
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Revista del Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán"

VOLUMEN 38
NUMEROS 3-4
JULIO-DICIEMBRE, 1985



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director

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

Vicedirector

Dr. Angel García Gancedo, Vicedirector del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Consejo de Redacción

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

Prof. Dr. Enrique Montoya, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.

Prof. Dr. Alberto Ramos Cormenzana, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

Prof. Dr. Benito Regueiro, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

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

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

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez.

«Microbiología Española» está citada en:

Biological Abstracts
Chemical Abstracts
Index Medicus
Pascal Explore
Referativny Zhurnal

Redacción

«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
28002 Madrid (España)

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
28006 Madrid (España)

ISSN: 0026-2595

Depósito Legal M.702.-1958

IMPRESA CASILLAS - AGUSTIN CALVO, 47 - 28043 MADRID

I N D I C E

	Página
Poblaciones microbianas asociadas con brotes de melocotonero, <i>P. Melgarejo, R. Carrillo y E. M.-Sagasta (**)</i>	61
Actividad antimicrobiana frente a <i>Yersinia enterocolitica</i> en plantas superiores, <i>María Jiménez-Valera, A. Ruiz-Bravo y A. Ramos-Cormenzana (*)</i>	67
Influencia del medio de cultivo en el carácter inhibitor de una estirpe peroxidogénica de <i>Streptococcus durans</i> , <i>A. Quesada, A. Gálvez, E. Valdivia, M. Maqueda y E. Montoya (*)</i>	73
Obtención de proteínas a partir de bagacillo de caña. I. Estudio de hidrólisis de bagacillo y selección de especies de levaduras, <i>J. Pou, X. Figarella, M.ª J. Fernández y J. Garrido (*)</i>	81
Obtención de proteínas a partir de bagacillo de caña. II. Estudio de la multiplicación de <i>Trichosporum penicillatum</i> en cultivo semi-sólido en bandejas, <i>J. Pou, M.ª J. Fernández y J. Garrido (*)</i>	89
Estudio comparativo de dos fermentadores de relleno para la acidogénesis de vinazas de remolacha, <i>P. García-Serrano, E. Sardinero, M.ª L. Gil-Peña, M. A. Izaola, I. Schnabel y J. Garrido (*)</i>	97
Estudios sobre un <i>Streptomyces</i> hidroxilador de progesterona, <i>K. M. Ghanem, A. H. El-Refai y E. R. El-Helow (**)</i>	107
Variación de la actividad heterotrófica y de la densidad bacteriana en aguas de playa de Barcelona, <i>M. D. Vaqué, J. Martínez y J. Vives-Rego (*)</i>	115

(*) En español. (**) En inglés.

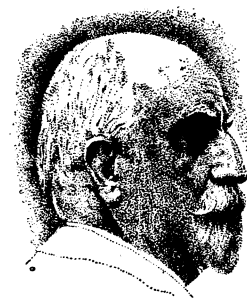
I N D E X

	Page
Microbial populations associated with peach twigs, <i>P. Melgarejo, R. Carrillo and E. M.-Sagasta (**)</i>	61
Studies on antimicrobial activity in plants against <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>María Jiménez-Valera, A. Ruiz-Bravo and A. Ramos-Cormenzana (*)</i>	67
Influence of the culture medium on the antagonist effect of a peroxidogenic strain of <i>Streptococcus durans</i> , <i>A. Quesada, A. Gálvez, E. Valdivia, M. Maqueda and E. Montoya (*)</i>	73
Production of single cell protein from sugar-cane bagasse. I. Study of bagasse hydrolysis and selection of yeasts species, <i>J. Pou, X. Figarella, M.ª J. Fernández and J. Garrido (*)</i>	81
Production of single cell protein from sugar-cane bagasse. II. Study of the multiplication of <i>Trichosporum penicillatum</i> in semi-solid substrate cultures in trays, <i>J. Pou, M.ª J. Fernández and J. Garrido (*)</i>	89
Comparative study of the acidification of beet root stillage in two fixed film fermenters in continuous process, <i>P. García-Serrano, E. Sardinero, M.ª L. Gil-Peña, M. A. Izaola, I. Schnabel and J. Garrido (*)</i>	97
Studies on a new progesterone-16 α -hydroxylating <i>Streptomyces</i> , <i>K. M. Ghanem, A. H. El-Refai and E. R. El-Helow (**)</i>	107
Variation of the heterotrophic activity and bacterial density in Barcelona beach waters, <i>M. D. Vaqué, J. Martínez and J. Vives-Rego (*)</i>	115

(*) In Spanish. (**) In English.

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Revista del Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán"



VOLUMEN 38. 1985

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director

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

Vicedirector

Dr. Angel García Gancedo, Vicedirector del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Consejo de Redacción

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

Prof. Dr. Enrique Montoya, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.

Prof. Dr. Alberto Ramos Cormenzana, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

Prof. Dr. Benito Regueiro, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

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

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

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez.

«Microbiología Española» está citada en:

Biological Abstracts
Chemical Abstracts
Index Medicus
Pascal Explore
Referativny Zhurnal

Redacción

«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
28002 Madrid (España)

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
28006 Madrid (España)

I N D I C E

	Página
<i>Argüelles, J. C.; Vicente, J. y Gacto, M.:</i> Influencia de la glucosa sobre la movilización de la trehalosa en <i>Candida utilis</i> (**).....	27
<i>Carrillo, R.:</i> véase <i>Melgarejo, P.</i>	61
<i>El-Helow, E. R.:</i> véase <i>Ghanem, K. M.</i>	107
<i>El-Refai, A. H.:</i> véase <i>Ghanem, K. M.</i>	107
<i>Fernández, M.ª J.:</i> véase <i>Pou, J.</i>	81
<i>Fernández, M.ª J.:</i> véase <i>Pou, J.</i>	89
<i>Figarella, X.:</i> véase <i>Pou, J.</i>	81
<i>Gacto, M.:</i> véase <i>Argüelles, J. C.</i>	27
<i>Gálvez, A.:</i> véase <i>Quesada, A.</i>	73
<i>García-Serrano, P.; Sardinero, E.; Gil-Peña, M.ª L.; Iznola, M. A.; Schnabel, I., y Garrido, J.:</i> Estudio comparativo de dos fermentadores de relleno para la acidogénesis de vinazas de remolacha (*).	97
<i>Garrido, J.:</i> véase <i>Gómez, R.</i>	11
<i>Garrido, J.:</i> véase <i>Tabera, J.</i>	35
<i>Garrido, J.:</i> véase <i>Pou, J.</i>	81
<i>Garrido, J.:</i> véase <i>Pou, J.</i>	89
<i>Garrido, J.:</i> véase <i>García-Serrano, P.</i>	97
<i>Ghanem, K. M.; El-Refai, A. H., y El-Helow, E. R.:</i> Estudios sobre un <i>Streptomyces</i> hidroxilador de progesterona (**).....	107
<i>Gil-Peña, M.ª L.:</i> véase <i>García-Serrano, P.</i>	97
<i>Gómez, R.; Schnabel, I., y Garrido, J.:</i> Regeneración de <i>Aspergillus niger</i> 44. Estudio de diferentes medios de esporulación (*).	11
<i>Iznola, M. A.:</i> véase <i>Tabera, J.</i>	35
<i>Iznola, M. A.:</i> véase <i>García-Serrano, P.</i>	97
<i>Jiménez-Valera, María; Ruiz-Bravo, A., y Ramos-Comenzana, A.:</i> Actividad antimicrobiana frente a <i>Yersinia enterocolitica</i> en plantas superiores (*).	67
<i>Lahoz, R.:</i> véase <i>Vázquez, C.</i>	53
<i>M.-Sagasta, E.:</i> véase <i>Melgarejo, P.</i>	61
<i>Maqueda, M.:</i> véase <i>Valdivia, E.</i>	19
<i>Maqueda, M.; Valdivia, E., y Montoya, E.:</i> Relación entre la estabilidad respiratoria y la resistencia a la supresividad de estirpes rho ⁺ de <i>S. cerevisiae</i> (*).	45
<i>Maqueda, M.:</i> véase <i>Quesada, A.</i>	73
<i>Martínez, M. J.:</i> véase <i>Vázquez, C.</i>	53
<i>Martínez, J.:</i> véase <i>Vaqué, M. D.</i>	115
<i>Melgarejo, P.; Carrillo, R., y M.-Sagasta, E.:</i> Poblaciones microbianas asociadas con brotes de melocotonero (**).....	61

	Página
<i>Montoya, E.</i> : véase <i>Valdivia, E.</i>	19
<i>Montoya, E.</i> : véase <i>Maqueda, M.</i>	43
<i>Montoya, E.</i> : véase <i>Quesada, A.</i>	73
<i>Muñoa, F. J.</i> ; <i>Vives-Rego, J.</i> , y <i>Parés, R.</i> : Detección, aislamiento y caracterización de <i>Bifidobacterium</i> en aguas libres superficiales (*).....	1
<i>Parés, R.</i> : véase <i>Muñoa, F. J.</i>	1
<i>Pou, J.</i> ; <i>Figarella, X.</i> ; <i>Fernández, M.ª J.</i> , y <i>Garrido, J.</i> : Obtención de proteínas a partir de bagacillo de caña. I. Estudio de hidrólisis de bagacillo y selección de especies de levaduras (*).....	81
<i>Pou, J.</i> ; <i>Fernández, M.ª J.</i> , y <i>Garrido, J.</i> : Obtención de proteínas a partir de bagacillo de caña. II. Estudio de la multiplicación de <i>Trichosporum penicillatum</i> en cultivo semi-sólido en bandejas (*).....	89
<i>Quesada, E.</i> ; <i>Gálvez, A.</i> ; <i>Valdivia, E.</i> ; <i>Maqueda, M.</i> , y <i>Montoya, E.</i> : Influencia del medio de cultivo en el carácter inhibitorio de una estirpe peroxidogénica de <i>Streptococcus durans</i> (*).....	73
<i>Ramos-Cormenzana, A.</i> : véase <i>Jiménez-Valera, María</i>	67
<i>Reyes, F.</i> : véase <i>Vázquez, C.</i>	53
<i>Ruiz-Bravo, A.</i> : véase <i>Jiménez-Valera, María</i>	67
<i>Sardínero, E.</i> : véase <i>García-Serrano, P.</i>	97
<i>Schnabel, I.</i> : véase <i>Gómez, R.</i>	11
<i>Schnabel, I.</i> : véase <i>Tabera, J.</i>	35
<i>Schnabel, I.</i> : véase <i>García-Serrano, P.</i>	97
<i>Tabera, J.</i> ; <i>Iznoala, M. A.</i> ; <i>Schnabel, I.</i> , y <i>Garrido, J.</i> : Criterios de selección de cepas de levadura para un proceso continuo de fermentación alcohólica (*).....	35
<i>Valdivia, E.</i> ; <i>Maqueda, M.</i> , y <i>Montoya, E.</i> : Estudios genéticos sobre la citocromo-c-peroxidasa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : posible influencia de factores citoplasmáticos (*).....	19
<i>Valdivia, E.</i> : véase <i>Maqueda, M.</i>	45
<i>Valdivia, E.</i> : véase <i>Quesada, A.</i>	73
<i>Vaqué, M. D.</i> ; <i>Martínez, J.</i> , y <i>Vives-Rego, J.</i> : Variación de la actividad heterotrófica y de la densidad bacteriana en aguas de playa de Barcelona (*).....	115
<i>Vázquez, C.</i> ; <i>Martínez, M. J.</i> ; <i>Lahoz, R.</i> , y <i>Reyes, F.</i> : Inducción por pectina de distintas actividades pécticas del hongo <i>Alternaria alternata</i> durante su autólisis (*).....	53
<i>Vicente, J.</i> : véase <i>Argüelles, J. C.</i>	27
<i>Vives-Rego, J.</i> : véase <i>Muñoa, F. J.</i>	1
<i>Vives-Rego, J.</i> : véase <i>Vaqué, M. D.</i>	115

(*) En español. (**) En inglés.

I N D E X

	Page
<i>Argüelles, J. C.; Vicente, J., and Gacto, M.: Effect of glucose on trehalose mobilization in Candida utilis (**)</i>	27
<i>Carrillo, R.: see Melgarejo, P.</i>	61
<i>El-Helow, E. R.: see Ghanem, K. M.</i>	107
<i>El-Refai, A. H.: see Ghanem, K. M.</i>	107
<i>Fernández, M.ª J.: see Pou, J.</i>	81
<i>Fernández, M.ª J.: see Pou, J.</i>	89
<i>Figarella, X.: see Pou, J.</i>	81
<i>Gacto, M.: see Argüelles, J. C.</i>	27
<i>Gálvez, A.: see Quesada, A.</i>	73
<i>García-Serrano, P.; Sardinero, E.; Gil-Peña, M.ª L.; Iznola, M. A.; Schnabel, I., and Garrido, J.: Comparative study of the acidification of beet root stillage in two fixed film fermenters in continuous process (*)</i>	97
<i>Garrido, J.: see Gómez, R.</i>	11
<i>Garrido, J.: see Tabera, J.</i>	35
<i>Garrido, J.: see Pou, J.</i>	81
<i>Garrido, J.: see Pou, J.</i>	89
<i>Garrido, J.: see García-Serrano, P.</i>	97
<i>Ghanem, K. M.; El-Refai, A. H., and El-Helow, E. R.: Studies on a new progesterone-16 α-hidroxylating Streptomyces (**)</i>	107
<i>Gil-Peña, M.ª L.: see García-Serrano, P.</i>	97
<i>Gómez, R.; Schnabel, I., and Garrido, J.: Regeneration of Aspergillus niger 44. Study of different sporulation media (*)</i>	11
<i>Iznola, M. A.: see Tabera, J.</i>	35
<i>Iznola, M. A.: see García-Serrano, P.</i>	97
<i>Jiménez-Valera, María; Ruiz-Bravo, A., and Ramos-Comenzana, A.: Studies on antimicrobial activity in plants against Yersinia enterocolitica (*)</i>	67
<i>Lahoz, R.: see Vázquez, C.</i>	53
<i>M.-Sagasta, E.: see Melgarejo, P.</i>	61
<i>Maquedea, M.: see Valdivia, E.</i>	19
<i>Maqueda, M.; Valdivia, E., and Montoya, E.: Relationship between respiratory stability and resistance to suppressiveness of rho⁺ in S. cerevisiae (*)</i>	45
<i>Maqueda, M.: see Quesada, A.</i>	73
<i>Martínez, M. J.: see Vázquez, C.</i>	53
<i>Martínez, J.: see Vaqué, M. D.</i>	115

	Page
<i>Melgarejo, P.; Carrillo, R., and M.-Sagasta, E.:</i> Microbial populations associated with peach twigs (**).....	61
<i>Montoya, E.:</i> see <i>Valdivia, E.</i>	19
<i>Montoya, E.:</i> see <i>Maqueda, M.</i>	45
<i>Montoya, E.:</i> see <i>Quesada, A.</i>	73
<i>Muñoa, F. J.; Vives-Rego, J., and Parés, R.:</i> Detection, isolation and characterization of <i>Bifidobacterium</i> in natural water (*).....	1
<i>Parés, R.:</i> see <i>Muñoa, F. J.</i>	1
<i>Pou, J.; Figarella, X.; Fernández, M.ª J., and Garrido, J.:</i> Production of single cell protein from sugar-cane bagasse. I. Study of bagasse hydrolysis and selection of yeasts species (*).....	81
<i>Pou, J.; Fernández, M.ª J., and Garrido, J.:</i> Production of single cell proten from sugar-cane bagasse. II. Study of the multiplication of <i>Trichosporum penicillatum</i> in semi-olid substrate cultures in trays (*).....	89
<i>Quesada, E.; Gálvez, A.; Valdivia, E.; Maqueda, M., and Montoya, E.:</i> Influence of the culture medium on the antagonist effect of a peroxidogenic strain of <i>Streptococcus durans</i> (*).....	73
<i>Ramos-Cormenzana, A.:</i> see <i>Jiménez-Valera, María</i>	67
<i>Reyes, F.:</i> see <i>Vázquez, C</i>	53
<i>Ruiz-Bravo, A.:</i> see <i>Jiménez-Valera, María</i>	67
<i>Sardínero, E.:</i> see <i>García-Serrano, P.</i>	97
<i>Schnabel, I.:</i> see <i>Gómez, R.</i>	11
<i>Schnabel, I.:</i> see <i>Tabera, J.</i>	35
<i>Schnabel, I.:</i> see <i>García-Serrano, P.</i>	97
<i>Tabera, J.; Izaola, M. A.; Schnabel, I., and Garrido, J.:</i> Yeast strains screening criteria for a continuous process of alcoholic fermentation (*).....	35
<i>Valdivia, E.; Maqueda, M., and Montoya, E.:</i> Genetic studies on cytochrome-c-peroxidase of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : possible influence of cytoplasmic factors (*).....	19
<i>Valdivia, E.:</i> see <i>Maqueda, M.</i>	45
<i>Valdivia, E.:</i> see <i>Quesada, A.</i>	73
<i>Vaqué, M. D.; Martínez, J., and Vives-Rego, J.:</i> Variation of the heterotrophic activity and bacterial density in Barcelona beach waters (*).....	115
<i>Vázquez, C.; Martínez, M. J.; Lahoz, R., and Reyes, F.:</i> Induction by pectin of diffent pectic activities of the fungus <i>Alternaria alternata</i> during autolysis (*).....	53
<i>Vicente, J.:</i> see <i>Argüelles, J. C.</i>	27
<i>Vives-Rego, J.:</i> see <i>Muñoa, F. J.</i>	1
<i>Vives-Rego, J.:</i> see <i>Vaqué, M. D.</i>	115

(*) In Spanish. (**) In English.

MICROBIAL POPULATIONS ASSOCIATED WITH PEACH TWIGS

P. MELGAREJO, R. CARRILLO and E. M.-ŞAGASTA

Departamento de Patología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Madrid

(Aceptado: 9 de abril de 1985)

SUMMARY

The microflora of peach twigs has been quantitatively studied. Numbers of fungi and yeasts were highest in spring and late summer while bacterial numbers were maximal in winter. These seasonal changes in number of microbes were discussed in relation to the optimal timing to establish antagonist against peach twig pathogens.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio cuantitativo de la microflora de los brotes de melocotonero. Las mayores cantidades de hongos y levaduras se obtenían en primavera y finales de verano, mientras que el número de bacterias aislado era máximo en invierno. Se discuten estas variaciones estacionales en el número de microorganismos presentes en los brotes en relación con el momento óptimo para la introducción de antagonistas a patógenos de brotes de melocotonero.

INTRODUCTION

Current interest in microbiology of plant surfaces is reflected by numerous publications concerning studies of microbial populations associated with the phylloplane (4, 13). In contrast, however, there are virtually scanty data on other plant tissues. Such information is of considerable importance from the standpoints both of basic

microbial ecology and implications for plant disease control. The knowledge could lead to the application of best strategies of control, for example by the determination of the appropriate timing for application of microbial antagonists to pathogens (2).

Studies on microbial communities associated with peach twigs are scarce and fragmentary (14, 16). We have described elsewhere data on the fungal

microflora of these organs and its possible significance to the biological control of the peach pathogen *Monilia laxa* (9).

Here we present evidence that substantial numbers of filamentous fungi, yeasts and bacteria occur there and how their populations fluctuate along the year.

MATERIALS AND METHODS

Field sampling

Samples of healthy peach twigs (*Prunus persica* L. cv. Jerónimo) were taken at random from an orchard in Madrid, Spain, in May, July, September and November 1980 and in January, March, May, July, September and November 1981. No chemical treatments were applied ever to the orchard.

Isolation and quantification

For the isolation of microbial populations ten 1 cm³ (8 cm long × 0.4 cm diameter) twigs were shaken individually in 150 ml sterile distilled water for 30 min. Dilutions of the washing were then plated in 1 ml aliquots into molten agar media, mixed and poured into Petri dishes. Filamentous fungal (hereafter abbreviated to fungi) and yeast populations were counted in potato-dextrose agar medium (PDA) prepared according to Booth (6) and amended with 0.5 g/l of streptomycin sulphate as a bacteriostat and bacteria were counted in plate count agar medium (7) amended with 10 ppm of actidione as a fungistat.

After one week of incubation at 25 ± 1 °C in the dark, total colony counts of fungi, yeasts and bacteria were made. Variability in number of

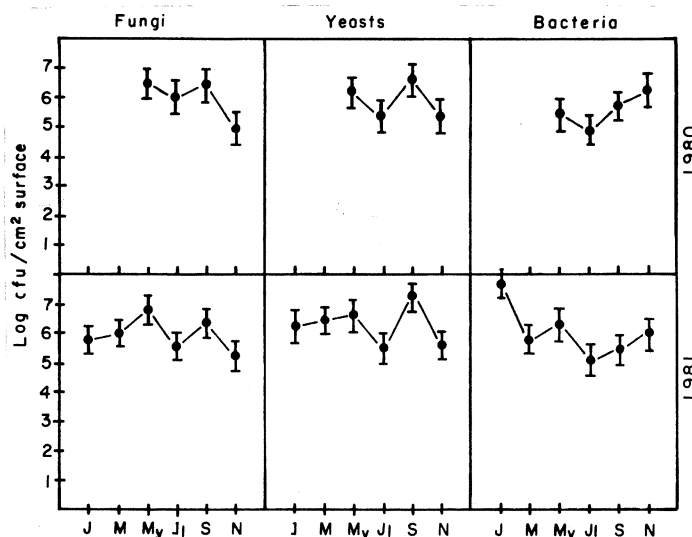


Figure 1. Variation on numbers of filamentous fungi, yeasts and bacteria isolated from peach twigs in 1980 and 1981. Values are means from ten twigs (\log_{10} colony forming units/cm² of twig surface) with standard error of the mean. Isolation dates were January (J), March (M), May (My), July (JI), September (S) and November (N)

microorganisms isolated was assessed by standard methods of analysis of variance and Neuman-Keuls range tests. Data were previously transformed by $\sqrt{x + \frac{1}{2}}$ to achieve homogenization of variances (12).

RESULTS AND DISCUSSION

The reliability of the sampling methods used to isolate the peach twig mycoflora was shown by Melgarejo *et al* (9). Similar conclusion could be drawn for bacterial and yeast populations since data on number of microbes isolated in 1980 did not differ at each sampling date from those of 1981 (figure 1). This fact occurs despite the differences in the prevailing climatic conditions of each year (i. e. the lowest average relative humidities of 1980 (figure 2)).

However, numbers of fungi, yeasts and bacteria did vary in twigs along the year, as can be observed in figure 1. The pattern followed by both fungi and yeasts was similar. Numbers increased in spring months (March to May), to become minimal in July, increasing again at the end of the summer and decreased in winter, being the lowest at November for fungi. However, bacterial numbers were maximal in winter (January) and minimal in summer (July). These numbers of microbes were on an order of magnitude similar to those obtained by Last and Deighton (8) in the aerial surface of trees and Andrews and Kenerley (2-3) in apple buds. However, they exceeded those reported by Wensley (16) in peach bark. Differences in methodology may account for these divergent estimates, or the anomaly could be due to the organ, varietal, seasonal or locational variations.

The seasonal changes observed in the number of microbes isolated from

twigs along the year are in accordance to those described by Blakeman and Fokkema (5) in the phylloplane. Bacterial populations used to be abundant in leaves in early growing season while yeasts and fungi increased later. The low number of bacteria isolated during the warmest months of the year

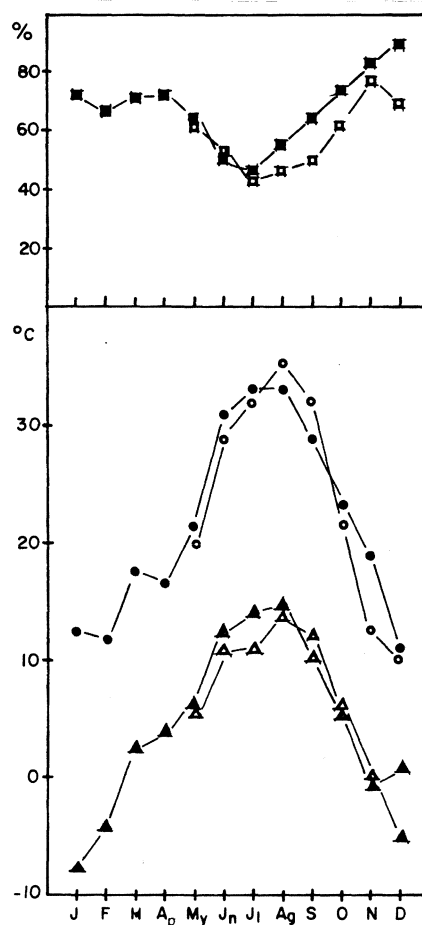


Figure 2. Variation on the average maximal temperatures (o—o), minimal temperatures (Δ—Δ) and relative humidities (□—□) along the years 1980 (in blank) and 1981 (in black). Months were January (J), February (F), March (M), April (Ap), May (My), June (J), July (Jl), August (Ag), September (S), October (O), November (N) and December (D)

could be explained by their inherent sensibility to desiccation (15). In winter, however, they developed quickly due to the prevailing higher humidity. On their turn, yeasts and fungi are more resistant to desiccation (3) and their numbers were highest in spring and late summer as their development become favoured by warm temperatures.

Our attention has been directed to twigs to determine the appropriate timing for application of microbial antagonist to *Monilia laxa* (Aderh et Ruhl) Honey which causes dry wilt of peach twigs. It has been shown that primary infection by this pathogen in Central Spain occurs from March to July, with occasionally a secondary infection in early autumn (11). On the other hand, it would be desirable to establish antagonists which might preempt an unoccupied habitat and thereby impede invasion by the pathogen (1). This report suggests that the optimal time to introduce the antagonists in twigs would be at the beginning of March for biocontrol of the primary infection and at the end of September for the secondary one: a postponement introduction would be confronted by a more numerous population of fungi, yeasts and bacteria (figure 1) that could impeded the antagonistic action to occur.

This kind of information is of great value since we have previously found four fungi (*Aspergillus flavus* Link ex Fries, *Epicoccum purpurascens* Ehrenb. ex Schlecht, *Penicillium frequentans* Stoll and *P. purpurogenum* Westling) antagonistic to *Monilia laxa* (10) which are resident species in peach twigs and have their peaks during the growing season (9). The coincidence between the best timing of application and the peaks add to their potential for biocontrol of the disease induced by *M. laxa* in peach twigs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. A. Fraile for helpful discussion and critical reading of the manuscript. This work was in part supported by the Ministry of Food, Fishery and Agriculture, Spain (Convenio núm. 02.14). P. Melgarejo was in receipt of a graduate research fellowship from the Ministry of Science and Education, Spain.

REFERENCES

1. ALEXANDER, M. 1971. Microbial Ecology. John Wiley and Sons, New York.
2. ANDREWS, J. H., and KENERLEY, C. M. 1980 a. Microbial populations associated with buds and young leaves of apple. Can. J. Bot., 58, 847-55.
3. ANDREWS, J. H., and KENERLEY, C. M. 1980 b. Positional variation in phylloplane microbial populations within an apple tree canopy. Microb. Ecol., 6, 71-84.
4. BLAKEMAN, J. P. 1981. Microbial Ecology of the Phylloplane. Academic Press, London, New York.
5. BLAKEMAN, J. P., and FOKKEMA, N. J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annu. Rev. Phytopathol., 20, 167-92.
6. BOOTH, C. 1971. Methods in Microbiology, IV. Academic Press, London, New York.
7. HARRIGAN, W. F., and MC CANCE, M. E. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London, New York, San Francisco.
8. LAST, F. T., and DEIGHTON, T. C. 1965. The non-parasitic microflora on the surfaces of living trees. Trans. Brit. Mycol. Soc., 48, 83-99.
9. MELGAREJO, P.; CARRILLO, R., and M-SAGASTA, E. 1985. The mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance to the biological control of *Monilia laxa*. Trans. Brit. Mycol. Soc., in press.
10. MELGAREJO, P., and M-SAGASTA, E. 1984. Fungal antagonism in relation to peaches. In: M. WOODBINE (ed.). Antimicrobials and Agriculture, 127-36. Butterworths, London.

11. M.-SAGASTA, E. 1977. *Monilia* disease. *Eur. Mediterr. Plant Prot. Organ. Bull.*, 7, 105-16.
12. PARBERY, I. A.; BROWN, J. P., and BOFINGER, V. J. 1981. Statistical methods in the analysis of phylloplane populations. In: J. P. BLAKEMAN (ed.). *Microbial Ecology of the Phylloplane*, 47-65. Academic Press, London, New York.
13. PREECE, T. F., and DICKINSON, C. H. 1971. *Ecology of Leaf Surface Micro-organisms*. Academic Press, London, New York.
14. ROYSE, D. J., and RIES, S. M. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 68, 603-7.
15. SLEESMAN, J. P., and LEBEN, C. 1976. Microbial antagonists of *Bipolaris maydis*. *Phytopathology*, 66, 1214-18.
16. WENSLEY, R. N. 1971. The microflora of peach bark and its possible relation to perennial canker (*Leucostoma cincta*) (Fr.) V. Hohnel (*Valsa cincta*). *Can J. Bot.*, 17, 333-37.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A *YERSINIA ENTEROCOLITICA* EN PLANTAS SUPERIORES

MARIA JIMENEZ-VALERA, A. RUIZ-BRAVO y A. RAMOS-CORMENZANA
Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

(Aceptado: 9 de mayo de 1985)

RESUMEN

Se ha estudiado la presencia de actividad antibacteriana en 179 especies de plantas superiores pertenecientes a 39 familias. Como microorganismo de prueba se utilizó una cepa de la enterobacteria productora de beta-lactamasas *Yersinia enterocolitica*, perteneciente al serotipo 0:3, descrito como patógeno humano. Se obtuvieron líquidos extractivos acuoso y alcohólico (etanol) de la trituración y maceración de las partes aéreas de las plantas, y con ellos se impregnaron discos de celulosa cuya actividad inhibidora se estudió frente a cultivos en agar de Müeller-Hinton incubados a 22 °C. Los resultados revelaron actividad antibacteriana en 17 especies botánicas pertenecientes a 13 familias. El mayor porcentaje de actividades se obtuvo con los líquidos extractivos alcohólicos.

SUMMARY

The presence of antimicrobial activity was evaluated in 179 species of higher plants belonging to 39 botanical families. Susceptibility test were performed against a serotype 0:3 strain of *Yersinia enterocolitica*. This member of Enterobacteriaceae is recognized as a beta-lactamase producing bacterium, and 0:3 is a human pathogen serotype. Aqueous and alcoholic (ethanol) extracts were obtained by grinding and maceration of aerial parts of plants. Cellulose disks received aseptically 10 µl of aqueous or alcoholic extracts, and they were tested against the proving microorganism on the surface of Müeller-Hinton agar plates, incubated at 22 °C. The results shown antimicrobial activity in 17 plants belonging to 13 families. Antimicrobial activities were detected more frequently in alcoholic than in aqueous extracts.

INTRODUCCIÓN

La importancia clínica de *Yersinia enterocolitica* como patógeno humano, es actualmente un hecho reconocido, ya que se ha descrito como agente causal de una gran variedad de síndromes, entre los que ocupan el primer lugar las infecciones intestinales (2). Mencionamos, a título de ejemplo, los datos recopilados por Swaminathan y cols. (11) sobre infecciones intestinales en la República Federal Alemana, indicando que *Y. enterocolitica* se aisló en el 1,5% de los casos y solamente fue superado este porcentaje por *Salmonella*.

Las actividades antimicrobianas frente a *Yersinia enterocolitica* han sido objeto de diversos estudios (7, 10). La presencia de dos tipos de beta-lactamasas (3-4) determina la resistencia observada en la mayoría de las cepas frente a los antibióticos beta-lactámicos. También suelen detectarse resistencias frente a eritromicina y novobiocina, mientras que, en general, resultan activos el cloranfenicol, tetracilinas, colistina, ácido nalidíxico, sulfonamidas y aminoglucósidos, si bien respecto de estos últimos se han observado resistencias de posible origen plasmídico a la estreptomomicina y kanamicina (5, 8). Cabe considerar, por tanto, a *Y. enterocolitica* como una bacteria gramnegativa productora de beta-lactamasas y moderadamente resistente a diversos antibióticos. Puede tomarse, en consecuencia, como un microorganismo de prueba adecuado para la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas con posible interés clínico.

La actividad antimicrobiana en vegetales se conoce desde muy antiguo (9), habiéndose descrito variabilidad en la detección de dicha actividad según factores como el tiempo de recolección (12) y la parte de la planta ensayada (9).

En el presente trabajo se investiga la presencia de sustancias con actividad antibacteriana frente a *Yersinia enterocolitica* en vegetales superiores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacteria

Yersinia enterocolitica TP134 (serotipo 0:3) aislada de ganglios mesentéricos humanos y cedida por H. H. Mollaret (Instituto Pasteur, París, Francia).

La bacteria se cultivó en agar tripticasa soja (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) a 22 °C durante 24 h.

Plantas

Se ensayaron un total de 179 especies botánicas recogidas en la provincia de Granada y pertenecientes a las siguientes familias: Amaranthaceae, 1, Anacardiaceae, 1, Apocynaceae, 2, Aristolochiaceae, 1, Asclepiadaceae, 1, Boraginaceae, 5, Cappariaceae, 1, Caryophyllaceae, 7, Cistaceae, 3, Compositae, 23, Convolvulaceae, 1, Cruciferae, 16, Cucurbitaceae, 1, Cupressaceae, 1, Chenopodiaceae, 6, Dipsacaceae, 1, Equisetaceae, 2, Euphorbiaceae, 6, Geraniaceae, 2, Gramineae, 3, Labiatae, 16, Leguminosae, 19, Liliaceae, 7, Linaceae, 1, Lythraceae, 1, Malvaceae, 3, Onagraceae, 2, Oxalidaceae, 1, Papaveraceae, 7, Polygonaceae, 5, Primulaceae, 1, Ranunculaceae, 2, Rubiaceae, 1, Scrophulariaceae, 12, Solanaceae, 3, Thymelaceae, 2, Umbelliferae, 8, Urticaceae, 3, y Verbenaceae, 1.

Procedimiento de extracción

Las partes aéreas de las especies botánicas a ensayar se sometieron a sendas extracciones acuosas y alcohólicas. Para ello, la planta fresca, previamente lavada, se trocó y sometió a trituración en un omni-mixer Sorwall

junto con el líquido extractor, a razón de 25 g de planta/100 ml de líquido. La extracción acuosa se efectuó con agua destilada, y la alcohólica con etanol de 96°. El producto triturado se mantuvo en maceración durante 18 h a 4°C, exprimiéndose a continuación sobre lienzo y filtrándose por papel de filtro corriente. Los líquidos extractivos así obtenidos, transparentes y coloreados, se esterilizaron a través de Millipore (0,2 µm de poro). Y se utilizaron para la impregnación de discos de papel Whatman n.º 4, a razón de 10 µl por disco, que una vez perfectamente secos a temperatura ambiente, se usaron en los ensayos de actividad antimicrobiana.

Prueba de susceptibilidad

La técnica seguida es similar a la descrita para la realización de anti-

biogramas por Bauer y cols. (1), cuya única salvedad fue el cambio de los discos de antibióticos por los discos anteriormente preparados, y que contenían los líquidos extractivos de las especies botánicas ensayadas. La temperatura de incubación fue de 22°C.

RESULTADOS

Los ensayos realizados sobre líquidos extractivos acuosos y alcohólicos de 179 especies botánicas permitieron detectar actividad antimicrobiana frente a *Yersinia enterocolitica* en 17 especies, que se detallan en la tabla 1. Estas especies mostraron actividad al menos en uno de los líquidos extractivos. Otras tres especies, también incluidas en dicha tabla, deben calificarse como de actividad dudosa, al

Tabla 1. Actividad antibacteriana en plantas frente a *Yersinia enterocolitica*

Especie botánica	Diámetro de inhibición (*) mm	
	Extracto acuoso	Extracto alcohólico
<i>Borago officinalis</i>	—(**)	10,7
<i>Cistus albidus</i>	12,3	17,0
<i>C. ladaniferus</i>	16,7	17,0
<i>C. monspeliensis</i>	11,7	16,0
<i>Eruca sativa</i>	—(**)	13,3
<i>Lepidium draba</i>	13,0	14,7
<i>Euphorbia helioscopia</i>	12,3	12,7
<i>E. nutans</i>	12,7	18,0
<i>E. pubescens</i>	< 8,0 (***)	11,3
<i>Allium naepolitanum</i>	13,0	11,3
<i>A. roseum</i>	13,7	< 8,0
<i>Epilobium hirsutum</i>	12,0	12,0
<i>E. parviflorum</i>	—(**)	10,7
<i>Rumex crispus</i>	—(**)	11,0
<i>R. pulcher</i>	—(**)	12,3
<i>Anagallis arvensis</i>	14,0	13,3
<i>Ranunculus repens</i>	19,0	—
<i>Pistacia lentiscus</i>	—(**)	< 8,0
<i>Erodium moschatum</i>	< 8,0	< 8,0
<i>Oxalis cernua</i>	< 8,0	< 8,0

(*) Los resultados son la media aritmética de tres pruebas. (**) Crecimiento hasta el borde del disco. (***) Resultado dudoso en las tres pruebas.

menos en alguno de los líquidos extractivos.

El estudio de muestras obtenidas a partir de una misma especie en distintas épocas del año puso de relieve la influencia de este factor sobre la presencia de los principios responsables de la actividad antimicrobiana. En la *tabla 2* se exponen las especies que mostraron variación de actividad según el tiempo de recolección.

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos se desprende que la presencia de sustancias con actividad antibacteriana sobre una enterobacteria patógena como *Yersinia enterocolitica*, no puede considerarse como un hallazgo infrecuente, puesto que aproximadamente el 9,5% de las especies estudiadas mostraron poseer dicha actividad. En apoyo del interés de este dato hemos de recordar que los ensayos no incluían ningún procedimiento de concentración de líquidos extractivos previo a la impregnación de discos de celulosa.

La distribución taxonómica de las especies con actividad antibacteriana frente a *Yersinia enterocolitica* debe calificarse de amplia, ya que de las 39 familias estudiadas, 13 contaron con una especie al menos con actividad en

alguno de sus líquidos extractivos, lo que supone un 33% de positividades respecto del total de familias. Cabe resaltar no obstante, la concentración de especies activas en los géneros *Cistus*, *Euphorbia*, *Allium*, *Epilobium* y *Rumex*, todos ellos con más de una especie con actividad antibacteriana.

Nuestros resultados permiten comparar la eficacia del agua y del etanol en la extracción de los principios antibacterianos detectados. En 9 de las 17 especies activas estudiadas, ambos líquidos extractivos mostraron actividad, por lo que las coincidencias suponen un 52,9% sobre el total de positividades. De las 8 especies restantes, la actividad se detectó solamente en uno de los líquidos, el alcohólico en 6 casos (35,3%), y el acuoso en los otros 2 (11,8%). Por tanto, el etanol extrajo la actividad en el 88,2% de las especies positivas, y el agua en el 64,7%.

Las variaciones observadas en la detección de actividad antimicrobiana, según el mes en que se realiza la recolección de ejemplares de las especies incluidas en la *tabla 2*, pueden obedecer a varias causas, tales como ausencia de producción de los correspondientes principios activos, degradación de los mismos, o cualquier factor que disminuya su concentración en las plantas por debajo de los nive-

Tabla 2. Variación de la actividad antibacteriana en plantas según la época de recolección

Especie botánica	Extracto acuoso		Extracto alcohólico	
	Actividad positiva	Ausencia de actividad	Actividad positiva	Ausencia de actividad
<i>Euphorbia helioscopia</i>	marzo	octubre	marzo	octubre
<i>Allium naepolitanum</i>	marzo mayo		marzo	mayo
<i>Borago officinalis</i>		marzo mayo	mayo	marzo
<i>Lepidium draba</i>	marzo junio	mayo	marzo junio	mayo

les de actividad detectable con la metodología empleada en este estudio. Es de resaltar que la variación de presencia a ausencia de actividad detectable siguió el mismo curso en los extractos acuosos y alcohólicos de *Euphorbia helioscopia* y *Lepidium draba*, pero hubo diferencias entre ambos extractos en *Borago officinalis* y *Allium naepolitanum*. Entre las posibles explicaciones para estas diferencias entre ambos extractos, tal vez la más sencilla sea atribuir las a hipotéticas diferencias de solubilidad o de estabilidad de los compuestos implicados en los respectivos líquidos extractivos; ello concuerda con los datos numéricos de la tabla 1, donde se observa que la actividad de *A. naepolitanum* es mayor en el extracto acuoso (que resultó positivo en marzo y mayo, mientras el alcohólico lo fue sólo en marzo); algo similar, pero en sentido contrario, ocurre con *B. officinalis*.

No poseemos actualmente datos que nos permitan discutir la posible naturaleza y propiedades de las moléculas responsables de las actividades antimicrobianas observadas. No obstante, cabe resaltar aquí que, en todo caso, debe tratarse de estructuras resistentes a la degradación por beta-lactamasas, ya que *Yersinia enterocolitica* es una bacteria productora de estas enzimas (4-5). Esta producción ha sido comprobada por nosotros con la cepa IP134, en ensayos previos no incluidos en el presente trabajo, usando como substratos penicilina-G y cefalotina (6). Los resultados que hemos aportado suministran la base para, en posteriores investigaciones, determinar las posibilidades de aplicación

que puedan ofrecer los agentes antimicrobianos detectados en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C., and TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Pathol.*, 45, 493-96.
2. BOTTONE, E. J. 1977. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of charismatic microorganism. *Crit. Rev. Microbiol.*, 5, 211-41.
3. CORNELIS, G. 1975. Distribution of beta-lactamase A and B in some groups of *Yersinia enterocolitica* and their role in resistance. *J. Gen. Microbiol.*, 91, 391-402.
4. CORNELIS, G., and ABRAHAM, E. P. 1975. Beta-lactamase from *Yersinia enterocolitica*. *J. Gen. Microbiol.*, 87, 273-84.
5. CORNELIS, G.; WAUTERS, G., et VANDERHAEGH, M. 1973. Présence de Beta-lactamase chez *Yersinia enterocolitica*. *Ann. Microbiol. Paris*, 124B, 139-52.
6. JIMENEZ-VALERA, M. 1983. Inhibición de las beta-lactamasas de *Yersinia enterocolitica* con especial referencia a inhibidores de origen vegetal. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
7. KANAZAWA, Y., and KURAMATA, T. 1976. Drug-susceptibility of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Jap. J. Antibiotics*, 29, 366-76.
8. KIMURA, S.; IKEDA, T.; EDA, T.; MITSUI, Y., and NAKATA, K. 1976. R-plasmids from *Yersinia*. *J. Gen. Microbiol.*, 97, 141-44.
9. OSBORN, E. M. 1943. On the occurrence of antibacterial substances in green plants. *Brit. J. Pathol.*, 24, 227-31.
10. RAEVOURI, M.; HARVEY, S. M.; PICKETT, M. J., and MARTIN, W. J. 1978. *Yersinia enterocolitica*: *in vitro* antimicrobial susceptibility. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 13, 888-90.
11. SWAMINATHAN, B.; HARMON, M. C., and MEHLMAN, I. J. 1982. A review: *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.*, 52, 151-83.
12. VOCCA, D. D., and WALSH, R. A. 1954. The antibacterial activity of an extract obtained from *Ascophyllum nodosum*. *J. Amer. Pharm. Ass.*, 43, 24-9.

INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL CARACTER INHIBIDOR DE UNA ESTIRPE PEROXIDOGENICA DE *STREPTOCOCCUS DURANS*

A. QUESADA, A. GALVEZ, E. VALDIVIA, M. MAQUEDA y E. MONTOYA
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

(Aceptado: 9 de octubre de 1985)

RESUMEN

Cuando la estirpe S-76 de *Streptococcus durans* se cultiva en anaerobiosis, en medio carente de glucosa (TSA), ejerce un notable efecto antagonista sobre un amplio espectro bacteriano, debido a la producción de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno durante la posterior aerobiosis.

El estudio de dicho carácter inhibidor en medio TSA modificado reveló la importancia de los glúcidos, metabolizados vía oxidativa, para la excreción de dicho metabolito, estableciéndose, recíprocamente, una relación entre fermentación y ausencia de inhibición.

SUMMARY

When *Streptococcus durans* S-76 is previously grown on TSA medium lacking glucose in anaerobiosis and then incubated under aerobic conditions, it produces a remarkable antagonist effect on a extensive number of bacteria, due to the production of high levels of hydrogen peroxide during the posterior oxygenation.

The requirements of non fermentable sugars for the excretion of this metabolite was pointed out in a study carried out modifying the amount and number of nutrients in such medium. Reciprocally, fermentative sugars inhibit the H₂O₂ production.

INTRODUCCIÓN

En las bacterias de género *Streptococcus* se ha detectado la producción de diversas sustancias inhibidoras del crecimiento, tales como bacteriocinas,

ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno. Estas, en algunas situaciones, pueden conferir ventajas de tipo ecológico en la competencia por un determinado hábitat.

Uno de estos metabolitos, el peró-

xido de hidrógeno, es sustancia extremadamente tóxica para los microorganismos. Los estreptococos, carentes de citocromos, realizan el transporte electrónico mediante flavoproteínas que en muchos casos reducen el oxígeno a agua oxigenada, extremo en parte paradójico puesto que carecen de catalasa y por tanto de un sistema efectivo de descomposición de ésta.

Mc Leod y Gordon (6) fueron los primeros en describir la producción de este metabolito por las bacterias. A partir de entonces se ha referido esta propiedad en distintas especies de los géneros *Streptococcus* (4, 8-11), *Mycoplasma* (1, 5), así como en *Bacillus*.

Además se han estudiado los requerimientos nutritivos de los microorganismos antes citados para la producción de peróxido de hidrógeno. Así, LeBien y Brommel (4), Vernazza y Melville (10) y Thomas y Pera (9) han propuesto que en algunas estirpes de *Streptococcus mutans* y *S. mitis* es necesaria la glucosa, que se degradaría vía glucosa oxidada, para la producción de este metabolito que incluso llega a alcanzar carácter inhibidor. Por el contrario en *Mycoplasma pneumoniae* es la presencia de glicerol, vía glicerol-oxidasa, la que produce su acumulación (5).

Hasta ahora sólo se había descrito el carácter antagonista debido al H_2O_2 en estreptococos del grupo viridans, pobladores de la cavidad oral (4, 10). En nuestro laboratorio hemos aislado una estirpe de *Streptococcus durans*, S-76, procedente de heces fecales en base a su alto carácter antagonista frente a un amplio espectro de microorganismos cuando era incubada previamente en anaerobiosis. En experiencias posteriores (7), se identificó esta sustancia como peróxido de hidrógeno, no habiéndose encontrado hasta ahora antecedentes bibliográficos

de que un enterococo produjese concentraciones inhibitorias de H_2O_2 . El presente trabajo aborda el estudio de los requerimientos nutritivos de *S. durans* S-76 que determinan su actividad inhibidora.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Microorganismos

Hemos utilizado la estirpe *Streptococcus durans* S-76, suministrada por el Servicio de Bacteriología de la Ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves, de Granada.

Fue aislada a partir de las heces fecales y seleccionada por nosotros en base a su carácter inhibidor.

Como bacterias indicadoras se han ensayado las siguientes especies: *Staphylococcus aureus* ATCC 8, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253 sp. *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* Delbruck, *Pseudomonas fluorescens* CECT 385, *Alcaligenes faecalis* CCM 1052 y *Shigella sonnei*.

2) Medios y condiciones de incubación

La actividad inhibidora de esta estirpe se ensayó en agar de soja y tripti-caseína (TSA: digerido pancreático de caseína 15 g, digerido papaínico de soja 5 g, NaCl 5 g, agua destilada 1.000 ml). Para estudiar la influencia de los distintos componentes del medio se modificó el mismo tal como se indica en la tabla 1.

La relación entre la vía metabólica oxidativa o fermentativa y el carácter inhibidor de *Streptococcus durans* S-76 se llevó a cabo en TSA y TSA carente de peptona de soja, adicionados de púrpura de bromocresol (3 ml de solución en etanol al 1%/l de medio) suplementados con los azúcares relacionados en las tablas 2-3, a una concen-

Tabla 1. Actividad inhibidora de *S. durans* S-76 incubada en anaerobiosis, en medio TSA con y sin modificaciones en la concentración y los componentes del mismo

Bactericidas indicadores	TSA	Caseína 0,75 %	Sin caseína	Soja 0,25 %	Sin soja
<i>C. glutamicum</i>	+	+	±	±	±
<i>Micrococcus</i> sp.	++++	++++	++++	++++	++
<i>B. megaterium</i>	++	++	+	++	-
<i>E. coli</i> Delbruck	±	±	±	±	-
<i>Ps. fluorescens</i>	+	++	+	++	±
<i>A. faecalis</i> CCM 1052	++++	++++	++++	++++	+++
<i>S. sonnei</i>	++	++	+	+	-

Bactericidas indicadores	NaCl 0,25 %	Sin NaCl	Sin soja		
			+5 % caseína	+5 % EL	+10 % EL
<i>Sta. aureus</i> ATCC 8	+++	+++	+	+++	+++
<i>C. glutamicum</i>	+	+	NE	NE	NE
<i>Micrococcus</i> sp.	++++	++++	NE	NE	NE
<i>B. megaterium</i>	+	++	NE	NE	NE
<i>E. coli</i> Delbruck	+	+	NE	NE	NE
<i>Ps. fluorescens</i>	++	++	NE	NE	NE
<i>A. faecalis</i> CCM 1052	+++++	++++	+++	++++	++++
<i>S. sonnei</i>	++	++	±	+	++

-, no inhibición. +, halo de inhibición de 1 mm. ++, halo de inhibición de 2 mm. +++, halo de inhibición de 3-5 mm. ++++ halo de inhibición de más de 5 mm. NE, no ensayado. EL, extracto de levadura.

tración final del 0,5%. Además la glucosa se adicionó a menores concentraciones (tabla 4). La producción de ácidos se detectó por el viraje a amarillo del indicador.

Los cultivos se llevaron a cabo a 37 °C. Cuando se hicieron en anaerobiosis se emplearon jarras GasPak (BBL).

3) Ensayo de la actividad antibacteriana

La estirpe S-76 se inoculó por medio de gotas de 5 µl de un cultivo en fase estacionaria sobre placas de Petri con el medio adecuado, incubándose a 37 °C durante 48 h en anaerobiosis o

aerobiosis, según ensayo. A continuación las placas se cubrieron con una capa de agar al 0,75% mantenida a 45 °C e inoculada con 0,1 ml de cultivo de la bacteria indicadora y se incubaron de nuevo, esta vez en aerobiosis, a 37% durante 24 h.

La actividad inhibidora se expresó en función del tamaño de los halos de inhibición aparecidos.

RESULTADOS

En la tabla 1 se puede observar el amplio espectro antagonista de *Streptococcus durans* S-76 frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas cuan-

Tabla 2. Actividad inhibidora de *S. durans* S-76 incubada en aerobiosis y anaerobiosis, detectada en medio TSA adicionado de diversos azúcares (0,5 %)

Medio TSA adicionado de	Vía de utilización de los azúcares O/F	Aerobiosis		Anaerobiosis	
		<i>Sta. aureus</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>Sta. aureus</i>	<i>A. faecalis</i>
	O	-	-	++++	+++
Lactosa	O	±	-	++++	+++
Glucosa	F	-	-	+	+
Galactosa	F	-	-	++	++
Glucosa + galactosa	F	-	-	±	+
Arabinosa	O	±	-	++++	+++
Lactato	O	±	-	++++	+++
Glicerol	O	++	±	++++	+++
Sorbosa	O	±	-	++++	+++
Fructosa	F	-	-	-	-

Tabla 3. Actividad inhibidora de *S. durans* S-76 incubada en aerobiosis y anaerobiosis, detectada en medio TSA sin soja adicionado de diversos azúcares (0,5 %)

Medio TSA adicionado de	Vía de utilización de los azúcares O/F	Aerobiosis		Anaerobiosis	
		<i>Sta. aureus</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>Sta. aureus</i>	<i>A. faecalis</i>
-	O	-	-	+++	+
Lactosa	O	-	-	+++	+
Glucosa	F	-	-	-	-
Galactosa	F	-	-	-	-
Glucosa + galactosa	F	-	-	-	-
Arabinosa	O	-	-	++	+
Lactato	O	-	-	+++	+
Glicerol	O	+	-	++++	+
Sorbosa	O	-	-	++	+
Fructosa	F	-	-	-	-

Tabla 4. Actividad inhibidora de *S. durans* S-76 incubada en aerobiosis y anaerobiosis, detectada en medio TSA adicionado de diferentes concentraciones de glucosa

Medio TSA adicionado de glucosa %	Producción de ácidos	Aerobiosis		Anaerobiosis	
		<i>Sta. aureus</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>Sta. aureus</i>	<i>A. faecalis</i>
-	NO	-	-	++++	+++
0,05	SI	-	-	+++	++
0,1	SI	-	-	+++	++
0,2	SI	-	-	++	+
0,5	SI	-	-	+	+

do era incubada en anaerobiosis previamente al ensayo de la actividad. Después de descartar la presencia de fagos líticos y ácidos orgánicos, la sustancia inhibidora se identificó como peróxido de hidrógeno (7). Para establecer los requerimientos de dicha estirpe referidos a la producción de este metabolito, se ensayó la actividad antibacteriana en medios derivados de TSA, en donde inicialmente se había detectado, cuyas composiciones se indican en dicha tabla.

Cuando el digerido de caseína estaba presente a la mitad de la concentración inicial o bien el medio carecía de él, la actividad inhibidora no se afectaba de modo significativo, al igual que ocurría cuando se modificaba del mismo modo la concentración de NaCl. Por el contrario, la reducción, y más aún la ausencia de peptona de soja, implicaba una disminución significativa del tamaño de los halos de inhibición de los distintos microorganismos ensayados. Estos resultados ponen de manifiesto la relación entre la peptona de soja y el carácter antagonista de la estirpe S-76. Además, cuando el medio carente de soja se suplementaba con peptona de caseína, no se recuperaba la actividad antibacteriana, hecho que por el contrario sucedía cuando se suplementaba con extracto de levadura al 5 y 10%.

El estudio de la composición de las peptonas de soja y caseína y del extracto de levadura recogido por Larpent y Larpent-Gourgand (3), nos reveló como diferencia más significativa, la ausencia de glúcidos en la caseína y la presencia de éstos en un 37% en la soja y en 16,6% en el extracto de levadura.

La relación entre los glúcidos y la actividad inhibidora de *Streptococcus durans* S-76 se estudió en los medios TSA y TSA sin soja, suplementados

por los azúcares expresados en las tablas 2-3.

En dichas tablas se indica la actividad antagonista obtenida en ambos medios, que era máxima cuando la estirpe S-76 creció previamente en anaerobiosis y en general se puede decir que, en ausencia de soja, los halos obtenidos son siempre menores.

Por el contrario, en condiciones aerobias no se detectaba dicha actividad, salvo en el caso del glicerol. De igual forma, en ambos casos se hace patente la relación entre la presencia de azúcares metabolizados oxidativamente y la de halos de inhibición, mientras que los azúcares fermentables (glucosa, galactosa y fructosa) implicaban la ausencia de dicho carácter inhibidor.

La influencia del tipo de metabolismo en la excreción de H_2O_2 se expone en la tabla 4, en donde la disponibilidad de la glucosa se ha hecho variar, desde concentraciones tan bajas (0,05%), que en principio hacían suponer su utilización por vía oxidativa, hasta la concentración anteriormente ensayada (0,5%) que favorecía la acumulación de ácidos en el medio.

En dicha tabla se puede observar que incluso en aerobiosis y a las más bajas concentraciones, se acumulan ácidos a partir de la glucosa. En anaerobiosis la producción de ácidos era lógicamente mayor, produciéndose halos de inhibición cuyo tamaño estaba en relación inversa a la concentración de glucosa.

DISCUSIÓN

Los resultados expuestos en el apartado anterior evidencian la relación entre los glúcidos y el carácter antagonista de *Streptococcus durans* S-76, debido a la excreción de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

En ausencia de peptona de soja, el tamaño de los halos de inhibición era siempre menor y ello no puede ser atribuido al empobrecimiento del medio, ya que la adición de peptona de caseína (5%) no suponía la total recuperación de la inhibición, mientras que al suplementar con extracto de levadura (5 y 10%) se recuperaba tal actividad (tabla 1). Parece clara, pues, la influencia de los glúcidos presentes en la peptona de soja y el extracto de levadura.

Además diversos autores (4, 9-10) habían señalado la necesidad de glucosa, metabolizada vía glucosa-oxidasa, para la producción de H_2O_2 en estreptococos del grupo «viridans». Sin embargo, nuestros resultados apuntan en otro sentido, puesto que la adición de azúcares fermentables como glucosa, galactosa y fructosa inhiben la producción de tal metabolito, que sólo se produce, de otra parte, cuando la fuente de carbono de que disponen se utiliza oxidativamente, hecho más acentuado en el caso del glicerol, con el que alcanzaron valores de H_2O_2 claramente inhibidores, cuando la estirpe S-76 había sido incubada previamente en anaerobiosis (tablas 2-3).

En bacterias con metabolismo facultativo, la concentración de un azúcar en el medio, condiciona la vía de utilización del mismo. Sin embargo, los resultados obtenidos al disminuir la concentración de glucosa hasta valores diez veces inferiores a los antes ensayados (tabla 4) ponen de manifiesto un metabolismo típicamente fermentativo en *Streptococcus durans* S-76, en el cual el oxígeno no es nunca último aceptor de electrones.

Los azúcares metabolizados oxidativamente, incapaces de ser degradados en ausencia de oxígeno, serían los responsables del acúmulo posterior de H_2O_2 posiblemente vía flavoprotein-

oxidasa, dependiente de una coenzima reducida, que podría ser el limitante en aerobiosis, de acuerdo con numerosos autores.

El glicerol, sin embargo, produce concentraciones claramente inhibitorias en aerobiosis, lo que parece indicar la existencia en esta estirpe de una glicerol-oxidasa, dependiente sólo del oxígeno, enzima detectada en otras especies de *Streptococcus* y en el género *Mycoplasma* (5).

BIBLIOGRAFÍA

1. COHEN, G., and SOMERSON, N. L. 1969. Glucose-dependent secretion and destruction of hydrogen peroxide by *Mycoplasma pneumoniae*. J. Bacteriol. 98, 547-51.
2. DINGMAN, D. W., and STALHY, D. P. 1984. Protection of *Bacillus larvae* from oxygen toxicity with emphasis on the role of catalase. Appl. Environ. Microbiol., 47, 1228-37.
3. LARPENT, J. P., and LARPENT-GOURGAUD, M. 1975. Memento Technique de Microbiologie. Editions P.I.C, Genève.
4. LeBIEN, T. W., and BROMEL, M. C. 1975. Antibacterial properties of a peroxidogenic strain of *Streptococcus mitior* (mitis). Can. J. Microbiol., 21, 101-3.
5. LOW, I. E., and ZYMKUS, S. M. 1973. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase and H_2O_2 formation of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Bacteriol., 116, 346-54.
6. McLEOD, J. W., and GORDON. 1923. Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide amongst bacteria with a scheme of classification based on these properties. J. Pathol. Bacteriol., 26, 326-31.
7. QUESADA, A. 1984. Estudios sobre una estirpe peroxidogénica de *Streptococcus durans*. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.
8. SEELEY, H. W., and VANDERMARK, P. J. 1951. An adaptive peroxidation by *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol., 61, 27-35.
9. THOMAS, E. L., and PERA, K. A. 1983. Oxy-

-
- gen metabolism of *Streptococcus mutans*: uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.*, 154, 1236-44.
10. VERNAZZA, T. R., and MELVILLE, T. H. 1979. Inhibitory activity of *Streptococcus mitis* against oral bacteria. *Microbios*, 26, 95-101.
11. WHITTEMBURY, R. 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 35, 13-26.

OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE BAGACILLO DE CAÑA. I. ESTUDIO DE HIDROLISIS DE BAGACILLO Y SELECCION DE ESPECIES DE LEVADURAS

J. POU^(a), X. FIGARELLA^(a), M.^a J. FERNANDEZ^(b) y J. GARRIDO^(b)

^(a) Departamento de Ingeniería Química, Universidad Metropolitana de Caracas (Venezuela)

^(b) Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Madrid

(Aceptado: 18 de octubre de 1985)

RESUMEN

Este trabajo (*) forma parte de un plan de investigación para el desarrollo de un proceso de tecnología sencilla sobre el «Aprovechamiento del bagacillo de caña para la alimentación de ganado, mediante la multiplicación de levadura».

En el estudio realizado se eligió un tratamiento de hidrólisis de 30 min a 1 atm de presión con H₂SO₄ (1 %) y una relación sólido/líquido de 1/5. La selección de especies de levaduras se llevo a cabo respecto a una mejor utilización de la fuente carbonada y a un mayor rendimiento en biomasa frente a la materia reductora utilizada. Las especies seleccionadas fueron *Hansenula-anómala* (cepa 925), *Geotricum candidum* (cepa 1471) y *Trichosporum penicillatum* (cepa 1735), las cuales presentaron un rendimiento en biomasa sobre fuente de carbono utilizada de un 53, 59 y 62 %, respectivamente. Las especies *Geotricum candidum* (cepa 1471) y *Trichosporum penicillatum* (cepa 1735) se han utilizado en el estudio de cultivo semi-sólido cuyos resultados se presentarán en una próxima publicación.

SUMMARY

This work is part of a Research Project for the development of a process requiring simple technology for the «Utilization of sugarcane bagasse for cattle feed through yeast multiplication».

The results given here correspond to the study of diverse aspects of bagasse preparation by means of an acid hydrolysis process and to the selection of the most suitable yeasts for their multiplication

(*) Es parte de una tesis doctoral y está financiado parcialmente por el CONICIT (Venezuela).

for conventional submerged culture or for semi-solid substrate culture on hemicelluloses obtained in the hydrolysis process.

The hydrolysis treatment selected for the study was 30 min at a pressure of 1 atm with 1 % H₂SO₄ and a solid/liquid ratio of 1 to 5. Yeast species were selected according to best utilization of the carbon source and best biomass yield on reducing matter utilized. The species selected were *Hansenula anomala* (strain 925), *Geotricum candidum* (strain 1471) and *Trichosporum penicillatum* (strain 1735) which gave good biomass yields on the carbon source utilized: 53, 59 and 62 % respectively. *Geotricum candidum* (strain 1471) and *Trichosporum penicillatum* (strain 1735) have been utilized in semi-solid substrate culture studies and the results will be presented in a following paper.

1. INTRODUCCIÓN

Paralelamente a la línea de investigación de obtención de proteínas mediante la multiplicación de levaduras, a partir de sustratos adecuados para plantas de 100.000 Tm/año, existe la necesidad de desarrollar trabajos de investigación sobre sustratos renovables a corto plazo, como son los residuos celulósicos.

La transformación de estos residuos, a pesar de encontrarse en cantidades limitadas, puede ser rentable cuando están concentrados en puntos concretos o cuando sea necesario eliminar residuos que puedan crear problemas de contaminación (aprovechamiento de residuos agrícolas o industriales como bagazo, bagacillo de caña, paja, cáscara de arroz, lejías bisulfíticas, etc.) (8).

A partir de la década de los setenta y a causa de la crisis mundial de energía y materias primas, numerosos investigadores han centrado su atención en la utilización de desechos celulósicos como sustrato para la obtención de proteínas (1, 5, 9).

Nosotros tratamos de realizar un primer estudio biotecnológico de un proceso de obtención de proteínas a partir de bagacillo de caña.

En una primera etapa, teniendo en cuenta la posibilidad de obtener proteínas mediante la multiplicación de levaduras sobre los azúcares procedentes de la fracción de hemicelulosas, se estudiaron distintos aspectos de la preparación del bagacillo de caña mediante un proceso de hidrólisis ácida. Sobre los hidrolizados ácidos obtenidos se efectuó una selección de especies de levaduras según su rendimiento en biomasa frente a materia reductora consumida y se estudió la multiplicación de dichas especies seleccionadas en cultivo líquido.

En una segunda etapa, cuyos resultados se presentarán en posteriores artículos, se dedicó especial atención a la multiplicación en cultivo semi-sólido de las especies seleccionadas para la obtención de un producto fermentado constituido por el bagacillo hidrolizado + la biomasa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Microorganismos*

Las especies de levaduras utilizadas procedían de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Madrid.

2.2. Métodos de análisis

En los cultivos de levadura se determinó la levadura seca obtenida y los azúcares y ácidos volátiles utilizados en el desarrollo de levaduras.

El análisis de azúcares totales en los hidrolizados de bagacillo y en los cultivos de levaduras se llevó a cabo según una modificación de Figarella (4) al método de Shaffer-Somogyi (11).

La determinación de pentosas y hexosas presentes en los hidrolizados se realizó según una modificación de Cruz y Figueroa (2) al método fenol-sulfúrico de Bennett.

Los ácidos volátiles se midieron según el método de Ribereau-Gayon (7).

La determinación cuantitativa de la proteína se llevó a cabo por el método de Kjeldahl.

2.3. Substrato

El substrato utilizado fue el bagacillo de caña procedente de una azucarera de Venezuela.

2.4. Métodos de hidrólisis

2.4.1. Hidrólisis ácida a 1 atm de presión. Series de muestras de 1 g de bagacillo, previamente ciclonado, se adicionaron con 3,5 y 7 ml. de diferentes concentraciones de ácido sulfúrico en orden creciente (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 expresadas siempre como % v/v).

Cada serie de muestras se mantuvo en autoclave a 1 atm de presión durante 15, 30 ó 45 min. Al finalizar el tratamiento las muestras se enfriaron, filtraron y se llevaron a 1 l con agua destilada. Una vez homogeneizadas las muestras tratadas se determinaron las hexosas, pentosas y azúcares totales obtenidos con estos tratamientos de hidrólisis.

2.4.2. Obtención del hidrolizado ácido del bagacillo Para obtener un hidro-

lizado homogéneo, una cantidad adecuada de bagacillo —previamente ciclonado— se adicionó con H_2SO_4 1 % hasta una relación sólido-líquido 1/5, y se sometió a un tratamiento de hidrólisis durante 30 min en autoclave a 1 atm.

Una vez homogeneizado este hidrolizado, se disluyo hasta obtener una concentración de 10-12 g/l de materia reductora, conservándolo en una cámara fría —sin neutralizar— para servir de base en los medios de cultivo utilizados en el estudio de selección de especies de levaduras.

2.5. Métodos de cultivo

La selección de especies de levaduras y la multiplicación de las especies seleccionadas se llevó a cabo en matraces de 250 ml con capacidad útil de 50 ml bajo condiciones aeróbicas, en agitador a 200 rpm.

Cada matraz, conteniendo 50 ml del medio de cultivo, se inoculó con 2 ml de inóculo.

El medio de cultivo se preparó adicionando las sales al hidrolizado ácido de bagacillo (previamente neutralizado con NaOH hasta pH 4,5), en la proporción siguiente: KH_2PO_4 , 1,3 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,37 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4 g/l; urea, 1,25 g/l. El medio inicial contenía en todos los casos 10-12 g/l de materia reductora.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El bagacillo de caña, ya sometido a un proceso de ciclonaje para la eliminación de polvo, se sometió a un proceso de hidrólisis química con H_2SO_4 diluido con objeto de solubilizar la fibra celulósica y transformarla en azúcares utilizables para el desarrollo de las levaduras.

En el estudio de la hidrólisis ácida

los ensayos se llevaron a cabo según se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

Las condiciones de hidrólisis se eli-

gieron de forma que con un gasto de energía o ácido menores se obtuviera una concentración de materia reductora adecuada para la multiplicación

Tabla 1. Selección de distintas especies de levaduras sobre hidrolizado de bagacillo de caña.

Especie de levadura	Materia seca g/l	Materia reductora consumida g/l	Acidos volátiles consumidos g/l	pH
<i>Saccharomyces carlbergensis</i> (cepa 384)	0,3	1,4	0,0	4,5
<i>Cryptococcus laurentii</i> (cepa 1496)	0,4	0,3	0,2	4,5
<i>Sporobolomyces pararoseus</i> (cepa 985)	0,5	0,5	0,2	4,5
<i>Debaryomyces nicotiana</i> (cepa 843)	0,9	3,2	0,1	4,5

Valores iniciales: materia reductora, 12,4 g/l; ácidos volátiles, 2,0 g/l. Cultivo en agitador a 30 °C durante 48 h. Inóculo procedente de un cultivo sobre hidrolizado.

Tabla 2. Selección de distintas especies de levaduras sobre hidrolizado de bagacillo de caña.

Especie de levadura	Materia seca g/l	Materia reductora consumida g/l	Acidos volátiles consumidos g/l	pH
<i>Saccharomyces pasteurianus</i> (cepa 556)	1,0	5,4	0,0	4,5
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (cepa 936)	1,0	6,1	0,3	4,5
<i>Kluyveromyces apiculata</i> (cepa 1014)	1,5	5,1	1,1	5,5
<i>Torulasporea rosei</i> (cepa 717)	1,7	5,9	1,3	5,8
<i>Kluyveromyces phaseolusporus</i> (cepa 983)	1,8	5,3	1,1	5,2

Valores iniciales: materia reductora, 12,4 g/l; ácidos volátiles, 2,0 g/l. Cultivo en agitador a 30 °C durante 48 h. Inóculo procedente de un cultivo sobre hidrolizado.

Tabla 3. Selección de distintas especies de levaduras sobre hidrolizado de bagacillo de caña.

Especie de levadura	Materia seca g/l	Materia reductora consumida g/l	Acidos volátiles consumidos g/l	pH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa p-2)	1,9	6,4	1,8	5,4
<i>Pullularia pullulans</i> (cepa 1741)	1,9	9,1	1,6	5,2
<i>Torulopsis inconspicua</i> (cepa 1328)	2,0	6,0	1,3	3,8
<i>Sac. elipsoideus</i> (cepa 87)	2,3	6,3	1,9	5,0
<i>Candida rugosa</i> (cepa 1272)	2,9	6,6	1,0	6,0

Valores iniciales: materia reductora, 12,4 g/l; ácidos volátiles, 2,0 g/l. Cultivo en agitador a 30 °C durante 48 h. Inóculo procedente de un cultivo sobre hidrolizado.

de levadura en cada caso (cultivo sumergido convencional o cultivo semi-sólido).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, las condiciones de trabajo elegidas para efectuar la hidrólisis ácida de bagacillo a 1 atm de presión fueron: concentración de H₂SO₄, 1 % (v/v); relación sólido/líquido, 1/5; tiempo de hidrólisis, 30 min.

En los ensayos realizados en estas condiciones, la cantidad de azúcares totales hidrolizados fue del 23,1 %.

Este porcentaje de azúcares obtenidos corresponde a la fracción de hemicelulosas que en las condiciones de estos ensayos es la única fracción que puede ser hidrolizada.

La selección de especies de levaduras para su utilización en la multiplicación del bagacillo de caña, se realizó respecto a la cantidad de materia seca obtenida a partir de la utilización de los ácidos volátiles y de la materia

reductora presentes en los hidrolizados de bagacillo.

Operando en las condiciones descritas en Materiales y Métodos se obtuvieron los resultados presentados en las tablas 1-4.

Como podemos observar en el caso de las especies de levaduras que aparecen en la tabla 1, la producción de biomasa es prácticamente despreciable.

En el grupo que aparece en la tabla 2 la producción de materia seca es sumamente baja a pesar del apreciable consumo de materia reductora.

En la tabla tabla 3 cabe destacar el hecho de que *Pullularia pullulans* produce tan sólo 1,9 g/l de biomasa a pesar del alto consumo (73 %) de materia reductora (9,1 g/l).

Como podemos observar, las levaduras agrupadas en la tabla 4 presentan los mejores resultados respecto a la cantidad de materia seca obtenida a partir de los azúcares totales y de los

Tabla 4. Selección de distintas especies de levaduras sobre hidrolizado de bagacillo de caña.

Especie de levadura	Materia seca g/l	Materia reductora consumida g/l	Acidos volátiles consumidos g/l	pH
<i>Trichosporum penicillatum</i> (cepa 1735)	3,9	10,3	1,5	3,8
<i>Rhodotorula rubra</i> (cepa 1471)	4,0	8,6	1,8	6,0
<i>Geotricum candidum</i> (cepa 1471)	4,2	10,6	1,9	3,5
<i>Hansenula anómala</i> (cepa 925)	4,9	9,9	1,2	5,5

Valores iniciales: materia reductora, 12,4 g/l; ácidos volátiles, 2,0 g/l. Cultivo en agitador a 30 °C, durante 48 h. Inóculo procedente de un cultivo sobre hidrolizado.

ácidos volátiles procedentes de la hidrólisis ácida del bagacillo.

En este grupo de levaduras el consumo de la materia reductora es del 80 al 85 % (9,9 a 10,5 g/l), exceptuando el caso de *Rhodotorula rubra* que consume tan sólo el 69 % (8,6 g/l).

En la tabla 5 se presentan los rendimientos en biomasa obtenidos frente a la fuente de carbono total utilizada. Como podemos observar, el peor rendimiento se obtuvo con *Rhodotorula rubra*, con un 44 %.

Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados se seleccionaron las tres especies con mejor rendimiento: *Geotricum candidum* (53 %), *Hansenula anómala* (59 %) y *Trichosporum penicillatum* (62 %).

La especie de levadura *Hansenula anómala* (cepa 925) se seleccionó por su buen rendimiento y teniendo en cuenta los antecedentes de su utilización para la obtención de proteínas en otros procesos a partir de desechos ligno-celulósicos (10) o a partir

de alcoholes (13), donde se puso de manifiesto la posibilidad de alcanzar con esta especie biomasa con un alto contenido en proteína, así como un excelente perfil de aminoácidos.

Por otra parte se seleccionaron las especies *Geotricum candidum* y *Trichosporum penicillatum* por su desarrollo de tipo miceliar más adecuado para su utilización en cultivo semi-sólido sobre bagacillo hidrolizado, y por su posible carácter celulolítico y hemicelulolítico como se demuestra en los trabajos de Dennis (3), Stevens y Payne (12) y Kudryashova y cols. (6), quienes comparan la actividad celulolítica del *G. candidum* con la de *Trichoderma viride*.

Una vez seleccionadas estas especies de levaduras se estudió su multiplicación en medio líquido para evaluar su rendimiento en biomasa frente a la materia reductora utilizada y se estudiaron distintas modificaciones del medio de cultivo.

Los ensayos realizados no presenta-

Tabla 5. Desarrollo sobre hidrolizados de bagacillo de caña de las especies de levaduras seleccionadas.

Especie de levadura	Tiempo de cultivo (*) horas	Materia seca (*) g/l	Materia reductora consumida g/l	Acidos volátiles consumidos g/l	Rendimiento en biomasa sobre fuente de carbono utilizada	
					Materia reductora %	Materia reductora ácidos volátiles %
<i>Rhodotorula rubra</i> (cepa 1389)	28	4,4	8,9	0,9	49	44
<i>Hansenula anomala</i> (cepa 925)	20,30	4,9	7,6	0,7	64	59
<i>Geotricum candidum</i> (cepa 1471)	19	5,2	8,8	1,0	59	53
<i>Trichosporum penicillatum</i> (cepa 1735)	15	5,9	8,7	0,8	68	62

(*) Período de cultivo en que se alcanza el punto máximo de materia seca indicado en (**). Cultivo en agitador a 30 °C. Valores iniciales: 11 g/l de azúcares reductores; 1,3 g/l de ácidos volátiles; pH, 4,5. Inóculo procedente de un cultivo sobre hidrolizado.

ron datos que permitan mejorar significativamente los resultados obtenidos con el medio de cultivo utilizado en la selección de especies de levaduras (hidrolizado de bagacillo con adición de fuente de fósforo, nitrógeno, $[\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2 + \text{urea}]$, magnesio y potasio.

Este resultado es lógico, ya que el substrato empleado (bagacillo de caña) es un producto natural que puede contener los requerimientos mínimos para el desarrollo de las especies utilizadas.

Estos ensayos permitieron llegar a un conocimiento de la transformación de la materia reductora en biomasa por estos microorganismos y permitieron seleccionar aquellas especies que presentaban mejores rendimientos en biomasa y mejores ca-

racterísticas para su aplicación a un sistema de cultivo semi-sólido, ya que este tipo de cultivo parecía el mecanismo más adecuado para el enriquecimiento proteico del bagacillo.

4. CONCLUSIONES

1.^a Las condiciones elegidas para obtener hidrolizados de bagacillo para cultivo líquido fueron: Relación sólido/líquido 1/5, con H_2SO_4 1 % y 30 min a 1 atm de presión.

2.^a De las cuatro especies que presentaban mejores rendimientos se seleccionó la especie *Hansenula anomala* (cepa 925) para los ensayos sobre hidrolizados de bagacillo en cultivo líquido por su desarrollo celular homogéneo en medio líquido.

Para los ensayos en cultivo semi-sólido, sobre bagacillo hidrolizado, se seleccionaron las especies *Geotricum candidum* (cepa 1471) y *Trichosporum penicillatum* (cepa 1735) por su buen rendimiento y su desarrollo de tipo miceliar.

3.^a Los ensayos en cultivo líquido pusieron de manifiesto que la adición de factores específicos (oligoelementos y vitaminas) al hidrolizado ácido no mejoraba los rendimientos de la multiplicación de las especies de levaduras utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. CHANG, M.; TERRY, Y. C., and TSAO T. G. 1981. Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. *Advan. Biochem. Eng.*, 20, 15.
2. CRUZ, J., y FIGUEROA, S. 1981. Trabajo de Licenciatura. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Metropolitana, Caracas (Venezuela).
3. DENNIS, C. 1972. Breakdown of cellulose by yeast species. *J. Gen. Microbiol.*, 11, 409-11.
4. FIGARELLA, X. 1978. Comunicación personal.
5. GONG, Ch. S.; CHEH, L. F.; TSAO, G. T., and FLICKINGER, M. C. 1981. Conversions of hemicelluloses carbohydrates. *Advan. Biochem. Eng.*, 20, 93.
6. KUDRYASHOVA, T. I.; FENIKSOVA, R. V., and TIONOVA, N. A. 1976. Cellulase biosynthesis by *Geotricum candidum*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 12, 339-44. (Chem. Abstr. *Biochem. Sec.*, 85, 44891 a).
7. RIBEREAU-GAYON, J., and PEYNAUD, E. 1962. *Análisis y Control de Vinos*, 98. Editorial Aguilar, Madrid.
8. ROCKWELL, J. 1976. Sources and Characteristics of Cellulose in Single Cell Proteins from Cellulose and Hydrocarbons, 4-16. Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey.
9. RÖLZ, C., and HUMPHREY, A. 1981. Microbiol biomass from renewables: review of alternatives. *Advan. Biochem. Eng.*, 21, 1-54.
10. SCHNABEL, I., y GARRIDO, J. 1964. Producción de levaduras sobre lejías bisulfíticas de *Eucalyptus globulus* y pre-hidrolizados de cáscara de almendra. III. Multiplicación y selección de levaduras sobre lejías. *Rev. Cienc. Apl.*, 98, 234.
11. SHAFFER, P. A., and SOMOGYI, M. 1941. *Sugar Analysis*. Wiley and Sons Inc., New York.
12. STEVENS, B. J. H., and PAYNE, J. 1977. Cellulase and xylanase production by yeast of the genus *Trichosporum*. *J. Gen. Microbiol.*, 100, 381-93.
13. VELA, C.; FERNÁNDEZ, M. J.; LLAGUNO, C., and GARRIDO, J. 1973. New protein source from alcohols. Selection of the most suitable yeast for their multiplication on ethanol. *Abstr. Commun. FEBS Meet. Ind. Aspects Biochem.* 19th, 119.

OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE BAGACILLO
DE CAÑA. II. ESTUDIO DE LA MULTIPLICACION DE
TRICHOSPORUM PENICILLATUM EN CULTIVO
SEMI-SOLIDO EN BANDEJAS

J. POU^(a), M.^a J. FERNANDEZ^(b) y J. GARRIDO^(b)

^(a) Departamento de Ingeniería Química, Universidad Metropolitana de Caracas (Venezuela)

^(b) Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Madrid

(Aceptado: 17 de septiembre de 1985)

RESUMEN

Este trabajo (*) forma parte del desarrollo de un proceso que con una tecnología sencilla permitirá incrementar el contenido protéico del bagacillo de caña para su empleo en la alimentación de ganado, mediante la multiplicación de levadura en cultivo semi-sólido sobre el bagacillo hidrolizado. En un trabajo anterior (9), se seleccionó la especie de levadura a utilizar (*Trichosporum penicillatum*) y las condiciones de hidrólisis ácida del bagacillo a aplicar para obtener la materia reductora que constituye la fuente de carbono para el desarrollo de la levadura.

Los resultados aquí presentados corresponden al estudio del desarrollo de la especie de levadura *Trichosporum penicillatum* (cepa 1735) sobre bagacillo hidrolizado en cultivo semi-sólido en bandejas.

Utilizando los parámetros de cultivo elegidos (30 °C y 6 l aire/min 100 g de bagacillo) se consiguió un coeficiente de proteína de 56. Este coeficiente representa una excelente transformación en proteína (56 g de proteína/100 g de materia reductora). Este sistema permitió prácticamente triplicar el contenido inicial en proteína del bagacillo de caña utilizado en nuestros ensayos (3,5 % a 9,1 %).

SUMMARY

This work is part of the development of a process which, by means of simple techniques enables the increase in protein content of sugar-cane bagasse for its use as animal feed, through yeast pro-

(*) Es parte de una tesis doctoral dentro de un plan de investigación sobre el «Aprovechamiento de bagacillo de caña para la alimentación de ganado, mediante la multiplicación de levadura» y está financiado parcialmente por el CONICIT (Venezuela).

pagation in a semi-solid substrate culture on hydrolysed bagasse. In previous experiments the yeast species *Trichosporum penicillatum* to be used was selected, as well as conditions to be applied in the acid hydrolysis of the bagasse to obtain reducing matter which constitutes a carbon source for yeast growth.

The results presented here correspond to the study of the development of the selected yeast species *Trichosporum penicillatum* (strain 1735) on hydrolysed bagasse in semi-solid substrate culture in trays. This yeast development permits the obtention of a protein-enriched fermented product consisting of hydrolysed bagasse and biomass.

Using the selected parameters for culture (30 °C and 6 l air/min 100 g of bagasse) a protein coefficient of 56 was obtained. This coefficient represents an excellent protein transformation (56 g of protein/100 g of reducing matter) taking into account the fact that the results in conventional submerged culture do not exceed a coefficient of 30.

The results obtained with the tray system show that the semi-solid substrate culture may be an efficient mechanism for transformation of reducing matter from cellulose residue into protein. This system permits the initial protein content of the sugar-cane bagasse utilized to be practically tripled in our experiments (3,5 % to 9,1 %).

A following paper will give details of studies carried out using other mechanisms for semi-solid substrate culture of yeasts (rotating vessels) to achieve greater transformation of reducing matter into protein due to improved mixing and aerating systems.

1. INTRODUCCIÓN

A partir de la década de los años setenta y a causa de la crisis mundial de energía y materias primas, numerosos investigadores han centrado su atención en la utilización de desechos celulósicos como substrato para la obtención de proteínas (3, 5, 10).

En estos últimos años, y a causa del auge creado por la innovación de tecnologías para la producción de proteínas a partir de desechos celulósicos, se han señalado las ventajas de llevar a cabo los procesos de obtención de biomasa en sistema semi-sólido (20-30 p/v) en el cual se añade suficiente líquido para saturar los sólidos, pero sin permitir agua libre (2).

Entre los trabajos más destacados en este campo se encuentran los de Han y Anderson (6), quienes utilizaron el H₂SO₄ para hidrolizar la paja de césped que constituía la matriz semi-sólida para el cultivo de *Candida utilis* logrando, en un período de cultivo de 3 d, un 12,4 % de proteína.

Lequerica y La Fuente (7), utilizando una cepa de *Candida utilis* y como substrato la corteza húmeda triturada de naranja, lograron un incremento del contenido bruto de proteínas del 7,3 al 18,5 % sobre materia seca, después de 48 h de cultivo a temperatura ambiente.

Siempre en la misma línea de investigación, Pamment y cols. (8) estudiaron el cultivo de *Chaetomium cellulolyti-*

cum sobre serrín deslignificado previamente con NaOH. En un periodo de cultivo de 20 d obtuvieron incrementos de proteína bruta de un 8 % y un 10 %, utilizando un sistema de jarras rotatorias o de bandejas, respectivamente.

Otros autores (12), lograron desarrollar un cultivo mixto de microorganismos (*Chaetomium celluloliticum*, *Trichoderma lignorum* y *Candida lipolitica*) sobre paja de trigo en un fermentador horizontal de 3 l de capacidad con aireación y agitación. A los 7 d de cultivo, el contenido de proteínas de la paja aumentó de un 12-14 % a un 16-18 % y la degradación de la celulosa fue del 33 %.

En nuestro grupo de trabajo se ha llevado a cabo un estudio sobre el aprovechamiento del bagacillo de caña mediante el desarrollo de levaduras en cultivo semi-sólido.

Los resultados que se presentan a continuación corresponden al estudio del desarrollo de la especie de levadura *Trichosporum penicillatum* (cepa 1735) sobre bagacillo hidrolizado en cultivo semi-sólido en bandejas.

Este desarrollo de levadura permite obtener un producto fermentado enriquecido en proteínas, constituido por el bagacillo hidrolizado más la biomasa, que una vez secado podría utilizarse para la alimentación de ganado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos

La especie de levadura utilizada fue el *Trichosporum penicillatum* (cepa 1735), procedente de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), de Madrid. Seleccionada en un anterior trabajo (9), por su buen rendimiento en biomasa frente a

materia reductora y utilizada por su característico crecimiento micelar.

2.2. Métodos de análisis

En el cultivo semi-sólido de bagacillo el desarrollo celular se determinó por el incremento del porcentaje de proteína bruta respecto a materia seca total (bagacillo hidrolizado + biomasa). Además se determinó la materia reductora utilizada en el desarrollo de la levadura.

El análisis de los azúcares totales se llevó a cabo según una modificación de Figarella (4) al método de Shaffer-Somogyi (11).

La determinación cuantitativa de la proteína se llevó a cabo por el método de Kjeldahl.

2.3. Substrato

El substrato utilizado fue el bagacillo de caña procedente de una azucarera de Venezuela.

El bagacillo hidrolizado constituía una matriz celulósica adecuada para el desarrollo de la levadura en cultivo semi-sólido.

2.4. Material utilizado

Estufa adaptada para cultivo semi-sólido de bagacillo. Estufa marca Memmert mod. V-30, provista de un compresor y un conducto de entrada de aire que pasa a través de un burbujeador en un tanque de humidificación para mantener saturado de humedad el ambiente.

La adaptación de este sistema fue realizada por Vittori y cols. (datos no publicados).

2.5. Métodos de cultivo

Cultivo semi-sólido en bandejas. Se pesaron 30 g de bagacillo/bandeja, que se sometió a un tratamiento de hi-

Tabla 1. Condiciones de hidrólisis del bagacillo de caña para cultivo semi-sólido en bandejas

Hidrolizado	Relación sólido/líquido p/v	Tiempo de reacción min	SO ₄ H ₂		Materia reductora inicial %
			%	v/v	
A	1/3	30	0	0 atm	4,7
B	1/3	30	0,5	0 atm	9,0
C	1/3	30	0,5	1 atm	14,0

drólisis según las condiciones que se detallan en cada caso y que fueron determinadas en un trabajo previo (9).

Una vez hidrolizado, el bagacillo se neutralizó con NaOH 0,5 M (pH 4,5) y se enriqueció con el medio de cultivo

núm. 1. El sustrato se inoculó con un cultivo de contenido celular equivalente en materia seca a 3 g/l y en proporción de 2 % (p/v) de células frescas cultivadas en fermentador.

El medio de cultivo utilizado para

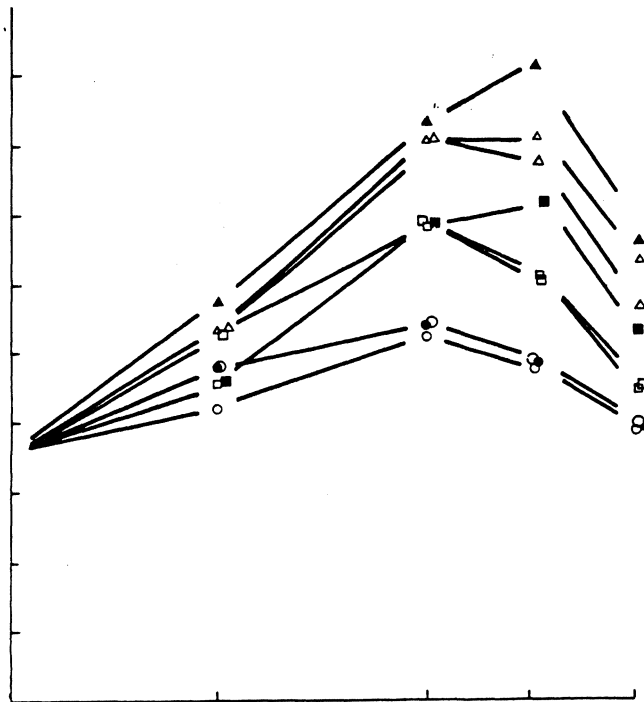


Figura 1. Comparación del desarrollo de *T. penicillatum* sobre diferentes hidrolizados con distintos flujos de aireación a 30 °C de temperatura. 1 l/min: ○ hidrolizado A; □ hidrolizado B; △ hidrolizado C. 2,5 l/min: ○ hidrolizado A; □ hidrolizado B; △ hidrolizado C. 6 l/min: ● hidrolizado A; ■ hidrolizado B; ▲ hidrolizado C

los ensayos sobre cultivo semi-sólido de bagacillo fue el medio núm. 1 que contenía una relación, fijada/g de materia reductora, de: KH_2PO_4 0,13 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,037 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14 g/l y urea 0,125 g/l.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos en cultivo semi-sólido en bandejas se llevaron a cabo sobre bagacillo hidrolizado con tres tratamientos de hidrólisis diferentes (tabla 1).

Utilizando los parámetros de trabajo de 30 g de bagacillo/bandeja, relación sólido/líquido 1/7 y período máximo de cultivo 72 h, se estudió la influencia de la aireación (figura 1).

Las diferencias entre los porcentajes de proteína obtenidos se deben principalmente a la utilización de los diferentes hidrolizados, debido a los diferentes contenidos en materia reductora inicial.

Cuando se eleva el flujo de aireación a 6 l/m se aprecia una ligera diferencia en el porcentaje de proteína obtenido (6 %) al utilizar el hidrolizado B (9,8 % de materia reductora) y una respuesta apreciable (20 %) al utilizar el hidrolizado C (14 % de materia reductora), lo que demuestra que es necesario un mayor aporte de aire para utilizar el 14 % de materia reductora presente en el hidrolizado C.

Teniendo en cuenta estos resultados se estudió la posibilidad de desa-

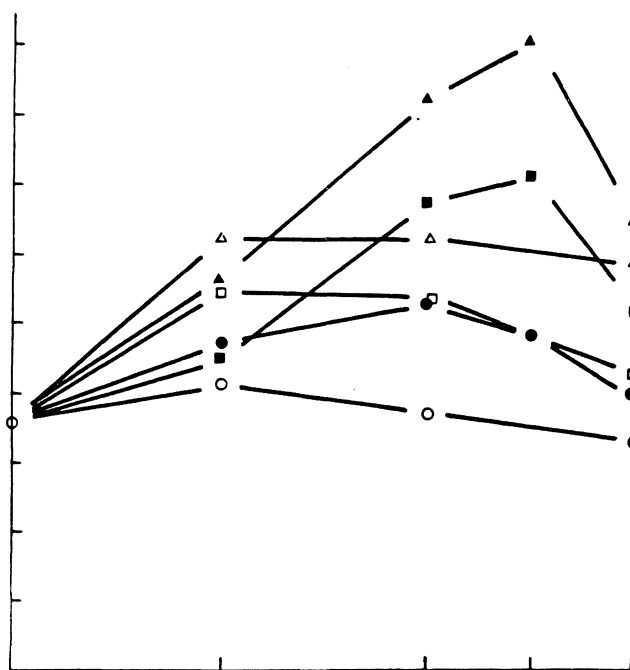


Figura 2. Comparación del desarrollo de *T. penicillatum* sobre diferentes hidrolizados a 30 °C o a temperatura ambiente y 6 l/min de flujo de aireación. 30 °C: ●—● hidrolizado A; ■—■ hidrolizado B; ▲—▲ hidrolizado C. Temperatura ambiente: ○—○ hidrolizado A; □—□ hidrolizado B; △—△ hidrolizado C.

Tabla 2. Coeficiente de transformación en proteína de *T. penicillatum* en cultivo semi-sólido en bandejas, sobre bagacillo de caña hidrolizado

Temperatura de cultivo °C	Flujo de aire (*) l/min	Proteína %			Coeficiente de proteínas (**)		
		A	B	C	A	B	C
25	1	0,6	1,4	2,7	23	20	—
	6	0,6	2,1	2,9	17	35	36
30	1	1,7	3,3	4,6	46	47	42
	6	1,8	3,6	5,6	49	51	56

(*) g de proteína producida/100 g de materia inductora consumida. (**) Por 100 g de bagacillo.

rollar el *Trichosporum penicillatum* con un flujo de aire de 6 l/min, pero a temperatura ambiente (figura 2). Las diferencias en los valores de porcentajes de proteínas en ambos casos son muy significativas.

Si se tienen en cuenta los coeficientes de proteínas obtenidos (tabla 2), queda claramente de manifiesto que el mejor resultado obtenido se logró utilizando el sistema de bandejas con el hidrolizado de mayor contenido en materia reductora (hidrolizado) a 30 °C y con 6 l de aire/min 100 g bagacillo, cuyo coeficiente de transformación en proteínas (*) fue de 56.

Teniendo en cuenta que un mayor aporte de oxígeno favorece la transformación de materia reductora, en nuestro grupo de trabajo se realizaron una serie de ensayos cuyos resultados aparecerán en un próximo artículo sobre el desarrollo de la especie *Trichosporum penicillatum* sobre bagacillo hidrolizado en proteínas en jarras giratorias. El objetivo de estos ensayos era buscar un sistema de cultivo semi-sólido que permitiera una mejor mezcla y aireación del cultivo y de este modo obtener una mayor transformación de materia reductora en proteína.

(*) g de proteína obtenida/100 g de materia reductora transformada.

4. CONCLUSIONES

1.^a En el caso de cultivo semi-sólido en sistema de bandejas, a 30 °C y con 6 l de aire/min 100 g de bagacillo, se ha conseguido un coeficiente de proteína de 56.

2.^a Este coeficiente representa una excelente transformación en proteína (56 g de proteína/100 g de materia reductora) teniendo en cuenta que los resultados en cultivo convencional sumergido no sobrepasan un coeficiente de 30.

3.^a Esta excelente transformación de materia reductora, obtenida con *Trichosporum penicillatum*, permitió triplicar el contenido en proteína del bagacillo utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

1. CANNEL, E., and MOO-YOUNG, M. 1989 a. Solid-state fermentation systems, I. Process. Biochem., 15, 2-7.
2. CANNEL, E., and MOO-YOUNG, M. 1980 b. Solid-state fermentation systems, II. Process. Biochem., 15, 24-8.
3. CHANG, M.; TERRY, Y. C., and TSAO, T. G. 1981. Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. Advan. Biochem. Eng. 20, 15.
4. FIGARELA, X. 1978. Comunicación personal.
5. GONG, CH. S.; CHEH, L. F.; TSAO, T. G., and FLICKINGER, M. C. 1981. Conversions of

- hemicelluloses carbohydrates. *Advan. Biochem. Eng.* 20, 93.
6. HAN W. Y., and ANDERSON W. A. 1975. Semisolid fermentation of raygrass straw. *Appl. Microbiol.*, 30, 930-34.
 7. LEQUERICA, J. L., y LA FUENTE, B. 1977. Aprovechamiento de subproductos cítricos. II. Fermentación en medio semi-sólido de corteza de naranja por *Cándida utilis*. *Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 17, 71-7.
 8. PAMMENT, N.; ROBINSON, W. C., and MOO-YOUNG, M. 1978. Solid state cultivation of *Chaetomium cellulolyticum* on alcalipretreated sawdust. *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 1735-44.
 9. POU, J.; FIGARELLA, X.; FERNANDEZ, M.^a J., y GARRIDO, J. 1985. Obtención de proteínas a partir de bagacillo de caña. I. Estudio de hidrólisis de bagacillo y selección de especies de levaduras. *Microbiol. Españ.*, 38, ¿ ?.
 10. ROLZ, C., and HUMPHREY, A. 1981. Microbial biomass from renewables: review of alternatives. *Advan. Biochem. Eng.* 21, 1-54.
 11. SHAFFER, P. A., and SOMOGYI, M. 1941. *Sugar Analysis*. Edited by Wiley and Sons. Inc., New York.
 12. VIESTURS, V. E.; APSITE, A. F.; LAUKEVISC, J. J.; OSE, V. P.; BAERS, M. J., and TANGERDY, R. P. 1981. Solid-state fermentation of wheat straw with *Chaetomium cellulolyticum* and *Trichoderma lignorum*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 11 th, 359-69.

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS FERMENTADORES DE RELLENO PARA LA ACIDOGÉNESIS DE VINAZAS DE REMOLACHA

P. GARCIA-SERRANO, E. SARDINERO, M.^a L. GIL-PEÑA, M. A. IZNAOLA, I. SCHNABEL y J. GARRIDO

UEI de Tecnología de las Fermentaciones y Bioingeniería, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Arganda del Rey (Madrid)

(Aceptado: 14 de octubre de 1985)

RESUMEN

Se ha estudiado el comportamiento de dos reactores de lecho fijo funcionando en continuo para la acidogénesis de vinazas de remolacha. El primero, relleno en su totalidad con bolas de arcilla expandida de 1 cm \varnothing , presenta flujo descendente y reciclaje 0,5-0,9 veces su volumen/h. El segundo fermentador posee un biofiltro de 10 cm de espesor constituido por bolas huecas de alúmina de unos 5 mm \varnothing , situado a 15 cm por debajo del nivel del líquido. Este último fermentador funciona con flujo ascendente y reciclaje interno una vez/h. El inóculo empleado en ambos casos procede del aparato digestivo del ganado vacuno y la temperatura en que transcurre la acidogénesis es de 30 °C.

Del estudio estadístico de los resultados se deduce que no existen diferencias significativas en cuanto a la cantidad máxima de ácidos orgánicos (acético, propiónico y butírico) producidos; los tiempos de retención hidráulica óptimos son aproximadamente iguales en ambos fermentadores (7,5 h). Con el primer fermentador se consiguen tiempos de retención aún rentables, de 1,1 h, debido a una fijación de la microflora mayor que en el segundo fermentador, en el que sólo se consigue trabajar con tiempos de retención mínimos de 3 h. La productividad obtenida en ambos fermentadores es de 63 y 70 kg/m³ d, respectivamente.

SUMMARY

Two kinds of fixed-bed anaerobic reactors have been studied in relation to the acidification of beet-root vinasses. The first, which is

full of expanded clay balls, has down-flow flux and a rate of recycling varying between 0.5 and 0.9 times per hour. The second one contains a 10 cm thick biofilter, composed of alumina balls, placed 15 cm bellow the surface of the liquid; it works with an up-flow flux and completes its internal recycling in 1 h. Having studied the results statistically, it has been established that there are no great differences as regards the maximum quantity of organic acids produced (acetic, propionic and butiric); the best hydraulic retention time for each of the two fermenters is approximately the same (7,5 h). Retention times of 1,1 h have been achieved with the first fermenter, due to a greater fixation of microflora, while retention times in the second kind are only profitable as from 3 h. The productivity achieved with the first fermenter was of 63 kg/m³ a day, and with the second of 70 kg/m³ a day.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos de este trabajo, ha sido lograr una microflora estable y adecuada para la acidogénesis de las vinazas de remolacha en proceso continuo.

En la bibliografía existen modelos de digestores que pueden utilizarse para el tratamiento de residuos (1, 5-6) y que comprenden desde los digestores tradicionales de mezcla completa hasta aquellos en que la masa bacteriana se mantiene en suspensión en el seno del fluido, por adición de partículas inertes.

Las primeras experiencias efectuadas por nosotros con dispositivos de mezcla completa, decantación de las bacterias y reciclaje al digestor, no dieron resultado debido al carácter no floculante de la flora microbiana, por lo cual se recurrió a los reactores de relleno cuyo fundamento consiste en el empleo de algún tipo de soporte capaz de retener la biomasa en el fermentador (8), siendo así posible trabajar con tiempos de retención realmente bajos, para rendimientos de proceso muy altos.

En este trabajo se han ensayado dos tipos de relleno para la retención de la

microflora durante la acidogénesis de las vinazas de remolacha y se ha hecho un estudio comparativo del comportamiento de los dos fermentadores diseñados para este fin.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Para este estudio se utilizó vinaza de melaza de remolacha, recién obtenida, cuya demanda química de oxígeno es de 70-80 g/l.

Para facilitar el desarrollo de la flora acidogénica se diluyó la vinaza en una cuarta parte y se enriqueció con sales nutrientes: 2,5 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,4 g/l de MgSO₄·7H₂O y 0,1 g/l de KH₂PO₄.

Preparación de la siembra

Como fuente de bacterias, se ha utilizado un inóculo procedente del aparato digestivo de ganado vacuno.

Para la adaptación de la microflora a la vinaza, se introdujo el inóculo en un matraz conteniendo vinaza diluida, en la misma proporción en que se halla en el fermentador. Se deja en estufa a 30 °C controlando diariamente el

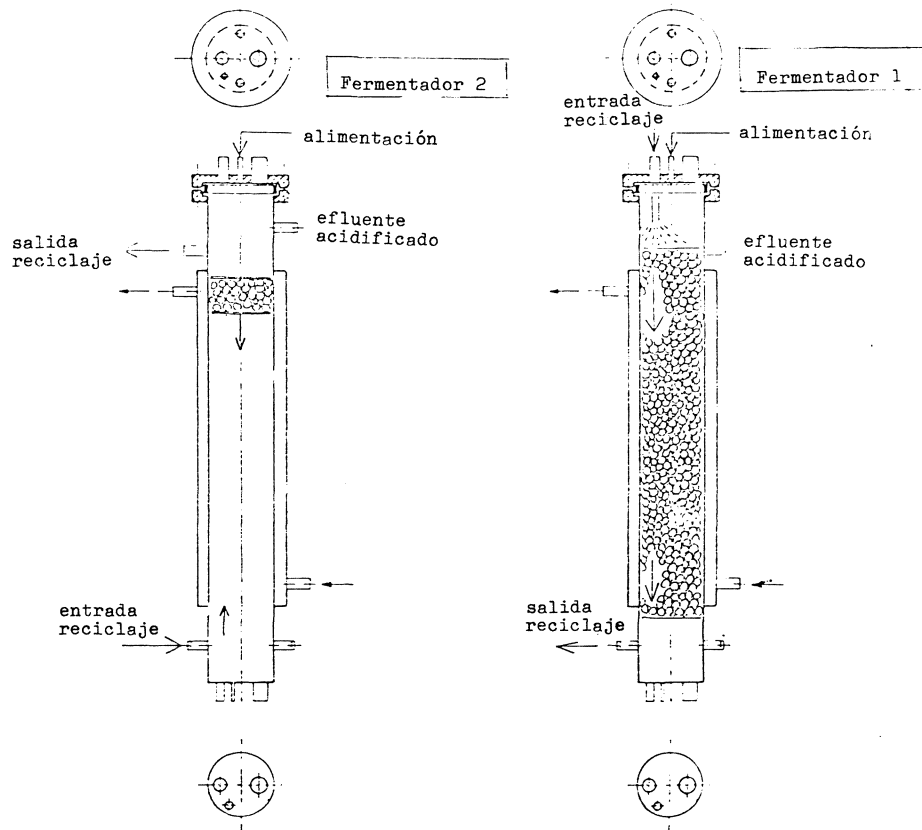


Figura 1. Esquema de los dos fermentadores empleados para la acidogénesis de vinaza

pH hasta que alcance un valor en torno a 5,5, al cual se considera que la flora está adaptada al medio.

Métodos analíticos

El control de la acidogénesis se ha llevado a cabo por cromatografía de gases empleando un método que permite cuantificar los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) producidos durante el proceso. Las condiciones de análisis son las siguientes: columna rellena de PORA-PAK-QS, temperatura de la columna 200 °C, temperatura del inyector (FID)

250 °C, y flujo del gas portador (N_2), 30 ml/min.

La demanda química de oxígeno se determina según Tecator (7).

Fermentadores

Se diseñaron dos dispositivos tubulares de vidrio (figura 1), de 100 cm de altura y 20 cm de diámetro, de 9 l de capacidad, con doble camisa para la recirculación de agua termostatazada. Los materiales utilizados como relleno, suministrados por el Instituto de Cerámica y Vidrio (CSIC) consisten

en bolas de arcilla expandida y bolas huecas de alúmina.

Descripción de los fermentadores

Fermentador núm. 1. Este fermentador está relleno, en su totalidad, de bolas de arcilla expandida. Las bolas, de 1 cm de diámetro, presentan una superficie irregular muy apropiada para la retención de bacterias. La superficie del relleno se evalúa en unos 1,7 m² y su volumen es de 3 l, por lo que el volumen real de vinaza en este fermentador es de 6 l.

Por la parte superior entra la alimentación y en forma de ducha el reciclado. La ducha tiene la ventaja de romper la espuma que se pudiera acumular en la parte superior de la columna.

El flujo descendente de este fermentador dificulta la eliminación de los gases desprendidos, principalmente CO₂, a lo largo de toda la columna, lo que conduce a la oclusión de bolsas gaseosas. Para la eliminación de estos gases se tuvo que instalar un «bypass» en la recirculación del medio.

Fermentador núm. 2. Este fermentador es equivalente al anterior en tamaño y forma.

Difiere del fermentador núm. 1 en que tiene instalado un filtro, unos 15 cm debajo de la superficie del líquido que contiene. El filtro consiste en una capa de 10 cm de espesor formado por bolas de alúmina de 5 mm de diámetro, retenidas entre dos mallas de plástico.

La finalidad primordial de este filtro fue evitar que el efluente arrastrara la flora del fermentador. Como era de prever, con el tiempo se fija la flora sobre este filtro, pasando a funcionar como un biofiltro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia del relleno en la retención de la microflora

Como ensayo preliminar, se comprobó el efecto de la introducción de un soporte, en la retención de la microflora. Los ensayos se realizaron a partir de una misma siembra inicial, en un fermentador sin lecho y en un dispositivo similar al que se le añadió el relleno (fermentador 1).

En la figura 2(A) se muestra la variación en la concentración de ácido butírico frente al tiempo (días) en el fermentador sin lecho, a un tiempo de retención hidráulico de 12 h.

La microflora se mantiene durante 5 d en este fermentador, mientras que en el fermentador con soporte (figura 2(B)), funcionando al mismo tiempo de retención hidráulica, se consigue incrementar a 20 d la retención de la biomasa activa.

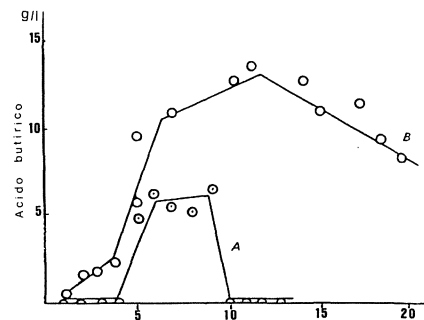


Figura 2. Retención de la microflora en los fermentadores medida en función del ácido butírico formado a un TRH de 12 h. A) fermentador sin lecho. B) fermentador al que se le ha introducido un soporte (véase fermentador 1 de la figura 1)

La adición de un nuevo inóculo a este fermentador hace que la microflora se adhiera definitivamente al relleno, lo que permite continuar la marcha del proceso sin necesidad de realizar una nueva siembra (figura 3).

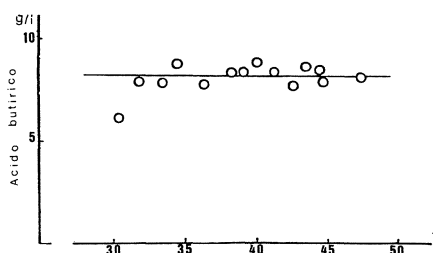


Figura 3. Asentamiento de la microflora en el fermentador 1 durante el mes siguiente a la siembra

El tiempo de retención como variable significativa en la producción de ácidos (acético, propiónico y butírico). Tiempo de retención óptimo

Con el fin de determinar el tiempo de retención óptimo al cual la producción de ácidos es máxima, se estudió

la producción de ácido butírico a distintos tiempos de retención hidráulica. Se eligió como respuesta a estudiar el ácido butírico, por ser el mayoritario en la producción total de ácidos, y como primer paso se estudió la influencia que en esta respuesta pueda tener la variable tiempo de retención.

En la tabla 1 se presentan los distintos tiempos de retención a los que se ha operado, los valores medios de butírico obtenidos, la desviación típica, los coeficientes de variación y los parámetros estadísticos para las variaciones en la concentración de ácido butírico debidas a la variable tiempo de retención.

Para comprobar si el tiempo de retención es un factor significativo en la producción de ácido butírico y que las variaciones observadas no son productos del azar, se realiza un análisis de la varianza a los datos experimen-

Tabla 1. Parámetros estadísticos calculados para las variaciones experimentales en la concentración de ácido butírico debidas al tiempo de retención en los fermentadores

	TRH (h)	27,3	12,0	8,0	4,0	3,0	1,1	1,0
Fermentador 1	m _i (g/l)	8,28	7,43	11,84	8,81	8,56	8,50	1,6
	σ	2,2	1,56	1,04	11,6	0,95	0,6	0,27
	c _v	20,6	20,0	8,8	18,0	11,2	7,4	17,0
	D _T	D _R	D _F	V _F	V _R	F	F	
	(x - M) ²	(x - m _i)	(D _F - D _R)	(D _F /K - 1)	(D _R /n - K)	calculada	tabulada	
	342,48	68,78	274,31	47,72	2,08	22	2,5	
Fermentador 2	TRH (h)	34,5	13,5	7,5	4,0	3,0	2,0	1,8
	m _i (g/l)	11,24	9,1	13,53	9,16	9,7	0,275	0,27
	σ	1,9	1,03	2,5	1,42	0,47	0,043	0,04
	c _v	17,5	11,4	19,1	15,6	5,0	15,75	15,70
	D _T	D _R	D _F	V _F	V _R	F	F	
Σ(x - M) ²	Σ(x - m _i)	(D _F - D _R)	(D _F /K - 1)	(D _R /n - K)	calculada	tabulada		
	846,3	82,65	763,6	127,27	3,06	41,58	2,6	

TRH, tiempo de retención hidráulica = $\frac{\text{vol. ferment.}}{\text{caudal}}$. m_i, valores medios obtenidos. σ, desviación estándar. c_v, coeficiente de variación. D_T, dispersión total. D_R, dispersión debida al azar. D_F, dispersión debida al factor. V_F, varianza factorial. V_R, varianza debida al azar. F, estadística de Snédecor. M, media total. n, número de datos. K, número de factores.

Tabla 2. Prueba de Newman-Keuls aplicada a los valores experimentales de ácido butírico obtenidos a distintos flujos en el fermentador 1. Nivel de significación $P < 0,05$

Comparación	Rango	ma-mb	S(error-estándar)	Q. experi-mental	Q. teórico	Conclusión m = concentr. media
7-1	7	10,24	0,64	16,00	4,46	$m_7 > m_1$
7-2	6	4,41	0,57	7,73	4,30	$m_7 > m_2$
7-3	5	3,56	0,59	6,03	4,10	$m_7 > m_3$
7-4	4	3,34	0,54	6,18	3,85	$m_7 > m_4$
7-5	3	3,28	0,57	5,75	3,49	$m_7 > m_5$
7-6	2	3,03	0,59	5,13	2,84	$m_7 > m_6$
6-1	6	7,21	0,68	10,60	4,30	$m_6 > m_1$
6-2	5	1,38	0,62	2,22	4,10	$m_6 \approx m_2$
6-3	4	0,53	0,64	0,83	3,85	$m_6 \approx m_3$
6-4	3	0,31	0,59	0,52	3,49	$m_6 \approx m_4$
6-5	2	0,25	0,62	0,40	2,89	$m_6 \approx m_5$
5-1	5	6,96	0,66	10,50	4,10	$m_5 > m_1$
5-2	4	1,13	0,59	1,91	3,85	$m_5 \approx m_2$
5-3	3	0,28	0,62	0,45	3,49	$m_5 \approx m_3$
5-4	2	0,06	0,57	0,10	2,89	$m_5 \approx m_4$
4-1	4	6,90	0,64	10,80	3,85	$m_4 > m_1$
4-2	3	1,07	0,57	1,88	3,49	$m_4 \approx m_2$
4-3	2	0,22	0,59	0,37	2,84	$m_4 \approx m_3$
3-1	3	6,68	0,68	9,82	3,49	$m_3 > m_1$
3-2	2	0,85	0,62	1,37	2,89	$m_3 \approx m_2$
2-1	2	5,83	0,66	8,83	2,89	$m_2 > m_1$

$$m_7 > m_6 \approx m_5 \approx m_4 \approx m_3 \approx m_2 > m_1.$$

tales y se calcula la F de Snédécór; si F calculada es mayor que F tabulada podemos concluir que el factor objeto del estudio influye significativamente (3) para un nivel de significación de P menor que 0,05.

Para el fermentador 1, F calculada (22) es mayor que F tabulada (2,5); para el fermentador 2, F calculada (41,58) es mayor que F tabulada (2,6) con lo cual podemos concluir que el tiempo de retención influye muy significativamente en el proceso, como ya se intuía en los datos experimentales.

Una vez comprobada la influencia del tiempo de retención mediante análisis de la varianza, se estudia el tiempo de retención óptimo en la producción de ácido butírico.

Se ordenan de mayor a menor las

medias de todas las muestras, como paso previo a la aplicación de la prueba de Newman-Keuls.

En las tablas 2-3 se exponen los valores obtenidos aplicando la prueba de Newman-Keuls a los datos experimentales.

Se calcula el parámetro Q experimental que debe ser mayor que el valor de la Q tabulada para una diferencia significativa (3). De los resultados correspondientes al fermentador 1, se concluye que puesto que $m_7 > m_6 = m_5 = m_4 = m_3 = m_2 > m_1$ (m es el valor de la media de la concentración de ácido butírico) la mayor concentración de ácido butírico se obtiene a un tiempo de retención de 8 h.

De la misma manera, para el fermentador 2 se concluye que puesto

Tabla 3. Prueba de Newman-Keuls aplicada a los valores experimentales de ácido butírico obtenidos a distintos flujos en el fermentador 2. Nivel de significación $P < 0,05$

Comparación	Rango	ma-mb	S(error-estándar)	Q. experi-mental	Q. teórico	Conclusión m = concentr. media
7-1	7	13,26	0,78	17,00	4,50	$m_7 > m_1$
7-2	6	13,25	0,78	16,99	4,33	$m_7 > m_2$
7-3	5	4,43	0,72	6,15	4,13	$m_7 > m_3$
7-4	4	4,37	0,72	6,07	3,88	$m_7 > m_4$
7-5	3	3,83	0,72	5,32	3,51	$m_7 > m_5$
7-6	2	2,29	0,72	3,20	2,90	$m_7 > m_6$
6-1	6	10,97	0,83	13,21	4,33	$m_6 > m_1$
6-2	5	10,96	0,83	3,20	4,30	$m_6 > m_2$
6-3	4	2,14	0,78	2,74	3,88	$m_6 \approx m_3$
6-4	3	2,08	0,75	2,77	3,55	$m_6 \approx m_4$
6-5	2	1,54	0,83	1,85	2,90	$m_6 \approx m_5$
5-1	5	9,43	0,87	10,83	4,30	$m_5 > m_1$
5-2	4	9,42	0,87	10,83	3,88	$m_5 > m_2$
5-3	3	0,60	0,78	0,77	3,55	$m_5 \approx m_3$
5-4	2	0,54	0,83	0,65	2,90	$m_5 \approx m_4$
4-1	4	8,89	0,83	10,70	3,88	$m_4 > m_1$
4-2	3	8,88	0,83	10,70	3,55	$m_4 > m_2$
4-3	2	0,06	0,78	0,077	2,90	$m_4 \approx m_3$
3-1	3	8,83	0,83	10,64	3,55	$m_3 > m_1$
3-2	2	8,82	0,83	10,63	2,90	$m_3 > m_2$
2-1	2	0,005	0,87	0,006	2,90	$m_2 \approx m_1$

$m_7 > m_6 \approx m_5 \approx m_4 \approx m_3 > m_2 \approx m_1$.

que $m_7 > m_6 = m_5 = m_4 = m_3 = m_2 > m_1$, la mayor obtención de ácido butírico se consigue a un tiempo de retención de 7,5 h.

Tiempo de retención mínimo

Tiempo de retención mínimo es el tiempo al cual la velocidad de producción de microorganismos es igual al lavado de los mismos por dilución.

En el caso de los fermentadores de relleno, este concepto de tiempo de retención mínimo está afectado por la pretendida retención de las bacterias y, por tanto, en este tipo de fermentadores se consiguen tiempos de reacción menores.

Volviendo a los datos de la tabla 1, en donde se exponen las concentra-

ciones medias de ácido butírico a distintos tipos de retención, se comprueba que para el fermentador 1 el tiempo de retención mínimo es de 1,1 h, al cual se obtienen concentraciones de ácido butírico aceptables; por debajo de este valor la producción baja drásticamente (se obtienen 1,6 g/l de ácido butírico a un tiempo de retención de 1 h).

En el caso del fermentador 2, el tiempo de retención mínimo al que es posible obtener un rendimiento de ácido butírico aceptable es de 3 h.

A tiempos de retención de 2 y 1,8 h, la disminución en el rendimiento de ácido butírico es significativa.

Bories (2) y Gosh y cols. (4) operan a tiempos de retención hidráulica de 1 d, empleando dispositivos de mezcla

Tabla 4

Fermentador	m_i	σ	c_v
1	11,84	1,4	8,8
2	13,53	2,5	19,1

completa con vinaza de vino (DQO = 80 gO₂/l) y un medio sintético (DQO = 12 gO₂/l), respectivamente.

Comparación de los dos fermentadores de relleno empleados

En la comparación de ambos fermentadores para un TRH de 8 h se demuestra que las diferencias entre las medias de concentración de butírico no son significativas, pero de la observación de la *tabla 4*, en la que se representan la desviación típica y coeficientes de variación para ambos fermentadores a los flujos óptimos correspondientes a cada uno, podemos deducir que existe menos dispersión en los datos obtenidos para el fermentador 1, lo cual ya nos indica que, debido a su relleno, la producción de ácido butírico no experimenta tantas

fluctuaciones, como consecuencia de que la microflora está más uniformemente distribuida en todo el fermentador.

Productividad del proceso

La productividad del proceso basada en la totalidad de los ácidos producidos al tiempo de retención óptimo reflejados en la *tabla 5* sería de 63 kg/m³ d en el fermentador 1 y de 70 kg/m³ d en el fermentador 2. Queda reflejado en dicha tabla que más del 50 % de los ácidos formados corresponde al ácido butírico.

BIBLIOGRAFÍA

1. BIGERIEGO, M.; BUENDIA, E., y MELLADO, L. 1983. Instalación de Biogás. Mesa Redonda sobre Biogás organizada por el Instituto de Ingeniería de España, Madrid.
2. BORIES, A. 1980. Fermentation méthanique avec separation des phases acidogène et methanogène appliquée au traitement des effluents à forte charge polluante (destilleries). Ann. Technol. Agr., 29, 509-28.
3. CARRASCO, J. L. 1983. El Método Estadístico en la Investigación Médica. Ediciones Ciencia, Madrid.

Tabla 5. Composición total de ácidos del efluente de dos muestras aleatorias a un tiempo de retención hidráulico máximo y mínimo

	Volumen real del fermentador l	Flujo de alimentación ml/h	TRH h	Acidos totales g/l	Acético %	Propiónico %	Butírico %
Fermenta- dor 1	6	750	8	21	35	9	56
	3 (*)	2.700	1,1	13	23	3	74
Fermenta- dor 2	6	1.200	7,5	22	29	8	6
	6	3.000	3,0	16	34	4	62

TRH, tiempo de retención hidráulica. (*) Con flujo de alimentación de 2.700 ml/h se obtiene una gran acumulación de gases (CO₂, H₂) en este fermentador, con lo cual el volumen real de vinaza medido es de 3 l.

4. GHOSH, S.; SAJJAD, A., and HENRY, M. P. 1983. Two satage upflow anaerobic digestion of concentrated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 13, 351-70.
5. MATA, J. 1983. Digestores de alta velocidad. Mesa Redonda sobre Biogás organizada por el Instituto de Ingeniería de España, Madrid.
6. NYNS, E. J.; NAVEAU, H. P.; CHOME, R., and BERTRAND, Y. 1980. Digesters, a worlwide review. En: D. A. STAFFORD, B. I. WHEATLEY y D. E. HUGHES (eds.). *Anaerobic Digestion*, 37-59. Applied Science Publishers LTD, London.
7. Tecator. 1981. Determination of chemical oxigen demand —COD_{cr}— in water. Application Note, AN 30/81.
8. WILKIE, A.; REYNOLDS, P. J., and COLLEREN, E. 1983. Media effects in anaerobic filters. *Anaerobic Waste Water Treatment Symp.*, 50-55. TNO Comm. Depart., The Hague.

STUDIES ON A NEW PROGESTERONE-16 α - HYDROXYLATING *STREPTOMYCES*

K. M. GHANEM, A. H. EL-REFAI and E. R. EL-HELOW

Botany Department, Faculty of Science, Alexandria University, Cairo
Microbiological Chemistry Laboratory, National Research Centre, Cairo (Egypt)

(Aceptado: 5 de julio de 1985)

SUMMARY

Studies were made on 45 local *Streptomyces* isolates for their potentialities to introduce a hydroxyl group into carbon 16 of the progesterone.

Streptomyces coriofaciens appeared to be the most potent progesterone 16 α -hydroxylator. This microorganism has not been previously reported to possess 16 α -hydroxylating activity for steroids. The identity of the transformation products was confirmed by estimation of their physical and chemical constants after their individual separation by the preparative thin layer chromatograms.

The progesterone-transforming enzyme system produced by the experimental organism was markedly influenced by the composition of the transformation medium, the pH value as well as the culture age. The starch-nitrate medium adjusted to pH value ranged between 7 and 8, and inoculated with cultures representing the logarithmic phase of growth (2 d old) allowed good bioconversion efficiencies.

This manuscript presents a report on the potentiality of some locally isolated *Streptomyces* species to perform this type of microbial oxidation, viz, the introduction of a hydroxyl group at C-16 position of one of the Δ^4 -pregnene steroids; namely progesterone (Δ^4 -pregn-3,20-dione). Additionally the productivity of progesterone-16 α -hydroxylation reaction was investigated under different physiological conditions.

RESUMEN

Se han efectuado estudios sobre 45 *Streptomyces* locales aislados por sus potencialidades para introducir un grupo hidroxilo en el carbono 16 de la progesterona.

Se ha encontrado que el *Streptomyces coriofaciens* es el más potente hidroxilador-16 α de la progesterona. La identidad de los productos de transformación se ha confirmado mediante la determinación de sus constantes físicas y químicas después de su separación por medio de cromatografía de capa fina.

El sistema enzimático que transforma la progesterona, producido por *Streptomyces coriofaciens*, estaba fuertemente influido por la composición del medio, el valor del pH y la edad del cultivo. El medio almidón-nitrato (pH 7-8) inoculado con cultivos en fase logarítmica (2 días) permite obtener una buena bioconversión.

INTRODUCTION

Since 1952, some workers (7-8, 14) had reported in the introduction of a hydroxyl group into a steroid at C₁₆. Progesterone was converted to 16 α -hydroxy-progesterone as well as to 16 α -hydroxy-5 β -pregnane-3,20 dione with *Streptomyces* species, this reaction proved to be of great significance in the synthesis of one of the commercially available potent cortical hormone derivatives; namely 16 α -hydroxyfluoro-prednisolone (triamcinolone) (17). Few other *Streptomyces* species had also been reported to perform the 16 α -hydroxylation reaction (1-3, 5-8, 10-11, 18). As still fewer, are the studies devoted to outline the physiological and the biochemical factors controlling the microbial 16 α -hydroxylation of steroids.

MATERIALS AND METHODS

Cultivation

The organisms used are 45 different *Streptomyces* cultures isolated from Egyptian soil. The most active 16 α -progesterone hydroxylator was identified through Centraalbureau voor Schimmelcultures at Baarn, Holland and reported to be *Streptomyces coriofaciens*.

The cultivation was made in 250 ml Erlenmeyer flasks, each containing 50 ml portions of the following medium (g/l): KNO₃, 1.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeCl₃·6H₂O, 0.01; starch, 10. The medium was adjusted to initial pH of 7.0. The flasks were autoclaved for 20 min at 15 lb/inch², and inoculated with 2 ml of 36 h shaken aged culture; maintained on the above medium. The culture flasks were agitated on a reciprocal shaker (180 shakes/min, amplitude 7 cm) at 30 \pm 2 °C for 72 h. There after, 5 mg progesterone dissolved in 0.5 ml 96 % ethanol were added to each flask and fermentation was continued for another 72 h.

Extraction

At the end of the fermentation period, the contents of each flask were homogenized in a blender (16.000 rpm) with 2 volumes of chloroform. The extraction was repeated three times to ensure that all the transformation products were extracted. The combined chloroform extracts were washed with half its volume 5 % NaHCO₃ solution, followed by an equal volume distilled water, then dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and then distilled to give a semisolid residue referred to as the test material.

Analysis

The test material was dissolved separately in a measured volume of chloroform: methanol mixture (1:1; v/v). Analysis was carried out by the thin-layer chromatography (TLC) on silica gel-G plates (16). For the resolution of the different products encountered during this work, the following four solvent systems proved to be suitable: a) cyclohexane: acetone: chloroform (15:5:4; v/v/v); b) cyclohexane: chloroform: iso-propanol (10:5:2; v/v/v); c) toluene: ethyl acetate: acetone (3:2:1; v/v/v) and d) benzene: acetone: ethanol (4:1:1; v/v/v). The transformation products as well as the untransformed progesterone were identified by TLC after careful comparison with the authentic steroids using different colour reagents (16).

Quantitative estimation of the products was made by the preparative thin-layer chromatography using standard equipments. A measured volume of the test material was applied as streak across the bottom of glass pla-

tes (20 × 20 cm) covered with a layer of silica gel G (1 mm thickness). After development of the plates, the bands of the individual steroids were marked, scrapped from the plates and quantitatively eluted with spectroscopic ethanol. The concentration of each compound was then determined colorimetrically (12).

Estimation of protein content

The protein content was estimated by grinding 50 mg of the dried microbial powder (at 80 °C) in a porcelain mortar using quartz sand and 10 ml of 20 mM sodium phosphate buffer of pH 6.8 (19). This was followed by centrifugation and then the absorbance of a known volume of the supernatant was measured at 235 and 280 nm in a UV spectrophotometer. To avoid different sources of error, various concentrations of bovin serum albumin were used as reference protein.

$$\text{Protein concentration (mg/ml)} = \frac{A_{235} - A_{280}}{2.51}$$

Table 1. Transformation of progesterone (5 mg/50 ml medium) by the active *Streptomyces* isolates

Streptomyces No.	Transformation mixture				
	Converted progesterone		16 α -hydroxyprogesterone (HP)		
	mg/50 ml med. (*)	%	mg/50 ml med.	% to added progesterone (**)	% to converted progesterone (***)
42	2.43	48.6	2.09	41.8	86.0
31	2.58	51.6	1.61	32.2	62.4
19	2.70	54.0	1.41	28.2	52.6
41	2.64	52.8	1.30	26.0	49.2
27	2.36	47.2	1.13	22.6	42.8
11	1.62	32.4	0.90	18.0	55.5

(*) % Prog. conversion = $\frac{\text{amount of converted prog.}}{\text{initial prog. conc.}} \times 100$. (**) 16 α -HP% to added prog. = $\frac{\text{amount of 16}\alpha\text{-HP}}{\text{initial conc. of prog.}} \times 100$. (***) 16 α -HP% to converted prog. = $\frac{\text{amount of 16}\alpha\text{-HP}}{\text{amount of converted prog.}} \times 100$.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Bioconversion of progesterone at C-16 position by *Streptomyces* isolates

Among 45 different isolates of *Streptomyces* tested, only six isolates referred to by the numbers 11, 19, 27, 31, 41, 42 are able to perform the desired 16 α -hydroxylation of progesterone. These promising isolates (table 1) manifested considerable variations in capacity to accumulate 16 α -hydroxyprogesterone. However, isolate n.º 42 (*Streptomyces coriofaciens*) proved to be the most potent since it converted nearly half the amount of the added progesterone together with the formation of the desired 16 α -hydroxy derivative in 42 % yield. It is interesting to note that no previous reports have been given on the 16 α -hydroxylation of steroids by *S. coriofaciens*. According to the available literature, the last named property was confined to *S. roseochromogenes* (1, 3, 5-8, 11), *S. argenteolus* (3-4), *S. olivaceus* (3), *S. halstedii* and *S. mediocidicus* (10).

Accordingly, it is safe to conclude that the present finding is the first report on the 16 α -hydroxylation of progesterone by *Streptomyces coriofaciens*.

2. Identification of progesterone-transformation products obtained with *S. coriofaciens*

This was approached by study of their thin-layer chromatographic pictures (table 2), together with the estimation of their physical and chemical constants.

Streptomyces coriofaciens was cultured on the basal medium charged with 1.0 g progesterone. After a period of 72 h transformation, extraction of the steroidal compounds present in the culture was carried out. The obtained residue (1.28 g) was dissolved in the minimal volume of (chloroform: methanol mixture 3:1 v/v) and its steroidal constituents were separated by the preparative thin layer chromatographic technique, eluted from the plates with absolute ethanol. The fraction corresponding to the progesterone authentic sample (i.e. unchanged substrate) was crystallized from chloroform: methanol to afford crystals (483 mg), m.p. 126 °C, reported 128-130 °C (15). $[\alpha]_D + 195^\circ$ (in chloroform), reported $+195^\circ \cdot \lambda_{\max}^{\text{EtOH}} 244 \mu\text{m}$ reported 242 μm .

The produced 16 α -hydroxyprogesterone was crystallized from methanol to give crystals (397 mg), m.p. 225-6 °C,

Table 2. Chromatographic properties of the steroid compounds encountered during the bioconversion process

Compound	Rf \times 100 with solvents (*)				Colour with		
	I	II	III	IV	I ₂ /KI	Liebermann-Burchard	
						Day light	UV fluorescence
Progesterone	93	87	80	81	Brown	Brown	Blue
16 α -hydroxyprogesterone	75	64	47	65	Blue	Brown	Violet

(*) Solvent systems (v/v/v): I: Cyclohexane: chloroform: isopropanol (15:5:4); II: Benzene: acetone: ethanol (20:5:5); III: Toluene: ethyl acetate: acetone (15:10:5); IV: Cyclohexane: chloroform: isopropanol (15:10:5).

reported 225-6 °C (14) · [α]_D + 161 ° (in chloroform), reported +158° (3), λ_{max}^{alc.} 239 mμ, reported 239 mμ. No depression of the m.p. was observed upon mixing the isolated products (namely; residual progesterone or 16α-hydroxyprogesterone) with the authentic samples.

3. Suitability of the fermentation medium

To test the effect of the composition of the medium and the nature of its constituents on the 16α-hydroxylation of progesterone, *Streptomyces coriofaciens* was cultivated in five different media. The results given in table 3 show that the media containing starch as sole carbon source allowed better bioconversion activities. Best efficiencies were however recorded upon using the starch-nitrate medium (medium I), whereby about 42 % of the added progesterone were converted into 16α-hydroxyprogesterone. On the contrary, poor transformation yields were attained with media containing simple sugars as carbon source and ammonium chloride or urea as nitrogen source.

It follows from this discussion that the composition of the basal starch-NO₃ medium provides all the necessary nutrients for growth as well as the production of adequate level of the progesterone-16α-hydroxylase system. It may be of importance here to point out that the starch-NO₃ medium is routinely used by some investigators for the cultivation of a variety of species of *Streptomyces* (9, 13).

4. pH relations

The effect of different starting pH values on the transformation of progesterone by *Streptomyces coriofaciens* was investigated using aliquots of the basal medium which were initially adjusted either with 1 N solutions of HCl or NaOH to pH values ranging from 4 to 9. The results presented in figure 1 show that the initial adjustment of the medium to pH 4.0 is deleterious for the growth and consequently for progesterone conversion by the tested organism. On the other hand, the progesterone 16α-hydroxylase functioned optimally at a pH range from 7 to 8. A

Table 3. Progesterone bioconversion with *S. coriofaciens* grown on different fermentation media

Medium	Converted progesterone		16α-hydroxyprogesterone	
	mg/50 ml med.	% to added prog.	mg/50 ml med.	% to added prog.
I	2.19	43.8	2.09	41.8
II	1.89	37.8	1.65	33.0
III	1.35	27.0	0.66	13.2
IV	1.26	25.2	0.60	12.0
V	1.88	37.6	1.33	26.6

Progesterone (5 mg/50 ml) was added to 72 h old cultures and the transformation period continued for 72 h. The reaction of the tested media was initially adjusted to pH 7.0. Media (g/l) I: starch, 10; KNO₃, 1.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeCl₃·6H₂O, 0.01. II: starch, 15; (NH₄)₂HPO₄, 1.0; MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeSO₄·7H₂O, 0.01. III: glucose, 20; NH₄Cl, 2.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5; ZnSO₄·7H₂O, 0.01. IV: sucrose, 20, urea (*), 2.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeCl₃·6H₂O, 0.01. V: starch, 10; peptone, 10; MgSO₄·7H₂O, 0.5; K₂HPO₄, 0.5.

(*) Urea was sterilized by filtration and added aseptically to the autoclaved balanced medium.

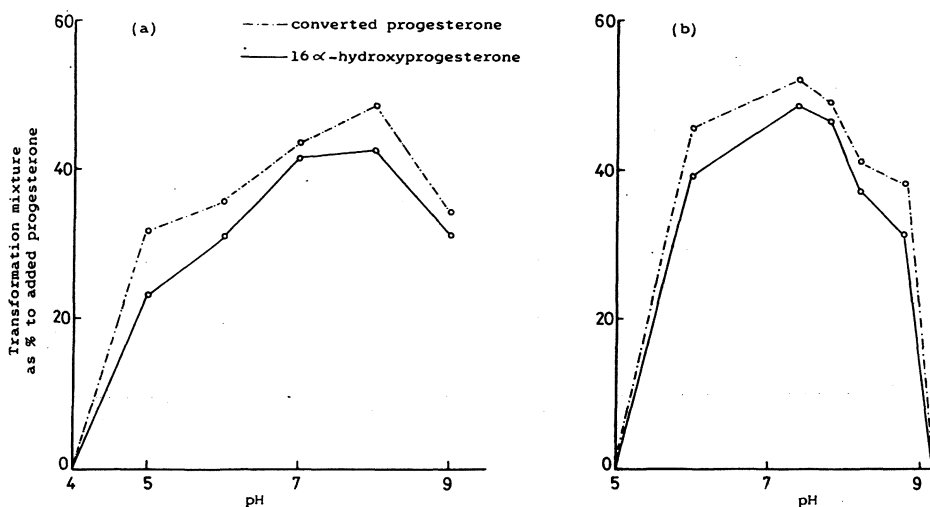


Figure 1. Transformation of progesterone by *S. coriofaciens* as influenced by the pH value of the fermentation medium using (a) initially pH adjusted media and (b) buffered media

fact worthy of notice is that the reaction of the medium always shifts to higher pH values due to the metabolic activities exhibited by the tested organism. To overcome this difficulty, a sodium phosphate buffered medium was used. As expected maximal outputs of 16 α -hydroxyprogesterone (46-49 %) were obtained with pHs 7.4 and 7.8. This result compare very favourably with that of other workers (7-8, 10).

5. Growth phases-relations

For the estimate of the growth phases of *Streptomyces coriofaciens*, portions (50 ml) of the basal medium were dispensed in 250 ml Erlenmeyer flasks, sterilized and mixed with standard inocula of the tested microorganism (1 ml of 36 h old culture). The culture flasks were then shaken at 30 ± 2 °C. Samples were collected at different time intervals for determination of the culture dry weight, the protein content

and the final pH value of the culture medium (figure 2).

The conversion of progesterone (5.0 mg) was performed by selected cultures of *Streptomyces coriofaciens* representing the different growth phases; the initial lag phase (12 h old culture), logarithmic growth phase (2 d old culture), stationary phase (5 d old culture), and decline phase (10 d old culture). The transformation process was conducted in phosphate buffer solution (pH 7.4) using equal amounts (1 g) of the washed *S. coriofaciens* cells (resting cells); representing the different selected growth phases. The cultures did not undergo any further increase in their dry weight values during the conversion process which lasted for 72 h. The results presented in table 4 indicated that the culture age influenced the rate of progesterone transformation but not the type of the resulting metabolites. Thus 16 α -hydroxyprogesterone was produced in different yields in all cases. The microbial

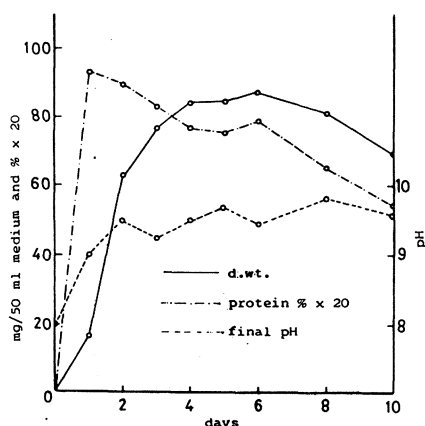


Figure 2. Final pH values, dry weight and protein % of *S. coriofaciens* during 10 days period of growth

culture representing the logarithmic phase of growth exhibited the highest progesterone conversion efficiency. Nearly half the amount of the added progesterone was converted in this phase. Thus it may be concluded that the enzyme productivity was greatest at the logarithmic growth phase of the test organism. Similar conclusions were arrived at for the activities of 11 α - and 21-hydroxylases produced by *Aspergillus nidulans* cultures representing both the accelerated and logarithmic phases of growth (4).

BIBLIOGRAPHY

1. BERNSTEIN, S.; LENHARD, R. H.; BIGLER, N. E., and DARKEN, M. A. 1960. 16 α -hydroxylated steroids. VIII. 9 α -fluoro-11 β , 16 α -dihydroxy-4-androstene-3, 17-dione. *J. Org. Chem.*, 25, 297-8.
2. FRIED, J.; PERLMAN, D.; LANGLUKKE, A. F., and ELWOOD, T. 1958 a. 16 α -hydroxylated steroids. U.S.2,855, 343, Oct. 7 (to Olim Mathieson Chemical Corp.).
3. FRIED, J.; PERLMAN, D.; LANGLUKKE, A. F., and ELWOOD, T. 1958 b. 16 α -hydroxy steroid derivs. U.S.2,855, 410, Oct. 7.
4. GHANEM, K. M. 1982. Physiological studies on steroid-transforming microorganisms. Ph.D. thesis, Alexandria University Faculty of Science, Alexandria, Egypt.
5. IIDA, M., and IZUKA, H. 1980. Studies on microbial transformations. XVII. Influence of steroid structure on the 16 α -hydroxylation activity of steroid by microorganism.
6. IIDA, M.; MATSUHASHI, K., and NAKAYAMA, T. 1975. Biosynthesis of 16 α -hydroxydehydroepiandrosterone 7-3H having specific activity. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 15, 189-3.
7. IIDA, M.; MATSUHASHI, K.; SAKURA, H., and YANAIHAR, T. 1979. Microbiological production of radioisotopically labelled 16 α -hydroxylated steroids in trace quantities. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 19, 553-6.
8. IIDA, M.; SHINOZUKA, T., and IIZUKA, H. 1979. Microbial introduction of a 16 α -hydroxyl function into the steroid nucleus. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 19, 557-61.
9. INUKAI, M.; ENOKITA, R.; TORIKATA, A.; NAKAHARA, M.; IWADO, S., and ARAI, M. 1978. Globomycin, a new peptide antibiotic with spheroplast-forming activity. *J. Antibiotic.*, 410.
10. KITA, D. A.; SARDINAS, J. L., and SHULL, G.

Table 4. Transformation of progesterone (5 mg/50 ml phosphate buffer of pH 7.4) by lg fresh weight of different aged cultures of *S. coriofaciens*

Culture age (days)	Converted progesterone		16 α -hydroxyprogesterone	
	mg/50 ml med.	% to added prog.	mg/50 ml med.	% to added prog.
1/2	1.77	35.4	1.56	31.2
2	2.29	45.8	2.05	41.0
5	2.06	41.2	1.93	38.6
10	0.67	13.4	0.51	10.2

- M. 1961. Introduction of the 16 α -hydroxyl group into estrogens by streptomycetes. *Nature*, 190, 627-8.
11. MILLS, J. S.; BOWERS, A.; DJERASSI, C., and RINGOLD, H. I. 1960. Synthesis of a new class of potent cortical hormones. 6 α , 9 α -difluoro-16 α -hydroxyprednisolone and its acetonide. *J. Amer. Chem. Soc.*, 82, 3399.
 12. MIZEI, A., and SZABO, A. 1961. A rapid estimation of prednisolone produced by fermentation oxidation. *Microbiol. Technol. Eng.*, 3, 114.
 13. OMURA, S.; TANAKA, H.; OIWA, R.; AWAYA, J.; MASUMA, P., and TANAKA, K. 1977. New antitumor antibiotics, OS-4742, A₁, A₂, B₁ and B₂ produced by a strain of *Streptomyces*. *J. Antibiotics*, 908.
 14. PERLMAN, D.; TITUS, E., and FRIED, J. 1952. Microbiological hydroxylation of progesterone. *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 2126.
 15. PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C.; EPPSTEIN, S. H.; REINEKE, L. M.; WEINTRAB, A.; MEISTER, P. D., and LEIGH, H. M. 1952. Microbiological transformation of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 5933.
 16. SALLAM, L. A.; EL-REFAI, A. H., and EL-KADY, I. A. 1969. Thin-layer chromatography of some C₂₁, C₁₉ and C₁₈ steroids.
 17. SEBEK, O. K., and PERLMAN, D. 1979. In: H. J. PEPPLER and D. PERLMAN (eds.). *Microbiol. Technology* vol. 1, 483. Academic Press, New York, London, San Francisco.
 18. THOMA, R. W.; FRIED, J.; BONANNO, S., and GRABOWICH, P. 1957. Oxidation of steroids by microorganisms. IV. 16 α -hydroxylation of 9 α -fluorohydrocortisone and 9 α -fluoroprednisolone by *Streptomyces roseochromogenes*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 79, 4818.
 19. WHITAKER, R. J., and GRANUM, E. P. 1980. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.*, 109, 156-9.

VARIACION DE LA ACTIVIDAD HETEROTROFICA Y DE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUAS DE PLAYA DE BARCELONA

M. D. VAQUÉ, J. MARTINEZ y J. VIVES-REGO

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

(Aceptado: 9 de octubre de 1985)

RESUMEN

Se estudia la actividad heterotrófica bacteriana por incorporación de timidina y el número de bacterias mediante recuento directo por epifluorescencia en las aguas de playa de una zona de costa de aproximadamente 30 km al norte y al sur de la ciudad de Barcelona, España. Se observa que el comportamiento de la población bacteriana de la zona al norte de Barcelona (Barceloneta-Montgat) es sustancialmente distinto del detectado en las aguas de playa al sur de Barcelona (Castelldefels-El Prat). En esta última zona se observa una población bacteriana relativamente uniforme a lo largo de todo el año, con un gran incremento de actividad bacteriana asociada al período estival. Sin embargo, la zona al norte de Barcelona presenta unas fluctuaciones de actividad y número de bacterias más acusadas que el otro sector de playa, y que se atribuyen a la influencia de la contaminación municipal e industrial a que están sometidas estas aguas, considerada superior a la de la zona al sur de Barcelona.

SUMMARY

Heterotrophic activity and direct counts by epifluorescence has been done in beach waters from a litoral of 30 km where Barcelona, Spain, is situated in the middle of the studied area. The sector situated at the north of Barcelona behaves differently when compared with the area situated at the south of Barcelona. Fluctuations of bacterial numbers and activities are much more apparent in the north part than in the south part of the beaches. Such differences are attributed to the municipal and industrial pollution which is much more important at the north of Barcelona than to the south.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias planctónicas son responsables de la degradación de la materia orgánica autóctona y alóctona. La materia orgánica autóctona proviene del fitoplancton, de las macroalgas (macrofitos) y de la fauna planctónica y bentónica (2). El material alóctono proviene de la descarga de los ríos y de las costas, que, en el caso de las costas próximas a Barcelona, tienen un alto contenido en contaminación orgánica. Este aporte de materia orgánica es responsable generalmente de niveles de actividad heterotrófica superiores a las de las aguas marinas distantes, poco contaminadas (4,8). Sin embargo, no debe descartarse que el posible efecto tóxico de estas descargas pueda inhibir parcialmente esta actividad (6). Existen variaciones estacionales de la actividad heterotrófica y de la densidad bacteriana, aunque por el momento no hay modelos comunes para todos los ecosistemas acuáticos. En zonas poco contaminadas, como el Inner Kiel Fjord, la concentración media de partículas sólidas en suspensión (medida a 2 m de profundidad y en el período de un año) es de 4,1 mg l⁻¹, mientras que en el estuario de Humber varía de 300 mg l⁻¹ en verano a 1.900 mg l⁻¹ en invierno-primavera. Las densidades y actividades bacterianas de ambos ecosistemas presentarán un comportamiento netamente distinto (2). Los cambios de temperatura, la salinidad y el «bloom» de las algas han sido tres características estudiadas por distintos autores, en relación con la actividad y densidad bacteriana en medios naturales, aunque en muchas ocasiones intervienen factores externos ajenos al propio ecosistema. Lancelot y Billen (9) describen en una zona del mar del Norte, cómo el aumento de la

actividad bacteriana va precedido de un pico de producción de clorofila «a» entre abril y mayo. Wright (13) concluye que el efecto de la temperatura está relacionado directamente con un aumento de la actividad heterotrófica y actividad específica en el trayecto que va desde el estuario de Essex hasta 14 km de distancia del golfo de Maine. Parece ser que en aguas dulces el porcentaje de bacterias ligadas a partículas de materia orgánica es superior al de aguas marinas. Cuando estas aguas fluyen al mar, el grado de bacterias ligadas a la materia orgánica decrece con el aumento de la salinidad (1), asumiéndose que las bacterias ligadas a partículas de materia orgánica son más activas que las libres (1-2).

En el presente trabajo se aportan datos del número de bacterias, actividad heterotrófica y actividad específica de las aguas de playa de una zona de costa de aproximadamente 30 km (desde Castelldefels a Montgat), en la que más o menos en el centro se sitúa Barcelona. Los objetivos de este trabajo son fundamentalmente dos: 1) estudiar la población bacteriana costera de Barcelona; 2) intentar modelizar su evolución a lo largo del año.

Para una mejor comprensión de los fenómenos que allí suceden, hemos dividido esta zona de costa en dos áreas: área al sur de Barcelona (Castelldefels-El Prat) y área al norte de Barcelona (Barceloneta-Montgat). Los datos obtenidos para cada área sugieren un comportamiento estacional distinto, atribuible a la acusada contaminación urbana e industrial de la zona costera situada al norte de Barcelona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se toman las muestras de agua de playa en bidones de 25 l a 10 l y se tras-

ladan inmediatamente al laboratorio, donde se mantienen al resguardo de la luz a 4 °C hasta que se procesan en un plazo máximo de 24 h.

Los puntos de muestreo del área Castelldefels-El Prat son: Castelldefels (CAS), La Pineda (PIN) perteneciente al municipio de Gavá, La Murtra (MUR) y El Prat de Llobregat (PRA). El principal foco de contaminación de este sector es el río Llobregat [$\text{DBO}_5 = 20 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$; $\text{N-NH}_4 = 0,6\text{-}3,4 \text{ mg l}^{-1}$; caudal de agua: $20 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$; $\text{DQO} = 112 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ (12)].

Los puntos de muestreo del área Barceloneta-Montgat son: Barceloneta (BAR), Playa de Marbella, en el municipio de Barcelona (MAR), San Adrián del Besós (SA), Badalona (BAD) y Montgat (MON). El principal foco de contaminación de este sector es el río Besós [$\text{DBO}_5 = 300 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-2}$;

$\text{N-NH}_4 = 20 \text{ mg l}^{-1}$; caudal de agua: $3 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$; $\text{DQO} = 386 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ (12)].

Una descripción más precisa del emplazamiento de estos puntos de muestreo la han efectuado Parés y col. (10). La representación de los mismos se encuentra en la figura 1.

Actividad heterotrófica

La actividad heterotrófica del bacterioplancton se determina mediante la incorporación de timidina tritiada en la fracción insoluble en el ácido tricloroacético frío, de acuerdo con la metodología de Fuhrman y Azam (4-5). Se utiliza 20 nM de metil- ^3H -timidina (80-90 Ci/mmol, Amersham, Inglaterra). La incubación se efectúa en el laboratorio a temperatura ambiente (18-22 °C) durante 30 min. La fracción insoluble en ácido tricloroa-

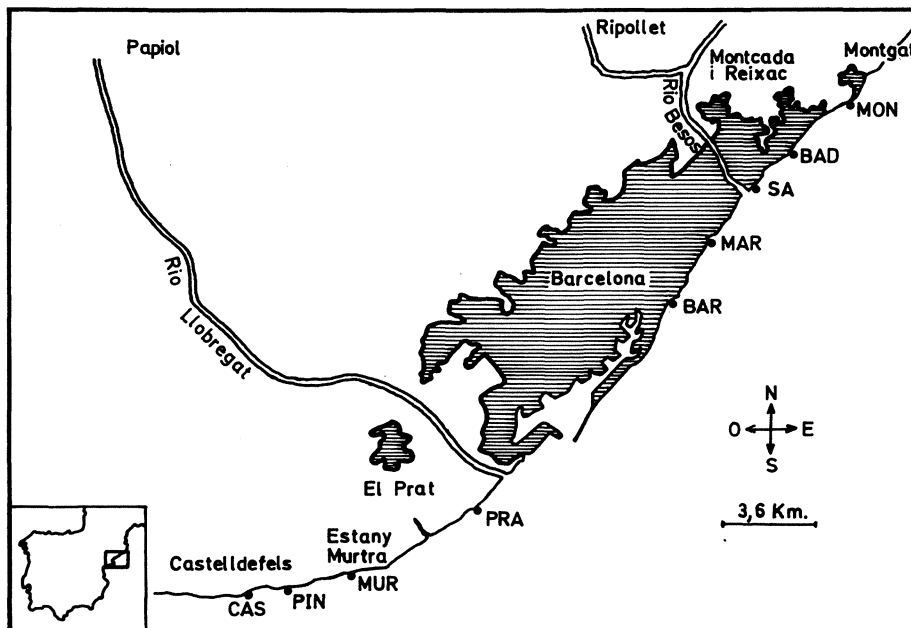


Figura 1. Situación de los puntos de muestreo en la zona de estudio

cético frío se recoge en filtros de acetato de celulosa de 0,2 μ de diámetro de poro (Sartorius), que una vez colocados en los viales de centelleo se disuelven con 1 ml de acetato de etilo, añadiéndose después 10 ml de líquido de centelleo. La radiactividad se mide por centelleo líquido en un tri-carb 460 C, Packard Instruments Co. La eficiencia se determina mediante un estándar interno de n-hexadecano tritiado. La actividad heterotrófica se expresa en nmol de timidina incorporada por litro y por hora.

Enumeración de bacterias por epifluorescencia

Se realizan recuentos de la población bacteriana por epifluorescencia, basándose en el método descrito por Hobbie y col. (7). Las submuestras se fijan inmediatamente al llegar al laboratorio con formaldehído 0,2 % concentración final. La tinción se efectúa con una solución de anaranjado de acridina (0,01 % concentración final en tris 0,02 M, pH 7,2-8,0, 20 °C, 2-3 min). Las bacterias teñidas se recogen sobre filtros nucleopore de policarbonato de 0,22 μ de diámetro de poro. Las observaciones se efectúan con un microscopio Nikon Optiphot, dotado con un sistema de fluorescencia episcópica EF-D, lámpara de mercurio Osram 100 W/2 y filtros B y ND₁₆ (Nikon).

Actividad específica

El concepto de actividad específica es usado habitualmente en enzimología y hace referencia a la cantidad o tasa de actividad enzimática con respecto a la cantidad de proteína. En este trabajo, el término de actividad específica hace referencia a la actividad heterotrófica (medida por incorpora-

ción de timidina tritiada) en relación con el número total de microorganismos detectados por epifluorescencia, sin precisar volumen celular, biomasa o contenido proteico; a pesar de que esta enumeración de bacterias no distinga entre bacterias activas, inactivas o muertas. Los criterios de actividad específica de este tipo han sido usados previamente por otros autores (13). En este trabajo la actividad específica se expresa en nmoles de timidina incorporada por hora y por bacteria (nmol timidina h⁻¹ bact.⁻¹).

RESULTADOS

Para evaluar las variaciones estacionales que presenta la población bacteriana de la zona de costa Castelldefels-Montgat, se ha determinado la actividad heterotrófica (por incorporación de timidina tritiada (4-5), la densidad bacteriana (recuento directo por epifluorescencia (7) y la actividad específica (actividad heterotrófica/densidad bacteriana (13); a su vez se determinan los valores de la temperatura en el momento de la recogida de las muestras. La evolución de dicha población se ha seguido durante el período comprendido entre noviembre de 1983 y octubre de 1984.

En la *figura 2* están representados los valores obtenidos de actividad heterotrófica y densidad bacteriana de la zona de costa considerada (Castelldefels-Montgat), durante el período de estudio. Se observa que el área Barceloneta-Montgat presenta en líneas generales una actividad heterotrófica y densidad bacteriana superiores a las del área Castelldefels-El Prat.

En el área Castelldefels-El Prat, los valores de actividad heterotrófica oscilaron entre 0,00095-2,077 nmol timidina l⁻¹ h⁻¹ y la densidad bacteriana fluctuó entre 0,5-101 $\times 10^6$ bact. ml⁻¹; excepcionalmente los puntos de mues-

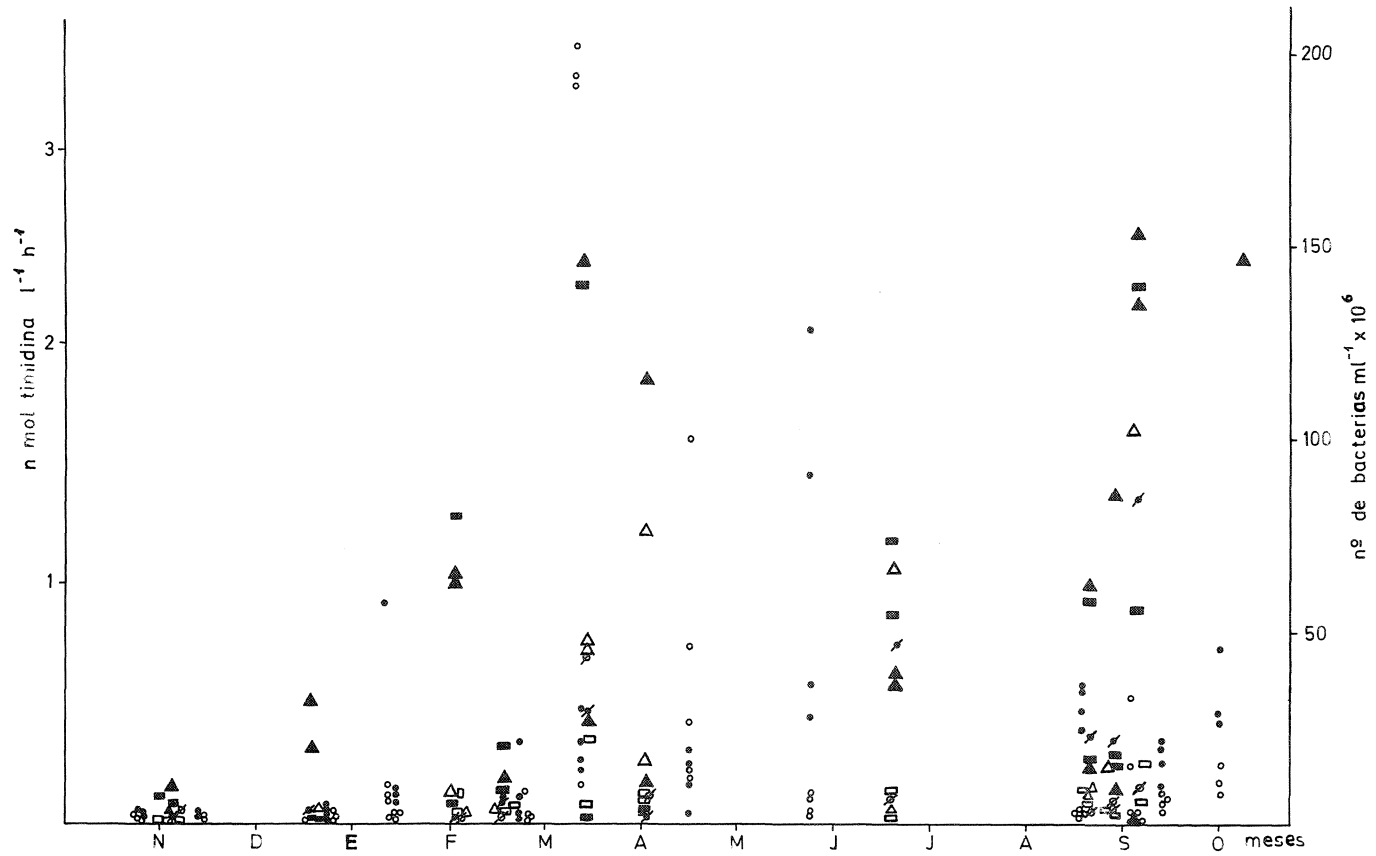


Figura 2. Evolución a lo largo del año de la actividad y densidad de la población bacteriana. CAS, PIN, MUR, PRA: (●) incorporación de timidina; (○) número de bacterias. BAR, BAD: (■) incorporación de timidina; (□) número de bacterias. SA, MAR: (▲) incorporación de timidina; (Δ) número de bacterias. MON: (♣) incorporación de timidina; (⊙) número de bacterias

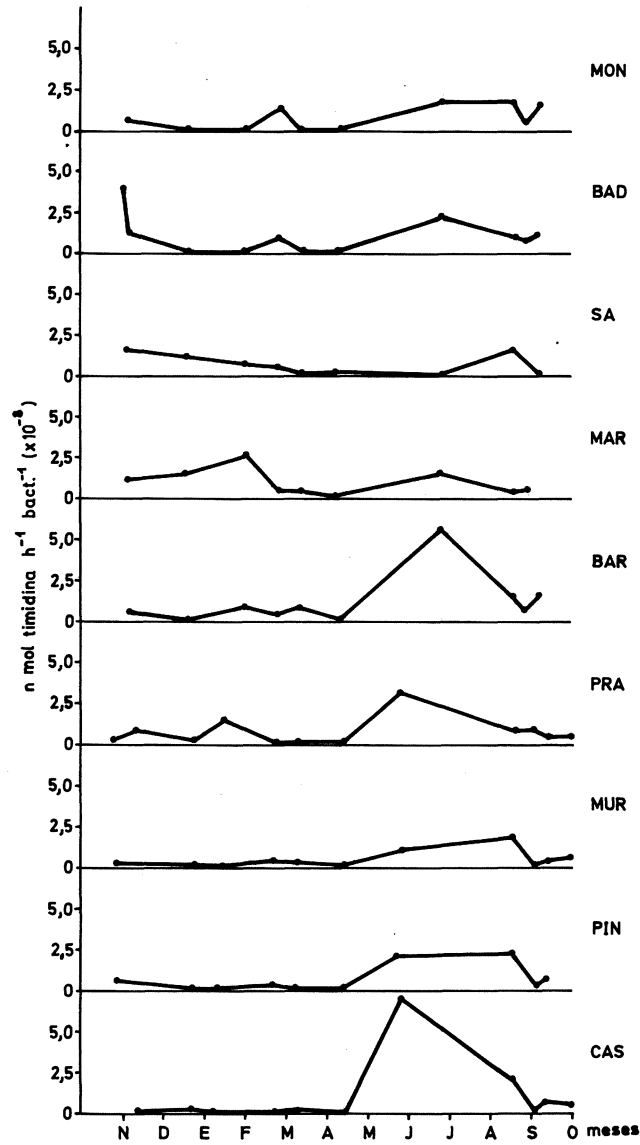


Figura 3. Actividad específica de la población bacteriana a lo largo del año

treo de CAS, PIN y PRA arrojaron unos valores de 204×10^6 , 187×10^6 y 180×10^6 bact. ml^{-1} , respectivamente. Estos resultados fueron obtenidos en

el mes de abril, y no se han vuelto a repetir en ningún otro caso, siendo sorprendentemente elevados sin que podamos dar una explicación coherente,

ya que durante estas fechas la temperatura del agua es baja y la población humana que puede ocupar la zona de playas es escasa.

El área Barceloneta-Montgat presentó un intervalo de valores de actividad heterotrófica entre 0,0011 – 2,457 nmol timidina l⁻¹ h⁻¹ y de densidad bacteriana que osciló entre 0,04 – 102 × 10⁶ bact./ml⁻¹. Ambos intervalos de valores son similares a los obtenidos en el área Castelldefels-El Prat; sin embargo, en líneas generales, durante todo el año fueron superiores en el área Barceloneta-Montgat (*figura 2*).

En el área Castelldefels-El Prat se observa un máximo en el número de bacterias durante el mes de abril, siendo la actividad heterotrófica muy baja en este punto (*figura 2*). Al establecer la relación entre la actividad heterotrófica/densidad bacteriana (actividad específica) para esta misma zona de playa se obtienen valores muy bajos (*figura 3*), sugiriéndose que no todas las bacterias son uniformemente activas, debido a que predominen las bacterias poco activas o bien que exista una población bacteriana autóctona proporcionalmente alta y por tanto inactiva. Sin embargo, en el mes de junio se observa un máximo de actividad heterotrófica, mientras que el número de bacterias es relativamente bajo, siendo por tanto la actividad específica elevada (*figuras 2-3*), sugiriéndose la presencia de bacterias activas y autóctonas. La temperatura del agua en junio es de 23,4 – 24,2 °C mientras que desde noviembre a mayo (inclusive) oscila entre 9,6 – 15,7 °C. Este hecho induce a pensar que las variaciones estacionales de actividad heterotrófica y actividad específica en el área Castelldefels-El Prat, estarían relacionadas con la temperatura, además de otros factores ambientales acuáticos (materia orgánica fácilmente utiliza-

ble, «bloom» de las algas, salinidad).

En el área Barceloneta-Montgat se obtienen dos picos máximos de actividad heterotrófica durante los meses de abril y octubre (*figura 2*). Sin embargo, los valores de actividad específica son bajos en el mes de abril para todos los puntos de esta zona, lo que puede explicarse por la presencia de bacterias alóctonas que reduzcan la actividad específica, que, sin embargo, se incrementa en el mes de octubre para los puntos BAD y MON (*figura 3*). Durante el mes de julio la actividad específica aumentó en todos los puntos de muestreo (excepto en SA), presumiblemente debido a un mayor incremento de la temperatura, que osciló entre 23 – 23,7 °C.

En el *cuadro 1* se expresan los coeficientes de correlación entre actividad heterotrófica-temperatura y actividad específica-temperatura, para cada uno de los puntos de muestreo. En los puntos CAS y PIN se obtienen unos coeficientes de correlación mucho más significativos que los obtenidos en MUR y PRA. Posiblemente se deba a que estos dos últimos se encuentran sometidos (por su situación) a una mayor influencia de los vertidos de la zona. El punto de muestreo MUR recibe de manera intermitente y no de manera periódica los vertidos de la laguna de La Murtra; por otra parte, El Prat se encuentra muy cercano a la desembocadura del río Llobregat. Para los puntos de muestreo de BAR, MAR y SA los coeficientes de correlación entre las actividades y la temperatura son muy poco significativos. Este sector está influido directamente por el núcleo urbano de Barcelona y por la desembocadura del río Besós (principal foco de contaminación de este sector de costa) en la playa de San Adrián de Besós. En los puntos de BAD y MON (menos contaminados que BAR, MAR

Cuadro 1. Coeficientes de correlación entre temperatura y actividad heterotrófica ($t-A_h$) y entre temperatura y actividad específica ($t-A_e$)

Puntos de muestreo	n	Parámetros correlacionados	r	P	t_s
CAS	8	$t-A_h$	0,91621	< 1 %	5,60098
	8	$t-A_e$	0,86641	< 1 %	4,25021
PIN	9	$t-A_h$	0,91451	< 0,1 %	5,98100
	8	$t-A_e$	0,77213	< 5 %	2,97629
MUR	9	$t-A_h$	0,66189	< 10 %	2,33600
	8	$t-A_e$	0,81609	< 2 %	3,45893
PRA	9	$t-A_h$	0,66627	< 10 %	2,36391
	9	$t-A_e$	0,65347	< 10 %	2,28405
BAR	8	$t-A_h$	0,13414	< 80 %	0,33157
	8	$t-A_e$	0,53023	< 20 %	1,53185
MAR	8	$t-A_h$	-0,10833	< 80 %	0,26692
	8	$t-A_e$	-0,15421	< 80 %	0,38231
SA	8	$t-A_h$	-0,01811	< 90 %	0,02893
	8	$t-A_e$	-0,07105	< 80 %	0,17452
BAD	8	$t-A_h$	0,79517	< 2 %	3,21213
	8	$t-A_e$	0,73546	< 5 %	2,65880
MON	8	$t-A_h$	0,84602	< 1 %	3,88802
	8	$t-A_e$	0,73927	< 5 %	2,68910

n, pares de valores. r, coeficiente de correlación. P, significación, expresada como probabilidad de rechazo de la hipótesis según la t-student.

y SA) presentan unos coeficientes de correlación entre las actividades y la temperatura con un mayor nivel de significación que los anteriores.

La observación de las bacterias (previamente teñidas con anaranjado de acridina) al microscopio de epifluorescencia puede orientarnos sobre su estado fisiológico, además de constatar una gran heterogeneidad morfológica en todo el sector de costa estudiado.

El anaranjado de acridina a bajas concentraciones y pH básico tiene la propiedad de ligarse a los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Cuando el ADN es mayoritario con respecto al ARN

las células se tiñen de color verde fluorescente; contrariamente, si el ARN predomina la coloración es roja fluorescente (7). La tasa de crecimiento de las bacterias marinas en aguas poco contaminadas es baja; en ellas hay un predominio de ADN, por tanto la coloración observada al microscopio de epifluorescencia será verde. Cuando la tasa de crecimiento es alta la cantidad de ARN aumenta y la coloración observada será roja (7).

En la zona Castelldefels-El Prat, en general, predominan las formas bacilares pequeñas y de color verde durante el año de estudio. En el mes de junio el predominio de bacterias de peque-

ño tamaño va acompañado de color rojo fluorescente intenso. Este hecho estaría de acuerdo con el aumento de actividad específica que experimenta este sector en este mes (*figura 3*). En el área Barceloneta-Montgat se observan formas bacilares de mayor tamaño que en el área Castelldefels-El Prat. En el punto de SA aparecen largas cadenas de bacilos de gran tamaño y de color rojo intenso, así como la presencia de una gran diversidad de formas, tamaños y predominio del color rojo. Esta flora bacteriana visualizada en este punto (SA) es muy semejante a la observada en muestras del río Besós, que descarga sus aguas en esta zona. Desde julio a mediados de septiembre en los puntos de BAR, MAR y BAD la población bacteriana es de pequeño tamaño con acusada fluorescencia roja, mientras que en MON la fluorescencia es predominantemente verde. Posiblemente se trataría de bacterias autóctonas, las cuales serían responsables del incremento de la actividad específica, sobre todo la que corresponde al mes de julio. Los puntos de muestreo de BAD y MON presentan una población bacteriana más similar a la que se observa en la zona al sur de Barcelona, es decir, predominio de formas pequeñas con coloración verde, lo que aún es más evidente en MON.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren una variación biestacional a lo largo del año, tanto del número de bacterias como de la actividad heterotrófica en la zona situada al norte de la ciudad de Barcelona (Barceloneta-Montgat). El área situada al sur de Barcelona (Castelldefels-El Prat) presenta un modelo unimodal mucho más semejante a las variaciones estacionales en mares poco contaminados. Las diferencias entre ambas zonas de costa tan próximas entre sí,

se atribuyen a la acusada contaminación urbana e industrial del área situada al norte de Barcelona.

DISCUSIÓN

Hasta la fecha muchos han sido los intentos realizados para establecer un modelo de variación estacional de actividad y densidad bacteriana en distintos ecosistemas acuáticos (lagos, ríos, estuarios, aguas oceánicas y marinas). Los resultados obtenidos para cada uno de ellos son distintos, incluso dentro de un mismo ecosistema (2), evidenciándose que las variaciones estacionales de actividad y densidad bacteriana pueden depender del pH, temperatura, salinidad, fitoplancton, presencia de materia orgánica fácilmente utilizable (2, 6, 10-11).

Las zonas costeras presentan un grado elevado de turbulencia y un enriquecimiento en materia orgánica constante de la costa, lo que implica un aumento de actividad con respecto a las aguas más interiores. Es posible que en aguas poco profundas los procesos microbiológicos estén influidos por una interacción entre el agua y el sedimento (3).

El estudio de las variaciones estacionales de actividad y densidad bacteriana en las aguas de playa de la zona litoral de Barcelona, indica un modelo muy variable entre puntos de la costa próximos entre sí. Este hecho induce a pensar que la variación de la actividad y del número de bacterias está más influido por los aportes de la costa que por parámetros estacionales. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la población bacteriana de las aguas de playa al sur de Barcelona (Castelldefels-El Prat) presenta un comportamiento distinto al de la población bacteriana al norte de Barcelona (Barceloneta-Montgat).

Globalmente podemos considerar que la zona al norte de Barcelona presenta a lo largo de todo el año una población bacteriana numéricamente superior, más activa y de mayor tamaño celular al de la zona de playa correspondiente al sur de Barcelona. Sin embargo, los niveles de actividad específica son equivalentes en ambas zonas.

La evolución de la actividad específica muestra un modelo unimodal en la zona al sur de Barcelona en relación con la época estival, mientras que las fluctuaciones de actividad específica en la zona al norte de Barcelona son mucho más variables y no se pueden ajustar a un modelo unimodal estival.

El mayor tamaño celular observado en la zona al norte de Barcelona podría indicar un mayor aporte de nutrientes en dicha zona; si así fuera, la actividad heterotrófica y la actividad específica detectadas deberían ser superiores. Por tanto, este mayor tamaño celular y las variaciones atípicas de las actividades podrían atribuirse al impacto de la contaminación costera debida por una parte a la descarga del río Besós (materia orgánica, tóxicos, bacterias autóctonas y alóctonas), y por otro lado a la elevada densidad urbana e industrial: situación contrapuesta a lo que sucede en el área al sur de Barcelona, en la que la contaminación producida por la descarga del río Llobregat parece ser inferior a la del Besós y la densidad industrial y urbana es mucho menor que en la zona anterior.

Por otra parte, los coeficientes de correlación entre la temperatura y las actividades tienen un mayor nivel de significación en la zona al sur de Barcelona que en el área Barceloneta-Montgat; no obstante, en ambas zonas, cuanto más alejados están los

puntos de muestreo del núcleo urbano de Barcelona, más alto es el nivel de significación. Este fenómeno se hace mucho más evidente en el área Barceloneta-Montgat (*cuadro 1*), lo que induce a pensar que en los puntos de playa más alejados del núcleo urbano de Barcelona las variaciones de actividad y densidad bacterianas no están tan influidos por el impacto de la contaminación urbana y sí por parámetros ambientales naturales acuáticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. BELL, C. R., and ALBRIGHT, L. J. 1982. Attached and free-floating bacteria in a diverse selection of water bodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1227-37.
2. BENT, E. J., and GOULDER, R. 1981. Planktonic bacteria in the Humber Estuary: seasonal variation in population density and heterotrophic activity. *Mar. Biol.*, 62, 35-45.
3. BOLTER, M.; MEYER-REIL, L.; DAWSON, R.; LIEBEZEIT, G.; WOLTER, K., and SZWERINSKI, H. 1981. Structure analysis of shallow water ecosystems: interaction of microbiological, chemical and physical characteristics measured in the overlying waters of sandy beach sediments. *Est. Coast. She. Sci.*, 13, 579-89.
4. FUHRMAN, J., and AZAM, F. 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 1085-95.
5. FUHRMAN, J., and AZAM, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.*, 66, 109-20.
6. GOULDER, R.; BLANCHARD, A. S.; SANDERSON, P. L., and WRIGHT, B. 1980. Relationships between heterotrophic bacteria and pollution in an industrialized estuary. *Water Res.*, 14, 591-601.
7. HOBIE, J.; DALEY, R. J., and JASPER, S. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1225-28.
8. KIRCHMAN, D.; DUCKLOW, N., and MITCHELL, R. 1982. Estimates of bacterial

- growth from changes in uptake rates and biomass. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1296-307.
9. LANCELOT, CH., and BILLEN, G. 1984. Activity of heterotrophic bacteria and its coupling to primary production during the spring phytoplankton bloom in the southern bight of the North Sea. *Limnol. Oceanogr.*, 29, 721-30.
 10. PARES, R.; JOFRE, J.; LUCENA, F., y RIPOLL, J. 1983. Contaminación litoral de Barcelona. Informe núm 1 correspondiente al contrato entre la Corporación Metropolitana de Barcelona y la Universidad de Barcelona de 1 de junio de 1982.
 11. PEDROS-ALIO, C., and BROCK, T. D. 1982. Assessing biomass and production of bacteria in eutrophic lake Mendota, Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 203-18.
 12. SUAREZ-NOVOA, M., y TRILLO-MONSORIU, J. D. 1977. Plan de saneamiento y reutilización de los vertidos de aguas de Barcelona. CIMA Area Agua., 189-201.
 13. WRIGHT, R. T. 1978. Measurement and significance of specific activity in the heterotrophic bacteria of natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 297-305.

NORMAS PARA LOS AUTORES

«Microbiología Española» publica 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 originales 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 12 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. Dibujos, gráficas y fotografías 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, 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 de los trabajos, en español e inglés, de un máximo de 250 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 original. No deberán incluir material o datos no citados en el texto. En las notas, los resúmenes no deberán exceder de 100 palabras.

La bibliografía se reducirá a la que está directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabéticas, constarán de los siguientes datos:

Revistas: apellidos de los autores con las iniciales de los nombres propios, año de publicación, título del trabajo, título abreviado de la revista (según Chemical Abstracts-Bibliographic Guide for Editors and Authors), número del volumen, número de la primera y última páginas.

Patentes: apellidos de los inventores con las iniciales de los nombres propios, país y número de la patente, año de petición de la patente, nombre de la compañía propietaria de la patente.

Tesis: apellido del autor con la inicial del nombre propio, tipo de tesis, universidad en la que se llevó a cabo, sede de la universidad, año de terminación.

Libros: a) Monografías. Apellidos de los autores con las iniciales de los nombres propios, año de publicación, título completo del libro, editorial y lugar, números del volumen y de la página. b) Volúmenes colectivos. Apellidos de los autores con las iniciales de los nombres propios, apellidos e iniciales de los directores de la obra, año de publicación, título completo de la obra, editorial y lugar, números del volumen y de la página.

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 100 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 pruebas, que deberán devolver en plazo no superior a una se-

mana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, éstas serán corregidas por la Revista y publicado el trabajo. 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 25 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, 28002 Madrid. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo de Redacción de la Revista.

GUIDELINES TO AUTHORS

«Microbiología Española» publishes original research papers, research notes and occasionally reviews covering all aspects of microbiology. All submissions should be written in Spanish or English. The decision to accept submissions is made by the Editorial Board.

Submission of a paper to this journal is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere. Consent is given for reproducing publications of this journal if accredited as the source.

Papers addressed to «Microbiología Española», Joaquín Costa, 32, 28002 Madrid, Spain, should be typewritten with double spacing and 2.5 cm wide margin on UNE A-4 format sheets. Only one side of the sheet should be used and the pages should be numbered sequentially.

Papers must be restricted to a maximum of 12 typescript pages including figures and tables. The original and one copy are required of the text, tables and illustrations.

The title should be supplied on the heading of a separate sheet, including the names of the authors, their affiliations and complete address.

Papers should be divided into: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments (if any) and Bibliography.

Abstracts of no more than 250 words in Spanish and English should be supplied with the articles.

Well-known methods should be indicated only by references. The Metric System is to be used throughout. Symbols according to UNE rules of the National Rationalization and Standardization Institute for texts in Spanish.

Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the paper should be submitted. Photoprints must be of sufficient quality to ensure good reproduction. They should be numbered on

the back and identified with the first author's name written in pencil.

Drawings and line-figures should be drawn in black ink on tracing paper. Photoprints are also acceptable instead of the originals, in any case, they should be marked in the same way as photographs. Drawings, graphs and photographs should be numbered jointly and consecutively.

Legends for line-drawings and photoprints must be typed, double-spaced on a separate sheet.

Tables should be compiled on separate sheets with a descriptive title and numbered independently of the figures using roman numerals.

Bibliography should be confined to the directly related to the concerned subject, numbered and alphabetized.

References to journals should contain the names and initials of all authors, the year of publication, the title of the paper, the title of the periodical abbreviated according to Chemical Abstracts-Bibliographic Guide for Editors and Authors. These should be followed by the volume number first and last page numbers.

References to patents should contain the names and initials of all inventors, country and number of patent, year of application and name of the company owning the patent.

References to thesis should contain the name and initials of the author, type of thesis, name of the University where submitted, place and year.

References to books should also include the names and initials of all authors, editors if applicable, year, title of the book, volume, page, publishers and town.

Notes should be restricted to 4 typescript pages and are intended to present experimental observations and descriptions of techniques or methodological changes of interest. They should be written according to the guidelines given for papers, but without the heading divisions,

and their abstracts should not exceed 100 words. Figures and tables should be kept to a minimum.

Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write them. Instead of an abstract, they will contain a list of contents.

On acceptance of the paper, one galley proof will be sent to the nominated author

to check for typesetting accuracy. The corrected proofs shall be duly returned within one week's time. If delay were observed, the proofs will be corrected by the editorial staff and published. Broader changes implying recomposition of the text will be at the author's expense.

For each author 25 free reprints will be supplied. Additional reprints will be billed at cost price if requested in written upon returning the corrected galley proofs.