comparison of the yield with those reported by others from hydrocarbon reveals that the yield of the isolate is not unsatisfactory. A further increase in the yield can be attempted, however by isolating high yielding mutants and by other biochemical genetical manoeuverings.

Homogeneity of the isolated lysine

That the isolated sample of lysine represents a single compound was tested by paper chromatography using six different solvent systems and co-chromatography with authentic sample of l-lysine. That the isolated lysine was a pure sample of l-isomer was proved by microbiological assay using *Candida guilliermondii (figura 1).*

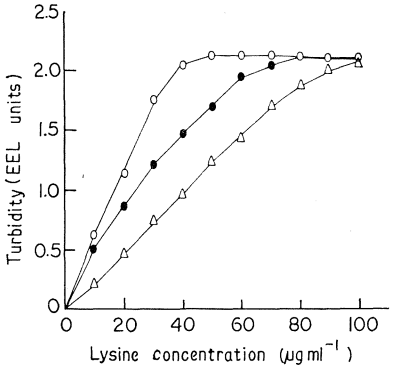

Figure 1. Microbiological assay curves. l (-○-), *dl* (-△-), *and isolated sample of lysine* (-●-). *10 ml of sterile basal medium with 1 % glucose were used in 25 ml flasks. Stock solution of lysine (l, dl and the isolated sample) were added separately to make a graded concentration with control flasks without lysine. The flasks were inoculated with a* Candida guillier mondii *lysine auxotroph and growth was measured turbidimetrically after 30 h shaking at 30 °C*

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. A. K. Banerjee, Professor and Head of the Department of Botany, Burdwan University for his interest and valuable suggestions. The authors are grateful to the U.G.C. India for their financial assistance. The authors are thankful to M/S Barauni Refinaries, Bihar for supplying straight run gas oil free of cost. The authors are also thankful to Dr. B. K. Sinha.

REFERENCES

1. Ajnomoto Co. Inc. 1977. l-Lysine production. GB 1449,087 ('76).
2. BIRNBAUM, J., and DEMAIN, A. L. 1969.

Conservation of citrate to extracellular glutamate by penicillin treated resting cells of *Corynebacterium glutamicum*. Agr. Biol. Chem., 33, 1169-73.

3. Bucko, M.; Zajicek, J.; Dasek, J.; Hano, A.; Verga, V.; Okanik, B., and Salka, J. 1971. Biosynthetic production of l-lysine. Czech., 142, 797.
4. Chatterjee, S., and Banerjee, A. K. 1973. Influence of B-vitamins on growth and extracellular lysine accumulation by *Bacillus megaterium* C II 19. Indian J. Microbiol., 12, 142-46.
5. Chatterjee, S., and Banerjee, A. K. 1975. Production of extracellular lysine by a strain of *Bacillus coagulans*. Folia Microbiol., 20, 46-51.
6. Chatterjee, M., and Chatterjee, S. P. 1982. Lysine production from hydrocarbon by a *Micrococcus* sp. Acta Biotechnol., 3, 187-98.
7. Demain, A. L. 1971. Microbial production of food additives. Symp. Soc. Gen. Microbiol. XXI, 1, 77-101.
8. Kyowa Fermentation Industry Co. Ltd. 1976. Production of lysine, GB 1, 446, 987.
9. Makula, R., and Finnerty, W. R. 1968. Microbial assimilation of hydrocarbons. I. Fatty acids derived from n-alkanes. J. Bacteriol., 22, 1156-58.
10. Miyamura, Y.; Arai, T., and Matsura, M. 1972. Fermentative preparation of amino acids. Japan, 7202, 546.
11. Nakayama, K.; Kitada, S.; Seto, Z., and Kinoshita, S. 1961. Induction of nutritional mutants of glutamic acid producing bacteria and their amino acid accumulation. J. Gen. Appl. Microbiol., 7, 41-51.
12. Nakayama, K. 1972. Fermentation preparation of l-lysine. Japan, 7202, 547.
13. Sen, S. K.; Chatterjee, M., and Chatterjee, S. P. 1982. Microbial production of amino acids from hydrocarbon. Biol. Bull. Ind., 4, 131-35.
14. Shigato, M. 1963. L-Lysine. Japan, 26, 943.
15. Tanaka, K.; Oshima, K.; Tokro, Y., and Okii, M. 1971. l-Lysine by hydrocarbon fermentation. Japan, 7, 125, 711.
16. Work, E. 1962. Methods Enzymol., 5, 864.

TRANSPOSICION DE TN10 A LA REGION XYL-MTL (MINUTO 78) DEL CROMOSOMA DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

A. CONTRERAS y J. CASADESÚS

Departamento de Genética de la Facultad de Biología. Universidad de Sevilla

RESUMEN

Se aislaron 4095 transposiciones independientes de Tn10 de un plásmido F-prima termosensible (F'114ts *lac zzf*: : Tn10) al cromosoma de *Salmonella typhimurium*. Se construyó un mapa de las inserciones de Tn10 localizadas cerca de *mtl* y/o *xyl* (minutos 77 y 78) mediante transducción con el fago P22. Las inserciones cotransducibles con *mtl* y/o *xyl* son menos frecuentes de lo esperado (0,4 % de las inserciones en 2 % del cromosoma); ello puede reflejar o una escasez de dianas para Tn10, o la existencia de muchos genes vitales en esta región. Una de las estirpes estudiadas ha sufrido una reordenación genética, interpretada como la inversión, inducida por Tn10, de un segmento cromosómico que engloba el operón *mtl*. Dos estirpes resultaron parcialmente refractarias a la mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, lo cual sugiere que la región del minuto 78 del cromosoma de *S. typhimurium* puede contener un gen homólogo del gen *inm* de *Escherichia coli*.

SUMMARY

A total of 4095 independent transpositions of Tn10 from a thermosensitive F-prime vector (F'114ts *lac zzf*: : Tn10) to the chromosome of *Salmonella typhimurium* were isolated. Tn10 insertions near the *xyl* and *mtl* markers (minutes 77-78 of the chromosome map) were mapped by transduction with phage P22. The frequency of Tn10 insertions in this region was lower than expected (0.4 % of the insertions in 2 % of the chromosome) reflecting either a scarcity of Tn10 targets or the presence of many essential genes in this region. One of the strains studied had suffered a genetic rearrangement, perhaps a Tn10-induced inversión of a chromosomal segment

containing the *mtl* operon. Two strains proved to be partially refractory to mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, suggesting that the 78 minute region of the *S. typhimurium* chromosome may contain a gene homologous to the *inm* gene of *Escherichia coli*.

Introducción

La región *xyl-mtl*, situada en el minuto 78 del mapa cromosómico de *Salmonella typhimurium* (19), es aparentemente homóloga, al menos en cuanto al orden de genes, del minuto 79 del cromosoma de *Escherichia coli* (2). En ambos organismos, el número de marcadores conocidos en esa región y en sus alrededores es más bien escaso, aunque algunos son tan interesantes como la mutación *inm-1* en *E. coli* (17), y en *Salmonella* algunos cistrones que codifican ARN ribosómicos (1).

Una estrategia apropiada para abordar el estudio de regiones poco conocidas del cromosoma bacteriano, consiste en aprovechar las propiedades de las secuencias de ADN transponible (y muy particularmente de los transposones de resistencia a antibióticos) para llevar a cabo operaciones de ingeniería genética *in vivo* (5-6, 12). El trabajo que presentamos describe el aislamiento y la caracterización de inserciones del transposón Tn10 en las proximidades de los marcadores *xyl* y *mtl* (minutos 77 y 78) en el cromosoma de *Salmonella typhimurium*. Tn10 es un transposón que confiere resistencia a la tetraciclina, originario del plásmido R100 de *Shigella* (8). Posee una longitud total de 9300 pares de bases (pb), con terminaciones invertidas de 1400 pb (10-11). Es uno de los transposones más utilizados para llevar a cabo manipulaciones genéticas *in vivo* en las bacterias, y constituye una herramienta analítica de fácil y amplio manejo (5-6, 12, 16); en ello se basa su elección para este trabajo.

Material y métodos

Estirpes bacterianas

Véase la *tabla 1*.

Bacteriófago

P22 *int7* HT (20).

Medios de cultivo

Para la preparación de caldo de Luria, agar nutritivo, agar de cobertera, agar mínimo y suplementos nutritivos, se emplearon las recetas descritas por Miller (13).

Para preparar agar de MacConkey se utilizó el preparado base de Difco, añadiendo xilosa, manitol o lactosa (10 g/l). El medio MacConkey con xilosa y manitol contiene 8 g/l de cada azúcar. El agar mínimo con arabinosa, glucosa y nitrosoguanidina tiene una base de unos 20 ml de agar mínimo con arabinosa (2 g/l), suplementado con los requerimientos de la estirpe SV303 o derivadas, y una capa superior de 5 ml de agar semiblando (7 g/l) de la misma composición, que además contiene 5 µg/ml de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Sigma) y 0,4 g/l de glucosa.

Antibióticos

Tetraciclina (Sigma), 25 μg/ml. Sulfato de estreptomicina (CEPA), 100 μg/ml.

Mutagénesis con nitrosoguanidina

En el método usual de mutagénesis en tampón tris-maleato (9) se exponen las células a 100 μg/ml de nitrosoguanidina durante 30 min, sin aireación, a 37 °C.

En el tratamiento «crónico» con nitrosoguanidina, se replican las colonias a ensayar sobre agar mínimo con arabinosa, glucosa y nitrosoguanidina. En el tratamiento «crónico» se usan la estirpe SV303 y derivadas, que incluyen en su fondo genético la mutación *araD531* (18). Esta mutación impide el crecimiento en medios con arabinosa y glucosa; la reversión a Ara^R es apropiada para realizar estudios cuantitativos de mutagénesis (18).

Preparación y titulación de suspensiones del fago P22 int7 *HT*

La preparación de suspensiones fágicas y su titulación por recuento de unidades formadoras de placa, se llevaron a cabo siguiendo a Davis y cols. (6).

Transducción y análisis de cotransducción

La transducción mediada por el fago P22 *int7* HT se efectuó según el método dsecrito por Davis y cols. (6). Para realizar los análisis de cotransducción, los transductantes se replicaron con palillos estériles sobre los medios selectivos apropiados.

Obtención de inserciones independientes de Tn10 en el cromosoma de Salmonella typhimurium

Se incubaron suspensiones de unas mil células Lac^+ de la estirpe SV310 en 2 ml de caldo Luria con tetraciclina durante 48 h, a 42 °C, y se sembraron muestras en agar MacConkey con lactosa y tetraciclina. Como el plásmido F'114ts *lac zzf*: : Tn10 no se replica a 42 °C, las colonias resultantes suelen haber integrado el transposón Tn10 del plásmido en su cromosma. De cada suspensión se conservó sólo una colonia Lac^- Tc^R, para asegurar la recolección de inserciones independientes.

Caracterización de mutantes auxótrofos

Para determinar los requerimientos de los auxótrofos se siguió el método descrito por Davis y cols. (6).

Nomenclatura

Las denominaciones de marcadores cromosómicos de *Salmonella* se adjuntan a la nomenclatura usada por Sanderson y Hartmann (19). La nomenclatura de elementos transponibles sigue las recomendaciones de Campbell y cols. (3). La denominación de las inserciones cromosómicas de Tn10 sigue las normas propuestas por Chumley y cols. (5).

Resultados

Transferencia del plásmido F'114ts lac zzf : : *Tn10 a* Salmonella typhimurium *SV303*

El plásmido fue transferido de la estirpe NK1015 a SV303 utilizando la técnica de conjugación en membrana. Los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo con tetraciclina, treonina y triptófano. La frecuencia de transferencia fue de 10^{-1} por donador, aproximadamente. Varias colonias transconjugantes fueron estudiadas para comprobar que conservaban el fondo genético de la estirpe parental SV303 y que eran, además, Lac^+ Tc^R. Una de esas colonias, elegida arbitrariamente, dio origen a la estirpe SV310

Transposición de Tn10 al cromosoma de Salmonella typhimurium *SV310*

La pretensión de coleccionar inserciones independientes de Tn10 en el cromosoma bacteriano utilizando un vector F-prima, aconseja seleccionar una sola colonia Lac^- Tc^R de cada cultivo obtenido en condiciones restrictivas para el mantenimiento del plásmido. Cumpliendo este requisito, se aislaron 4095 inserciones independientes de Tn10. La heterogeneidad de dichas inserciones fue comprobada mediante pruebas de auxotrofía. De los 4095 aislamientos, 27 (0,6 %) eran auxótrofos, claramente heterogéneos: 1 Arg^-, 2 Cys^-, 2 His^-, 4 Ilv^-, 1 Leu^-, 1 Lys^-, 3 Met^-, 1 Pro^-, 3 Pyr^-, 1 Pur^-, 1 Ser^-, 1 Tyr^- y 6 no identificados. La frecuencia de un 0,6 % de auxótrofos es ligeramente inferior a las descritas usando fagos P22 defectivos o semidefectivos como vectores de Tn10 (5-6, 12). De todos modos hay que tener en cuenta que el fondo genético de la estirpe SV310 impide detectar transposiciones Thr^- y Trp^-; ello puede influir en la frecuencia global de auxótrofos.

Detección de inserciones de Tn10 cotransducibles con mtl *y/o* xyl

Se utilizó una variante de la técnica de mutagénesis local descrita por Kleckner y cols. (12). Los 4095 aislamientos Lac^- Tc^R fueron divididos arbitrariamente en lotes de 100. Con cada lote se preparó un cultivo mezclado en caldo de Luria y se lisó con fago P22 *int7* HT. Una vez titulados, estos lisados sirvieron para llevar a cabo transducción utilizando SV315 y/o SV390 y SV391 como estirpes receptoras. Los transductantes fueron seleccionados en agar de MacConkey suplementado con tetraciclina y manitol y/o xilosa. La frecuencia de transducción de la resistencia a la tetraciclina (Tn10) varió entre 10^{-5} y 10^{-4}. La cotransducción de Tn10 con los alelos silvestres xyl^+ y/o mtl^+ fue detectada por el color rojo de las colonias. El número de transductantes Tc^R observados en cada experimento varió entre 2000 y 20000. Sólo 17 de las 41 transducciones dieron lugar a la aparición de colonias en las que aparentemente Tn10 había cotransducido con mtl^+ y/o xyl^+. Frecuentemente, en un mismo experimento se observó más de una colonia de este tipo, pero sólo una de ellas fue aislada y conservada para su estudio, con el fin de evitar la recolección de inserciones repetidas. Según su fenotipo, los 17 transductantes conservados se pueden clasificar en tres grupos: Mtl^+ Xyl^+ Tc^R, Mtl^+ Xyl^- Tc^R y Mtl^- Xly^+ Tc^R.

Situación en el mapa genético de inserciones de Tn10 cotransducibles con mtl *y/o* xyl

Los 17 transductantes mencionados en el apartado anterior (referidos como estirpes a partir de este punto e incluidos como tales en la *tabla 1*) fueron utilizados como donadores en experimentos de transducción con el fago P22 *int7* HT. Dependiendo del fondo genético de cada donador se eligió como receptora una de las estirpes SV315, SV390 o SV391. Como medio selectivo se utilizó agar de MacConkey con tetraciclina y xilosa o manitol, según los casos. La frecuencia de transducción de la resistencia a la tetraciclina (Tn10) varió entre 10^{-4} y 10^{-5},

Tabla 1. Estirpes de Salmonella typhimurium

Designación	Genotipo o fenotipo
NK1015	*pyrC* Str^R / F'114ts *lac zzf*: : Tn10
SV303	*trp-209 thr-115 araD531*
SV310	*trp-294 thr-115 araD531* / F'114ts *lac zzf*: : Tn10
SV315	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 xyl-19*
SV346	*trp-294 thr-115 araD531 zhi-1*: : Tn10
SV347	*trp-294 thr-115 araD531 zhi-2*: : Tn10
SV348	*trp-294 thr-115 araD531 zhi-3*: : Tn10
SV349	*trp-294 thr-115 araD531 zhi-4*: : Tn10
SV650	*trp-294 thr-115 araD531 zhi-5*: : Tn10
SV353	*trp-294 thr-115 araD531 zhh-1*: : Tn10
SV355	*trp-294 thr-115 araD531 zhi-6*: : Tn10
SV356	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 zhi-7*: : Tn10
SV357	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 zhh-2*: : Tn10
SV358	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 zhh-3*: : Tn10
SV359	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 zhi-8*: : Tn10
SV363	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 zhi-12*: : Tn10
SV364	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 zhi-13*: : Tn10
SV365	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 zhi-14*: : Tn10
SV366	*trp-294 thr-115 araD531 xyl-19 zhh-4*: : Tn10
SV367	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 zhh-5*: : Tn10
SV368	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-8 zhh-6*: : Tn10
SV390	*trp-294 thr-115 araD531 mtl-9*
SV391	*trp-294 thr-115 araD531 xyl-19*

La estirpe NK1015 fue proporcionada por D. Botstein (Dept. Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass.). Las estirpes restantes se describen por primera vez en este trabajo. El plásmido F'114ts *lac zzf*: : Tn10 presenta replicación termosensible (temperatura restrictiva: > 39-40 °C).

con una excepción: al utilizar como donadora la estirpe SV359 la frecuencia de transducción de Tn10 fue de 10^{-6} aproximadamente.

La cotransducción de Tn10 con *mtl* y/o *xyl* fue estimada por uno de estos dos procedimientos:

a) Recuento de la fracción colonias rojas/colonias totales (ej. cotransducción Tn10 / *xyl*$^+$ utilizando un donador Xyl$^+$ Tc^R y un receptor Xyl$^-$).

b) Recuento de la fracción colonias blancas/colonias totales (ej. cotransducción Tn10 / *mtl*-8 usando un donador Mtl$^-$ Tc^R y un receptor Mtl$^+$).

la tabla, ya que es indistinguible de SV366.

La ordenación de las inserciones de Tn10 en torno a *mtl* y *xyl* se ha llevado a cabo mediante el procedimiento clásico de los cruces de tres factores. Para ello se determinó el porcentaje de cotransducción entre *mtl* y *xyl*, utilizando la estirpe SV303 como donadora y SV315 como receptora. Se seleccionaron transductantes Xyl$^+$ en medio mínimo con xilosa y fueron replicados en agar de MacConkey con manitol. La frecuencia de cotransducción es de un 11 %. La transformación

Tabla 2. Cotransducción de algunas inserciones de Tn10 con mtl *y/o* xyl

Donador	Número de cotransductantes/Número de colonias observadas		Denominación provisional de la inserción
	Con *mtl*	Con *xyl*	
SV346	21/5645 (1 %)	2/3841 (1 %)	*zhi*- 1 : : Tn10
SV347	682/6269 (10 %)	0/5600	*zhi*- 2 : : Tn10
SV348	307/3840 (8 %)	0/4500	*zhi*- 3 : : Tn10
SV349	391/1804 (21 %)	0/2200	*zhi*- 4 : : Tn10
SV350	138/495 (27 %)	0/1500	*zhi*- 5 : : Tn10
SV353	0/1900	6/347 (2 %)	*zhh*- 1 : : Tn10
SV355	46/292 (16 %)	244/1042 (23 %)	*zhi*- 6 : : Tn10
SV356	42/1702 (3 %)	0/2000	*zhi*- 7 : : Tn10
SV358	36/3706 (1 %)	4216/4274 (98 %)	*zhh*- 2 : : Tn10
SV359	52/1600 (3 %)	80/4820 (2 %)	*zhi*- 8 : : Tn10
SV363	502/4300 (11 %)	1/4000	*zhi*-12 : : Tn10
SV364	54/2190 (3 %)	0/2000	*zhi*-13 : : Tn10
SV365	30/3911 (1 %)	0/3300	*zhi*-14 : : Tn10
SV366	0/2000	1771/2580 (68 %)	*zhh*- 4 : : Tn10
SV367	0/750	182/301 (60 %)	*zhh*- 5 : : Tn10
SV368	0/390	264/326 (81 %)	*zhh*- 6 : : Tn10

Los resultados de la situación en el mapa genético por cotransducción se resumen en la *tabla 2*. Una de las estirpes de partida ha sido excluida de

de los porcentajes de ligamiento en distancias físicas se efectuó por medio de la fórmula de Wu (22). El mapa resultante es el de la *figura 1*.

Dos inserciones han sido excluidas del mapa. Una de ellas, *zhi-1*: : Tn10, cotransduce muy poco con *mtl* y *xyl*, a pesar de haber sido detectada en un transductante Mtl$^+$; tal vez, dicho transductante surgió de una doble transducción. Otra inserción, *zhi-8*: : Tn10, es de localización dudosa: cotransduce con *xyl* (2 %) y con *mtl*

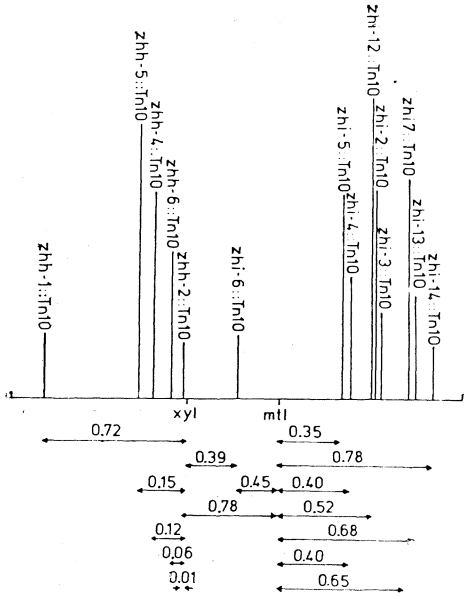

Figura 1. Mapa genético de las inserciones de Tn10 que cotransducen con mtl *y/o* xyl. *Mediante la fórmula de Wu (22) los porcentajes de cotransducción se han transformado en las distancias genéticas que se indican sobre las flechas*

(3 %). Estos porcentajes son demasiado bajos para admitir que se halle entre *mtl* y *xyl* y uno de los dos es demasiado alto para situarla fuera del tramo *xyl-mtl*. Como hipótesis de trabajo se admitió la posibilidad de que Tn10 se hallara realmente entre *xyl* y *mtl*, y que su inserción hubiera ocasionado la integración de un fragmento del vector (fragmento que no contendría el operón *lac*, ya que SV359 es Lac$^-$). Si ello fuera cierto, el alargamiento del tramo *xyl-mtl* debería ser detectable por cotransducción: al usar la estirpe SV359 como donadora la cotransducción entre *xyl* y *mtl* debería ser baja o nula.

Para ensayar esta hipótesis se llevó a cabo una transducción usando SV359 como estirpe donadora y SV391 como receptora. Se aislaron independientemente transductantes Xyl$^+$ y Tc^R. La frecuencia de transductantes Tc^R fue de 10^{-6} aproximadamente (como siempre que el lisado transductor procede de SV359). En contra de la hipótesis propuesta, la frecuencia de cotransducción entre *xyl*$^+$ y *mtl-19*, no sólo no disminuía, sino que aumentaba hasta un 65-70 %. Por tanto, la inserción *zhi-8*: : Tn10 no se halla entre *mtl* y *xyl* y estos marcadores parecen hallarse anormalmente próximos en SV359. Estos datos sugieren que Tn10 ha originado una reordenación cromosómica en la región estudiada. No es probable que se trate de una deleción, ya que Tn10 no se halla entre *xyl* y *mtl* (el orden parece ser *xyl* - *mtl* - Tn10). Parece más razonable suponer que Tn10 haya originado la inversión de un segmento cromosómico que engloba *mtl*. La falta de homología sería la causa del descenso en la frecuencia de transducción del segmento invertido, y la aproximación entre *xyl* y *mtl* sería consecuencia de la inversión.

Ensayos para la identificación de los genes afectados por la inserción de Tn10

Las estirpes que contienen una copia de Tn10 en la región estudiada fueron sometidas a tres tipos de ensayos:

1. Pruebas de auxotrofía. Todas las estirpes son protótrofas.

2. Utilización de ácidos dicarboxílicos. Las estirpes que contienen una copia de Tn10 a la izquierda de *xyl* (es decir en el minuto 77) crecen normalmente en agar mínimo con 2 g/l de succinato como única fuente de carbono. Por tanto, ninguna de las inserciones estudiadas ha inactivado el gen *dctA* (14).

3. Mutabilidad por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Todas las estirpes que llevan una copia de Tn10 en la región estudiada se sometieron a tratamiento «crónico» con este mutágeno y se compararon con la estirpe parental SV303. Sólo las estirpes SV358 y SV359 produjeron menor número de colonias Ara^R que SV303. En vista de este resultado, se estudió con más detalle la mutabilidad de esas estirpes.

Tabla 3. Mutabilidad de las estirpes SV303, SV358 y SV359 con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina: detección de reversiones Ara^R

Estirpe	Frecuencia de revertientes Ara^R	
	Espontánea	Inducida
SV303	$1{,}2 \times 10^{-6}$	$1{,}0 \times 10^{-3}$
SV358	$2{,}3 \times 10^{-6}$	$6{,}0 \times 10^{-4}$
SV359	$1{,}9 \times 10^{-6}$	$4{,}3 \times 10^{-4}$

Cada frecuencia es la media de 3-4 experimentos. Para determinar las frecuencias inducidas por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, los supervivientes a un tratamiento agudo con el mutágeno fueron lavados, diluidos y sembrados sin recrecimiento en el medio selectivo apropiado.

Los datos de las *tablas 3-4* confirman que SV358, y sobre todo SV359, son menos mutables por nitrosoguanidina que la estirpe parental SV303.

Discusión

En la vecindad de *mtl* y *xyl* se producen relativamente pocas inserciones de Tn10. Teniendo en cuenta la cantidad de ADN que cabe en la cápsida del fago P22, cabría esperar que cualquier inserción de Tn10 que estuviera situada hasta a 1 min de distancia de *mtl* o *xyl* sería cotransducible con uno de estos marcadores. La zona de cotransducción tendría por tanto una extensión de al menos 2 min. Si las dianas de Tn10 estuvieran distribuidas al azar por todo el cromosoma, la región estudiada debería contener al menos el 2 % de las inserciones de Tn10.

Si una proporción *p* de las inserciones de Tn10 cotransducen con *xyl* y/o *mtl*, la proporción de lotes de 100 estirpes que no incluyen ninguna de tales inserciones será $(1\text{-}p)^{100}$. En nuestros experimentos dieron resultado negativo 24 de los 41 lotes investigados. Igualando estas dos expresiones, estimamos $p = 5{,}3 \times 10^{-3}$: el intervalo de confianza del 95 % para esta estimación se extiende desde $8{,}4 \times 10^{3}$ a $3{,}3 \times 10^{-3}$, y la mejor estimación es de $5{,}3 \times 10^{-3}$ (15). Por tanto la frecuencia de inserciones cotransducibles con *mtl* o *xyl* se puede estimar en un 0,5 % frente al 2 % teórico. La frecuencia 16 inserciones / 4095 insertos (0,4 %) coincide razonablemente con la anterior. Concluimos que Tn10 se inserta cerca de *xyl* y *mtl* más raramente que en otras zonas del cromosoma; por tanto, de las 4095 inserciones cabría esperar al menos 80 co-

transducibles con *mtl* y/o *xyl*, pero sólo se han obtenido 16 ó 17; de hecho Tn10 muestra una marcada especificidad regional y la distribución de inserciones en un gen o un cúmulo de genes es imprevisible (7, 10-11). No se debe descartar la posibilidad de que la región estudiada sea pobre en dianas para Tn10, o contenga genes vitales cuya inactivación por inserción sería letal y, por tanto, indetectable.

Las inserciones de Tn10 que cotransducen con *mtl* y/o *xyl* se distribuyen de forma irregular y son especialmente abundantes en las proximidades del minuto 79. En cambio, sólo una de ellas cae dentro del segmento comprendido entre *xyl* y *mtl*. Este segmento también resulta afectado por la presunta reordenación cromosómica protagonizada por la inserción *zhi-8*: : Tn10, e interpretada como una inversión. Es conocido que Tn10 puede dar lugar a inversiones, aunque la mecánica del proceso no se conoce con detalle (16).

Se ha detectado una disminución de la mutabilidad por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en las estirpes SV358 y SV359; esta última, presunta portadora de una inversión, es cinco veces menos mutable que la estirpe parental SV303. Esta reducción es ligeramente menor que la de la estirpe SE53 de *Escherichia coli*, portadora de la mutación *inm-1* (17). La alta rezumancia sugiere que el gen *inm* no ha sido inactivado por la inserción o la inversión, sino que se ha visto afectada su expresión. El aislamiento de estas estirpes sugiere que en la región del minuto 78 del cromosoma de *Salmonella* existe, al menos, un gen cuya actividad está de algún modo relacionada con la mutabilidad por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Este gen sería homólogo del gen *inm* de *E. coli* (17).

Tabla 4. Mutabilidad de las estirpes SV303, SV358 y SV359 con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina: recuento de auxótrofos

Estirpe	Supervivencia %	Número de colonias ensayadas	Número de auxótrofos	Auxótrofos %	p
SV303	3,1	400	25	6,25	
SV358	3,4	800	16	2	$2{,}6 \times 10^{-4}$
SV359	3,0	1600	22	1,38	2×10^{-6}

Tras una exposición aguda al mutágeno y cultivo durante 2-3 generaciones, se determinó la frecuencia de auxótrofos; *p* es la probabilidad de obtener una divergencia igual o mayor respecto del resultado con la estirpe SV303 suponiendo mutabilidades idénticas según el test arcoseno sobre las proporciones (21).

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración, a veces decisiva, de las siguientes personas: Enrique Cerdá-Olmedo, Fran-

cisco del Castillo, Francisco Rivero, Rafael Garcés, David Botstein, Jordi Barbé, Asunción Fernández-Estefane, Loli Suárez y Javier Avalos.

Bibliografía

1. Anderson, P., and Roth, J. R. 1981. Spontaneous tandem genetic duplications in *Salmonella typhimurium* arise by unequal recombination between rRNA (*rrn*) cistrons. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 78, 3113-17.
2. Bachmann, B. J., and Brooks-Low, L. 1980. Linkage map of *Escherichia coli* K-12. Microbiol. Rev., 44, 1-56.
3. Campbell, A.; Berg, D.; Botstein, D.; Lederberg, E.; Novick, R.; Starlinger, P., and Szybalski, W. 1977. Nomenclature of transposable elements in prokaryotes. En A. I. Bukhari, J. A. Shapiro and S. L. Adhya (eds.). DNA Insertion Elements. Plasmids and Episomes, 15-22. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
4. Casadesús, J., and Olivares, J. 1979. Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. Mol. Gen. Genet., 174, 203-9.
5. Chumley, F. G.; Menzel, R., and Roth, J. R. 1979. Hfr formation directed by Tn10. Genetics, 91, 639-55.
6. Davis, R. W.; Botstein, D., and Roth, J. R. 1980. Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
7. Foster, T. J. 1977. Insertion of the tetracycline resistance translocation unit Tn10 in the *lac* operon of *Escherichia coli* K-12. Mol. Gen. Genet., 154, 305-9.
8. Foster, T. J.; Howe, T. G. B., and Richmond, K. M. V. 1975. Translocation of the tetracycline determinant from R100-1 to the *E. coli* K-12 chromosome. J. Bacteriol., 124, 1153-58.
9. Gomori, G. 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods Enzymol., 1, 138-46.
10. Kleckner, N.; Barker, D. F.; Ross, D. F.; Botstein, D.; Swan, J., and Zabeau, M. 1978. Properties of the translocatable tetracycline-resistance element Tn10 in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. Genetics., 90, 427-61.
11. Kleckner, N.; Chan, R. K.; Tye, B. K., and Botstein, D. 1975. Mutagenesis by insertion of a drug-resistant element carrying an inverted repetition. J. Mol. Biol., 97, 561-75.
12. Kleckner, N., Roth, J. R., and Botstein, D. 1977. Genetic engineering *in vivo* using translocatable drug-resistance elements. New methods in bacterial genetics. J. Mol. Biol., 116, 125-59.
13. Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
14. Parada, J. L.; Ortega, M. V., and Carrillo-Castañeda, G. 1973. Biochemical and genetic characteristics of the C_4-dicarboxylic acids transport system of *Salmonella typhimurium*. Arch. Mikrobiol., 94, 65-76.
15. Rohlf, F. J., and Sokal, R. R. 1969. Statistical Tables. W. H. Freeman & Co., San Francisco.
16. Ross, D. G.; Swan, J., and Kleckner, N. 1979. Physical structures of Tn10-induced deletions and inversions: role of the 1400 bp inverted repetitions. Cell, 16, 721-31.
17. Ruiz-Vázquez, R., and Cerdá-Olmedo, E. 1980. An *Escherichia coli* mutant refractory to nitrosoguanidine mutagenesis. Mol. Gen. Genet., 178, 625-31.
18. Ruiz-Váquez, R.; Pueyo, C., and Cerdá-Olmedo, E. 1978. A mutagen assay detecting forward mutations in an arabinose-sensitive strain of *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res., 54, 121-29.

19. SANDERSON, K. E., and HARTMANN, P. E. 1978. Linkage map of *Salmonella typhimurium*. Microbiol. Rev., 42, 471-519.

20. SCHMIEGER, M. 1972. Phage P22 mutants with increased or decreased transduction abilites. Mol. Gen. Genet., 119, 75-88.

21. SOKAL, R. R., y ROHL, F. J. 1969. Biometría. H. Blume ediciones, Madrid.

22. WU, T. T. 1966. A model for three-point analysis of random general transduction. Genetics (USSR), 54, 405-10.

ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS EN ESTAFILOCOCOS COAGULASA-POSITIVOS AISLADOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS

J. J. FRANCISCO-POLLEDO, L. M. GUTIERREZ, M. L. GARCIA y B. MORENO

Departamento de Higiene, Inspección y Microbiología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria. Universidad de León

Resumen

Ochenta y tres cepas de estafilococos coagulasa-positivas (80 de *Staphylococcus aureus* y 3 no clasificadas), aisladas de las fosas nasales de manipuladores de alimentos, han sido sometidas a las pruebas propuestas por Hajek y Marsalek para la subdivisión en biotipos de la especie *S. aureus*. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la población de cepas estudiadas era muy heterogénea. Unicamente el 20,4 % de las cepas correspondían en todas sus propiedades a alguno de los 6 biotipos o ecotipos propuestos. Considerando las cepas en su conjunto, 28 (33,7 %) fueron adscritas al biotipo A o próximo a A, 31 (37,3 %) eran del biotipo C o próximo a C, 12 (14,4 %) pertenecían o estaban próximas al biotipo B y 3 (3,4 %) eran del biotipo D. De las 9 cepas restantes, 2 (2,4 %) compartían propiedades de los biotipos A y D, y 7 no pudieron ser clasificadas ni siquiera de forma aproximada. Los resultados obtenidos demuestran no sólo que las cepas de *S. aureus* de origen animal pueden colonizar las fosas nasales humanas, sino también que las cepas de algunos biotipos animales se aislan más frecuentemente que las de origen humano. Este hecho, que debe relacionarse con el diario y estrecho contacto entre los manipuladores de alimentos y los animales y productos de origen animal, tiene importancia a la hora de establecer el origen inmediato de las cepas implicadas en brotes de intoxicación estafilocócica.

Summary

Eighty three strains of coagulase positive staphylococci (80 *Staphylococcus aureus* and 3 unclassified) isolated from the noses of food handlers were characterized according to the bio-

typing scheme of Hajek and Marsalek. The studied cultures formed a heterogeneous group. Only 20.4 % of the strains correlated completely with any of the six biotypes. Twenty eight cultures (33.7 %) were biotype A or similar to A, 31 (37.3 %) were biotype C or similar to C, 12 (14.4 %) were biotype B or similar to B and 3 (3.4 %) were biotype D. Of the remaining 9 strains, 2 (2.4 %) were considered as intermediate between A and D, and 7 (8.4 %) could not be classified. From these results, and the number of cells found per swab, it can be concluded that coagulase positive staphylococci from animal origin can colonize the anterior nares of humans. It was also notable that most of the strains isolated from this habitat belonged to animal biotypes. This fact can be explained taken into account that many of the human handlers sampled were closely in contact with animals and food derived from animals. Besides ecological interest, from the epidemiological point of view it is important to note that food handlers can act as a source of animal staphylococci making difficult to establish the origin of the strains involved in outbreaks of staphylococcal food poisoning.

Introducción

La complejidad de la especie *Staphylococcus aureus* y su capacidad de adaptación a diferentes hábitats, se ponen de manifiesto en la especificidad que ciertas poblaciones de cepas muestran por determinados hospedadores (3, 7-8, 12-13, 16). Basándose en este hecho, Hajek y Marsalek (7) han propuesto dividir *S. aureus* en 6 biotipos o ecotipos (A-F) en los que se incluyen cepas procedentes del hombre y de diversas especies animales. El estudio detallado de algunas propiedades químicas y bioquímicas de cepas de estafilococos coagulasa-positivas de diversos orígenes (15), ha confirmado la validez de esta subdivisión, poniendo, además, de manifiesto, que ciertos biotipos, especialmente el E y el F, poseen caracteres tan claramente diferenciados que permiten su inclusión en una nueva especie: *S. intermedius* (6).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con cepas de origen animal (5, 11), demostraron que la clasificación en biotipos es de gran utilidad en estudios ecológicos y epidemiológicos. Por lo que se refiere a los estafilococos presentes en las fosas nasales humanas, Kloos y Musselwhite (10) y Kloos (9) han señalado que *Staphylococcus aureus* es una de las especies aisladas con mayor frecuencia, indicando, además, que se multiplica activamente y limita la presencia simultánea de otros miembros del género *Staphylococcus*. Aún cuando no se han realizado estudios al efecto, cabría esperar que estas cepas de *S. aureus* perteneciesen al biotipo A (de origen humano). Teniendo en cuenta, no obstante, que los manipuladores de alimentos tienen contacto diario con productos de origen animal, e incluso a veces con los propios animales, es razonable la hipótesis de un intercambio

de cepas y de una colonización de las fosas nasales humanas por cepas de *S. aureus* de origen animal.

El objetivo principal de este trabajo ha sido determinar los biotipos a los que pertenecían 83 cepas de estafilococos coagulasa-positivas, aisladas de fosas nasales de manipuladores de alimentos, la mayoría de los cuales estaban en contacto con animales o con productos de origen animal, a fin de determinar si las fosas nasales humanas pueden ser colonizadas por cepas de estafilococos procedentes de otros hábitats. Se pone también de manifiesto la variabilidad de comportamiento bioquímico encontrada en esta población de estafilococos, atribuible al origen animal de una parte de la misma y a su adaptación a las fosas nasales humanas. Asimismo, se indican las pruebas de mayor significado en la diferenciación en biotipos.

Material y métodos

Cepas

Se han estudiado 83 cepas, todas aisladas de las fosas nasales de manipuladores de alimentos. De ellas, 32 procedían de manipuladores que trabajaban en industrias cárnicas, 12 en industrias lácteas, 9 en pescaderías, 15 en hostelería y comedores colectivos, 7 en panaderías y pastelerías y 8 en industrias diversas.

Cuantificación

Las muestras se tomaban empleando una torunda de algodón estéril que se introducía en las fosas nasales a una profundidad de 2,5-3 cm. A continuación se depositaba el hisopo en un tubo de ensayo conteniendo 5 ml de agua de peptona con 0,85 % de ClNa y, una vez desprendido el algodón, se agitaba 30 s. A partir de este tubo, se realizaban las correspondientes diluciones decimales, empleando como diluyente agua de peptona salina. Para determinar el número de células por torunda, se sembraban, por duplicado, volúmenes de 0,1 ml en la superficie de placas de agar sal manitol (Difco).

Esquema utilizado para la clasificación en biotipos

El cuadro de clasificación empleado ha sido, en esencia, el propuesto por Hajek y Marsalek (7-8), ya publicado previamente por nosotros (11) junto con las técnicas utilizadas para ensayar cada una de las propiedades (*tabla 1*), salvo la reducción del telurito y la producción del factor de agrupamiento («clumping factor»). La reducción del telurito se investigó en el medio de Baird-Parker (Oxoid) adicionado de un 5 %, v/v, de emulsión de yema de huevo telurito potásico (Oxoid). En las pruebas de producción del factor de agrupamiento, se tuvieron en cuenta las recomendaciones de Devriese y Hajek (1). Las cepas a ensayar se sembraban en agar BHI (Difco). A partir de este medio, se tomaba un asa de cultivo que, en un portaobjetos, se suspendía homogéneamente en un asa de solución salina estéril. La prueba se consideraba positiva cuando al mezclar con la suspensión anterior un asa de coagulasa plasma EDTA (Difco), se observaba la aparición de grumos, visibles macroscópicamente, en un período de tiempo no superior a 15 s.

Resultados

Todas las cepas estudiadas se hallaban en las fosas nasales en cuantía su-

perior a 10^2 células/torunda, correspondiendo la mayor frecuencia al rango 10^3-10^5 (48 cepas).

En la *tabla 1* se presentan los resultados obtenidos en las pruebas utilizadas para la adscripción a biotipos. Por lo que se refiere a la tipificación por bacteriófagos, se tipificaron 34 cepas: 16 por fagos comunes a los conjuntos humano y bovino, 12 por fagos presentes únicamente en el conjunto humano, 3 por fagos presentes únicamente en el conjunto bovino y 3 por fagos comunes a los conjuntos humano y bovino y por fagos específicos bovinos.

Los diferentes grupos establecidos, según su comportamiento con las 80 cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas, el número de cepas incluidas en cada uno y su adscripción a biotipos, se recogen en la *tabla 2*. De las 3 cepas no clasificadas en especies, una mostraba propiedades idénticas a las del grupo 4 (próx. A) y las 2 restantes eran similares a las cepas del grupo 23 (no biotipificadas).

Tabla 1. Resultados obtenidos en las pruebas utilizadas para la adscripción a biotipos de 83 cepas de S. aureus *y de 3 cepas no clasificadas aisladas de manipuladores de alimentos*

Pruebas utilizadas	*S. aureus*			No clasificadas		
	+	±	−	+	±	−
Fibrinolisina	34	5	41	3		
Pigmentos	80			3		
Coagulación del plasma humano	80			3		
Coagulación del plasma bovino	36		44	2		1
Hemolisina alfa	18		62			3
Hemolisina beta	18		62			3
Reducción del telurito	80			3		
Factor de agrupamiento	74		6	2		1
Tipo de crecimiento en agar cristal violeta	10		70			3
Bacteriófagos comunes a los conjuntos humano y bovino	16					
Bacteriófagos específicos humanos	12		46			3
Bacteriófagos específicos bovinos	3					
Bacteriófagos comunes a los conjuntos humano-bovino y específicos bovinos	3					

+ = positiva. ± = débilmente positiva. — = negativa.

Discusión

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la población de cepas

Tabla 2. Combinaciones de propiedades presentadas por 80 cepas de S. aureus, *biotipos a los que se han adscrito y número de cepas incluidas en cada uno*

Pruebas	Grupos de *S. aureus*																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Fibrinolisina	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	±	−	−	±	±	−	−	+	+	+
Pigmentos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulación plasma humano	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulación plasma bovino	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+
Hemolosina alfa	+	+	+	−	+	+	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Hemolosina beta	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	−
Reducción del telurito (*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Factor de agrupamiento (*)	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+
Tipo de crecimiento en agar cristal violeta	−	−	−	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−
Bacteriófagos humanos	+/−	+	+	+/−	+/−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−/+	−/+	−/+	+	+/−	−	−	−	−/+
Bacteriófagos específicos bovinos	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−/+	−/+	−/+	−	−	−	−	−	−	−
Biotipo	A	A	A	Próx. A	Próx. A	Próx. A	Próx. A	B	Próx. B	Próx. B	Próx. B	Próx. B	Próx. B	Próx. B	C	Próx. C	Próx C	Próx C	D	D	Int. A y D	Int. A y D	NC
Número de cepas	7	1	1	11	3	3	1	1	1	5	1	1	1	2	4	24	2	1	2	1	1	1	5

+ = positiva. ± = débilmente positiva. — = negativa. (*) Estas pruebas aparecen en el esquema propuesto por HAJEK y MARSALEK en 1971, pero no en el de 1976. Próx. = falla una propiedad. Int. = intermedia. Nc = no clasificada

estudiada, en contra de lo que cabría esperar, era muy heterogénea. En efecto, como puede apreciarse en las *tablas 2-3*, las cepas no sólo pertenecían a diferentes biotipos, sino que sus comportamientos eran tan diversos que fue preciso establecer 23 combinaciones o grupos de propiedades distintos. Debe señalarse, sin embargo, que, en la mayoría de los casos, las diferencias entre los grupos adscritos y próximos a un mismo biotipo era mínima. Unicamente el 20,4 % de las cepas correspondían en todas sus propiedades a alguno de los biotipos o ecotipos de Hajek y Marsalek (7-8).

Teniendo en cuenta la procedencia de las cepas estudiadas, resulta sorprendente que únicamente 9 de ellas (11,25 %), incluidas en los grupos 1-3, pudieran ser adscritas al biotipo A, al que pertenecen las cepas de origen humano (2, 7-9, 15, 17). Debe señalarse, sin embargo, que otras 19 cepas, 18 *Staphylococcus aureus* y 1 no clasificada (grupos 4-7), se consideraron como próximas al biotipo A. Estas 19 cepas eran fibrinolisina-positivas, carácter exclusivo de las cepas de origen humano, pero se desviaban del biotipo A en una propiedad: 12 no producían hemolisina alfa y las 7 restantes eran cristal violeta-positivas. Las 12 cepas de los grupos 8-14 mostraban propiedades idénticas (1 cepa) o muy similares (11 cepas) a las del biotipo B. En este biotipo se incluyen las cepas de *S. aureus* aisladas de pollos y cerdos, que se caracterizan por no producir fibrinolisina y por ser cristal violeta-positivas (8). Su insensibilidad a los bacteriófagos humanos y bovinos sugiere que se trataba de cepas de origen aviar. Como puede observarse, también en las *tablas 2-3* las 31 cepas de los grupos 15-18 pertenecían (4 cepas), o estaban muy próximas (27 cepas), al biotipo C. A este biotipo pertenecen las cepas de *S. aureus* de origen bovino y ovino, cuyos caracteres más destacados son la producción de hemolisina beta y la coagulación del plasma bovino. El hecho de que ninguna de estas cepas fuera lisada por el fago 78 del conjunto bovino, al que son sensibles la mayoría de las cepas de origen ovino (5,

Tabla 3. Relación entre los biotipos de Hajek y Marsalek a los que fueron adscritas las cepas, su comportamiento y posible origen

Biotipos	Grupos de comportamiento (*)	Número de cepas	Posible origen
A y próx. A	1 a 7	27	Humano
B y próx. B	8 a 14	12	Aves (**)
C y próx. C	15 a 18	31	Vacuno
D	19 y 20	3	Conejo
Int. A y D	21 y 22	2	No determinable

(*) Véase tabla 2. (**) La mayoría.

11), es indicativo que se trata de cepas de origen vacuno. Las 3 cepas de los grupos 19-20 se incluyeron en el biotipo D, al que pertenecen exclusivamente las cepas de *S. aureus* aisladas de conejos y liebres (7-9). Resulta interesante destacar que los tres manipuladores de los que se aislaron estas cepas trabajaban en carnicerías en las que se vendía carne de conejo. Las dos cepas de los grupos 21-22 se clasificaron como intermedias entre los biotipos A y D por presentar propiedades características de ambos biotipos. Finalmente, 5 cepas de *S. aureus* (grupo 23) y 2 no clasificadas mostraban una combinación de propiedades que no permitió su adscripción a grupos de referencia, ni siquiera de forma aproximada. Debe destacarse también que no se han encontrado cepas de los biotipos E y F, hecho explicable porque en estos biotipos se incluyen únicamente cepas adaptadas específicamente a ciertas especies animales no productoras de alimentos.

Un análisis de la variación observada en las propiedades de las cepas estudiadas frente a la resistencia a los antibióticos (datos no publicados), y con el fin de buscar sus posibles relaciones, no permitió establecer ninguna conclusión. De las 83 cepas estudiadas, 14 eran resistentes a la penicilina, 27 a la penicilina y ampicilina y sólo 2 a la eritromicina. Sin embargo, los porcentajes de resistencia en las cepas pertenecientes a cada biotipo fueron muy similares. Tampoco se observaron diferencias que tuvieran un significado entre los distintos grupos dentro de cada biotipo.

La bibliografía existente sobre clasificación en biotipos de cepas de *Staphylococcus aureus* es poco abundante. Sin embargo, en todos los trabajos examinados que se refieren a las diversas especies animales (2, 4-7, 11), se pone de manifiesto que la mayoría de las cepas aisladas de una determinada especie animal pertenecían al biotipo correspondiente a la misma, y tan sólo ciertos porcentajes reducidos de cepas se correspondían con otros biotipos; esto parece indicar que el intercambio de cepas, entre las diversas especies animales es perfectamente posible, aunque en cuantía limitada. Por lo que se refiere al hombre, la información con que se cuenta es aún más escasa. Unicamente Devriese y Oeding (2) presentan datos relativos a cepas de *S. aureus* aisladas de fosas nasales de estudiantes de veterinaria: el 87 % de 38 de estas cepas pertenecían al biotipo A.

El elevado porcentaje, encontrado por nosotros, de cepas pertenecientes a biotipos animales (38,7 % del biotipo C o próximo a C, y 18,7 % del B-próximo B y D-próximo D) debe relacionarse con el diario y estrecho contacto entre los manipuladores de alimentos estudiados y los animales y productos de origen animal. El análisis de los resultados obtenidos en la tipificación por bacteriófagos de las cepas estudiadas, encaminado a determinar su origen, no permitió comprobar la afirmación anterior, al menos cuantitativamente, debido a que el número de cepas tipificadas fue sólo del 40,9 %. No obstante, el hecho de que 3 cepas tuviesen fagotipos o patrones líticos propios de las cepas de origen bovino y que en el fagotipo de otras 3 cepas estuvieran presentes fagos específicos bovinos, demuestra sin lugar a dudas que el paso de cepas desde alimentos de origen animal al hombre, tiene, en efecto, lugar. Este número de cepas, inequívocamente de origen bovino, puede parecer poco significativo, aunque no lo es tanto si se con-

sidera que la parte de la población tipificada (34 cepas) es la que tiene más relación con el origen humano, dados los fagos utilizados. Cabe pensar, y asi lo demuestran los resultados, que en la parte de la población no tipificada (49 cepas) estarían la mayoria de las cepas de origen animal. Apoya la primera de estas ideas el hecho de que las 14 cepas incluidas en el biotipo A o próximo a A (de origen humano) tenían fagotipos típicamente humanos.

El hecho de que las cepas adscritas a biotipos animales se aislaran de las fosas nasales de los manipuladores en número considerable (la mayoría entre 10^3 y 10^5 células/torunda), pone bien de manifiesto que las cepas en cuestión no se hallaban presentes de forma accidental, sino que se trataba realmente de una colonización. En este sentido, cabe señalar que Noble (14) ha establecido el nivel de 6 células/torunda para diferenciar entre las cepas «contaminantes» y las «residentes», incluyendo en este último término, tanto las cepas adaptadas a la piel de un hospedador específico, como las denominadas «residentes temporales», capaces de sobrevivir y multiplicarse en la piel de un hospedador distinto del habitual.

El hallazgo de cepas de *Staphylococcus aureus* de biotipos animales en las fosas nasales de los manipuladores estudiados tiene, además de interés ecológico, importancia en higiene de los alimentos a la hora de establecer la procedencia inmediata de las cepas implicadas en brotes de intoxicación estafilocócica, ya que cabe la posibilidad de que aún siendo las cepas en cuestión de origen animal, llegaran al alimento a partir de un manipulador. Además, este hecho puede incidir en el porcentaje de manipuladores portadores de cepas de *S. aureus* productoras de enterotoxinas, puesto que, generalmente, la capacidad enterotoxigénica de las cepas del biotipo A (de origen humano) es superior a la de las cepas de otros biotipos (de origen animal).

Finalmente, resulta muy difícil pronunciarse sobre qué pruebas del esquema de Hajek y Marsalek son más significativas para la diferenciación de los biotipos, y cuáles son más susceptibles de modificarse por variación bacteriana debida a interacciones de tipo ecobiológico. Existen muy pocos trabajos sobre este tema y la mayoría de ellos se refieren a cepas de origen animal. En nuestra experiencia (5, 11), la producción de fibrinolisina y de hemolisina beta son dos propiedades que permiten diferenciar el biotipo A (humano) de los restantes biotipos (animales) y la coagulación del plasma bovino es propia de las cepas del biotipo C (de origen bovino y ovino).

Bibliografía

1. Devriese, L. A., and Hajek, V. 1980. Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. J. Appl. Bacteriol., 49, 1-11.
2. Devriese, L. A., and Oeding, P. 1976. Characteristics of *S. aureus* strain isolated from different animal species. Res. Vet. Sci., 21, 284-91.
3. Gedek, W. 1968. Koagulasepositive Staphylokokken aus kuhmilch. III. Vergleiche mit humanpathogenen stammen. Arch. Lebensmittelhyg., 19, 7-11.
4. Gibbs, P. A.; Patterson, J. T., and Harvey, J. 1978. Biochemical characteristic and enterotoxigenicity of *S. aureus* strain isolated from poultry. J. Appl. Bacteriol., 44, 57-74.

5. GUTIÉRREZ, L. M.; MENES, I.; GARCÍA, M. L.; MORENO, B., and BERGDOLL, M. S. 1982. Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from mastitic ovine milk in Spain. J. Food Prot., 45, 1282-86.

6. HAJEK, V. 1976. *S. intermedius*, a new species isolated from animals. Int. J. Syst. Bacteriol., 26, 401-7.

7. HAJEK, V., and MARSALEK, E. 1971. The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. Bakteriol. Hyg., Abt. Orig., 217, 176-82.

8. HAJEK, V., and MARSALEK, E. 1976. Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. En J. JELJASZEWICZ (ed.), Staphylococci and Staphylococcal Diseases, 11-21. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart-New York.

9. KLOOSS, W. E. 1980. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. Annu. Rev. Microbiol., 34, 559-92.

10. KLOOS, W. E., and MUSSELWHITE, M. S. 1975. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. Appl. Microbiol., 30, 381-95.

11. MENES, I.; GUTIÉRREZ, L.; FRANCISCO POLLEDO, J. J.; GARCÍA, M. L., y MORENO, B. 1982. Clasificación en biotipos de estafilococos de origen animal. Microbiol. Españ., 35, 21-31.

12. MEYER, W. 1966. Some possibilities of subdividing the species *Staphylococcus auseus* into subspecies. Postepy Mikrobiol., 5, 435-39.

13. MEYER, W. 1967. Uber die brauchbarkeit des kristallviolett testes zur differenzierung von *S. aureus*-stammen. Z. Med. Mikrobiol. Immunol., 153, 158-68.

14. NOBLE, W. C. 1969. Skin carriage of the *Micrococcaceae*. J. Clin. Pathol., 22, 249-53.

15. SCHLEIFER, K. G.; SCHUMACHER-PEDRAU, F.; GOTZ, F., and POPP, B. 1976. Chemical and biochemical studies for the differentiation of coagulase-positive staphylococci. Arch. Microbiol., 110, 263-70.

16. SHIMIZU, T. 1968. Host-specific parasitism of *S. aureus*. Mem. Fac. Agr. Univ. Miyazaki, 5, 1-55.

17. SZULGA, T.; MEYER, W.; WITLE, W., and HORN, G. 1976. Numerical taxonomy of *S. aureus*. En J. JELJASZEWICZ (ed.). Staphylococci and Staphylococcal Diseases, 101-4. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart-New York.

AUTOLISINAS BACTERIANAS

R. LOPEZ, P. GARCIA y E. GARCIA
Instituto de Inmunología y Biología Microbiana (CSIC). Madrid

INDICE

Página

1. Introducción ... 45
2. Funciones biológicas de las autolisinas ... 47
2.1. Síntesis de la pared celular y separación de las células hijas ... 47
2.2. Autolisinas y transformación genética ... 48
2.3. Autolisinas y liberación de la progenie fágica ... 49
2.4. Papel de las autolisinas en la muerte celular ... 50
3. Conclusiones ... 53
4. Bibliografía ... 54

1. Introducción

Las autolisinas son enzimas que hidrolizan uniones específicas de los peptidoglicanos, polímeros que forman parte de la pared bacteriana. Los términos mucopéptido, glicopéptido o mureína, usados por algunos autores, son sinónimos de peptidoglicano.

La estructura de los peptidoglicanos ha sido objeto de varias revisiones (15, 41). Todos ellos están constituidos, básicamente, por largas cadenas glicánicas de aminoazúcares, unidos por enlaces β $(1 \rightarrow 4)$, que están unidas entre sí por pequeños péptidos (*figura 1*). Los residuos del disacárido son normalmente N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, aunque otros grupos acilos pueden, en algunos casos, reemplazar al acetilo. En la mayoría de las bacterias gram-positivas están presentes otros polímeros covalentemente unidos a la cadena glicánica a través de los grupos 6-OH de los residuos N-acetilmuramilo. La cadena lateral peptídica se une al ácido láctico, sustituyente del ácido murámico a través del grupo $-NH_2$ terminal del primer aminoácido (normalmente la L-alanina). La disposición de estos péptidos al entrecruzarse con las cadenas glicánicas es variable, incluso dentro de una misma especie bacteriana, habiéndose descrito cinco tipos de estructuras distintas (15).

La presencia de enzimas autolíticas en bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas es un fenómeno casi general, aunque sólo en algunos casos

se conoce su mecanismo de acción. Atendiendo a la especificidad del enlace hidrolizado se puede afirmar que existen tres tipos de enzimas líticas (42):

a) Glicosidasas, que hidrolizan la cadena glicánica del peptidoglicano.

b) Las N-acetilmuramil-L-alanil amidasas, que hidrolizan el enlace amida entre la L-alanina y el N-acetilmurámico.

c) Endopeptidasas, que rompen la cadena peptídica del peptidoglicano, y de las cuales se han descrito varios ejemplos, según el lugar de corte dentro del péptido.

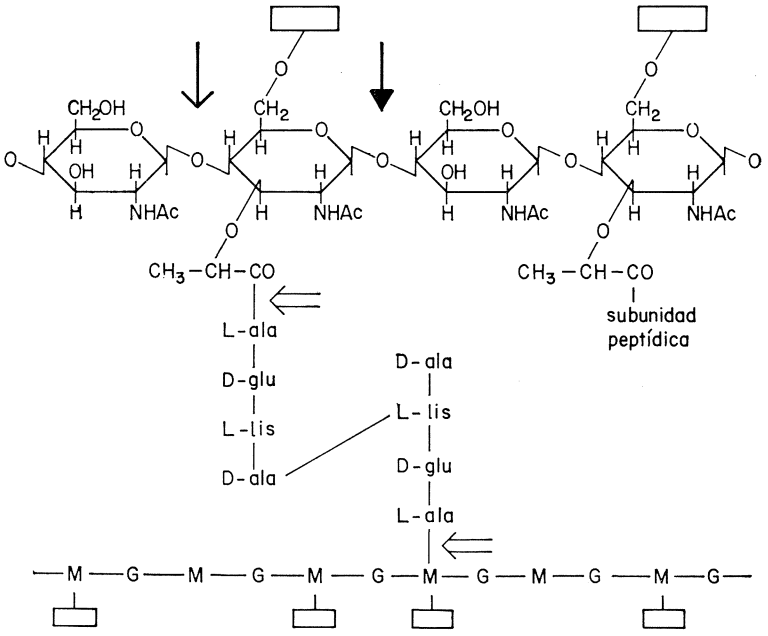

Figura 1. Esquema general de la pared celular de S. pneumoniae. *Las cadenas glicánicas están compuestas de residuos de N-acetilglucosamina (G) y N-acetilmurámico (M). La cadena lateral peptídica está representada por los símbolos L-ala, D-glu, L-lis y D-ala. El ácido teicoico, sustituyente del ácido N-acetilmurámico, se representa por un rectángulo. Las flechas indican el enlace hidrolizado por cada tipo de enzima: (↓) endo-N-acetilmuramidasa; (↓) endo-N-acetilglucosaminidasa; (⇓) N-acetilmuramil-L-alanilamidasa. Las endopeptidasas pueden romper por varios puntos dentro de la cadena lateral peptídica*

Entre ellas se encuentran las endo-N-acetilglucosaminidasas, que liberan fragmentos con residuos de N-acetilmurámico en el extremo reductor, y las endo-N-acetilmuramidasas, que liberan fragmentos con residuos de N-acetilglucosamina en el extremo reductor (*figura 1*).

Pocas autolisinas bacterianas se han purificado a homogeneidad electrofo-

rética. La principal razón que explica las dificultades encontradas en dicha purificación reside en la fuerte asociación de las autolisinas con su substrato, en particular con los ácidos teicoicos (42). En la última década se ha generalizado un procedimiento de extracción de autolisinas que facilita su posterior purificación que consiste básicamente en la utilización de soluciones salinas de elevada fuerza iónica que permiten la separación de paredes y enzimas (36). De entre las enzimas bacterianas purificadas a homogeneidad se pueden citar, a modo de ejemplo, las amidasas de *Bacillus megaterium* (3), *B. subtilis* (18), *Streptococcus pneumoniae* (21), y más recientemente tres endo-N-acetil-glucosaminidasas de tres especies de *Staphylococcus* (59). Los pesos moleculares de las autolisinas purificadas muestran una gran variabilidad (entre 20.000 y 100.000) (42); al menos en el caso de las glucosaminidasas parece existir un requerimiento de grupos —SH libres para su actividad.

La capacidad de las autolisinas para degradar su substrato depende tanto de la estructura del peptidoglicano como de la del polímero unido a él. Así, la eliminación del ácido teicoico de las paredes de *Bacillus subtilis* trae consigo una marcada disminución en la actividad de la amidasa (18). *Streptococcus pneumoniae* representa un caso extremo de especificidad puesto que variaciones tan pequeñas como la eliminación de los grupos metilo de los residuos de colina sustituyentes de los ácidos teicoicos son suficientes para convertir a este substrato en resistente a la acción de la amidasa de esta especie bacteriana (57).

La simple enumeración de las enzimas que intervienen en los procesos autolíticos bastaría para sobrepasar los límites propuestos en la presente revisión. No obstante, el lector interesado podrá encontrar en el trabajo de Rogers (42) una reciente recopilación sobre las autolisinas bacterianas.

2. Funciones biológicas de las autolisinas

2.1. Síntesis de la pared celular y separación de las células hijas

El crecimiento de la pared celular implica que ésta debe ser «preparada» químicamente para aceptar nuevas unidades de sus componentes. Así, los diferentes tipos de enzimas descritos anteriormente pueden dar lugar a residuos tales como los grupos reductores N-acetilmuramilo, o grupos amino libres, etc., que facilitarían la incorporación de tales unidades.

A pesar del gran número de investigaciones llevadas a cabo con objeto de demostrar de una manera directa la intervención de las autolisinas en la síntesis de la pared bacteriana sólo en el caso de *Streptococus faecalis* (47) parecen existir unas sólidas bases experimentales para sostener tal afirmación. En efecto, en esta especie se ha detectado la presencia de una única autolisina, una muramidasa, que además está localizada preferencialmente en la región en la que se incorpora el material de pared recién sintetizado.

El principal inconveniente encontrado hasta el momento para aceptar un papel de las autolisinas en la síntesis de la pared celular se basa en el aislamiento de mutantes defectivos en autolisinas que, sin embargo, se multiplican con tiempos de duplicación similares a los de las estirpes salvajes. Como ejemplo de estos mutantes podemos citar cepas de *Streptococcus fae-*

calis (37) y de *S. pneumoniae* (27). No obstante, ninguno de estos mutantes carece por completo de enzimas autolíticas por lo cual no se puede excluir la posibilidad de que la porción residual de tales enzimas tenga una localización estratégica en la célula en lugares donde se realiza la biosíntesis de pared.

En contraste con lo hasta aquí señalado, parece fuera de toda duda que las autolisinas desempeñan un papel fundamental en la separación de las células hijas. Así, mutantes defectivos en autolisinas forman cadenas de longitud variable (8, 37). Uno de los casos mejor estudiados es el de *Streptococcus pneumoniae*. Mutantes que carecen en un 95 % de la amidasa, que es la única autolisina descrita hasta el momento en neumococo, forman cadenas cortas. Además, la sustitución biosintética del aminoalcohol presente en los ácidos teicoicos (colina) por su análogo estructural, la etanolamina, trae consigo la carencia total de la enzima autolítica activa y paralelamente la formación de largas cadenas de células (49). Observaciones de cortes celulares al microscopio electrónico muestran que las células de las cadenas están totalmente compartimentalizadas (57), puesto que la agitación mecánica de tales cadenas produce un drástico incremento en el título de células viables. Por lo tanto, la formación de cadenas de los neumococos multiplicados en presencia de etanolamina sugiere que la autolisina está implicada en una fase tardía o final de la separación de las células hijas.

En *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis* la deficiencia en el sistema autolítico se pone de manifiesto, además de por la formación de cadenas, por la pérdida de la motilidad celular ocasionada por el bloqueo de la flagelina, componente esencial de los flagelos, a nivel citoplásmico (1). Los revertientes de tales mutantes recuperan simultáneamente la motilidad y la capacidad de separación celular. Esto parec indicar (42) que ambas propiedades están controladas por un gen regulador común. En *Escherichia coli* existen resultados que sugieren que la separación de las células hijas depende de la la presencia de una amidasa autolítica (60).

2.2. *Autolisinas y transformación genética*

Se ha demostrado que las cepas de *Bacillus subtilis* que son altamente transformables contienen una mayor actividad autolítica que las que muestran bajos niveles de transformabilidad (63). La actividad de una amidasa traería como consecuencia la relajación de la malla del peptidoglicano en una zona localizada que permitiría el paso del ADN transformante a través de la pared para alcanzar los receptores situados en la membrana celular (10). Por otra parte, la adición del factor de competencia a estreptococos del grupo A aumenta la tasa de lisis de estos microorganismos (40).

Asimismo, en células de *Streptococcus pneumoniae* que han sido inducidas a la competencia, para unir e incorporar ADN exógeno, por tratamiento con activador electroforéticamente puro, se ha sugerido que el desenmascaramiento localizado de los receptores situados en la membrana (45) a los cuales se une el ADN transformante, está condicionado por una actividad limitada de la amidasa de neumococo (46).

En este sentido, células que contienen etanolamina en su pared celular y

que carecen, como ya se ha señalado, de la amidasa activa, son incapaces de adquirir el estado de competencia. La adición a tales células de colina y activador restauraba, tanto la capacidad de transformación genética, como la presencia de amidasa activa (46).

Una aparente contradicción sobre lo dicho hasta aquí en lo que respecta al papel de la autolisina en la transformación bacteriana, surgió de la observación de que un mutante de neumococo defectivo en autolisina es, sin embargo, transformable (42). Este problema ha sido resuelto recientemente en nuestro laboratorio, al demostrar que dicho mutante es en realidad temperatura-sensible y que posee a 30 °C, la temperatura a la que se lleva a cabo la transformación, unos niveles normales de autolisina (manuscrito en preparación).

2.3. *Autolisinas y liberación de la progenie fágica*

Las autolisinas parecen también estar implicadas en los procesos de adsorción y liberación de la progenie fágica. En *Streptococcus pneumoniae* se sugirió la intervención de la amidasa del huésped en ambos procesos (32) en experimentos con células cultivadas en presencia de etanolamina que carecen de amidasa activa. Experimentos posteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio han permitido poner de manifiesto que, si bien la colina forma parte esencial de los receptores fágicos (28), la autolisina no parece ser imprescindible en esta etapa del proceso infectivo (13). Por el contrario, la participación de la amidasa del huésped en el proceso de liberación fágica ha sido bien establecida experimentalmente. Algunos de los hechos en los que se basa esta conclusión son los siguientes:

a) Células cultivadas en presencia de etanolamina que reciben un minipulso de colina para permitir la entrada del fago Dp-1, son resistentes a la lisis. No obstante, cuando estas células infectadas se resuspenden en un medio conteniendo colina, se produce la lisis y la consiguiente liberación de la progenie fágica (14).

b) Condiciones experimentales que inhiben la actividad de la amidasa del huésped también bloquean la liberación de los fagos (bajo pH, ácido lipoteicoico, etc.) (19, 44).

Paralelamente, muchos bacteriófagos inducen la síntesis de lisinas que degradan la pared celular durante el proceso infectivo. Varias de estas lisinas se han caracterizado tanto genética como bioquímicamente. Lisinas, con distintas actividades hidrolíticas, se han aislado de cultivos infectados con los colifagos, T3, T4, T5, T6, T7 y lambda y del fago P22 de *Salmonella* (2, 5, 24, 26, 38, 58). Por otra parte, también se han estudiado en detalle las lisinas asociadas a fagos que infectan a estreptococos.

La lisina del fago T4 es una N-acetilmuramidasa (58), mientras que la del fago T7 es una N-acetilmuramil-L-alanil amidasa (24) y la del fago lambda es una endopeptidasa (2). Los bacteriófagos T3 y T5 parece que también poseen actividades líticas similares (5). La gran mayoría de estas enzimas se han aislado y purificado, lo que ha permitido estudiar sus propiedades químicas.

Se ha comprobado que diversas mutaciones encontradas en colifagos conducen a la pérdida de su actividad lítica, lo que indica que los genes responsables de la síntesis de estas proteínas líticas se encuentran localizados en el genoma viral (7, 17, 48).

En el caso del fago Ø6, un virus ARN con envuelta lipídica que infecta a *Pseudomonas phaseolicola*, la infección comienza por la adsorción a los pili del huésped (33). A través del empleo de mutantes se ha podido demostrar que se requiere la actividad de una lisina en un paso temprano de la infección. Esta lisina es una proteína estructural (P5) de la partícula fágica. Se ha sugerido que la proteína P5 es fundamental para el paso del ARN del virión a través de la pared bacteriana; además, esta lisina colabora en la liberación de la progenie fágica a través de una interacción, cuya naturaleza se desconoce, con otra proteína estructural de la partícula fágica (P10). Sin embargo, la asociación de la lisina (P5) con la partícula fágica es, probablemente, necesaria para la penetración del ARN, pero no lo es para la lisis de la célula, ya que mutantes defectivos en el proceso de morfogénesis fágica pueden lisar la célula huésped.

La mayoría de las lisinas fágicas son solubles y no están asociadas a las partículas del bacteriófago (2, 6, 26, 58); sin embargo, hay excepciones como el caso citado anteriormente (fago Ø6) o en el del bacteriófago G de *Bacillus megaterium* que induce dos agentes líticos, uno libre y otro asociado al virión (35). Se ha estudiado con gran detalle una lisina asociada al bacteriófago C1 (C-PAL) que infecta a estreptococos del grupo C (9, 62, 64), aunque sólo recientemente se ha conseguido su purificación a homogeneidad (39). Se ha demostrado que esta C-PAL se encuentra tanto unida a las partículas fágicas como libre en los sobrenadantes, después de la lisis del cultivo (9). También se ha descrito (61) una lisina asociada al fago A25 que infecta a los estreptococos del grupo A (A-PAL). Esta A-PAL comparte con la C-PAL muchas propiedades físico-químicas, pero es mucho menos activa frente a paredes aisladas en ensayos *in vitro*; además, esta A-PAL sólo se ha detectado en forma libre y nunca asociada con las partículas fágicas.

A través del empleo de un mutante de *Streptococcus pneumoniae* defectivo en autolisina, hemos conseguido aislar y purificar a homogeneidad un nuevo enzima lítico asociado al bacteriófago Dp-1. Esta lisina requiere para su actividad, tanto *in vivo* como *in vitro*, la presencia de residuos de colina en el ácido teicoico de la pared celular (14). Asimismo, mediante la utilización de un antisuero específico y del uso de células defectivas en autolisina e incubadas en medio con etanolamina, se ha demostrado la intervención de esta enzima en el proceso de liberación fágica (13).

2.4. Papel de las autolisinas en la muerte celular

Resulta evidente que durante la multiplicación bacteriana, se requiere un equilibrio entre los procesos de síntesis de componentes de pared y de ruptura de las cadenas del peptidoglicano preexistentes para permitir la incorporación de aquéllos durante el crecimiento de la pared. Tal y como se ha indicado anteriormente, las autolisinas desempeñarían un papel fundamental en este proceso. Se ha postulado recientemente que los ácidos lipoteicoicos ALT intervienen en el control de la actividad autolítica en varios sistemas bacterianos (4, 19). Una característica general de los ALT es que se intercalan dentro de la matriz de la pared, habiendo sido identificados, en *Bacillus*

subtilis, como cofactores esenciales en la biosíntesis de la pared celular (31). El ALT de neumococo (antígeno de Forssman, Fag) es un fuerte inhibidor de la amidasa de esta bacteria en experimentos *in vitro* (20) a la cual se asocia físicamente.

La adición de ALT a los medios de cultivo inhibe la lisis de *Streptococcus pneumoniae* que se produce en la fase estacionaria (19), lo que sugiere que la amidasa de neumococo se encuentra implicada en el fenómeno de autolisis. En efecto, células de *S. pneumoniae* incubadas en medio con etanolamina que contienen una amidasa inactiva no se lisan al alcanzar la fase estacionaria de cultivo (52). Además, el empleo de un antisuero anti-amidasa preparado en nuestro laboratorio, bloquea asimismo dicha lisis (11).

El tratamiento de un cultivo de neumococo con desoxicolato produce una rápida lisis del mismo. El análisis comparativo de los productos de degradación de la pared celular así obtenidos y de aquellos otros resultantes de la acción *in vitro* de la amidasa purificada sugiere que esta autolisina es la responsable del fenómeno de la lisis celular (34). Tanto en este caso como en la lisis de los cultivos de *Streptococcus pneumoniae* en la fase estacionaria, se detecta concomitantemente la liberación de ALT al medio de cultivo (52). Se supone que este hecho propiciaría un disparo de la actividad incontrolada de la amidasa que conduce a la destrucción celular. Este mismo mecanismo ha sido sugerido para explicar la actividad incontrolada de la mureín-hidrolasa en cultivos tratados con antibióticos betalactámicos (56).

El tratamiento de neumococos con inhibidores de la síntesis de pared trae como consecuencia la degradación del peptidoglicano y la consiguiente lisis del cultivo. Investigaciones llevadas a cabo en su mayor parte en *Streptococcus pneumoniae* (16, 29, 53) indicaban muy positivamente la implicación de las autolisinas del huésped en los efectos de mayor importancia farmacológica inducidos por los antibióticos beta-lactámicos y que serían siempre efectos indirectos propiciados por la autolisina, bajo acción del antibiótico. En efecto, en estirpes carentes de autolisina la respuesta bacteriolítica que se produce normalmente frente a los antibióticos betalactámicos se convertía en bacteriostática. Este fenómeno constituye un nuevo tipo de resistencia intrínseca denominado «tolerancia antibiótica» (53). El fenómeno de tolerancia se ha puesto de manifiesto en otras especies bacterianas, tales como *Bacillus licheniformis* (43) y *B. subtilis* (1), así como en *Escherichia coli* K12 (25) y *S. sanguis* grupo H (22). Recientemente, se han aislado estafilococos penicilín-tolerantes a partir de pacientes con infecciones recurrentes (50) y Horne y Tomasz (23) han demostrado en estreptococos del grupo B aislados en clínica la existencia de tolerancia antibiótica vía modulación del pH del ambiente natural donde se produce la infección (vaginitis). Esto confirma nuestras observaciones *in vitro* sobre tolerancia condicionada por el pH que modula la actividad de las autolisinas (16, 29).

Con el fin de ilustrar de forma esquemática la implicación de las autolisinas en los efectos irreversibles de los antibióticos beta-lactámicos (acción bactericida), presentamos un modelo simplificado que resume los conocimientos acumulados hasta ahora (*figura 2*). En este esquema basado en una serie de hechos experimentales sobre los cuales el lector interesado puede encontrar una información adicional en revisiones re-

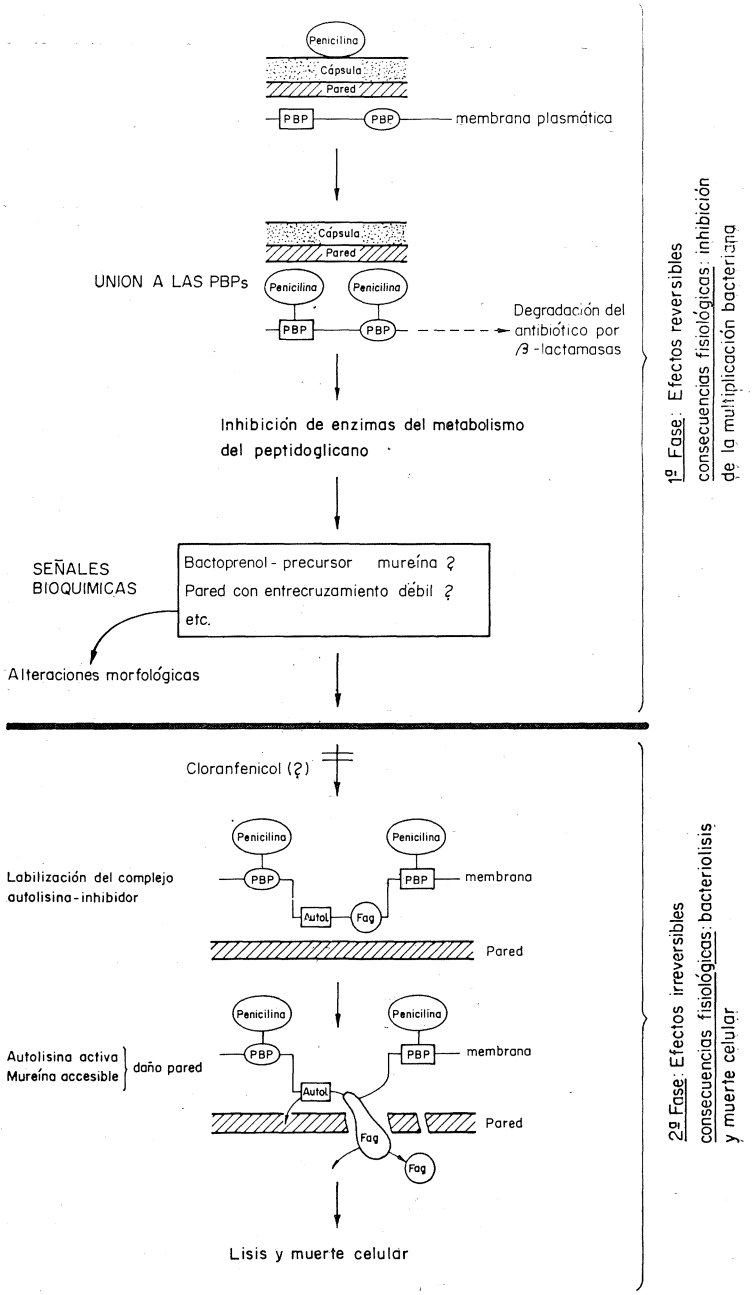

Figura 2. Modelo sobre el mecanismo de acción de la penicilina en S. pneumoniae. *PBP = proteínas de unión específica a beta-lactámicos; Fag = ácido lipoteicoico; Autol = autolisina. Modificado por los autores a partir de datos previos tomados de las referencias 50, 54 y 65*

cientes (30, 50-51, 54-55), se postula que las moléculas beta-lactámicas alcanzarían su diana metabólica (PBP, penicillin-binding proteins) en una primera fase. Este hecho trae consigo la inhibición de enzimas que participan directamente en el metabolismo del peptidoglicano. Se ha sugerido que la respuesta fisiológica primaria sería la inhibición de la multiplicación bacteriana. Esta fase reversible puede separarse experimentalmente de la siguiente etapa (irreversible) con el empleo de mutantes defectivos en autolisina o a través de manipulaciones fisiológicas (bajo pH) o bioquímicas (incubación en medios con etanolamina) (16, 29, 53). En este modelo cabe destacar que no se conoce con exactitud por qué la inhibición de la síntesis de mureína origina la inhibición de la multiplicación; se especula sobre la posible intervención de un producto intermediario que actuaría como señal bioquímica reguladora entre biosíntesis de pared y producto citoplásmico. Tomasz (51-52) sugiere que una interferencia, vía antibiótico, en la síntesis de pared generaría una o más señales que dejarían sin regulación bioquímica a las mureín-hidrolasas.

En algunas bacterias, estas señales —hasta ahora desconocidas— podrían, a su vez, iniciar un proceso capaz de originar daños estructurales irreversibles (lesión de membrana). Entre las posibles moléculas que podrían actuar como señales se han citado aquellas que se acumulan en algunas bacterias tratadas con penicilina (bactoprenol unido a mureína, nucleótidos, etc.).

En la segunda fase, o de efectos irreversibles, se supone que bajo la acción de los antibióticos y, posiblemente, disparado por una señal bioquímica desconocida, tendría lugar una disociación fago-autolisina, con liberación del primero y dejando a la autolisina actuar sin control, produciéndose así la lisis y la consiguiente muerte celular. Actualmente se especula sobre si las autolisinas bacterianas actuarían en estos casos desde el interior de la célula o si deberían ser liberadas al medio previamente y posteriormente unirse a la pared celular. En este sentido, el empleo de un antisuero específico frente a la amidasa de neumococo (11), así como el tratamiento con tripsina (29) apoyan la segunda de estas dos posibilidades.

3. Conclusiones

Las autolisinas bacterianas son enzimas que degraban el peptidoglicano que forma la estructura básica de la pared celular de estos microorganismos. Su papel biológico aún no ha podido ser determinado con exactitud y así, por ejemplo, no se ha establecido todavía de una manera clara su participación en la síntesis de la pared bacteriana. No obstante, parece fuera de toda duda la intervención de tales enzimas en procesos como la separación de las células hijas al final de la división celular, el desenmascaramiento de los receptores implicados en la unión del ADN exógeno en el proceso de transformación genética, así como en los procesos irreversibles (bacteriolisis) inducidos por antibióticos betalactámicos. Las enzimas líticas de pared están asimismo implicadas en el proceso de liberación de la progenie fágica. El papel de las posibles sustancias reguladoras de la actividad biológica de las autolisinas (ácidos lipoteicoicos, u otras sustancias lipídicas) parece ser fundamental para evitar el efecto suicida que ocasionaría el funcionamiento descontrolado de tales enzimas en las bacterias.

4. Bibliografía

1. Ayusawa, D.; Yoneda, I.; Yamane, K., and Merno, D. 1975. Pleiotropic phenomena in autolytic enzyme(s) content, flagellation and simultaneous hyperproduction of extracellular α-amylase and protease in a *Bacillus subtilis* mutant. J. Bacteriol., 124, 459-69.
2. Black, L. W., and Hogness, D. S. 1969. The lysozyme of bacteriophage λ. I. Purification and molecular weight. J. Biol. Chem., 244, 1968-75.
3. Chan, L., and Glaser, L. 1972. Purifica tion of N-acetyl-muramic acid-L-alanine amidase from *Bacillus megaterium*. J. Biol. Chem., 247, 5391-97.
4. Cleveland, R. F.; Holtje, J. V.; Wicken, A. J.; Tomasz, A.; Daneo Moore, L., and Shockman, G. D. 1975. Inhibition of bacterial wall lysins of lipoteichoic acids and related compounds. Biochem. Biophys. Res. Commun., 67, 1128-35.
5. De Martini, M.; Halegona, S., and Inouye, M. 1975. Lysozymes from bacteriophages T3 and T5. J. Virol., 16, 459-61.
6. Eichholtz, H.; Freund-Molbert, E., and Stirm, S. 1975. *Escherichia coli* capsule bacteriophages, V. Lysozyme 29. J. Virol., 15, 985-93.
7. Emrich, J. 1968. Lysis of T4-infected bacteria in the absence of lysozyme. Virology, 35, 158-65.
8. Fein, J. E., and Rogers, H. J. 1976. Autolytic enzyme-deficient mutants of *Bacillus subtilis* 168. J. Bacteriol., 127, 1427-44.
9. Fox, E. N., and Wittner, M. K. 1965. Observations of the group C streptococcal bacteriophage and lytic enzyme system. J. Bacteriol., 89, 496-502.
10. García, E.; López, P.; Pérez-Ureña, M. T., and Espinosa, M. 1978. Early stages in *Bacillus subtilis* transformation: association between homologous DNA and surface structures. J. Bacteriol., 135, 731-40.
11. García, E.; Rojo, J. M.; García, P.; Ronda, C.; López, R., and Tomasz, A. 1982. Preparation of antiserum against the pneumococcal autolysin-inhibition of autolysin activity and some autolytic processes by the antibody. FEMS. Microbiol. Lett., 14, 133-36.
12. García, P.; García, E.; Ronda, C.; López, R., and Tomasz, A. 1983. A phage-associated murein-hydrolase in *Streptococcus pneumoniae* infected with bacteriophage Dp-1. J. Gen. Microbiol. (en prensa).
13. García, P.; García, E.; Ronda, C.; Tomasz, A., and López, R. 1983. Inhibition of lysis by antibody against phage-associated lysin and requirement of choline-residues in the cell wall for progeny phage release in *Streptococcus pneumoniae*. Curr. Microbiol., 8, (en prensa).
14. García, P.; López, R.; Ronda, C.; García, E., and Tomasz, A. 1983. Mechanism of phage-induced lysis in pneumococci. J. Gen. Microbiol. (en prensa).
15. Ghuysen, J. M. 1968. Use of bacteriolytic enzymes in determintaion of wall structure and their role in cell metabolism. Bacteriol. Rev., 32, 425-64.
16. Goodell, E. W.; López, R., and Tomasz, A. 1976. Suppression of lytic effect of beta lactams on *Escherichia coli* and other bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 73, 3293-97.
17. Harris, A. W.; Mount, D. W.; Fuerst, C. R., and Siminovitch, L. 1968. Mutations in bacteriophage lambda affecting host cell lysis. Virology, 32, 553-69.
18. Herbold, D. R., and Glaser, L. 1975. *Bacillus subtilis* N-acetyl-muramic acid L-alanine amidase. J. Biol. Chem., 250, 1676-82.
19. Holtje, J. V., and Tomasz, A. 1975. Biological effects of lipoteichoic acids. J. Bacteriol., 124, 1023-27.

20. HOLTJE, J. V., and TOMASZ, A. 1975. Lipoteichoic acid: a specific inhibition of autolysin activity in pneumococcus Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 72, 1690-94.
21. HOLTJE, J. V., and TOMASZ, A. 1976. Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. J. Biol. Chem., 251, 4199-207.
22. HORNE, D., and TOMASZ, A. 1977. Tolerant response of *Streptococcus sanguis* to beta-lactams and other cell wall inhibitors. Antimicrob. Ag. Chemother., 11, 888-96.
23. HORNE, D., and TOMASZ, A. 1981. pH-dependent penicillin tolerance of group B streptococci. Antimicrob. Ag. Chemother., 20, 128-35.
24. INOUYE, M.; ARNHEIM, N., and STERNGLANZ, R. 1973. Bacteriophage T7 lysozyme is an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. J. Biol. Chem., 248, 7247-52.
25. KITANO, K., and TOMASZ, A. 1979. *Escherichia coli* mutants tolerant to beta-lactam antibiotics. J. Bacteriol., 140, 955-63.
26. KOTESWARA RAO, G. R., and BURMA, D. P. 1971. Purification and properties of phage P22-induced lysozyme. J. Biol. Chem., 246, 6474-79.
27. LACKS, S. 1970. Mutants of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonucleases and other activities possibly pertinent to genetic transformation. J. Bacteriol., 101, 373-83.
28. LÓPEZ, R.; GARCÍA, E.; GARCÍA, P.; RONDA, C., and TOMASZ, A. 1982. Choline containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol., 151, 1581-90.
29. LÓPEZ, R.; ROJO, J. M.; RONDA, C.; GARCÍA, P.; GARCÍA, E., y PORTOLÉS, A. 1982. Tolerancia antibiótica: autolisinas y efectos bactericida y bacteriolítico inducidos por penicilinas. En A. M. MUNICIO y V. CÓRDOBA (coordinadores). Estudios sobre Biología. Librohomenaje al Prof. D. Florencio Bustinza Lachiondo, 149-68. Universidad Complutense. Madrid.
30. LÓPEZ, R.; RONDA-LAÍN, C.; TAPIA, A.; WACKS, S., and TOMASZ, A. 1976. Suppression of the lytic and bactericidal effect of cell wall-inhibitory antibiotics. Antimicrob. Ag. Chemother., 10, 696-706.
31. MANCK, J., and GLASER, L. 1972. An acceptor-dependent polyglycerol-phosphate polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 69, 2386-90.
32. MCDONNELL, M.; RONDA-LAÍN, C., and TOMASZ, A. 1975. «Diplophage»: a bacteriophage of *Diplococcus pneumoniae*. Virology, 63, 577-82.
33. MINDICH, L., and LEHMAN, J. 1979. Cell wall lysin as a component of the bacteriophage Ø6 virion. J. Virol., 30, 489-96.
34. MOSSER, J. L., and TOMASZ, A. 1970. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. J. Biol. Chem., 245, 287-98.
35. MURPHY, J. S. 1960. An agent derived from *B. megaterium* phage 6 which dissolves the bacterial cell wall. Virology, 11, 510-13.
36. POOLEY, H. M.; PORRES-JUAN, J. M., and SHOCKMAN, G. D. 1970. Dissociation of an autolytic enzyme cell-wall complex by treatment with unusual high concentration of salt. Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 1134-40.
37. POOLEY, H. M.; SHOCKMAN, G. D.; HIGGINS, M. L., and PORRES-JUAN, J. M. 1972. Some properties of two autolytic defective mutants of *Streptococcus faecalis* A TCC 9790. J. Bacteriol., 109, 423-31.
38. PRYME, I. F., and BERENTSEN, S. A. 1970. Lysozyme synthesis in *Escherichia coli* B cells infected with phage T7. Biochim. Biophys. Acta, 204, 630-32.

39. RAINA, J. 1981. Purification of *Streptococcus* group C bacteriophage lysin. J. Bacteriol., 145, 661-63.
40. RANHAND, J. M. 1973. Autolytic activity and its association with the development of competence in group H streptococci. J. Bacteriol., 115, 607-14.
41. ROGERS, H. J. 1974. Peptidoglycan (mucopeptides) structure, function and variations. Ann. N. Y. Acad. Sci., 235, 29-51.
42. ROGERS, H. J. 1979. The function of bacterial autolysins. En R. C. W. BERKELLY, C. W. GOODAY and D.. C. ELLWOOD (eds.). Microbial polysaccharides and polysaccharases. X, 237-68. Academic Press Inc., London.
43. ROGERS, H. J., and FORSBERG, C. W. 1971. Role of autolysins in the killing of bacteria by some bactericidal antibiotics. J. Bacteriol., 108, 1235-42.
44. RONDA-LAÍN, C.; LÓPEZ, R.; TAPIA, A., and TOMASZ, A. 1977. Role of the pneumococcal autolysin (murein hydrolase) in the release of progeny bacteriophage and in the bacteriophage-induced lysis of the host cells. J. Virol., 21, 366-74.
45. SETO, H.; LÓPEZ, R., and TOMASZ, A. 1975. Cell surface located deoxyribonucleic acid receptors in transformable pneumococci. J. Bacteriol., 122, 1339-50.
46. SETO, H., and TOMASZ, A. 1975. Protoplast formation and leakage of intramembrane cell components-induction by the competence activator substance of pneumococci. J. Bacteriol., 121, 344-53.
47. SHOCKMAN, G. D.; THOMPSON, J. S., and CONOVER, M. J. 1967. The autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. II. Partial characterization of the autolysin and its substrate. Biochemistry, 6, 1054-65.
48. STREISINGER, G.; MUKAI, F.; DREYER, W. J.; MILLER, B., and HORIUCHI, S. 1961. Mutations affecting the lysozyme of phage T4. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 25-30.
49. TOMASZ, A. 1968. Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability and loss of autolysis. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 59, 86-93.
50. TOMASZ, A. 1979. From penicillin binding proteins to the lysis and death of bacteria: A 1979 view. Rev. Infect. Dis., 1, 434-67.
51. TOMASZ, A. 1979. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: How the beta-lactams antibiotics kill and lyse bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 33, 113-37.
52. TOMASZ, A. 1981. Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Infect. Dis., 3, 190-211.
53. TOMASZ, A.; ALBINO, A., and ZANATI, E. 1970. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. Nature, 227, 138-40.
54. TOMASZ, A., and HOLTJE, J. V. 1977. Murein hydrolases and the lytic and killing action of penicillin. In D. SCHLESSINGER, (ed.). Microbiology, 1977, 209-15. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
55. TOMASZ, A.; KITANO, K.; LÓPEZ, R., and FREITAS, C. 1979. Variations in the mechanism of antibacterial effects of beta-lactams. In W. KALLMANT, (ed.). Drug Action and Design: Mechanism- based Enzyme Inhibitors, 197-224. Elsevier-North Holland Inc., Amsterdam.
56. TOMASZ, A., and WACKS, S. 1975. Mechanisms of action of penicillin: triggering of pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 72, 4162-66.
57. TOMASZ, A.; WESTPHAL, M.; BRILES, E. B., and FLETCHER, P. 1975. On the physiological functions of teichoic acids. J. Supramolecular Struct., 3, 1-16.
58. TSUGITA, A.; INOUYE, M.; TERZAGHI, E., and STREISINGER, G. 1968. Purification of bacteriophage T4 lysozyme. J. Biol. Chem., 243, 392-97.
59. VALINESA, S.; VARALDO, P. E., and SATTA,

G. 1982. Purification and characterization of three separate bacteriolytic enzymes excreted by *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus simulans* and *Staphylococcus saprophyticus*. J. Bacteriol., 151, 636-47.

60. VAN HEIJENOORT, J.; PARQUET, C.; FLOURET, B., and VAN HEIJENOORT, Y. 1975. Envelope-bound-N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem., 58, 611-19.
61. WANNAMAKER, L. W. 1982. Phages, transduction and phage-associated enzymes of group A, C and G streptococci. In D. SCHLESSINGER (ed.). Microbiology 1982, 112-16. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
62. WHEELER, J.; HOLLAND, J.; TERRY, J., and BLAINEY, J. 1980. Production of group C *Streptococcus* phage-associated lysin and the preparation of *Streptococcus pyogenes* protoplast membranes. J. Gen. Microbiol., 120, 27-33.
63. YOUNG, F. E. 1966. Autolytic enzyme associated with cell walls of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem., 241, 3462-67.
64. ZABRISKIE, J. B.; READ, S. E., and FISCHETTI, V. A. 1972. Lysogeny in Streptococci. In L. H. WANNAMAKER and J. M. MATREN (eds.). Streptococci and streptococcal diseases, 99-118. Academic Press. Inc., New York.
65. ZIGHELBOIM, S. 1980. Resistance to betalactam antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. Tesis doctoral. Cornell University, New York.

ISSN: 0026-2595

Depósito Legal M. 702.-1958

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