
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Revista del Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán"

VOLUMEN 39
ENERO-DICIEMBRE, 1986



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

La edición de este volumen ha corrido a cargo de:

Dr. Gonzalo Sierra, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Dr. Angel García Gancedo, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Dra. Ramona Beltrá, Centro de Investigaciones Biológicas, 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, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Dr. Miguel Rubio.

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 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Nota..... | 1 |
| Urato-oxidasa termoestable de una bacteria termófila. I. Determinación por una nueva técnica basada en la aparición de zonas de transparencia de ácido úrico, <i>M. S. Ammar, S. H. Elwan y M. A. Meki</i> (**)..... | 3 |
| Urato-oxidasa termoestable de una bacteria termófila. II. Producción de la enzima por <i>Bacillus stearothermophilus</i> S-90 L.N., <i>M. S. Ammar, S. H. Elwan y M. A. Meki</i> (**)..... | 9 |
| Urato-oxidasa termoestable de una bacteria termófila. III. Influencia de vitaminas, tampones, temperatura y velocidad de agitación en la producción de urato-oxidasa del <i>Bacillus stearothermophilus</i> S-90 L.N., <i>M. A. Ammar, S. H. Elwan y M. A. Meki</i> (**)..... | 15 |
| Estudio sobre los micovirus asociados al carácter matador en levaduras, <i>I. Martín, A. L. Extremera y E. Montoya</i> (*)..... | 23 |
| Algunos datos aclaratorios para las hipótesis de ensamblaje de rhabdovirus de plantas, <i>M. Rubio-Huertos y M. Rubio-Sáez</i> (*)..... | 29 |

(*) En español. (**) En inglés.

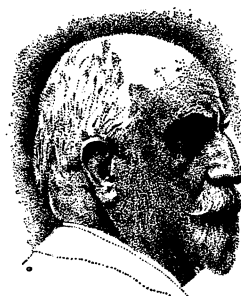
I N D E X

| | Page |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Note..... | 1 |
| Thermostable urate oxidase from obligate thermophilic bacteria. I. Estimation using the uric acid clearing zone (U.C.Z.) new technique, <i>M. S. Ammar, S. H. Elwan and M. A. Meki</i> (**)..... | 3 |
| Thermostable urate oxidase from obligate thermophilic bacteria II. The constitutive production of urate oxidase by <i>Bacillus stearothermophilus</i> , S-90 L. N., <i>M. S. Ammar, S. H. Elwan and M. A. Meki</i> (**)..... | 9 |
| Thermostable urate oxidase from obligate thermophilic bacteria. III. Urate oxidase production by <i>Bacillus stearothermophilus</i> , S-90 L. N. in relation to vitamins, buffers, temperature and agitation speed, <i>M. S. Ammar, S. H. Elwan and M. A. Meki</i> (**)..... | 15 |
| Studies about mycovirus related to the killer character in yeast, <i>I. Martín, A. L. Extremera and E. Montoya</i> (*)..... | 23 |
| Some more data tending to clarify the conceptions about the assembly of plant rhabdoviruses, <i>M. Rubio-Huertos and M. Rubio-Sáez</i> (*)..... | 29 |

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

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Revista del Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán"



VOLUMEN 39. 1986

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

La edición de este volumen ha corrido a cargo de:

Dr. Gonzalo Sierra, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Dr. Angel García Gancedo, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Dra. Ramona Beltrá, Centro de Investigaciones Biológicas, 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, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Dr. Miguel Rubio.

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

| | <u>Página</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <i>Ammar, M. S.; Elwan, S. H., y Meki, M. A.</i> : Urato-oxidasa termoestable de una bacteria termófila. I. Determinación por una nueva técnica basada en la aparición de zonas de transparencia de ácido úrico (**) | 3 |
| <i>Ammar, M. S.; Elwan, S. H., y Meki, M. A.</i> : Urato-oxidasa termoestable de una bacteria termófila. II. Producción de la enzima por <i>Bacillus stearothermophilus</i> S-90 L. N. (**) | 9 |
| <i>Ammar, M. S.; Elwan, S. H., y Meki, M. A.</i> : Urato-oxidasa termoestable de una bacteria termófila. III. Influencia de vitaminas, tampones, temperatura y velocidad de agitación en la producción de urato-oxidasa del <i>Bacillus stearothermophilus</i> S-90 L. N. (**) | 15 |
| <i>Elwan, S. H.</i> : véase <i>Ammar, M. S.</i> | 3 |
| <i>Elwan, S. H.</i> : véase <i>Ammar, M. S.</i> | 9 |
| <i>Elwan, S. H.</i> : véase <i>Ammar, M. S.</i> | 15 |
| <i>Extremera, A. L.</i> : véase <i>Martín, I.</i> | 23 |
| <i>Martín, I.; Extremera, A. L., y Montoya, E.</i> : Estudio sobre los microvirus asociados al carácter matador en levaduras (*) | 23 |
| <i>Meki, M. A.</i> : véase <i>Ammar, M. S.</i> | 3 |
| <i>Meki, M. A.</i> : véase <i>Ammar, M. S.</i> | 9 |
| <i>Meki, M. A.</i> : véase <i>Ammar, M. S.</i> | 15 |
| <i>Montoya, E.</i> : véase <i>Martín, I.</i> | 23 |
| Nota | 1 |
| <i>Rubio-Huertos, M., y Rubio-Sáez, M.</i> : Algunos datos aclaratorios para las hipótesis de ensamblaje de rhabdovirus de plantas (*) | 29 |
| <i>Rubio-Sáez, M.</i> : véase <i>Rubio-Huertos, M.</i> | 29 |

(*) En español. (**) En inglés.

I N D E X

| | Page |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <i>Ammar, M. S.; Elwan, S. H., and Meki, M. A.</i> : Thermostable urate oxidase from obligate thermophilica. I. Estimation using the uric acid clearing zone (U.C.Z.) new technique (**).... | 3 |
| <i>Ammar, M. S.; Elwan, S. H., and Meki, M. A.</i> : Thermostable urate oxidase from obligate thermophilic bacteria. II. The constitutive production of urate oxidase by <i>Bacillus stearothermophilus</i> , S-90 L. N. (**)..... | 9 |
| <i>Ammar, M. S.; Elwan, S. H., and Meki, M. A.</i> : Thermostable urate oxidase from obligate thermophilic bacteria. III. Urate oxidase production by <i>Bacillus stearothermophilus</i> , S-90 L. N. in relation to vitamins, buffers, temperature and agitation speed (**)..... | 15 |
| <i>Elwan, S. H.</i> : see <i>Ammar, M. S.</i> | 3 |
| <i>Elwan, S. H.</i> : see <i>Ammar, M. S.</i> | 9 |
| <i>Elwan, S. H.</i> : see <i>Ammar, M. S.</i> | 15 |
| <i>Extremera, A. L.</i> : see <i>Martín, I.</i> | 23 |
| <i>Martín, I.; Extremera, A. L., and Montoya, E.</i> : Studies about mycovirus related to the killer character in yeast (*)..... | 23 |
| <i>Meki, M. A.</i> : see <i>Ammar, M. S.</i> | 3 |
| <i>Meki, M. A.</i> : see <i>Ammar, M. S.</i> | 9 |
| <i>Meki, M. A.</i> : see <i>Ammar, M. S.</i> | 15 |
| <i>Montoya, E.</i> : see <i>Martín, I.</i> | 23 |
| Note..... | 1 |
| <i>Rubio-Huertos, M., and Rubio-Sáez, M.</i> : Some more data tending to clarify the conceptions about the assembly of plant rhabdoviruses (*)..... | 29 |
| <i>Rubio-Sáez, M.</i> : see <i>Rubio-Huertos, M.</i> | 29 |

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

Como consecuencia de la reciente reorganización del Consejo Superior de Investigaciones Científicas que ha originado la desaparición del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», cesa de publicarse «Microbiología Española».

El Equipo editorial, al despedirse, quiere hacer constar su agradecimiento a los lectores, muy especialmente, y a todos cuantos con su colaboración en las diferentes tareas, asesoramiento, organización, redacción, imprenta, han permitido la publicación de la revista que, después de treinta y nueve años de existencia, cierra con este volumen su colección.

THERMOSTABLE URATE OXIDASE FROM OBLIGATE THERMOPHILIC BACTERIA. I. ESTIMATION USING THE URIC ACID CLEARING ZONE (U.C.Z.) NEW TECHNIQUE

M. S. AMMAR, S. H. ELWAN and M. A. MEKI

Botany Department, Faculty of Science, Al-Azhar University, Cairo (Egypt)

(Aceptado: 19 de diciembre de 1985)

SUMMARY

An investigation was carried out in a trial to estimate activity of thermostable urate oxidase produced by an obligate thermophilic bacterium (*Bacillus stearothermophilus*, S-90 L.N.) isolated from Lake Nasser at Aswan. A new technique uric acid clearing zone (U.C.Z.) has been introduced and found sufficient for the purpose. The U.C.Z. technique was standardized to be useful for determining uricase(s) activities in terms of international units (I.U.). Optimal factors affecting the uricolytic activity in the U.C.Z. assay plates were: incubation temperature, 55 °C; borate buffer (0.05 M), pH 8.8; uric acid, 0.1 %; incubation period, 24; agar-agar, 2%. The standard curves proved useful in estimating all uricolytic activity data which indicates the scientific practical importance of the new U.C.Z. technique.

RESUMEN

Se ha estudiado la actividad de la urato-oxidasa producida por *Bacillus stearothermophilus*, S-90 L.N. aislado del lago Naser, en Asuán, con una nueva técnica que consiste en la medida de zonas de transparencia del ácido úrico. La técnica, que se ha mostrado útil para este propósito, se ha normalizado expresándose los resultados en unidades internacionales. Los parámetros óptimos fueron: temperatura de incubación, 55 °C; tampón de borato, 0,05 M, pH 8,8; ácido úrico, 01 %; período de incubación, 24 h, y agar, 2 %.

INTRODUCTION

Most of assay procedures of urate oxidase (Ec. 1.7.3.3.) are based upon the determination of unexhausted uric acid after allowing uricase oxidase to react with a certain amount of uric acid in the reaction mixture. Among these procedures are: the colorimetric (3-10), the spectrophotometric (5-6), the automated (12), the bromometric (8), the liquid chromatographic (9) and the fluorometric (4) methods.

Since urate oxidase from thermophilic bacteria is lacking, it was planned to investigate their estimation, production and activity.

The work in this paper was directed to establish a new technique «The so called uric acid clearing zone, U.C.Z.» for the estimation of urate oxidase produced by obligate thermophilic bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria used

Nine obligate thermophilic strains previously isolated (2) from Lake Nasser (L. N.) water at Aswan were used.

Microbiological media

a) *Growth medium.* Nutrient agar medium as described in the Manual of Microbiological Methods (7) was used.

b) *Screening medium.* Dox's sugar-free uric acid agar medium was used for the detection of uricolytic activities. It consisted of (% w/v): NaNO_3 , 0.2; K_2HPO_4 , 0.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05; KCl , 0.05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01; agar-agar, 2.0. All were dissolved in tap water, adjusted to a final pH of 7.4 and then autoclaved for 15 min at 1.5 atm. Sterile uric acid powder was prepared according to Bachrach (1) and

mixed with the sterile molten agar medium at a final concentration of 0.2% (w/v) to obtain a uniform uric acid suspension. The medium was then poured aseptically into the sterile petri dishes.

c) *Production medium.* Dox's yeast extract-uric acid liquid medium was used. Its composition is similar to the screening medium but contained yeast extract (0.1%) and uric acid was added (0.1%, w/v) in the form of emulsion.

Preparation of uric acid emulsion

A known weight of uric acid powder was prepared in the form of a paste by the careful addition of glycerol drop by drop with continuous grinding (for 30 min) in a mortar. The paste was then emulsified in a known volume of distilled water by the aid of cell homogenizer. The resulted homogeneous milky emulsion was sterilized and added as required into the production medium.

Preparation of bacterial inoculum

The bacterial growth onto sterile nutrient agar plates previously incubated at 60 °C for 48 h was transferred into a known volume of physiological saline solution (0.85%) to get a heavy suspension. One ml of this suspension (1.0664×10^{12} cells/ml) was used as a stock inoculum. It was stored —when necessary— in the refrigerator.

Determination of the most potent uricolytic bacterial strain

A comparative study for the production of both extracellular and intracellular uricase(s) in relation to different incubation temperatures by the most potent two strains was carried

out. Fifty ml of the production medium were transferred into conical flasks (250 ml capacity), autoclaved at 1.5 atm. for 15 min and inoculated with a standard inoculum of the bacterial suspension. The flasks were then incubated in a shaker at 150 rpm for 72 h at different incubation temperatures. Six conical flasks were used for each incubation temperature. The produced cells were collected by centrifugation, whereas the supernatants were collected in a sterile conical flasks and then allowed to pass through a sterile sintered glass funnel-G₅ to obtain the cell free filtrate containing the extracellular enzyme. The collected cells were washed 3 times with borate buffer (0.05 M) at pH 8.8, dispensed in a porcelian mortar containing coarse-sand (B.D.H.) and a known volume of borate buffer (0.05 M) at pH 8.8 was added. The whole mixture was exposed to a process of freezing and thawing, grinded at room temperature for 1 h, homogenized in an electric homogenizer and centrifuged to obtain the cell free clear supernatant containing the endocellular enzyme.

Determination of uricase activity

The urate oxidase (EC. 1.7.3.3) activity was determined by applying the new U.C.Z. technique. To prepare the digestive mixture of the assay, 0.15 g uric acid (B.D.H.) was grinded in few drops of glycerol for 30 min, the obtained paste was emulsified into 100 ml borate-borax buffer (0.05 M.) adjusted at pH 8.8, agar-agar (2 g) was added, the mixture was boiled in water bath and sterilized at 1.5 atm for 15 min. About 20 ml aliquots of the sterile hot buffered uric acid agar mixture were introduced aseptically into each sterile petri-dish of the same size.

Cups were made in each plate using a sterile cork borer (10 mm diameter). Equal amounts (0.1 ml) of the enzyme solution were put in each cup to be assayed. Plates were transported cautiously to be incubated at the required temperature for the required period. The appearance of distinct clearing zones surrounding the cups indicated the uricolytic activity. Diameters of clear zones were measured and means were calculated.

Factors affecting the precision of the U.C.Z. technique

In all cases, were used plates of the same diameter containing equal amounts of the assay agar (2 %), uric acid (0.15 %), cups of the same number (4) and size (10 mm), equal amounts (0.1 ml) of the enzyme per each cup and incubation temperature (55 °C) for 12 h or 24 h at the end of which, diameters of clearing zones were measured and means were calculated. The investigated factors were: different buffers (at 0.1 M) applied at different pH-values, borate buffer strength (M) at pH 8.8 different incubation temperatures, different uric acid concentrations, different incubation periods and different agar-agar concentrations.

Construction of a standard curve for assaying uricase activity and determination of uricase units

A stock solution of the crude uricase in borate buffer of pH 8.8 (0.05 M) was prepared from the cell free intracellular uricase preparation produced by *Bacillus stearothermophilus*, S-90 L.N. at 55 °C under static conditions. The protein content was determined according to Warburg and Christian (11). Down concentrations (mg protein) of the stock crude enzy-

me were prepared. 0.1 ml of each concentration was transferred into each cup in the assay plates which was then incubated at 55 °C for 12 h and also for 24 h periods at the end of which mean diameters of clearing zones (mm) were calculated and their corresponding enzyme activities in terms of enzyme units (I.U.) expressed as (log values) were then determined. Log values of I. U. were plotted against mean diameter of clearing zones (in mm). *One I. U. (international unit) is defined as the amount of mg protein of uricase enzyme which decompose one M of uric acid in 1 min under the specified conditions of the assay.* For the determination of uricase unit (I.U.), a known amount of uric acid introduced into the assay agar plates were allowed to be digested by a known amount of uricase (mg proteint) under the specified conditions of the U.C.Z. technique.

RESULTS AND DISCUSSION

The nine thermophilic bacterial isolates investigated in the present work exhibited a maximum growth tempe-

perature range of $65 \pm 1 - 79 \pm 1$ °C and a minimum of 50 °C on nutrient agar medium.

Studying the ability of the 9 bacterial strains to produce uricase(s) under both mesal (37 °C) and thermal (55-75 °C) incubation temperatures resulted in the fact that only 5 strains (*Bacillus stearothermophilus* numbers, 89, 90, 93, 96 and 97 are uricolytic and capable of attacking uric acid under thermophilic conditions (i.e. 55 °C or above) but not under mesophilic conditions (i.e. 37 °C). The only two strains which exhibited uricolytic activities at 70 °C were numbers 90 L.N. and 93 L.N. Therefore, an attempt to determine the most potent strain was carried out by allowing both strains to grow in the production medium under shaking condition at different incubation temperature (table 1). In all cases, *B. stearothermophilus*, S-90 L.N. was superior to strain number 93 L.N. In addition, the endocellular uricase proved higher in biosynthesis than the extracellular one under all incubation temperatures (table 1). Consequently, *B*

Table 1. Determination of the most potent uricolytic obligate thermophilic bacterial isolates. Uricase production was performed in relation to different incubation temperatures in Dox'x-yeast extract uric acid liquid (0.2%) medium by the most potent two bacterial strains under shaking conditions for 72 h. Enzyme activity was determined by the U.C.Z. technique at 55 °C for 24 h

| Bacterial strain | Incubation temperature (°C) | | | | | | | | | |
|----------------------------------------|-----------------------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | 37 | | 45 | | 55 | | 65 | | 70 | |
| | Enzyme activity | | Enzyme activity | | Enzyme activity | | Enzyme activity | | Enzyme activity | |
| | Exo-enzyme | Endo-enzyme | Exo-enzyme | Endo-enzyme | Exo-enzyme | Endo-enzyme | Exo-enzyme | Endo-enzyme | Exo-enzyme | Endo-enzyme |
| <i>B. stearothermophilus</i> , 90 L.N | 0.00 | 0.00 | 60.32 | 138.19 | 158.67 | 1072.73 | 38.95 | 107.27 | 30.23 | 64.64 |
| <i>B. stearothermophilus</i> , 93 L.N. | 0.00 | 0.00 | 47.91 | 47.91 | 126.03 | 263.32 | 38.94 | 64.64 | 0.00 | 0.00 |

stearothermophilus, S-90 L.N. was the organism of choice and its endocellular uricase was determined under both mesophilic and thermophilic incubation conditions by U. C. Z. technique. Results in figure 1 indicated

tructed representing mean diameter of clearing zones (mm) obtained from the U.C.Z. plates against uricase activities (in terms of I.U., log values). A linear relationship was obtained covering the concentrarion range of

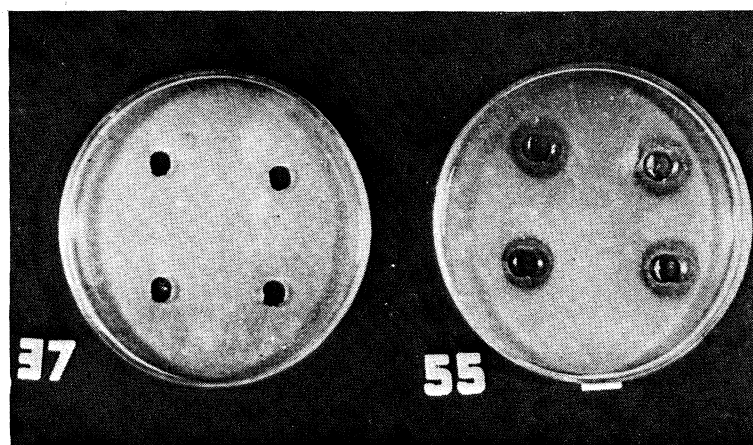


Figure 1. U.C.Z. assay of *B. stearothermophilus*, S-90 L.N. endocellular uricase(s) produced at 37 °C and 55 °C during 72 h incubation

the inability of S-90 L.N. to produce uricase at 37 °C because of its failure to grow at this mesophilic temperature, whereas the same strain succeeded to do so at 55 °C (figure 1) which provides an evidence for the obligate thermophilic nature of the bacterium under investigation.

In this paper, the U.C.Z. technique was fully standardized to be useful for determining uricase activities in terms of I. U. Different factors affecting the activities of uricase in the U.C.Z. assay plates were studied. The optima were: borate buffer at pH 8.8 and 0.05 M. incubation temperature setted at 55 °C, uric acid concentration in the assay plates of 0.1 %, incubation period of 42 h and agar-agar of 2 %.

Making use of these optimal conditions, standard curves were cons-

48.03-2401.54 I.U. corresponding to mean diameter of clearing zones of 10-19.1 mm after 12 h (figure 2) and 11-28 mm after 24 h (figure 3) respectively. The constructed standard curves (figures 2-3) proved very useful in determining all uricolytic activity da-

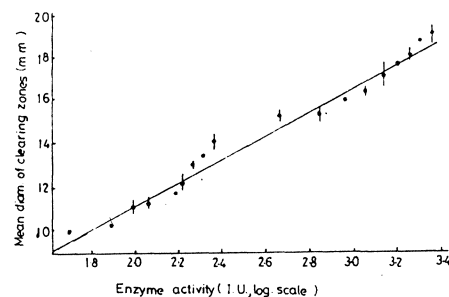


Figure 2. Showing a standard curve of uricase after 12 h incubation at 55 °C in the U.C.Z. assay plates

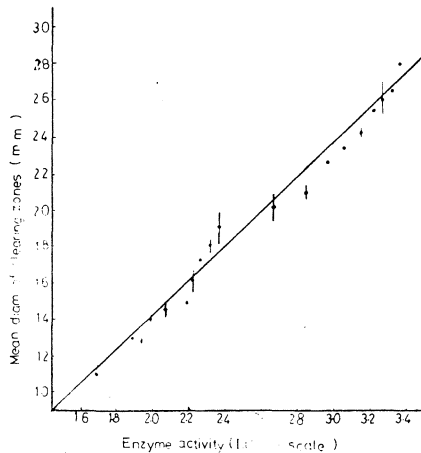


Figure 3. Showing a standard curve of uricase after 24 h incubation at 55 °C in the U.C.Z. assay plates

ta (in terms of I. U.) as recorded in the present work.

In conclusion, the new U.C.Z. technique contributed to a great extent in expressing all uricolytic activity data in terms of I. U. Therefore, this technique might be considered of both scientific and practical significance especially in the field of microbial uricase(s) in general and those of thermophilic nature in particular.

REFERENCES

- BACHRACH, U. 1957. The aerobic breakdown of uric acid by certain *Pseudomonas*. J. Gen. Microbiol. 17, 1-II.
- ELWAN, S. H.; EL-HOSEINY, M. M.; HAROUN, B. M., and MEKI, M. A. 1982. Studies on the bacterial flora of Nasser's Lake. d- The distribution of some strains of *Bacillus stearothermophilus* in lake water. Egypt Microbiol. 22, 83.
- HENRY, R.J.; SOBEL, C.; and KIM, J. 1957. Determination of uric acid by reaction with alkaline phosphatungstate. Amer J. Clin. Pathol., 28, 152.
- HIDEAKI, N.; ZAITSU, Z.; HAMADA, C., and OHKURA, Y. 1979. Ultramicroenzymatic method for fluorometric determination of uric acid in serum. Chem. Pharm. Bull., 27, 2245-48.
- ITAYA, K.; YAMAMOTO, T., and FUKUMOTO, J. 1967. Studies on yeast uricase. Part I. Purification and some enzymatic properties of yeast uricase. Agr. Biol. Chem., 31, 1256-64.
- MAHLER, J. L., 1970. A new bacterial uricase for uric acid determination. Anal. Biochem, 38, 65-84.
- Manual of Microbiological Methods 1957. Prepared by the Society of American Bacteriologists. McGraw-Hill Co., New York.
- RABER, H., and DIEHLACHER, M. 1970. Indirect bromometric determination of uric acid xanthine mixtures. Anal. Chim. Acta, 49, 198-200.
- SLAUNWHITE, W. D.; LAWRENCE, A. P.; DAVID, C.W., and PETER, T. K. 1975. Colorimetric, enzymic and liquid-chromatographic methods for serum uric acid compared. Clin. Chem., 21, 1427-29.
- THAPAR, V. K.; BRIJ, P., and RATTAN, S. 1973. Colorimetric method for assaying uricase activity in plant material. Indian J. Agr. Sci., 43, 536-38.
- WARBURG, O., and CRISTIAN, W. 1942. Cited from BONGAERTS et al. 1978. Biochem. Biophys. Acta., 527, 348-58.
- WELLS, M. G. 1970. Evaluation of an automated method for the estimation of uric acid concentration in blood and urine. J. Med. Lab. Technol., 27, 485-91.

THERMOSTABLE URATE OXIDASE FROM OBLIGATE
THERMOPHILIC BACTERIA. II. THE CONSTITUTIVE
PRODUCTION OF URATE OXIDASE BY
BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS

M. S. AMMAR, S. H. ELWAN and M. A. MEKI
Botany Department, Faculty of Science, Al-Azhar University, Cairo (Egipt)

(Aceptado: 19 de diciembre de 1985)

SUMMARY

A thermostable uricase was produced constitutively by the obligate thermophile *Bacillus stearothermophilus*, S-90 L.N. Optimal factors controlling the enzyme production under static conditions were: uric acid concentrations, 0.1 % (w/v); Mn^{++} , Co^{++} , Zn^{++} and Ca^{++} increased the production to 1.82, 1.74, 1.51 and 1.35 folds if supplied at 1, 1, 5 and 1 $\mu g/ml$ respectively; Mg^{++} exerted no effect at 10 $\mu g/ml$ concentration, whereas Cu^{++} and Fe^{++} exerted inhibition at all concentrations used (i.e. 1-50 $\mu g/ml$); glucose (1 %, w/v), peptone (0.2 %, w/v) were the best C and N sources; L-methionine, the best amino acid; incubation period, 72 h at 55 °C. Under these conditions, uricase yield reached 1072.73 I.U. Data indicated that α -amylase biosynthesis has a nullifying effect against uricase production at 55 °C and therefore, it was concluded that there was a relation between uricase biosynthesis and α -amylase suppression by the same investigated strain.

RESUMEN

El *Bacillus stearothermophilus* S-90 L.N., termófilo obligado, produce una uricasa constitutiva termoestable. Los factores para su óptima producción en condiciones estáticas son: concentración de ácido úrico, 0,1 % (p/v); los cationes Mn^{++} , Co^{++} , Zn^{++} y Ca^{++} incrementaron la producción en 1,82, 1,74, 1,51 y 1,35 veces cuando se añadieron 1 $\mu g/ml$, 1 $\mu g/ml$, 5 $\mu g/ml$ y 1 $\mu g/ml$, respectivamente; Mg^{++} no tuvo efecto a una concentración de 10 $\mu g/ml$, mientras que Cu^{++} y Fe^{++} inhibieron a todas las concentraciones usadas (1-50 $\mu g/ml$). La glucosa (1 % p/v) y la peptona (0,2 % p/v) fueron las mejores fuentes de C y N; la L-metionina, el mejor aminoácido; el período

de incubación, 72 h a 55 °C. Bajo estas condiciones, el rendimiento alcanzaba 1.072,73 UI. La biosíntesis de la α -amilasa presentaba un efecto anulador de la producción de uricasa a 55 °C, indicando una relación entre la síntesis de la uricasa y la supresión de la α -amilasa en la estirpe estudiada.

INTRODUCTION

Apart from scientific interest, microbial urate oxidase have been recently applied in the treatment of children from hyperuricemia (8) and patients with primary gout (6-7) and an increasing attention has been directed toward using intracellular uricase enzyme for industrial, analytical and medical purposes. Many investigators stated that uricase enzyme may be applicable to the analysis of serum or urinary uric acid, others believed that the purified enzyme would have practical importance in chemotherapy.

The standardization of the introduced U. C. Z. technique (1) facilitated the study performed purposely for controlling the factors and/or conditions affecting the production of a high yield of the endocellular thermostable uricase by the obligate thermophilic bacterium, *Bacillus stearothermophilus*, S-90 L. N. which is the main purpose of the present paper.

MATERIAL AND METHODS

Bacterium used

Bacillus stearothermophilus, S-90 L. N., the most potent uricolytic obligate thermophile previously studied by Ammar *et al.* (1) was used.

Microbiological methods

All microbiological methods —unless

otherwise stated— were performed according to Ammar *et al.* (1).

Uricase determination

The urate oxidase (E.C. 1.7.3.3) activity was determined according to the U.C.Z. technique at 55 °C for 24 h previously described by Ammar *et al.* (1).

Factors affecting the production of the endocellular uricase by Bacillus stearothermophilus S-90 L.N. under static conditions

The following factors were investigated for their effect on uricase production: different uric acid concentrations, certain heavy metallic ions at different concentrations, different carbon sources supplied at equimolecular weights of the C-skeleton located in 20 g sucrose, different nitrogen sources supplied at an equivalent amount of the nitrogen content of 2.0 g NaNO₃, different amino acids supplied at a N₂ level equivalent to that located in 2.0 g of Na NO₃, different glucose concentrations and different incubation periods respectively.

In all cases, 50 ml aliquots of the production medium were dispensed in flasks of 250 ml. Six flasks were prepared for each treatment. Autoclaving was carried out at 1.5 atm. for 15 min. Each flask was inoculated with 1 ml of a standard bacterial suspension (1.0664×10^{12} cells/ml). Incubation at 55 °C was carried out —unless otherwise stated— for 72. Ex-

traction of the endocellular enzyme and assaying for its activity using the U.C.Z. assay plates (1) was carried out at 55 °C for 24 h.

RESULTS AND DISCUSSION

Since substrates other than uric acid were of relatively similar (and probably higher) inductive effect on uricase formation by *Bacillus stearothermophilus*, S-90 L.N., purified uric acid was introduced into the production medium at various concentrations (table 1) in an attempt to determine the threshold concentration of uric acid. The best concentration required for a maximum introduction of endocellular uricase was 100 mg uric acid/100 ml (i.e. 0.1 %, w/v) at the end of 72 h incubation at 55 °C (table 1). However, concentrations higher than 0.3 % exerted complete inhibition against uricase production. Similarly, 0.1 % uric acid was recorded (9, 17, 21) for a maximum uricase production by *Candida tropicalis*, *Streptomyces* sp. and *Streptomyces albogriseolus*, whereas 0.03 % (15) was recorded for *C. utilis*, 0.06 % (22) for yeast cells; 0.08 % (16) for Hyphomycetes, 0.2 % (4)

for *Pseudomonas* sp., 0.5 % (13, 18) for *Nocardia* sp. and *Micrococcus luteus* and 1 % (3) for *B. fastidiosus* respectively.

The effect of 7 different metallic ions applied at different concentrations ($\mu\text{g/ml}$) on the endocellular uricase production are shown in table 2. Mn^{++} exerted an obvious stimulating effect at all concentrations used with a maximum increase of 1.82 folds at 1 $\mu\text{g/ml}$ concentration. This was followed by Co^{++} (at 1 $\mu\text{g/ml}$) causing an increase of 1.74 —folds, followed by Zn^{++} (5 $\mu\text{g/ml}$) with an increase of 1.51— folds and Ca^{++} (1 $\mu\text{g/ml}$) with 1.35-folds respectively. However, both Cu^{++} and Fe^{++} exhibited clear inhibitory effects at all concentrations used (table 2). In comparison with other findings, K^+ and Mg^{++} induced uricase formation by *Streptomyces* sp. (20), Mg^{++} induced uricase of *Candida tropicalis* (15) and Fe^{++} stimulated the formation of *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* uricase (14) respectively. On the other hand, Anon (2) stated that the uricase of *Micrococcus luteus* was inhibited by Co^{++} , Mn^{++} and NO_3^- but stimulated by Mg^{++} . However Bongaerts *et al.* (5) reported

Table 1. Effect of different uric acid concentrations on the endocellular uricase production by *B. stearothermophilus*, S-90 L.N. Incubation was carried out at 55 °C for three consecutive incubation periods namely: 24, 48 and 72 h respectively

| Uric acid concentrations mg/100 ml | Enzyme yield (I. U.) at the end of an incubation production period of: | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------|--------|
| | 24 h | 48 h | 72h |
| 25 | 72.52 | 158.67 | 166.15 |
| 50 | 204.4 | 263.32 | 295.45 |
| 100 | 158.67 | 339.23 | 339.23 |
| 150 | 44.72 | 44.72 | 50.18 |
| 200 | 138.19 | 178.03 | 178.03 |
| 300 | 0.00 | 30.23 | 50.18 |
| 400 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

Table 2. Effect of different ions at different concentrations ($\mu\text{g/ml}$) on the production of the endocellular uricase by *B. stearothermophilus*, S-90 L.N. Incubation was carried out at 55°C for 72 h

| Ions concentrat. $\mu\text{g/ml}$ | Enzyme yield (I.U.) in the presence of different concentrations of: | | | | | | |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Mn ⁺⁺ | Co ⁺⁺ | Zn ⁺⁺ | Ca ⁺⁺ | Mg ⁺⁺ | Cu ⁺⁺ | Fe ⁺⁺ |
| None | 195.20 | 195.20 | 195.20 | 195.20 | 195.20 | 195.20 | 195.20 |
| 1 | 355.21 | 339.23 | 141.41 | 263.32 | 126.04 | 155.06 | 95.61 |
| 5 | 309.38 | 158.67 | 295.45 | 158.67 | 127.49 | 144.71 | 107.27 |
| 10 | 229.34 | 158.67 | 131.97 | 151.53 | 195.20 | 83.27 | 107.27 |
| 50 | 229.34 | 155.06 | 52.54 | 138.19 | 128.97 | 107.27 | 83.27 |

that the uricase enzyme was partially inhibited in the presence of various cations and the inhibiting effect decreased in the order of Zn⁺⁺, Ni⁺⁺, Co⁺⁺, Cu⁺⁺, Cd⁺⁺, Cd⁺⁺, Cr⁺⁺, Mn⁺⁺, Pb⁺⁺ and Fe⁺⁺ respectively. No inhibition was exerted by Hg⁺⁺, Fe⁺⁺, Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ at the 10^{-3} M level. Comparison of the present results with those of other workers is largely improper. This is because the present uricase is unique in being obtained from an obligate thermophile and present results should be taken as contribution to knowledge because of their non-classic origin.

Since higher concentrations of uric acid (>0.3%) exerted clear inhibitory effects against uricase production by *Bacillus stearothermophilus*, S-90 L.N. (table 1). Other C sources were introduced in place of uric acid into the production medium (devoid of uric acid or any other C source, table 3). Amazingly, in the complete absence of uric acid, glucose induced the constitutive biosynthesis of uricase more than uric acid 16.3-folds, followed by mannose, sucrose, lactose, maltose, glycerol, xylose, fructose and galactose which caused 9.77, 7.6, 5.9, 4.6, 2.8, 2.13, 1.6 and 1.0 increasing folds of the control respectively.

Interestingly, the only C source which failed to induce the biosynthesis of uricase is starch (table 3) although the same strain is amylolytic (1). Somehow, α -amylase (induced by starch) could be correlated with uricase inhibition, this needs further work to elucidate the correlation.

Although peptone was found to be the best nitrogen source for uricase production (table 3), yet, in recent years, it has been replaced in culture media well defined for physiological studies by materials of known composition.

The fact that methionine was the best amino acid used as the sole nitrogen source for uricase production (table 3), is in accordance with that reported by Zaki (23) that the sulphur amino acids (e.g. cystine and methionine) were detected at the high growth temperature (i.e. at 50°C) of *Aspergillus fumigatus*, S-31. This also was similar to that recorded by Fries (10) who found that a strain of *Coprinus fimetarius* having a temperature optima for growth between 35°C and 44°C if supplemented with methionine or to a lesser extent with homocysteine.

Glucose was used as the best car-

Table 3. Effect of different sources of carbon, nitrogen and amino acids on the endocellular uricase production by *B. stearothermophilus*, S-90 L.N.

| Carbon source | Uricase yield I.U. | Nitrogen source | Uricase yield I.U. | Amino acids | Uricase yield I.U. |
|---------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Control | 30.23 | None | 0.00 | Peptone (control) | 631.67 |
| Glycerol | 83.27 | Sodium nitrate | 229.34 | L-glutamic acid | 30.23 |
| Glucose | 490.33 | Potassium nitrate | 380.62 | L-aspartic acid | 30.23 |
| Sucrose | 229.34 | Peptone | 631.67 | L-glycine | 50.18 |
| Maltose | 138.19 | Protease-peptone | 295.45 | L-serine | 295.45 |
| Xylose | 64.64 | L-asparagine | 380.62 | L-eyistine | 64.64 |
| Galactose | 30.23 | Ammonium sulphate | 44.72 | L-asparagine | 178.03 |
| Lactose | 178.03 | Ammonium chloride | 64.64 | L-methionie | 813.75 |
| Fructose | 50.18 | Casein | 107.27 | DL-valine | 83.27 |
| Mannose | 295.45 | Yeast extract | 380.62 | L-arginine | 295.45 |
| Starch | 0.00 | | | L-trptophane | 107.27 |
| | | | | L-alanine | 138.19 |
| | | | | L-leucine | 229.34 |
| | | | | D-phenyalanine | 83.27 |

bon source for uricase production (table 4) at the level of 1 % (w/v). This has a special economical value, since other workers (9, 15, 20-22) recorded 3 % glucose for the inductive production of uricase (s) by *Candida utilis*, *Alcaligenes faecalis* and different *Streptomyces* spp. Further, Fukumoto *et al.* (11) recorded 5 % glucose for maximum production of yeast uricase.

In a comparative study concerning

the effect of different incubation periods on uricase production (at 55 °C) by S-90 L.N., data recorded (in table 4) indicated that after 72 h incubation period, the highest uricase yield (1072.73 I.U.) was recorded. Similarly, Kano (12) recorded 3 d for maximum production of *Candida albicans* uricase. However, data in the literature gave no fixed optimum time for the production of uricase (s) by all microorganisms.

Table 4. Effect of various glucose concentrations and different incubation periods on the intracellular uricase production by *B. stearothermophilus*, S-90 L.N.

| Glucose concentrat. % w/v | Uricase yield I.U. | Incubation period h | Uricase yield I.U. |
|---------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| 0.1 | 64.64 | 12 | 0.00 |
| 0.5 | 178.03 | 24 | 123.17 |
| 1.0 | 956.07 | 48 | 295.45 |
| 2.0 | 380.62 | 72 | 1072.73 |
| 4.0 | 0.00 | 96 | 229.34 |
| 6.0 | 0.00 | 120 | 38.95 |

REFERENCES

1. AMMAR, M. S.; ELWAN, S. H., and MEKI, M. A. 1986 a. Thermostable urate oxidase from obligate thermophilic bacteria. I. Estimation using the uric acid clearing zone (U.C.Z.) new technique. *Microbiol. Españ.*, 39, 1-6.
2. ANON, 1977. Production of uricase from *Micrococcus luteus*. (Egl). *Res. Discl.* 155, 15-17 (Eng.). *Chem. Abst.* 86: (19) No. 137923 (1977).

3. AUNSTRUP, K., and MAHLER, J. L. 1970. Processes for the manufacture of uricase. Ger. Offen. I, 941, 768 (cl. c. 12 d), 26 Feb. 1970 Brit. Appl. 19 Aug. 1968, 14. pp.
4. BACHRACH, I. U. 1957. The aerobic breakdown of uric acid by certain *Pseudomonas*. J. Gen. Microbiol., 17, 1-11.
5. BONGAERTS, G. P. A.; UIZETTER, J.; BROUNS, R., and VOGELS, G. D. 1978. Uricase of *Bacillus fastidiosus*. Properties and regulation of synthesis. Biochim. Biophys. Acta., 527, 348-58.
6. BRILL, W. J.; WOLIN, E. A., and WOLFE, R. S. 1964. Anaerobic formate oxidation, a ferredoxin dependent reaction. Science, 144, 297-98.
7. BROGARD, J. M.; COUMAROS, D.; FRANKHAUSER, J.; STAHL, A., and STAHL, J. 1972. Enzymatic uricolysis: a study of the effect of a fungal urate oxidase. Rev. Eur. Etud. Clin. Biol., 17, 890-95.
8. DUMAS, R.; CASTEL, J., and JEAN, R. 1964. Urate-oxidase en pediatrie. Pathol. Biol., 21, 425-29.
9. EL-SHAHED, A. S. 1982. Studies on certain uricolytic microorganisms. Ph. D. Thesis, Botany Dept., Fac. of Sci., Al-Azhar Univ., Cairo, Egypt.
10. FRIES, L. 1953. Factors promoting growth of *Coprinus fimetarius* (L.) under high temperature conditions. Physiol. Plant., 6, 551-62.
11. FUKUMOTO, J.; WATANABE, Y., and MYOMI, Y. 1967. Studies on uricase. I. Induced production of uricase by *Streptomyces* sp. Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 41, 540-45.
12. KANO, K. 1965. Uricase onopharmaceutical col. Ltd. Japan. 5192 (67) (Cl. 36. Bo), March 2, Appl. July 28, 1965, 52 pp.
13. KATAI, M.; MIYAZAKI, K., and HATTO, F. 1974. Uricase production by *Nocardia*. Japan Katai, 75, 117-988.
14. KIDA, J., and KUNIHISA, M. 1966. Studies on bacterial uricase. Isolation of uricase producing bacteria and some culture condition for the production. J. Ferment. Technol., 44, 789-96.
15. KIMIKAZU, I.; TAKCHIKA, Y., and JUKHIRO, F. 1967. Studies on yeast uricase. Part I. Purification and some enzymatic properties of yeast uricase. Agr. Biol. Chem., 31, 1256-64.
16. KON, Y.; DOBASHI, Y., and KATSURA, H. 1976. The characteristics of uricase production by a hyphomycetes isolated from the excrements of *Cettia diphonecontans*. IV. Effect of amino acids as nutritional substances. Yakugaku Zasshi, 96, 742-49.
17. KURODO, A., and YASUDA, N. 1966. Uricase purification by ion exchange (Kinki Yak Urato Manufg. Co. Ltd.). Japan 6908 065 (135 C 01) 15 Apr. 1969. Appl. 29 Apr. 1966, 3 pp.
18. SNOKE, R. E.; RISLEY, H. A., and GOODHUE, C. T. 1976. Production of uricase from *Micrococcus luteus* (Eastman Kodak Co.) U.S. 4, 062, 371 (Cl. 195-62, C 12 D 13/10), 13 Dec. 1977 Appl. 707, 459, 21 Jul., 1976, 6 pp.
19. TANAKA, A.; YAMAMURA, M.; KAWAMOTO, and FUKUIE, S. 1977. Production of uricase by *Candida tropicalis* using n-alkane as substrate. Appl. Environ. Microbiol., 34, 342-46.
20. WATANABE, Y., and FUKUMOTO, J. 1970. Studies on the formation of uricase by *Streptomyces*. Part II. The induced formation of uricase by the resting cells. Agr. Biol. Chem., 34, 1625-32.
21. YOSHIMURA, Y.; KOYOKAWA, K., and SUNAHARA, N. 1970. Yeast uricase extraction. (Dinisspon pharmaceutical Co. Ltd.) Japan. Kakai 72, 29, 575 (Cl. 36 (2) Co.) 06 Nov. 1972, Appl. 7120, 155, 03 Apr. 1970, 5 pp.
22. YOSHIMURA, Y.; YOKOKAWA, T., and SUNAHARA, N. 1973. Microbial production of uricases. Jpn. patent 73. 18, 473. Abstract No. 90519 Chem. Absts. 79 (15), 303.
23. ZAKI, M. E. 1982. Physiological studies on thermophilic fungi. Ph. D. Thesis., Bot. Dept., Fac. of Sci., Al-Azhar Univ., Cairo, Egypt.

THERMOSTABLE URATE OXIDASE FROM OBLIGATE THERMOPHILIC BACTERIA. III. URATE OXIDASE PRODUCTION BY *BACILLUS STEARTHERMOPHILUS*, S-90 L.N. IN RELATION TO VITAMINS, BUFFERS, TEMPERATURE AND AGITATION SPEED

M. S. AMMAR, S. H. ELWAN and M. A. MEKI

Botany Department, Faculty of Science, Al-Azhar University, Cairo (Egypt)

(Aceptado: 19 de diciembre de 1985)

SUMMARY

The regulatory roles of certain factors on the production of a thermostable uricase from an obligate thermophilic bacterium (*Bacillus stearothermophilus*, S-90 L.N.) were as follows: Vitamins separately supplied failed to promote uricase production with the exception of thiamine at 10 ppm, optimal inoculum size was 2 ml of 1.0664×10^{12} cell/ml per 50 ml production medium, optimum inoculum age was 48 h, yeast extract exerted an obvious stimulatory effect at the level of 0.1 % (w/v), tris HCl buffer (out of 7 buffers used) was the most effective one at pH 8.0 and 0.1 M., incubation temperature was 55 °C, urate oxidase biosynthesis parallel growth (fresh and dry weights) a maximum yield (I.U.) after 72 h under static conditions. Agitation conditions (160 rpm) played an important role in increasing the yield (16.2-folds) within a relatively short period (27 h) if compared to the longer (72 h) incubation period (2.04 folds) under the same conditions. Therefore, it was suggested to establish thermophilic production processes —for the present thermostable uricase— under large scale fermentation.

RESUMEN

Los efectos reguladores de ciertos factores sobre la producción de una uricasa termoestable del *Bacillus stearothermophilus* S-90 L.M., termófilo obligado, eran los siguientes: las vitaminas disminuían la producción de uricasa con la excepción de la tiamina, a 10 ppm; el tamaño óptimo del inóculo era de 2 ml ($1,0664 \times 10^{12}$ células/ml) por 50 ml de medio; la edad óptima del inóculo, 48 h; el extracto de levadura ejercía un efecto estimulador claro a una concentración de 0,1 % (p/v); de los siete tampones utilizados, el tris-

HCl se mostraba el más efectivo a pH 8,0 y a 0,1 M de concentración; la temperatura de incubación, 55 °C; la biosíntesis de la uratoxidasa mostraba un desarrollo paralelo al crecimiento (pesos fresco y seco) con un máximo rendimiento después de 72 h, en condiciones estáticas. Las condiciones de agitación (160 rpm) tenían importancia en el aumento del rendimiento (16,2 veces) dentro de un período relativamente corto (27 h) si se comparaba con el mayor (72 h) período de incubación (2,04 veces) en las mismas condiciones. Consecuentemente, se sugiere el establecimiento de procesos de producción termófilos para la obtención de esta uricasa termoes- table en fermentaciones a gran escala.

INTRODUCTION

Although reports in the literature regarding the production of microbial uricase (s) included almost groups of the microbial world e.g. *Candida utilis* (19), *Aspergillus flavus* (11, 21), *Bacillus fastidiosus* (6), *Streptomyces cyanogenus* (23) and very recently *S. albobruseolus* (12) yet, no endeavour-whatsoever-has been given to thermophilic uricase (s) in general and those of obligate thermophilic bacteria in particular. Therefore, it is hoped that the work in this paper will provide some lacking information in this area. This is obviously shown by finding out a new source of thermostable uricase—for the first time—from *B. stearothermophilus*, S-90 L.N., an obligate thermophilic bacterium previously isolated from High Dam Lake water. This paper has also revealed certain fundamentals previously lacking regarding both the relatively high yield of thermophilic uricase (s) and their possible production under large scale thermophilic fermentation conditions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterium used

Bacillus stearothermophilus, S-90 L.N. previously investigated (3-4) for its uricolytic activity was used.

Procedures used

All microbiological procedures—unless otherwise stated—as well as urate oxidase (E.C. 1.7.3.3.) determination were performed according to Ammar *et al.* (3-4).

Production medium used

The production medium (3) previously optimized for the production of the highest yield of thermostable endocellular uricase (4) was used as the basic medium in this investigation. Different modifications were made in relation to uricase yield.

Vitamins

Different concentrations of the water soluble vitamins were singly supplied to the medium devoid of yeast extract or any other vitamin source.

The media were inoculated equally with a standard inoculum (1 ml/50 ml) and then incubated at 55 °C for 72 h at the end of which, extraction of the endocellular uricase was made and enzyme yield (I.U.) was determined.

Inoculum (size and age)

Different inocula sizes (ml) were introduced into the production medium in a way to keep the final volume of the production medium cons-

tant (i.e. 50 ml). The best inoculum age (h) was also determined.

Buffers

Different buffers at their pH ranges were used e.g. citrate buffer (5.8-6.2), citrate-phosphate (5.8-7.2), phosphate (5.8-8.0), veronal (6.8-8.2), the organic buffer HEPES (N-2 Hydroxy ethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid) at the pH range of (6.8-8.2) at different strengths namely 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 M. respectively, tris-HCl buffer (hydroxymethyl amino ethane-HCl) buffer (7.2-9.0) and borate buffer (7.6-9.2) respectively. All the constituents of the production medium were dissolved in the buffer solutions (0.1 M). Six flasks (250 ml capacity) each receiving 48 ml of the buffered medium at the desired pH were used, autoclaved at 1 atm for 25 min, inoculated with 2 ml bacterial suspension and then incubated at 55 °C for 72 h. In a further experiment, the effect of strength (M) of tris-HCl buffer (the best buffer) on uricase production was carried out. The constituents of the production medium were dissolved in tris-HCl buffer (pH 8.0) at different molar concentrations.

Yeast extract

Yeast extract (Oxoid) was supplied into the production medium at different concentrations (w/v, %).

Thermal incubation temperature

The influence of growth temperature on uricase production was carried out at relatively wide range of incubation temperatures e.g. 37-80 °C.

Cell production

The relation between the growth of *Bacillus stearothermophilus*, S-90 L.N.

(in terms of both cell fresh and dry weights) and uricase yield at the end of different incubation periods was carried out.

Agitation speed

Different incubation speeds (rpm) were used to determine their effect on uricase production.

RESULTS AND DISCUSSION

Although many individual vitamins were required for the growth and subsequently enzyme (s) production by most thermophiles (7-10), yet, supplying vitamins individually at different concentrations failed to increase uricase productivity (*table 1*). In contrast, they exhibited, a relatively and occasionally a complete inhibition except thiamine at the concentration of 10 ppm with resulted in a stimulatory effect regarding the uricase production. This was in agreement with the observation of Kida (18) who found that the addition of vitamins to the medium of *Brevibacterium vitarumen* containing adenine recovered growth retardation, but the effect of these vitamins on the recovery of uricase production was little.

The best inoculum size was found to be 2 ml of bacterial suspension (i.e. $\times 10664 \times 10^{12}$ cells/ml) 50 ml production medium (*table 2*). However, the optimum inoculum age was reached after 48 h (*table 2*).

The optimum pH for uricase production varied greatly with the difference of the kind of buffer used e.g. pH 8.0 was recorded for tris-HCl and borate buffers and pH 7.2 for citrate-phosphate, phosphate and veronal buffers respectively (*table 3*). This behaviour, however, is in correspondence with the general behaviour of

Table 1. Effect of supplying certain vitamins at different concentrations (ppm) to the production medium devoid of yeast extract on the production of endocellular uricase by *B. stearothersophilus*, S-90 L.N. Incubation was carried out at 55 °C for 72 h. Enzyme activity was determined by the U.C.Z. technique at 55 °C after 24 h

| Vitamin concentration ppm | Uricase yield (I. U.) due to the incorporation of: | | | | | |
|---------------------------|----------------------------------------------------|----------|------------------|---------|------------|-----------|
| | Nicotinic acid | Thiamine | Pantothenic acid | Biotin | Riboflavin | Vitamin C |
| 0.00 | 1072.73 | 1072.73 | 1072.73 | 1072.73 | 1072.73 | 1072.73 |
| 10 | 631.67 | 1381.93 | 490.33 | 631.67 | 490.33 | 490.33 |
| 50 | 107.27 | 229.34 | 107.27 | 631.67 | 380.62 | 380.62 |
| 100 | 107.27 | 0.00 | 107.27 | 380.62 | 0.00 | 302.34 |
| 200 | 89.23 | 0.00 | 64.64 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

Table 2. Effect of different inocula (sizes and ages) on the endocellular uricase production by *B. stearothersophilus*, S-90 L.N.

| Inoculum size ml (*) | Uricase yield I.U. | Inoculum age h | Uricase yield I.U. |
|----------------------|--------------------|----------------|--------------------|
| 1.0 | 1072.73 | 12 | 427.06 |
| 2.0 | 1447.07 | 24 | 562.97 |
| 3.0 | 1024.45 | 36 | 759.43 |
| 4.0 | 913.04 | 48 | 1907.61 |
| 5.0 | 832.70 | 72 | 1907.61 |

(*) Each ml contained 1.0664×10^{12} cells.

most enzyme biosynthesis and/or production (5).

The fact that tris-HCl buffer was found to be more effective at 0.1 M for the production of the present thermophilic uricase when the pH was 8.0 indicates that the slightly alkaline pH is the most favourable one for the enzyme biosynthesis. This was in contrast to that previously reported (12) that *Streptomyces albogriseolus* uricase prefers the neutral pH of phosphate buffer i.e. pH 7.0. However, that phosphate buffer resulted in no good production similar to that of tris-HCl under the same incubation conditions is in full accordance with that reported by Aharonowitz and Demain (1) who stated that the inorganic phosphate has a drastic effect on the biosynthesis of enzymes and other metabolites.

nic phosphate has a drastic effect on the biosynthesis of enzymes and other metabolites.

The introduction of yeast extract at the level of 0.1 % (w/v) was essential for both growth and uricase production (table 4). This is in accordance with the claim that yeast extract was found to promote the growth of many microorganisms especially at higher and elevated temperatures (8-9, 17, 25). For more evidence, El-Shahed (12) reported that yeast extract has no effect at all regarding the production of the mesophilic uricase of *Streptomyces albogriseolus* under mesophilic incubation conditions i.e. 30 °C.

That the optimal incubation temperature suitable for the highest production of the present uricase is 55 °C (table 4) is in complete accordance with the general behaviour of typical thermophiles, since 55 °C is considered to be an optimal one for the growth of many thermophiles (2, 13-16, 20, 22, 24, 27).

Determination of the growth curve of the producing bacterium in relation to uricase productivity at 55 °C resulted in a continuous increase of the enzyme corresponding to the increase of culture age till it reached up to 72 h (table 4) where the maximum

Table 3. Effect of different buffers at different pH ranges on the endocellular uricase production by *B. stearothermophilus*, S-90 L.N.

| pH | Citrate | Citrate phosphate | Phosphate | Veronal | HEPES pH 6.8-8.7 0.05-0.4 M | Tris-HCl | Borate |
|-----|---------|-------------------|-----------|---------|-----------------------------------|----------|--------|
| 5.0 | 0.00 | | | | | | |
| 5.2 | 0.00 | | | | | | |
| 5.4 | 0.00 | | | | | | |
| 5.6 | 0.00 | | | | | | |
| 5.8 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | | | |
| 6.0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | | | |
| 6.2 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | | | |
| 6.4 | | 0.00 | 0.00 | | | | |
| 6.6 | | 57.61 | 0.00 | | | | |
| 6.8 | | 113.30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | |
| 7.0 | | 214.04 | 87.23 | 70.87 | 0.00 | | |
| 7.2 | | 269.45 | 269.45 | 173.98 | 0.00 | 138.19 | |
| 7.4 | | | 214.04 | 00.00 | 0.00 | | |
| 7.6 | | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 214.04 | 138.19 |
| 7.8 | | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | |
| 8.0 | | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1997.50 | 525.4 |
| 8.2 | | | | 0.00 | 0.00 | | |
| 8.4 | | | | 0.00 | | 427.06 | 112.33 |
| 8.6 | | | | 0.00 | | | |
| 8.8 | | | | 0.00 | | 0.00 | 0.00 |
| 9.0 | | | | 0.00 | | 0.00 | |
| 9.2 | | | | 0.00 | | 0.00 | 0.00 |

Table 4. Effect of different yeast-extract concentrations, incubation temperatures and bacterial growth in relation to yield on the endocellular uricase production by *B. stearothermophilus*, S-90 L.N.

| Yeast-extract concentration %, w/v | Uricase yield I.U. | Incubation temperature °C | Uricase yield I.U. | Bacterial growth in relation to yield | | | |
|------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|---------|
| | | | | Incubation period h | Uricase yield I.V. | Wt. of bacterial growth mg/100 ml broth | |
| | | | | | | Fresh wt. | Dry wt. |
| 0.00 | 173.98 | 37 | 0.00 | 12 | 0.00 | 284.0 | 0.344 |
| 0.05 | 661.44 | 45 | 269.45 | 24 | 339.23 | 700.0 | 3.44 |
| 0.1 | 1997.51 | 55 | 1997.51 | 48 | 525.4 | 833.0 | 5.67 |
| 0.15 | 1289.70 | 60 | 214.04 | 72 | 1997.51 | 807.0 | 5.48 |
| 0.2 | 1289.70 | 65 | 89.23 | 96 | 1289.7 | 800.0 | 5.00 |
| 0.3 | 1024.45 | 70 | 57.61 | 120 | 214.04 | 800.0 | 5.00 |
| 0.4 | 525.40 | 75 | 0.00 | | | | |
| 0.5 | 525.40 | 80 | 0.00 | | | | |
| 1.0 | 525.40 | | | | | | |

weights of bacterial growth (fresh and dry wt.) were reached. Beyond 72 h, no appreciable increase in enzyme activity was observed. The importance of this lies in the fact that the pro-

duced uricase enzyme is typical thermostable enzyme since it resisted the incubation at 55 °C for more than 72 h with no appreciable loss in its activity although it was in the soluble

state. This behaviour, however, would be of special economical value especially if the enzyme exhibited its thermostability while in the crude form. Stress was made on determining optimal factors of uricase (s) in a crude form. Work on crude enzymes might have practical importance due to economic consideration if it showed significant productivity and activity. However, purification of uricase (s) of obligate thermophiles will be the future target.

The fact that an optimum incubation period for the highest uricase production under static conditions was found to be 72 h at 55 °C corresponding to only 27 h under shaking conditions at 160 rpm (table 5) is of great value from the industrial point of view; since it could be available to obtain high yield (an increase of 16.2 folds) of a thermostable uricase within a relatively short time (i.e. 27 h). Moreover, the finding that shaking conditions are necessary for the increase of the enzyme production is in full agreement with the fact that uric acid requires O₂ in order to be converted to allantoin (28). In addition to O₂, shaking conditions allow more and equal exposure to the sparingly soluble uric acid to be available for the attack and/or decomposition by the uricolytic microbe. Therefore, it is

suggested to perform thermophilic fermentation processes on large scale under all the previously established conditions which exhibited clear regulatory roles on uricase production by *Bacillus stearothermophilus*, S-90 L.N.

In conclusion, data in this paper represent a new report concerning the relatively high production of thermostable uricase (s) under thermal conditions from obligate thermophilic bacterial origin. Production under large scale thermophilic processes might find certain applications in the fields of industry and/or chemotherapy.

REFERENCES

1. AHARONOWITZ, Y., and DEMAINE, A. L. Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavulgaris*. Arch. Microbiol., 115, 169-73.
2. ALLEN, M. B. 1950. The dynamic nature of thermophily. J. Gen. Physiol., 33, 205-14.
3. AMMAR, M. S.; ELWAN, S. H., and MEKI, M. A. 1986a. Thermostable urate oxidase from obligate thermophilic bacteria. I Estimation using the uric acid clearing zone (U.C.Z.) new technique. Microbiol. Españ., 39, 1-6.
4. AMMAR, M. S.; ELWAN, S. H., and MEKI,

Table 5. Effect of different agitation speeds (rpm) on the endocellular uricase production by *B. stearothermophilus*, S-90 L.N.

| Agitation speeds rpm | Uricase field (relative increase, %) at the end of an incubation period of: | | | |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------|------------------|
| | 27 h | Increasing folds | 72 h | Increasing folds |
| 0.00 | 100 | 1.00 | 100 | 1.0 |
| 80 | 588.8 | 5.8880 | 123 | 1.23 |
| 120 | 977.1 | 9.7710 | 158.5 | 1.585 |
| 160 | 1621.7 | 16.217 | 204.2 | 2.042 |
| 200 | 1258.8 | 12.588 | 204.2 | 2.042 |

- M. A. 1986b. Thermostable urate oxidase from obligate thermophilic bacteria. II The constitutive production of urate oxidase by *Bacillus stearothermophilus*. S-90. L.N. Microbiol. Españ., 39, 7-12.
5. BAUM, H.; HUBSCHER, G., and MAHLER, H. R. 1956. Studies on uricase II. The enzyme substrate complex. Biochim. Biophys. Acta., 22, 514-27.
 6. BONGAERTS, G. P. A.; UIZETTER, J.; BROUNS, R., and VOGELS, G. D. 1978. Uricase of *Bacillus fastidiosus*. Properties and regulation of synthesis. Biochim. Biophys. Acta., 527 34-58.
 7. CAMPBELL (jr.), L. L., and WILLIAMS, O. B. 1953 a. The effect of temperature on the nutritional requirements of facultative and obligate thermophilic bacteria. J. Bacteriol., 65, 141-45.
 8. CAMPBELL (jr.), L. L., and WILLIAMS, O. B. 1953b. Observations of the biotin requirements of thermophilic bacteria J. Bacteriol., 65, 146-47.
 9. CAZZULO, J. J.; SUNDARUM, T. K., and KORNBERG, H. L. 1970. Mechanism of pyruvate carboxylase formation from the apoenzyme and biotin in a thermophilic *Bacillus*. Nature London, 227, 1103-5.
 10. CLEVERDON, R. C.; PELEZAR, M. J., and DOETSCH, R. N. 1949. The vitamin requirements of stenothermophilic aerobic sporegenus bacilli. J. Bacteriol., 58, 523-26.
 11. DESOUKY, E. M. 1981. Microbiological and biochemical studies on certain uric acid decomposing microorganisms. Ph.D. thesis, Bot. Dept., Fac. of Sci, Al-Aghar Univ., Cairo, Egypt.
 12. EL-SHAHED, A. S. 1982. Studies on certain uricolytic microorganisms. Ph.D. Thesis, Bot. Dept., Fac. of Sci., Al-Aghar Univ., Cairo, Egypt.
 13. ELWAN, S. H.; RADWAN, S. S., and AMMAR, M. S. 1972a. Studies on thermophilic bacteria of some Egyptian soils. I Growth and nutritinional requirements in relation to temperature.. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 2, 127, 253-60.
 14. ELWAN, S. H.; RADWAN, S. S., and AMMAR, M. S. 1972b. Studies on thermophilic bacteria of some Egyptian soils. II Relation of synthesis of α —amylase to thermophilism. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 2, 127, 261-69.
 15. EVANS, H. C. 1971a. Thermophilic fungi of coal spoil tips. I Taxonomy. Trans. Brit. Mycol. Soc., 57 241-54.
 16. EVANS, H. C. 1971b. Thermophilic fungi of coal spoil tips. II Occurrence, distribution, and temperature relationships. Trans. Brit. Mycol. Soc., 57, 255-66.
 17. KANE, B. E., and MUSLLINS, J. T. 1973. Thermophilic fungi in municipal waste compost system. Mycologia, 65, 1087-100.
 18. KIDA, J. 1969. Studies on bacterial uricase. II Influence of adenine on growth and uricase production of *Brevibacterium vitrumen* var *uricum*. Ferment. Technol., 47, 617-22.
 19. KIMIKAZU, I.; TAKCHIKA, Y., and JUKIRO, F. 1967. Studies on yeast uricase. Part I. Purification and some enzymatic properties of yeast uricase. Agr. Biol. Chem., 31, 1256-64.
 20. KUSTER, E., and LOCCI, R. 1964. Studies on peat and peat microorganisms II. Ocuurrence of thermophilic fungi in peat. Arch. Microbiol., 48, 319-24.
 21. LABOUREUR, P., and LANGLOIS, C. 1968. Urate oxidase d'*Aspergillus flavus*. I Obention, purification and properties. Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 811-25.
 22. LONG, S. K., and WILLIAMS, O. B. 1959. Growth of obligate thermophilic bacteria at 37 °C as a function of the cultural conditions employed. J. Bacteriol., 77, 545.
 23. OHE, T., and WATANABE, Y. 1981. Purification and properties of urate-oxidase (Ec. 1.7.3.3.) from *Streptomyces cyanogenus*. J. Biochem. Tokyo., 69, 1769-76.
 24. SUMMER, J. L.; MORGAN, E. D., and EVANS, H. C. 1969. The effect of growth temperature on the fatty acid composition of fungi in the order Mucorales. Can J. Microbiol., 15, 515-20.
 25. TANSEY, R. M.; MURRMANN, D. M.; BEHNKE, B. K., and BEHNKE, E. R. 1977. Enrichment, isolation and assay of growth of thermophilic and thermololerant fungi in lingnin containing media. Mycologia, 69, 463-76.
 26. THOMAS, M. A. 1930. Bacteriology. A Text Book on Fundamentals, 97, Temperature.
 27. WOLLMAN, E. 1928. A true thermophilic *Bacillus* isolated from the waters of kobrous. Arch. Inst. Pasteur Tunis, 17, 253-56.
 28. Worthington Enzymes 1977. Enzyme reagents and related biochemicals. Worthington Bioch. Co., Freehold, N.J., U.S.A., 07728.

ESTUDIOS SOBRE LOS MICOVIRUS ASOCIADOS AL CARACTER MATADOR EN LEVADURAS

I. MARTIN, A. L. EXTREMERA y E. MONTOYA

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

(Aceptado: 29 de enero de 1986)

RESUMEN

Se ha realizado un examen mediante microscopía electrónica, de los micovirus presentes en estirpes de levadura con fenotipos matadores y no matadores pertenecientes a los tres sistemas conocidos. En todas ellas se han encontrado partículas isométricas de igual forma y de tamaño muy semejante, independientemente de que las estirpes analizadas sean o no productoras de toxinas, y del tipo de toxina de que se trate.

Este hecho parece indicar que los L-ARNs que codifican la proteína mayoritaria de las cápsidas y están presentes en todas las estirpes examinadas, son muy similares en cuanto a tamaño y secuencia se refiere, para los tres sistemas matadores.

SUMMARY

Mycovirus from yeast strains with different phenotypes related to the killer character have been studied by electron microscopy. In all cases, isometric particles were detected, independently on the toxin produced, if any. The particles show the same morphology, and are approximately identical in size, suggesting that the L-dsRNA fractions —contained in all the strains examined— which encode for the major polypeptide of the capsid, are also very similar in different killer yeast.

INTRODUCCION

Entre las estirpes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* existen, por el momento, tres tipos diferentes de sistemas matadores. El primero de ellos fue descubierto por Makower y Be-

van (10) y es típico de estirpes de laboratorio. El segundo, descrito en 1973 por Naumov y Naumova (11), está muy difundido en levaduras homotálicas de vinificación. El tercer sistema matador aparece también en estas últimas, y ha sido puesto de manifiesto

en nuestro laboratorio por Extremera y cols. (6).

La capacidad de las células matadoras para originar la muerte de estirpes sensibles, reside en todos los casos en la producción de toxinas matadoras de naturaleza polipeptídica, denominadas YKT₁, YKT₂ e YKT₃ respectivamente.

La síntesis de estas toxinas viene condicionada por fragmentos de ARN bicatenario, conocidos como M1, M2 y M3 de 1,9, 1,7 y 1,5 kb, respectivamente. Las fracciones M1 y M2 se encuentran sólo en células que también contienen un ARN bicatenario adicional, denominado L_A, de 4,7 kb, necesario para su mantenimiento (12); por el momento se desconoce si su presencia es necesaria para el mantenimiento del fragmento M3.

Las fracciones M1 y M2 se encuentran en el citoplasma de las estirpes matadoras encapsidadas en unas partículas similares a virus (virus-like particles, VLP), no infectivas, isométricas y de unos 38-40 nm de diámetro (1, 4, 7). La proteína de la cápsida está codificada por las fracciones L_{1A} y L_{2A} de ARN bicatenario, variantes asociadas con los tipos M1 y M2, respectivamente (2, 8, 12).

El carácter matador sólo puede ser transmitido por cruzamiento, fusión citoplasmática durante la formación de yemas, y otras formas naturales o artificiales de fusión celular. Esto, unido a la naturaleza de los determinantes, y a su dependencia de genes nucleares, parece poner de manifiesto que el fenotipo matador es un atributo de un micovirus de levadura que siguiendo la nomenclatura propuesta por Hopper y cols. (9) se denominará ScV (*Saccharomyces cerevisiae* virus). Las partículas que contienen los M y L-ARNs, se designarían por tanto ScV-M y ScV-L, respectivamente.

En estirpes con fenotipo matador de los sistemas primero y segundo, existen siempre ScV-M y ScV-L (concretamente, ScV-M1, ScV-M2, ScV-L_{1A} y ScV-L_{2A}, según el tipo de toxina producido), mientras que en estirpes con otros fenómenos sólo aparecen partículas tipo L (4).

En el presente trabajo, ponemos de manifiesto la presencia de micovirus en estirpes matadoras pertenecientes a los tres sistemas conocidos, así como en estirpes del primer sistema con fenotipo no matador, mediante un examen realizado con microscopía electrónica, y la existencia de un L-ARNs en estirpes matadoras del tercer sistema que presenta la misma movilidad electroforética en geles de poliacrilamida que las fracciones L_{1A} y L_{2A} de las estirpes matadoras de los otros dos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos utilizados

Para la realización del presente trabajo hemos utilizado estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* matadoras y sensibles de diversos tipos. Los genotipos, fenotipos y procedencia de las mismas se muestran en la *tabla 1*.

Medios de cultivo

Para el crecimiento y conservación de las estirpes utilizadas, así como para la extracción de los micovirus y de los ARNs, ha sido empleado el medio YPD (extracto de levadura 0,5 %, peptona 1 %, glucosa 2 %, pH 4,5).

Extracción y purificación de los micovirus

Se ha seguido la técnica de Adler y cols. (1) modificada por nosotros. Las estirpes se cultivaron en 3 l de YPD

Tabla 1. Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas en el presente trabajo

| Estirpe | Genotipo | Fenotipo | Procedencia |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 3971 (ATCC 46030) | α , tyr1, his7-2, [KIL-k ₁] | K ₁ ⁺ R ₁ ⁺ | Dr. N. van Udem, Oeiras (Portugal) |
| K ₂ GR7 | a, met, his, [KIL-k ₂] | K ₂ ⁺ R ₂ ⁺ | Nuestro laboratorio |
| K ₂ GR3 | α , arg, ade, [KIL-k ₃] | K ₂ ⁺ R ₂ ⁺ | Nuestro laboratorio |
| K ₂ GR1 (ATCC 46029) | $\alpha\alpha$, prototrofa [KIL-k ₂] [KIL-k ₃] | K ₂ ⁺ R ₂ ⁺ K ₃ ⁺ R ₃ ⁺ | Nuestro laboratorio |
| 3972 (ATCC 46031) | α , prototrofa, [KIL-o] | K ⁻ R ⁻ | Dr. N. van Udem, Oeiras (Portugal) |
| T5TD | α , ade2 [KIL-n] | K ₁ ⁻ R ₁ ⁺ | Dr. G. R. Fink, Cornell, New York (USA) |
| T132B-NK ₃ | a, his4, ade2, [KIL-s] | K ₁ ⁻ R ₁ ⁻ | Dr. G. R. Fink, Cornell, New York (USA) |

durante 5 d, a 25 °C, en reposo. Las células se recogieron por centrifugación, y se resuspendieron en tampón fosfato 0,03 M con NaCl 0,15 M, pH 7,5 en proporción de 1 ml de tampón por cada gramo de células. A la suspensión se añadió un volumen doble de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y la mezcla se sometió durante 30 min a una vibración de 4.600 rpm, en un homogeneizador celular Edmund Bühler, manteniendo la temperatura durante el proceso a 0 °C. El homogeneizador resultante se diluyó a la mitad en el mismo tampón durante el proceso de separación y lavado de las perlas de vidrio, que se realizó por filtración sobre vacío en un embudo de placa porosa.

El extracto libre de perlas fue sometido a centrifugaciones sucesivas a 3.000 × g, 5.000 × g, 10.000 × g y 15.000 × g; en todos los casos se recogieron los sobrenadantes. El sobrenadante final se centrifugó a 74.000 × g durante 2 h a 4 °C a través de una capa de CsCl de densidad 1,26 g.ml⁻¹. El sedimento fue recogido y resuspendido en 5 ml de tampón y nuevamente centrifugado a 15.000 × g, desechándose en esta ocasión el sedimento. El sobrenadante se volvió a centrifugar a

través de CsCl durante 2 h a 74.000 × g. El sedimento obtenido, que contiene los micovirus, se resuspendió finalmente en 0,5 ml del mismo tampón.

Examen al microscopio electrónico

La tinción negativa se llevó a cabo por el método descrito por Brenner y Norne (3), utilizando fosfotungstato potásico al 2 % en agua destilada. La observación se realizó en un microscopio electrónico Philips EM-300.

Extracción, purificación y análisis de los ARN bicatenarios

Para la extracción, purificación y análisis de los ARN de doble cadena de las distintas estirpes utilizadas, se ha seguido el método descrito por Extremera y cols. (6).

Las células de 80 ml de un cultivo en YPD fueron recogidas por centrifugación, resuspendidas en 40 ml de EDTA 50 mM e incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugarlas, el sedimento se resuspendió en 20 ml de tris-SO₄H₂ 50 mM a pH 9, adicionado de 0,5 ml de 2-mercaptoetanol. La muestra se mantuvo en agitación durante 15 min a temperatura ambiente; tras ser recogida

das las células se llevaron al congelador a -18°C . Una vez descongeladas, se resuspendieron en 4 ml de una mezcla de NaCl 0,1 M, tris 10 mM, EDTA 10 mM y 2 % de SDS. La desproteinización se llevó a cabo añadiendo un volumen igual de fenol y agitando suavemente durante 1 h. Tras centrifugar, se extrajo la fase acuosa y los ácidos nucleicos se precipitaron con 2 volúmenes de etanol frío.

El precipitado se resuspendió en 1 ml de SSC (NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M, pH 7) al que se añadió un volumen igual de una solución de LiCl 4 M. Los ARN ribosómicos se sedimentaron por centrifugación y los ácidos nucleicos del sobrenadante se precipitaron de nuevo con 2 volúmenes de etanol frío. El precipitado final, una vez seco, se resuspendió en el tampón de electroforesis (tris 0,2 M, acetato sódico 0,1 M, pH 7,8) que contiene EDTA 5 mM y 50 % de glicerol.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida a 4°C durante 15 h, a voltaje constante de 30 V. Transcurrido este tiempo, los geles se fijaron con ácido acético 1M durante 1 h, se tiñeron con azul de metileno al 2 % en tampón acetato 0,4 M, pH 5, durante 30 min y se lavaron con agua destilada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los micovirus aislados de las estirpes citadas en la *tabla 1*, se muestran en la *figura 1*.

Como puede observarse, las partículas presentan la misma forma en todos los casos, independientemente del sistema matador al que pertenecan y de su fenotipo.

El hecho de que todas las estirpes del primer sistema matador presenten el mismo tipo de partículas, puede ser debido a que en todas ellas está pre-

sente la misma fracción de ARN bicatenario, L_A , de 4,7 kb, que codifica la síntesis de la proteína mayoritaria (y probablemente única) de las cápsidas (*figura 2A*). Por tanto, dicha proteína, que será siempre del mismo tipo, adoptará idéntica configuración espacial y conferirá la misma morfología a las partículas en todos los casos, independientemente de que las estirpes que las contienen sean o no matadoras, capacidad debida a la fracción M1 de ARN bicatenario.

De igual manera, la semejanza de forma y tamaño de las partículas contenidas en las estirpes matadoras de los tres sistemas, y en la estirpe K_2K_3GR1 —productora de las toxinas YKT_3 e YKT_3 — podría ser indicativa de que los ARN tipo L son igualmente semejantes. De hecho, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida aparece en todos los casos, una banda con igual movilidad electroforética que se identifica con esta fracción de ARN (*Figura 2B*).

Los ácidos nucleicos extraídos fueron tratados con DNasa y RNasa A (Sigma, USA). Todas las fracciones permanecieron tras los tratamientos con DNasa y con RNasa en $0,01 \times \text{SSC}$, mientras que desaparecieron tras el tratamiento de las muestras con $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de RNasa en MgSO_4 10 mM/ $0,01 \times \text{SSC}$, lo cual pone de manifiesto su naturaleza de ARN de cadena doble.

Postulamos, por lo tanto, que en el tercer sistema matador, al igual que en los otros dos (12), también sería necesaria la presencia de un ARN bicatenario tipo L, de igual tamaño que los presentes en los otros dos sistemas matadores, 4,7 kb, para el mantenimiento de la fracción M3 que codifica la correspondiente toxina matadora, y que según la nomenclatura utilizada se designaría como fracción L_{3A} .

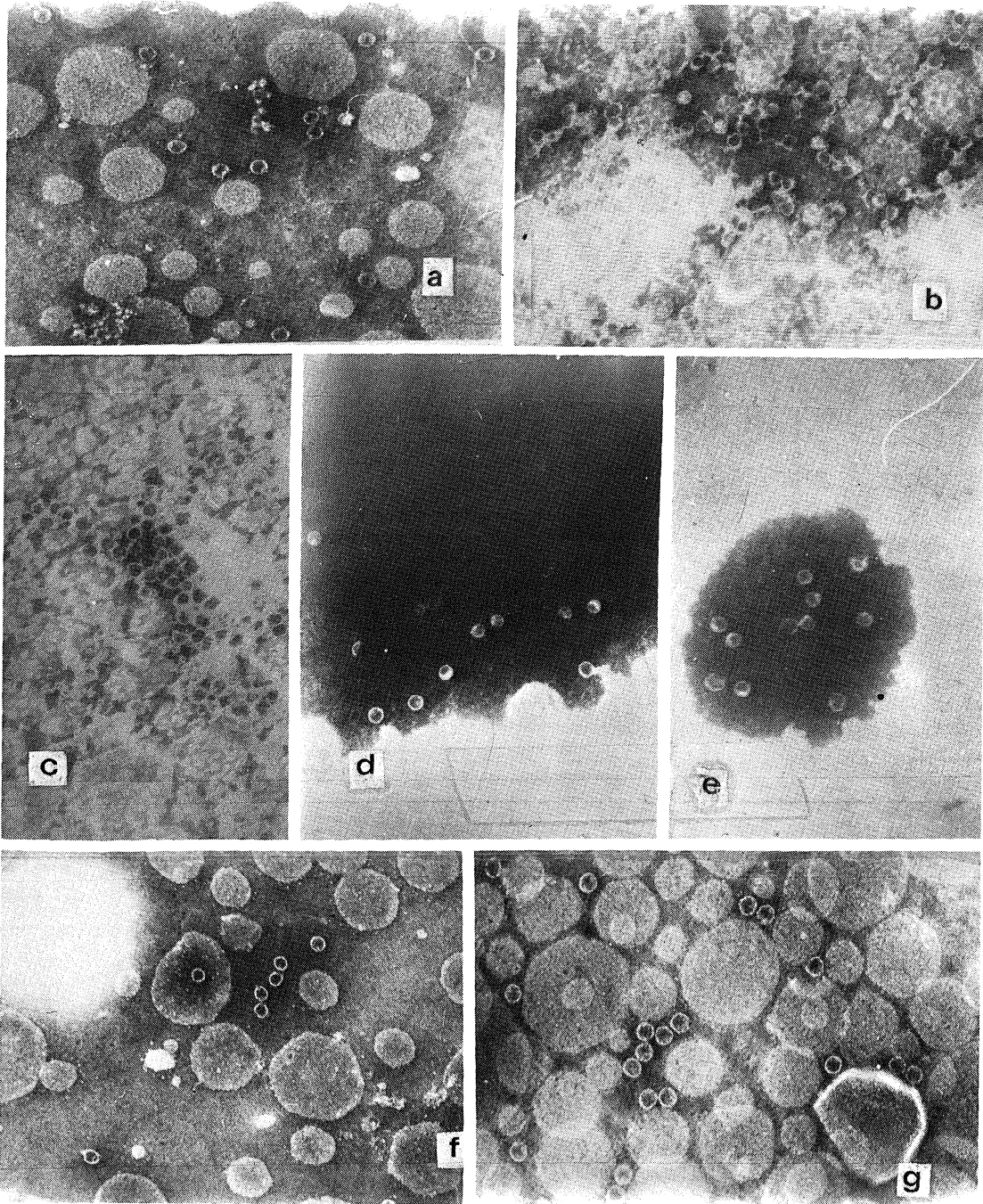


Figura 1. Micovirus presentes en las estirpes 3971 (a), T57D (b), T132B-NK3 (c), 3972 (d), K₂GR7 (e), K₃GR3 (f) y K₂K₃GR1 (g). $\times 60.420$

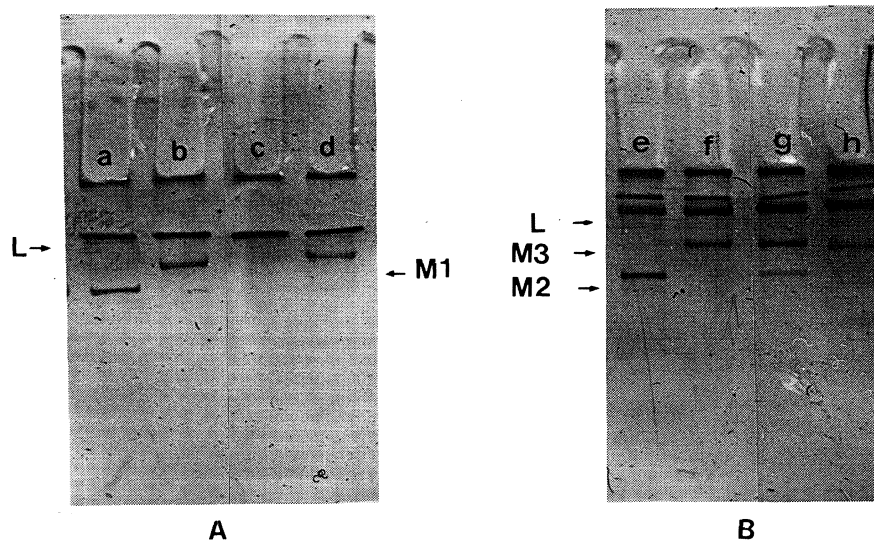


Figura 2. Electroforesis en gels de poliacrilamida de los ARN bicatenarios pertenecientes a estirpes de los tres sistemas mataadores. A) T132B-NK₃ (a), T57D (b), 3972 (c) y 3971 (d). B) K₂GR7 (e), K₃GR3 (f), K₂K₃GRI (g) y 3971 (h)

BIBLIOGRAFIA

- ADLER, J.; WOOD, H. A., and BOZARTH, R. F. 1976. Virus-like particles from killer, neutral and sensitive strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.*, 17, 72-76.
- BOSTIAN, K. A.; STURGEON, K. A., and TIPPER, D. J. 1980. En capsidation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: dependence of M on L. *J. Bacteriol.*, 143, 63-70.
- BRENNER, S., and HORNE, R. W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 103-10.
- BRUENN, J. A. 1980. Virus-like particles of yeast. *Ann. Rev. Microbiol.*, 34, 9-68.
- BUCK, K. W.; LHOAS, P.; BORDER, D. J., and STREET, B. K. 1973. Virus particles in yeast. *Biochem. Soc. Trans.*, 1, 1141-42.
- EXTREMERA, A. L.; MARTIN, I., and MONTROYA, E. 1982. A new killer toxin produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 5, 17-19.
- HARRIS, M. S. 1978. Virus-like particles and double stranded RNA from killer and non-killer strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 21, 116-17.
- HERRING, A. J., and BEVAN, E. A. 1974. Virus-like particles associated with the double-stranded RNA species found in killer and sensitive strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Virol.*, 22, 387-94.
- HOPPER, J. E.; BOSTIAN, K. A.; ROWE, L. B., and TIPPER, D. J. 1977. Translation of the L-species dsRNA genome of the killer-associated virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 252, 9010-17.
- MAKOMER, M., and BEVAN, E. A. 1963. The inheritance of killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Abstr. Proc. Int. Congr. Genet.*, 11th, 1, 202.
- NAUMOVA, R. I., and NAUMOV, G. I. 1973. Comparative genetics of yeast. XII. Study of antagonistic interrelations in *Saccharomyces* yeast. *Genetika*, 9, 85-90.
- TIPPER, D., and BOSTIAN, K. 1984. Double-stranded ribonucleic acid killer system in yeasts. *Microbiol. Rev.*, 48, 125-56.

ALGUNOS DATOS ACLARATORIOS PARA LAS HIPOTESIS DE ENSAMBLAJE DE RHABDOVIRUS DE PLANTAS

M. RUBIO-HUERTOS

Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán» (CSIC), Madrid

M. RUBIO-SAEZ

Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares (Madrid)

(Aceptado: 29 de enero de 1986)

RESUMEN

Los datos que presentamos sobre la presencia de nucleocápsidas y «cores» en el nucleoplasma en el caso de rhabdovirus de desarrollo nuclear, como en el citoplasma en el caso de virus de desarrollo citoplásmico, así como la formación de membranas *de novo* por el virus LNYV y el paso de viriones a través de plasmodesmos modificados en el virus MT, ayudan a esclarecer las secuencias del ensamblaje de los virus de plantas y de su transmisión de célula a célula.

SUMMARY

The data that we are presenting about the presence of nucleocapsids and cores in the nucleoplasm in the case of rhabdoviruses that develop in the nucleus, or in the cytoplasm in the case of those that develop in the cytoplasm as well as the formation of membranes *de novo* by the virus LNYV and the passage of virions through the modified plasmodesmata in the virus MT help to obtain a better overall picture of the development of the infection of plant rhabdoviruses.

INTRODUCCIÓN

El ensamblaje de los componentes de los rhabdovirus en las células de las plantas infectadas, se ha podido observar por microscopía electrónica de transmisión en cortes ultrafinos de tejidos. Sin embargo, la interpretación de las imágenes no está todavía

bien aclarada, se sabe que en un grupo de rhabdovirus sus componentes se ensamblan en el núcleo y espacio perinuclear y otro grupo lo hace en el citoplasma, excepto en el caso del virus mosaico estriado del trigo (4), que parece que lo hace en ambos.

Debido a la diferente interpretación de datos conocidos y también a

ignorar algunos de éstos ya publicados, se han propuesto dos modelos de ensamblaje, uno, el de Francki (1) para rhabdovirus de plantas, que lo hacen en el núcleo y está basado en la presencia de nucleocápsidas completas «cores» en el nucleoplasma, como demostraron Kitajima y cols. (3). y Rubio-Huertos y Bos (9), que son extruidas al espacio perinuclear tomando su final membrana lipoproteica de la membrana interna del núcleo.

El segundo modelo, propuesto por Peters y Schulz (6), presenta un concepto unificador, es decir, según los autores sirve para explicar el ensamblaje en los rhabdovirus de plantas, tanto los que se forman en el núcleo como en el citoplasma, así como también en los rhabdovirus animales. En este modelo la formación, enrollamiento de las nucleocápsidas para formar el «core» se realizaría simultáneamente a su recubrimiento por las membranas celulares y dan una explicación peregrina para justificar la presencia de «cores», tanto en el nucleoplasma como en el citoplasma, en el caso de ensamblaje en dicho lugar.

En el presente trabajo aportamos datos, unos, de nuestros trabajos realizados en los últimos años, y otros nuevos, de un virus del maíz, que esperamos contribuyan a aclarar estas teorías y explicar también el paso de viriones de una célula a otra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus y plantas

Virus Clover enation, en plantas de *Trifolium incarnatum* de Italia, produce tumores en las hojas y mosaico (6). Desarrollo nuclear.

Virus Red clover mosaic, en plantas

de *Trifolium incarnatum*, España, produce mosaico y achaparramiento de la planta (15). Desarrollo nuclear.

Virus Zea mais thinning, en plantas de maíz híbrido ZMT, produce adelgazamiento muy marcado del tallo y mosaico y anormalidades en los frutos (8). Desarrollo citoplásmico.

Virus Melon variegation, en plantas de melón, produce mosaico y color variegado en los frutos (11). Desarrollo citoplásmico.

Virus Lettuce necrotic yellow, en lechuga y en *Nicotiana glutinosa* (10, 12, 16). Desarrollo citoplásmico.

Microscopia electrónica

Se han seguido los métodos de fijación con glutaraldehído, posfijación en tetraóxido de osmio, deshidratación e inclusión en durcupán, descritos con detalle en un trabajo anterior (10). Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo LKB y se tiñeron según el método de Reynolds.

RESULTADOS

Antes de exponer los resultados creemos conveniente para una mejor comprensión de éstos describir brevemente las partes morfológicas de que se componen los viriones completos de los rhabdovirus de plantas (en general de todos los rhabdovirus) y cuales de estos elementos son los que se pueden observar por microscopia electrónica de transmisión en cortes ultrafinos.

Existen cuatro elementos principales:

1.º El ácido nucléico ARN monocatenario de polaridad negativa y que *no* se puede observar en cortes ultrafinos. Se supone que forma un largo filamento.

2.º La nucleocápsida que es la unión de la proteína N, y es posible

que alguna más, al ácido nucleico formando un filamento que se enrolla en espiral más o menos apretada alrededor de un eje. Estas estructuras pueden ser observadas claramente en algunas virosis de desarrollo citoplásmico y es posible que constituyan unas masas no bien definidas en los núcleos de células infectadas con virus de desarrollo nuclear.

3.º) La nucleocápsida completa o «core», es decir, la fase anterior más una (o varias) proteínas (M, G, etc.) donde la nucleocápsida 2 se encuentra enrollada apretadamente alrededor de su eje y su recubre de otra/otras proteínas formando un cilindro con un extremo plano y otro hemisférico: forma de «bala». Estos «cores» se han observado dentro de núcleos y, en algunos casos, en el citoplasma.

4.º) Virión. Esta fase consiste en la adquisición de una envoltura membranosa por el «core» formándose el virión maduro. En los virus de plantas los viriones suelen ser baciliformes, es decir, en forma cilíndrica, con los dos extremos hemisféricos. La membrana presenta unas espículas formadas por glicoproteína codificada por el genoma vírico.

Datos experimentales y explicación de las figuras

A) Ensamblaje de rhabdovirus de desarrollo nuclear

En la *figura 1* se ven en la parte superior izquierda una serie de formas helicoidales (nucleocápsidas) y cerca de ellas, «cores» cortados en diferentes planos. A la derecha se ve la doble membrana nuclear.

En la *figura 2*, en la parte inferior un trozo de núcleo conteniendo «cores» en diferentes planos y una serie de ellos unidos a la membrana nu-

clear interna empezando la invaginación. En la parte superior de la *figura*, en el espacio perinuclear, viriones completos.

En la *figura 3*, a la izquierda, se ve parte de un núcleo con una bolsa de EPN con viriones completos y a la derecha, citoplasma con «cores».

Las *figuras 1-3* son del rhabdovirus de *Trifolium incarnatum*, descrito por Vela y Rubio-Huertos (15).

En la *figura 4* se observa un núcleo con gran cantidad de «cores» en la parte derecha, cortados en dos planos diferentes, y en la parte izquierda, viriones maduros. La membrana nuclear interna se ve con dificultad por las invaginaciones. Virus *Clover enation* (9).

B) Ensamblaje de rhabdovirus de desarrollo citoplásmico

En la *figura 5* se pueden observar filamentos halicoidales, correspondientes a nucleocápsidas en una fase temprana de enrollamiento, cerca de un Golgi.

En la *figura 6* se observa una inclusión citoplásmica formada por un conjunto de nucleocápsidas de enrollamiento más denso y dos viriones. Las *figuras 5-6* corresponden al virus *Melon variegation* descrito por nosotros y Peña Iglesias (11). En estas virosis aparecen numerosas vacuolas en el citoplasma y los «cores» toman su membrana externa del tonoplasto, aunque luego aparecen también dentro de las cisternas del aparato de Golgi y del RE (11).

En la *figura 7* se pueden ver, en la parte izquierda, cuatro «cores» cortados longitudinalmente junto a la membrana externa de un cloroplasto y en la parte derecha, una serie de «cores» en corte transversal entre dos cloroplastos: virus del maíz (8).

La *figura 8* muestra una inclusión

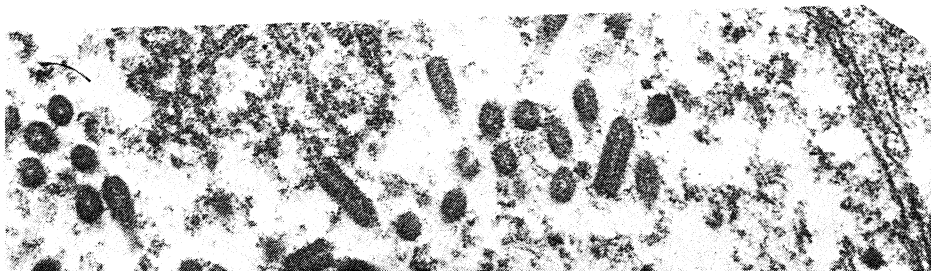


Figura 1

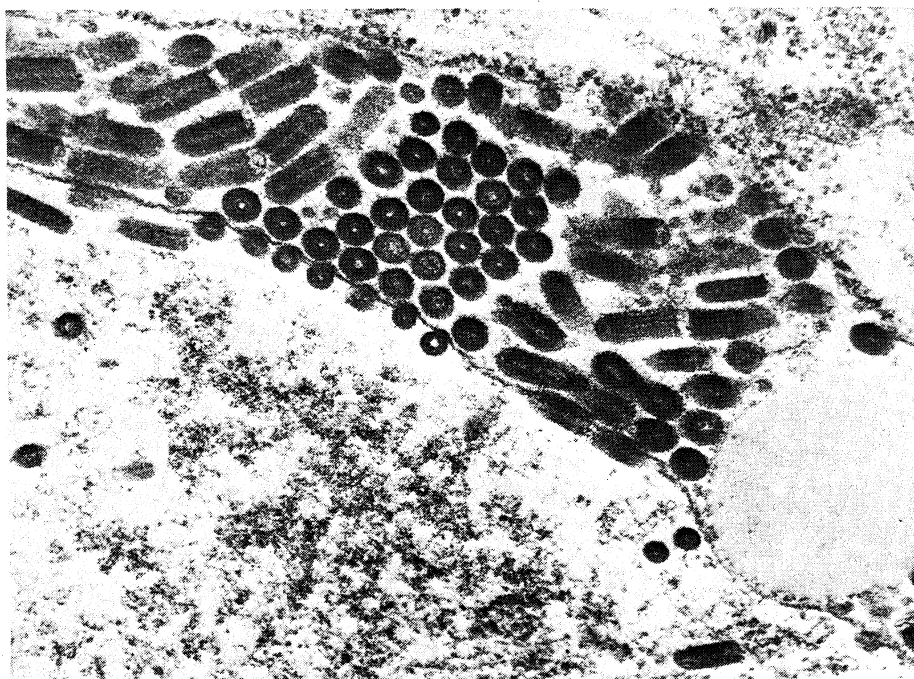


Figura 2

intracitoplásmica formada por una masa de nucleocápsidas y a la derecha, parte de un núcleo.

En la *figura 9* aparecen las inclusiones membranosas producidas por el virus LNY y «cores» ya envueltos por estas membranas.

Tanto la *figura 8* como la *9* corresponden al virus LNY (10).

La *figura 10* muestra un grupo de viriones en bloque y en el que se observa una peculiar disposición en las membranas envolventes: virus del lirio (7).

C) Paso de viriones de célula a célula

En un trabajo reciente sobre el virus del maíz, descrito por noso-

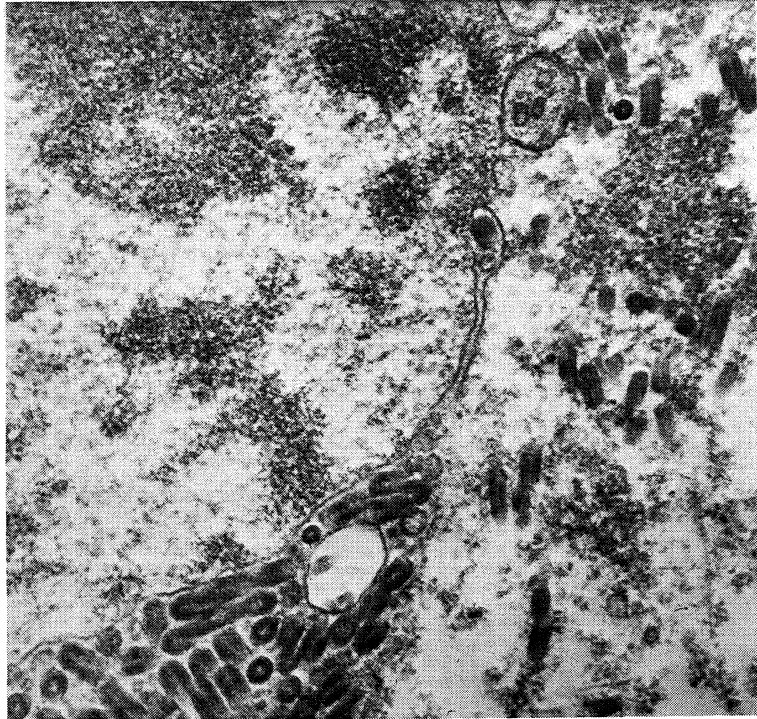


Figura 3

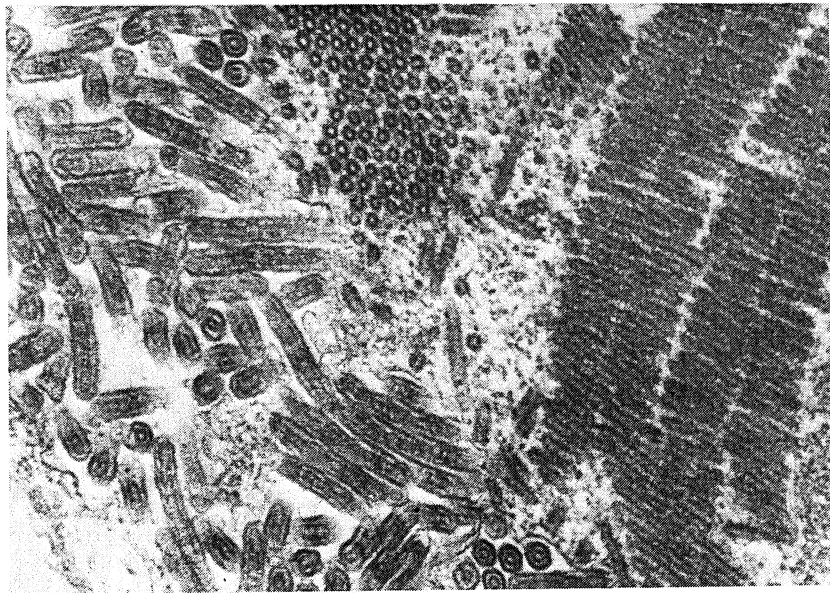
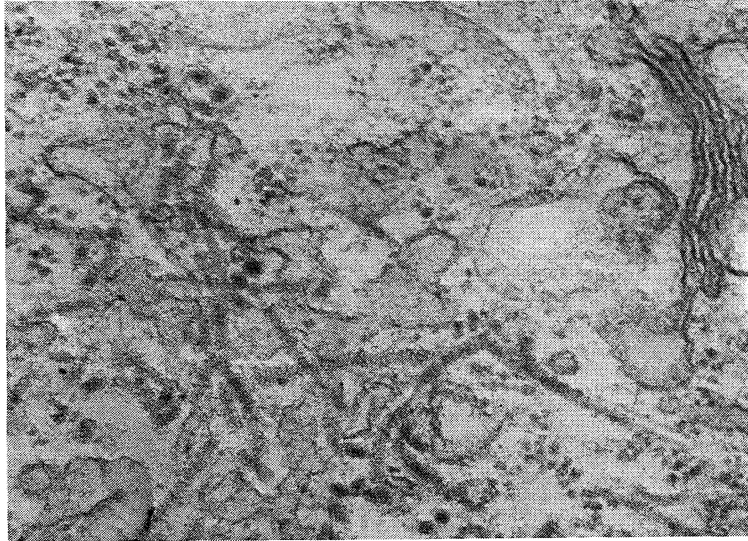
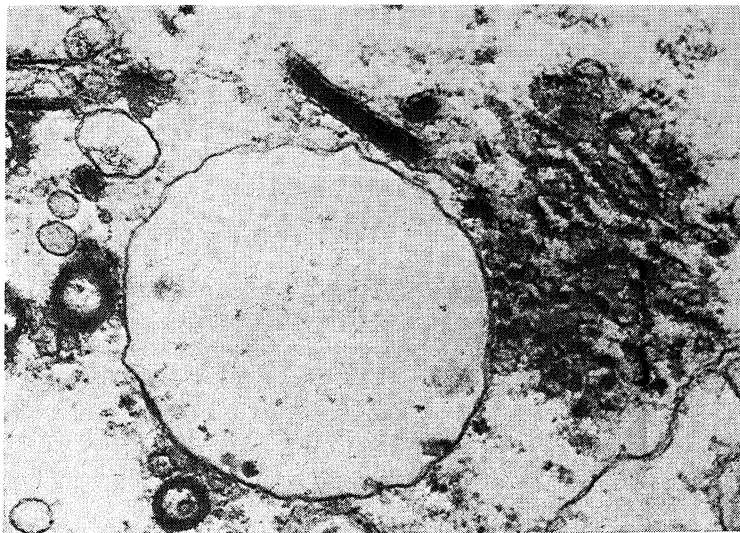


Figura 4

*Figura 5**Figura 6*

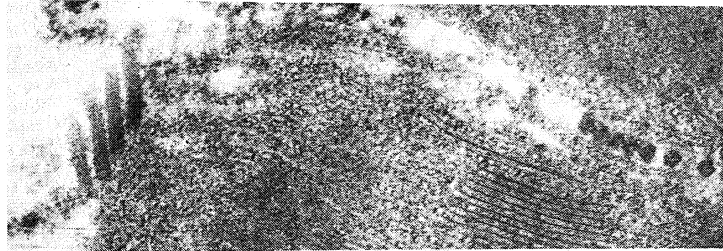


Figura 7

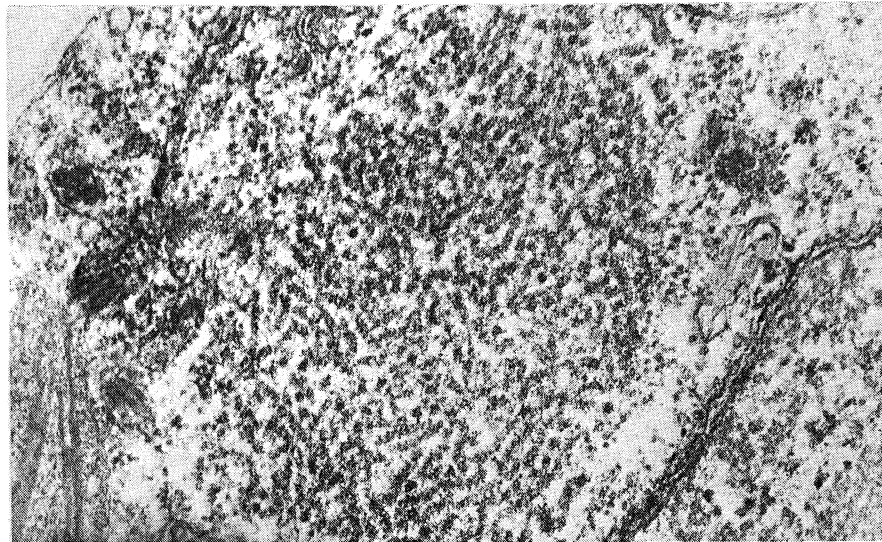


Figura 8

tros (8), hemos encontrado imágenes frecuentes de viriones dentro de plasmodesmos de tamaño mayor de lo normal en maíz. En la *figura 11* se puede observar una de estas imágenes.

DISCUSIÓN

Ensamblaje de virus de formación nuclear

Para poder interpretar los resultados obtenidos por microscopia electrónica hay que tener en cuenta que la fijación de los tejidos congela una secuencia de movimientos y fases de

la actividad celular y es como si examináramos una o varias fotos fijas sacadas de una película tomada de un objeto en movimiento.

Los contenidos celulares están en movimiento constante como se puede observar empleando microscopia fotónica con contraste de fases y naturalmente también lo hacen las partículas víricas o sus componentes llevados por estas corrientes intracelulares; teniendo esto en cuenta, es fácil explicarse como los «cores» que aparecen cerca del centro del nucleoplasma próximos a una inclusión posiblemente formada por nucleo-

cápsidas, serían arrastrados por este movimiento hacia la membrana interna nuclear previamente modificada por una o dos proteínas codificadas por el virus, que reconocería las partículas envolviéndolas tal como llegan y no solamente por la zona hemisférica, como dicen Peters y

Schulz (6) para formar allí el «core» (el «core» está ya formado) (veáanse las *figuras 1-2*, donde se ve claramente esta secuencia). También explicaría este movimiento que lleva al casual encuentro entre los «cores» y la membrana, el encontrarse, aunque de manera infrecuente, algunos «co-

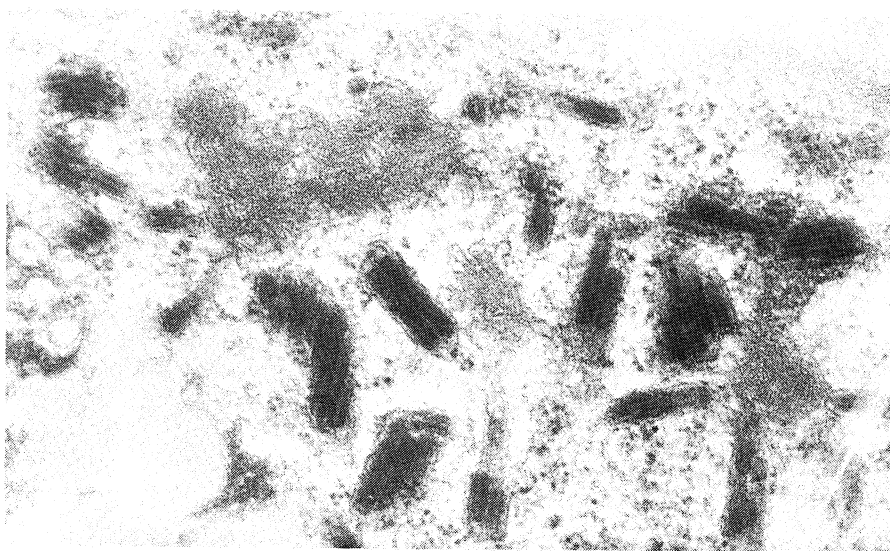


Figura 9

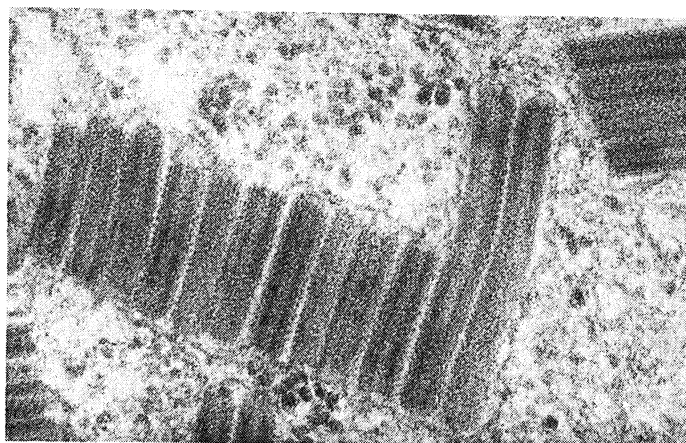


Figura 10

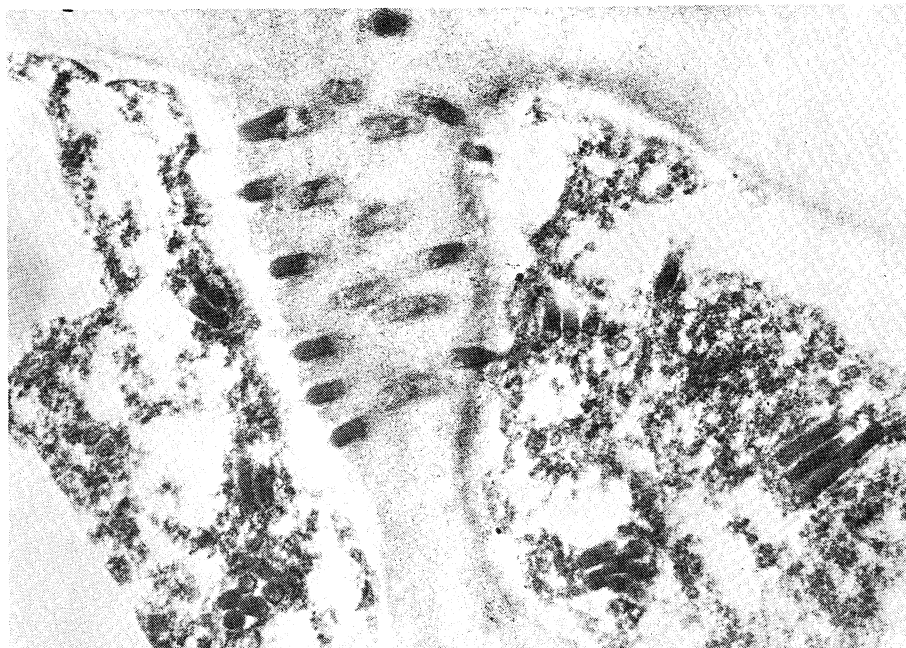


Figura 11

res» sin envoltura en el espacio perinuclear, pues es posible que algunos «cores» entren en contacto con la parte interna de poro nuclear por donde pasarían al EPN que ya tiene las membranas separadas, quedando dentro del EPN o saliendo directamente el citoplasma.

Una cosa que ninguna de las teorías expuestas tienen en cuenta es la capacidad de la membrana interna nuclear, modificada, de ayudar al proceso de invaginación de los «cores», formando espontáneamente vesículas de tamaño aproximado a la envoltura de un virión, vesículas vacías que hemos podido observar desprendiéndose de la membrana nuclear y que luego son transportadas al enquilema del retículo endoplásmico (9).

Nuestros resultados apoyan claramente la sugerencia de Francki para

virus de formación nuclear (1), de que las nucleocápsidas y más tarde los «cores» se forman libremente en el nucleoplasma y luego adquieren su envuelta externa a costa de la membrana interna del núcleo y vierten al espacio perinuclear ya como viriones maduros, pasando al enquilema del retículo endoplásmico por las conexiones que existen entre ambos sistemas.

La explicación que dan Peters y Schulz (6) para la presencia de «cores» en el nucleoplasma, como un rechazo de la membrana nuclear interna, no parece tener sentido alguno.

Ensamblaje de virus de formación citoplásmica

La hipótesis de Francki (1), fue hecha solamente para explicar el en-

samblaje de virus de formación nuclear. Peters y Schulz (6) en su hipótesis unificadora postulaban la validez de su hipótesis, tanto para rhabdovirus de formación nuclear como citoplásmica en un modelo en que la nucleocápsida y el «core» se formarían paulatinamente en contacto directo con las membranas celulares receptoras según el esquema adjunto (figura 12).

La aparición de nucleocápsidas y «cores» libres en el nucleoplasma y el citoplasma, comprobados por microscopía electrónica, hacen muy poco probable que esta hipótesis sea cierta.

2.^a) *Forma de ensamblaje B.* En el que las membranas que van a dar la envoltura externa de los viriones no es la membrana modificada de la célula, en este caso de la membrana del retículo endoplásmico, sino que estas membranas aparecen *de novo* en el citoplasma formando inclusiones y probablemente codificadas por el genoma vírico o fabricadas por la propia célula incitadas por la infección vírica. Este proceso se ve claramente en la infección por el virus *Lattuce necrotic yellow*, descrito por Stubbs y Grogan en Australia (12) y estudiado por microscopía electrónica por Wolanski y Chambers (16) y encontrado



Figura 12

Según nuestros resultados, el ensamblaje de los rhabdovirus de formación citoplásmica se puede efectuar de dos maneras diferentes, según los tipos de rhabdovirus conocidos hasta ahora.

1.^a) *Forma de ensamblaje A.* Semejante a la hipótesis de Francki (1) para virus de formación nuclear; aparición de nucleocápsidas, «cores» y paso de los «cores» al retículo endoplásmico tomando como envoltura externa la membrana de dicho sistema. Este proceso se puede seguir claramente en el desarrollo del virus *Melon variegation*, descrito por Rubio-Huertos y Peña-Iglesias (11) (figuras 5-6), en donde se encuentran además inclusiones o viroplasmias en el citoplasma, formados por un acúmulo de nucleocápsidas (figura 5).

y estudiado por Rubio-Huertos y García-Hidalgo (10) (primera descripción de este virus en Europa), en el que hemos observado inclusiones formadas por nucleocápsidas en zonas del citoplasma desprovistas de ribosomas (figura 8) y otras inclusiones densas formadas por una maraña de membranas que servirán para la maduración de los viriones (figura 9).

Paso de los rhabdovirus de célula a célula

Una cuestión que no han contemplado hasta ahora las teorías sobre ensamblaje de rhabdovirus de plantas es la de el paso de viriones o algunos de sus componentes de célula a célula para generalizar la infección.

El diámetro de los rhabdovirus, en general, es de 65 a 90 nm lo que pare-

ce impedir su paso a través de los plasmodesmos que comunican las células vegetales, ya que el diámetro de éstos es generalmente menor de 50 nm. Sin embargo, se conoce el caso de los *caulimovirus*, cuyas partículas isométricas miden de 50 a 60 nm, que son capaces de pasar a través de plasmodesmos que parecen ser modificados por la infección (3). Trabajando recientemente con el virus del ahilamiento del maíz (8), hemos encontrado viriones pasando a través de plasmodesmos de tamaño apropiado, mucho mayor de los que se encuentran en las células sanas de maíz, lo que explica la infección célula a célula en estas virosis (figura 11).

BIBLIOGRAFÍA

1. FRANCKI, R. I. B. 1973. Plant rhabdoviruses. *Advan. Virus Res.*, 18, 257-345.
2. KITAJIMA, E. W.; LAURITIS, J. A., and SWIFT, H. 1969a. Fine structure of *Zinnia* leaf tissues infected with *Dahlia* mosaic virus. *Virology*, 39, 240-49.
3. KITAJIMA, E. W.; LAURITIS, J. A., and SWIFT, H. 1969b. Morphology and intracellular localization of a bacilliform latent virus in sweet clover. *J. Ultrastruct. Res.* 29, 141-50.
4. LEE, P. E. 1970. Developmental stages of wheat striate mosaic virus. *J. Ultrastruct. Res.* 31, 282-90.
5. PETERS, D. 1981. Plant Rhabdovirus Group. CMI/AAB. Description of plant viruses.
6. PETERS, D., and SCHULZ, H. G. 1975. Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Ser. C, 78, 172-81.
7. RUBIO-HUERTOS, M. 1978a. A rhabdovirus in *Iris germanica*. *Phytopathol. Z.*, 92, 294-97.
8. RUBIO-HUERTOS, M. 1978b. A rhabdovirus in *Zea mays* L. in Spain. *Phytopathol. Z.*, 93, 1-4.
9. RUBIO-HUERTOS, M., and BOS, L. 1969. Morphology and intracellular localization of bacilliform virus particles associated with the clover enation disease. *Neth. J. Plant Pathol.*, 75, 329-37.
10. RUBIO-HUERTOS, M., and GARCÍA-HIDALGO, F. 1982. A rhabdovirus resembling lettuce necrotic yellows from lettuce in Spain. *Phytopathol. Z.*, 103, 232-38.
11. RUBIO-HUERTOS, M. and PEÑA-IGLESIAS, A. 1973. Bacilliform particles in cortex cells of *Cucumis melo* fruits. *Plant Dis. Rep.*, 57, 649-52.
12. STUBBS, E. L., and GROGAN, R. C. 1963. Necrotic yellows, a newly recognized virus disease of lettuce. *Aust. J. Agr. Res.*, 14, 439-59.
13. VAN BEEK, N. A. M.; LOHUIS, D.; DIJKSTRA, J., and PETERS, D. 1985. Morphogenesis of sonchus yellow net virus in cow pea protoplasts. *J. Ultrastruct. Res.*, 90, 249-303.
14. VEGA, J.; GRACIA, O.; RUBIO-HUERTOS, M., and FELDMAN, J. M. 1976. Transmission of a bacilliform virus of sowthistle mitochondria modifications in the infected cells. *Phytopathol. Z.*, 85, 7-14.
15. VELA, A., and RUBIO-HUERTOS, M. 1974. Bacilliform particles within infected cells of *Trifolium incarnatum*. *Phytopathol. Z.*, 79, 342-51.
16. WOLANSKI, B. S., and CHAMBERS, T. C. 1971. The multiplication of lettuce necrotic yellows virus. *Virology*, 44, 582-91.

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 alfabetizadas, 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 return 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.