

Volumen 12, nº 1
Marzo 1996
ISSN 02 13-4101

PUBLICACION DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGIA

Microbiología

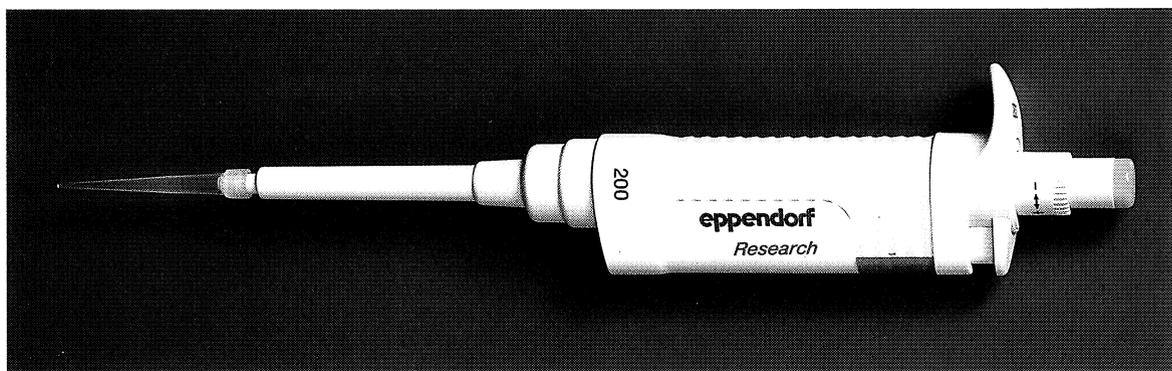


eppendorf



eppendorf Research

LA PIPETA DE INVESTIGACION CON EXPULSOR DE PUNTAS INDEPENDIENTE



✓ *Construcción robusta y materiales de alta duración.*

✓ *Cuerpo rugoso, antideslizante.*

✓ *Expulsor y pistón libres de corrosión.*

✓ *Uso con puntas de cualquier marca.*

✓ *Selector de volúmenes manejable con guantes, sin problemas de rotura.*

✓ *Manejo total con una sola mano.*

✓ *Ajuste rápido de volumen.*

✓ *Visión permanente del volumen.*

✓ *2 años de garantía.*

eppendorf

C/ Isabel Colbrand, 10 - 4º - Of. 121
28050 Madrid
Tel. (91) 358 85 66 Fax. (91) 358 88 04

C/ Conde Borrell, 210, bajo 1
08029 Barcelona
Tel. (93) 451 05 60 Fax. (93) 451 37 55

Envíe su cupón por fax. (91) 358 88 04 (93) 451 37 55



NOMBRE

CENTRO/EMPRESA

DEPARTAMENTO O SERVICIO

DIRECCION

POBLACION

C.P.

TELEFONO ()

FAX ()

EXT.

Visita

Demostración

Más información

Interés inmediato

A 6 meses

A largo plazo

BARCELONA 22-26 OCTUBRE 1996

EXPOQUIMIA'96

FERIA TECNICA DE LA QUIMICA APLICADA



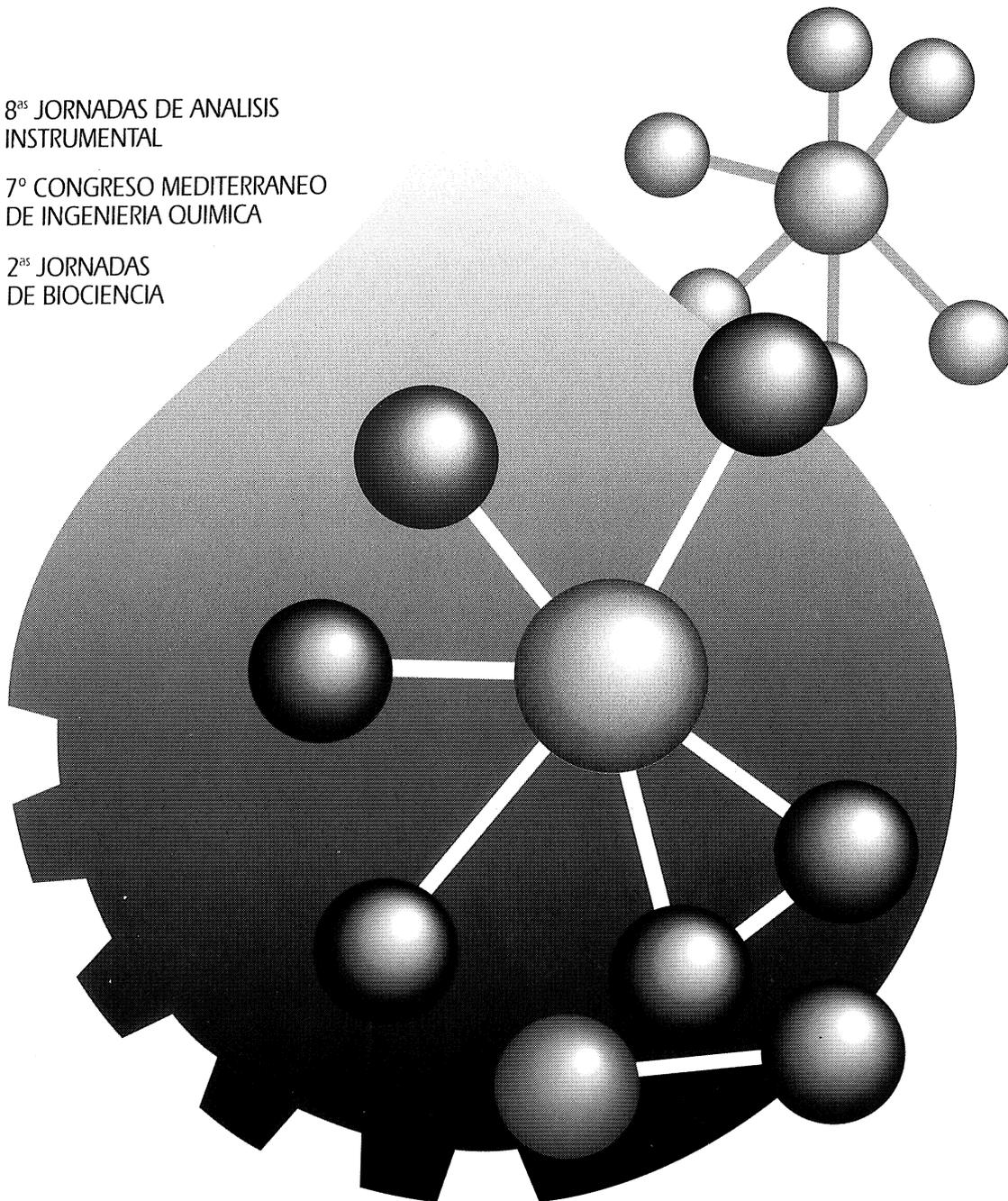
8^{as} JORNADAS DE ANALISIS
INSTRUMENTAL



7^o CONGRESO MEDITERRANEO
DE INGENIERIA QUIMICA



2^{as} JORNADAS
DE BIOCIENCIA



Fira de Barcelona

INFORMACION: Avda. Reina M^a Cristina - E-08004 Barcelona - Tel. (93) 233 20 00 - Fax (93) 233 23 11 - (93) 423 63 48 - (93) 233 20 01

Hemocultivos

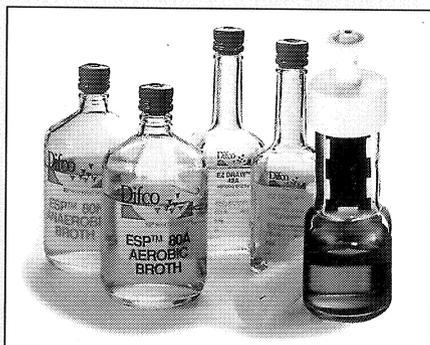
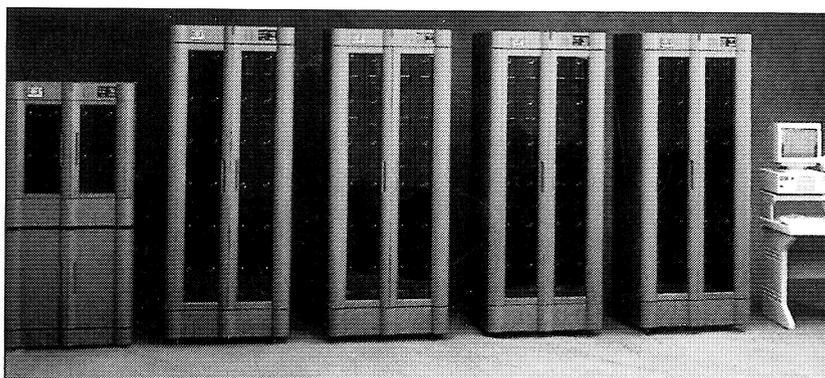
ESP

LA NUEVA
TECNOLOGIA
CONDUCE A
UNA MAYOR
RAPIDEZ

ESP ofrece lectura
continua, no invasiva,
de los hemocultivos
con automatización
total y monitorización
tanto de consumo como
de producción
de cualquier gas.

Configuraciones

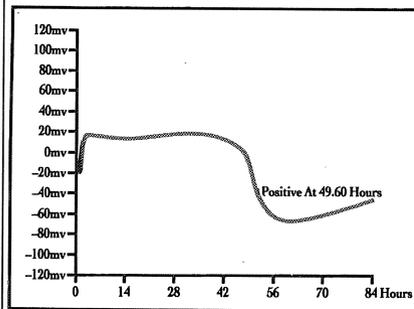
El sistema de Hemocultivos ESP, se
ajusta con precisión a su volumen
de trabajo. Los instrumentos están
disponibles en dos tamaños, 128 y 384
botellas. El ordenador controla hasta 5
instrumentos de cualquier capacidad.



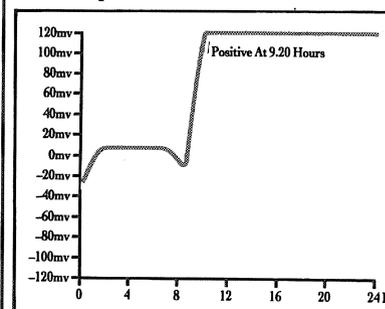
Formatos de botellas

Los medios de nuevo desarrollo se
ofrecen en una selección de tamaños.
La botella de 30 ml. acepta muestras entre
0,1 y 10 ml. La botella pediátrica acepta
hasta 5 ml. en extracción directa.
La botella bifásica contiene además una
lengüeta con Agar Chocolate y Sabouraud
Dextrose.

Cryptococcus neoformans



Klebsiella pneumoniae



Mayor recuperación. Mayor rapidez

Los sensores están continuamente monitorizando tanto el consumo como la producción
cualquier gas de forma que los positivos son detectados antes que con sistemas que
monitorizan la producción de CO₂.

DISTRIBUIDOR PARA ESPAÑA:



**FRANCISCO
SORIA MELGUIZO, S.**

Caramuel, 38 - 28011 MADRID
Telf.: 464 94 50 - 464 36 00 • Fax: 464

Microbiología SEM

The Official Journal of Spanish Society for Microbiology

Editorial Board*

President of the SEM

Francisco Ruiz Berraquero, Universidad de Huelva, Huelva, Spain

Editor-in-Chief

Ricard Guerrero, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain

Biodeterioration

Margarita Flores, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain
Harold W. Rossmore, Wayne State University, Detroit, MI, USA

Environmental Microbiology

Victoriano Campos, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile
José M. López Pila, Institute for Environmental Hygiene, Berlin, Germany
Gary A. Toranzos, University of Puerto Rico, Río Piedras, Puerto Rico

Eukaryotic Microorganisms

Juan C. Gutiérrez, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain
Antonio Torres, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

Food Microbiology

M. Luisa García López, Universidad de León, León, Spain
David A. A. Mossel, Eijkman Found. for Medical Research, Utrecht, the Netherlands

Industrial Microbiology

Paloma Liras, Universidad de León, León, Spain
M. Benjamín Manzanal, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain
Harlyn O. Halvorson, University of Massachusetts, North Darmouth, MA, USA

Microbial Biochemistry and Physiology

Germán Larriba, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain
Miquel Viñas, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain

(continued in next page)

* See addresses in pp. 4 and 151–152.

[MICROBIOLOGÍA SEM 12(1): 1–156 (1996)]

Dirección: Sociedad Española de Microbiología. Serrano, 117.
28006 Madrid (España). Tel. +34-1-561 33 81. Fax: +34-1-561 32 99.
Aparecen cuatro números al año (1996), que se integran en un volumen.
Precio de suscripción anual. Año 1996: España, 20.000 ptas. (IVA incluido);
Internacional, 180 US \$.

IMPRIME: Graesal, Madrid.
DEPOSITO LEGAL: M-30455-1985.


EDITORIAL GARSÍ, S.A.
GRUPO MASSON

Edita: EDITORIAL GARSÍ, S. A.
Juan Bravo, 46. 28006 Madrid. Teléfono (91) 402 12 12.
Avda. Príncipe de Asturias, 20. 08012 Barcelona.
Teléfono (93) 415 45 44



ATENCIÓN AL CLIENTE
902-21 00 74


ASOCIACION
DE PRENSA
PROFESIONAL

Editorial Board*

Microbial Ecology

Juan J. Borrego, Universidad de Málaga, Málaga, Spain
Yehuda Cohen, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel
Juan Iriberry, Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain

Microbial Genetics

Josep Casadesús, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain
Moselio Schaechter, San Diego State University, San Diego, CA, USA

Microbial Taxonomy and Phylogeny

Antonio Ventosa, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain
Hans G. Trüper, University of Bonn, Bonn, Germany

Medical Microbiology

J. Claudio Pérez Díaz, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain
Manuel de la Rosa, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

Morphology and Ultrastructure

Enrico Cabib, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Isabel Esteve, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Mycology

Salomón Bartnicki-García, University of California-Riverside, Riverside, CA, USA
Josep M. Torres-Rodríguez, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Soil Microbiology

José Olivares, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain
Tomás Ruiz Argüeso, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain

Virology and Immunology

Esteban Domingo, Centro de Biología Molecular, CSIC-UAM, Cantoblanco, Spain
Mariano Esteban, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Cantoblanco, Spain

Former Editors-in-Chief

Rubens López, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain
Juan A. Ordóñez, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

* See addresses in pp. 4 and 151–152.

[MICROBIOLOGÍA SEM 12(1): 1–156 (1996)]

Internet location:

The index of the latest issue of the Journal can be found in the Internet at the following URL:
<http://www.bcn.servicom.es/ImasD.kiosko.html#C-Vida>

Instructions to Authors:

Information about the Journal, including instructions on the preparation and submission of manuscripts, is published on pp. 149–150 of this issue, and may also be obtained from the Editorial Office.

Publication Board

Editor-in-Chief

Ricard Guerrero, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain

Secretary General

Jordi Mas-Castellà, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain

Members

Jordi Barbé, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Josep Guarro, Universidad Rovira i Virgili, Reus (Tarragona), Spain

Enric Herrero, Universidad de Lleida, Lleida, Spain

Josep M. Monfort, IRTA, Monells (Girona), Spain

Emili Montesinos, Universidad de Girona, Girona, Spain

Carles Pedrós-Alió, Instituto de Ciencias del Mar, CSIC, Barcelona, Spain

Guillem Prats, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Managing Coordinator

Carmen Chica

Staff Editor

Mercè Piqueras

Editorial office:

Microbiología SEM
Apartado 16009
E-08080 Barcelona
Spain
Tel. +34-3-4482373. Fax +34-3-3341079.
E-mail: guerrero@bcn.servicom.es

SEM Secretariat address:

Isabel Perdiguero
Sociedad Española de Microbiología
Serrano, 117
E-28006 Madrid
Spain
Tel.: +34-1-5613381. Fax: +34-1-5613299.

Preparation and layout of originals by:

Ana Fernández de Castillo
Isabel Gallego
Eulàlia Massana

With the collaboration of Begoña Gómez Miranda (Madrid) and Richard Pike (Barcelona).

Microbiología SEM and the Spanish Society for Microbiology acknowledge the assistance of various people and centers of the **Universidad de Barcelona**.

Editorial Board addresses

Salomón Bartnicki-García
Department of Plant Pathology
University of California-Riverside
Riverside, CA 92521. USA

Juan J. Borrego
Departamento de Microbiología
Universidad de Málaga
Campus Universitario Teatinos
29071 Málaga. Spain

Enrico Cabib
National Institutes of Health
Bldg. 10 Room 9H-11
Bethesda, MD 20892. USA

Victoriano Campos
Fac. Ciencias Básicas y Matemáticas
Universidad Católica de Valparaíso
Av. Brasil, 2950
Valparaíso. Chile

Josep Casadesús
Departamento de Genética
Facultad de Biología
Universidad de Sevilla
41012 Sevilla. Spain

Yehuda Cohen
Institute of Life Science
The Hebrew University of Jerusalem
Givat Ram Campus
91904 Jerusalem. Israel

Esteban Domingo
Centro de Biología Molecular
CSIC-Univ. Autónoma de Madrid
28049 Cantoblanco (Madrid). Spain

Mariano Esteban
Centro Nacional de Biotecnología
CSIC
28049 Cantoblanco (Madrid). Spain

Isabel Esteve
Instituto de Biología Fundamental
Universidad Autónoma de Barcelona
08193 Bellaterra (Barcelona). Spain

Margarita Flores
Departamento de Microbiología III
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid. Spain

M. Luisa García López
Dpto. de Higiene y Tecnol. Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad de León
24071 León. Spain

Juan C. Gutiérrez
Departamento de Microbiología III
Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid. Spain

Continued on p. 151

CONTENTS

	Page
Editorial	7
First BioScience Symposium (Madrid, April 4–7, 1995)	
Origins and evolution of antibiotic resistance. <i>Davies, J.</i>	9
Ancestral relationships of the major eukaryotic lineages. <i>Sogin, M. L., Morrison, H. G., Hinkle, G., Silberman, J. D.</i>	17
Diversity of eukaryotic microorganisms: computer-based resources, the <i>Handbook of Protoctista</i> and its <i>Glossary</i> . <i>Margulis, L., Olendzenski, L., Dolan, M., MacIntyre, F.</i>	29
Preliminary studies on the adaptation of retroviral vectors to gene targeting. <i>Martín, F., Jean-Mairet, Y., Talavera, A.</i> [In Spanish]	43
Significance of <i>Chlamydia pneumoniae</i> as a new respiratory pathogen. <i>Bartolomé, C., Mata, M., Bernárdez, I.</i> [In Spanish]	51
Effect of growth conditions on viscosity and emulsifying activity of V2-7 biopolymer from <i>Volcaniella eurihalina</i> . <i>Martínez-Checa, F., Calvo, C., Caba, M. A., Ferrer, M. R., Béjar, V., Quesada, E.</i> [In Spanish]	55
Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by <i>Lactococcus lactis</i> . <i>Rodríguez, J. M., Dodd, H. M.</i>	61
Optimization of the production of a bacteriocin from <i>Haloferax mediterranei</i> Xia3. <i>Platas, G., Meseguer, I., Amils, R.</i>	75
<i>Dipodascus magnusii</i> (Saccharomycetes) contains multiple glucose-6-phosphate dehydrogenases with different NAD ⁺ /NADP ⁺ dependencies. <i>Krállová, B., Valentová, O., Demnerová, K., Silhánková, L.</i>	85
Separation and partial purification of β -glucosidase and two endoglucanases in <i>Aspergillus niveus</i> . <i>Taj-Aldeen, S. J., Alkenany K. I.</i>	91
A second <i>Escherichia coli</i> gene with similarity to <i>gapA</i> . <i>Hidalgo, E., Limón, A., Aguilar, J.</i>	99
Perspectives	
Short history of the Spanish Society for Microbiology, III. 1977–1983. <i>García Mendoza, C.</i> [In Spanish]	107
The journal of the SEM, from 1947 to 1995. <i>Isamat, D., Navarrete, A., Fernández de Castillo, A.</i> [In Spanish]	117
Opinion	
Language, gender and science. <i>Keller, E. F.</i>	127
Ways of making science. <i>Guerrero, R.</i> [In Spanish]	131
Book reviews	137
Instructions to authors	149
Editorial Board addresses	151

ÍNDICE

	Página
Editorial	7
Primeras Jornadas de BioCiencia (Madrid, 4-7 de abril de 1995)	
Origins and evolution of antibiotic resistance. <i>Davies, J.</i>	9
Ancestral relationships of the major eukaryotic lineages. <i>Sogin, M. L., Morrison, H. G., Hinkle, G., Silberman, J. D.</i>	17
Diversity of eukaryotic microorganisms: computer-based resources, the <i>Handbook of Protoctista</i> and its Glossary. <i>Margulis, L., Olendzenski, L., Dolan, M., MacIntyre, F.</i>	29
Estudios preliminares de la adaptación de vectores retrovíricos para la terapia génica de sustitución. <i>Martín, F., Jean-Mairet, Y., Talavera, A.</i>	43
Importancia de <i>Chlamydia pneumoniae</i> como nuevo patógeno respiratorio. <i>Bartolomé, C., Mata, M., Bernárdez, I.</i>	51
Efecto de las condiciones nutricionales sobre la viscosidad y capacidad emulgente del biopolímero V2-7 de <i>Volcaniella eurihalina</i> . <i>Martínez-Checa, F., Calvo, C., Caba, M. A., Ferrer, M. R., Béjar, V., Quesada, E.</i>	55
Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by <i>Lactococcus lactis</i> . <i>Rodríguez, J. M., Dodd, H. M.</i>	61
Optimization of the production of a bacteriocin from <i>Haloferax mediterranei</i> Xia3. <i>Platas, G., Meseguer, I., Amils, R.</i>	75
<i>Dipodascus magnusii</i> (Saccharomycetes) contains multiple glucose-6-phosphate dehydrogenases with different NAD ⁺ /NADP ⁺ dependencies. <i>Králová, B., Valentová, O., Demnerová, K., Silhánková, L.</i>	85
Separation and partial purification of β -glucosidase and two endoglucanases in <i>Aspergillus niveus</i> . <i>Taj-Aldeen, S. J., Alkenany K. I.</i>	91
A second <i>Escherichia coli</i> gene with similarity to <i>gapA</i> . <i>Hidalgo, E., Limón, A., Aguilar, J.</i>	99
Perspectivas	
Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, III. De 1977 a 1983. <i>García Mendoza, C.</i> ...	107
La revista de la SEM, de 1947 a 1995. <i>Isamat, D., Navarrete, A., Fernández de Castillo, A.</i>	117
Opinión	
Language, gender and science. <i>Keller, E. F.</i>	127
Maneras de hacer ciencia. <i>Guerrero, R.</i>	131
Revisión de libros	137
Normas para los autores	149
Direcciones de los miembros del Consejo Editorial	151

Editorial *

En lo que respecta a la ciencia y tecnología microbiológicas, el panorama latinoamericano muestra unos picos notables sobre un fondo de escasa consistencia. La microbiología en los países de América Latina ha tenido una larga trayectoria, que se prolonga hasta nuestros días. Pero una escasez generalizada de recursos ha hecho que los beneficios del progreso científico y tecnológico apenas alcancen a sus habitantes. Por ello, a pesar de haber conseguido logros significativos, la tendencia general resulta desalentadora para muchos observadores. Queremos compartir con los lectores de *Microbiología SEM* la confianza en que hay razones para esperar una mejoría notable de la situación. Deseamos que esos mismos lectores compartan nuestro interés por el estado de la microbiología en una parte del mundo tan profundamente relacionada con España.

Ha habido descubrimientos de importancia internacional realizados en América Latina, y los más conocidos corresponden al área de la microbiología médica. Es fácil recordar epónimos y figuras famosas en nombres tales como enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, o *Rochalimaea quintana*, que adornan el léxico microbiológico. Los microbiólogos latinoamericanos han pasado a formar parte del saber popular de nuestra disciplina, algunos por sus sacrificios personales, como el peruano Daniel Carrión, otros por la fuerza de sus convicciones científicas, como el cubano Carlos Finlay. Esta tradición se remonta al origen de nuestra ciencia, cuando algunos latinoamericanos viajaron a Europa con el afán de conseguir los conocimientos necesarios en los laboratorios pioneros, especialmente en los de Pasteur y sus discípulos.

Las contribuciones de los científicos de esta parte del mundo han continuado hasta nuestros días, ampliándose así la gama de descubrimientos; de los fundamentos básicos a la aplicación. Institutos de renombre, especialmente en algunas naciones, han conseguido niveles muy significativos de productividad y bien merecido prestigio. Brasil, Argentina, México, Chile, Venezuela están entre los países con más larga tradición en la investigación y cuentan con instituciones de primera línea. Otros, por suerte,

* *Microbiología SEM* se propone dedicar el editorial de los próximos números a comentar la situación actual de la microbiología en América Latina. Hace ya algunos años que se observa un resurgir de la investigación científica en esos países, lo cual es algo que a nosotros, conocedores de lo difícil que resulta ponerse al lado de los países más desarrollados científicamente, no puede por menos de alegrarnos. Y no ya por los lazos históricos, tantas veces invocados pero pocas ejercidos, sino por el conocimiento que tenemos de las dificultades compartidas: lengua, recursos, estructura científica y universitaria, etc. Hemos pedido a diversos investigadores, bien conocidos por su categoría científica pero a la vez conocedores directos del tema y del medio, que expresen su opinión a este respecto y que indiquen las formas de ayuda más adecuadas que estamos en condición de ofrecerles desde Europa. Agradecemos muy sinceramente su colaboración.

están ahora uniendo sus esfuerzos. En este sentido merece destacarse el establecimiento en Cuba de una destacada empresa biotecnológica, el desarrollo en Colombia de la más prometedora vacuna contra la malaria y los avances en Costa Rica en el conocimiento de las bases genéticas de la sordera humana.

Para muchos científicos latinoamericanos, llevar adelante su investigación exige las más de las veces un sacrificio personal y la superación de continuas frustraciones. La necesidad de ayuda nunca ha sido mayor. Y, si se quiere que muchos esfuerzos no caigan en saco roto, es preciso atender la llamada y actuar. Evidentemente, hay una clase de fondos y recursos que sólo pueden proporcionar los gobiernos poderosos o los filántropos ricos. No obstante, es factible el apoyo individual desde todos los países, por medio de programas de cooperación científica. Las posibilidades de colaboración son inmensas y vienen avaladas por la experiencia de una gran cantidad de investigaciones conjuntas. Sabemos que la proporción de proyectos con participación de científicos de otros países es aproximadamente la misma para América Latina que para Europa y Norteamérica. Muchos de estos estudios se benefician de las condiciones locales, como la existencia de hábitats especiales o de enfermedades limitadas geográficamente, aunque no todos están restringidos a tales factores. Hay que destacar que en los proyectos que han resultado más fructíferos y permanentes los socios latinoamericanos ocupan una posición equiparable a la de investigador principal o líder. Insistimos en este punto porque la experiencia enseña que las interacciones con éxito suelen ser las que se establecen sobre actitudes cooperativas y de respeto mutuo. Cuando se dan, el beneficio afecta a todas las partes.

En el futuro, la investigación microbiológica en América Latina no seguirá los cánones tradicionales. La expansión sin precedentes de nuestra capacidad de comunicación coincide con la simplificación de importantes técnicas moleculares, que permiten, por ejemplo, utilizar la reacción en cadena de la polimerasa en laboratorios poco equipados, usando reactivos baratos y adecuados. El poder llevar la biología molecular fuera del laboratorio constituye una democratización de esas técnicas, cuyo uso, confiamos, podrá generalizarse. Todo ello, permitirá a los países con menos recursos saltarse los pasos tradicionales en el desarrollo tecnológico. Lo mismo puede decirse, con al menos igual énfasis, de la transferencia de información. La desnudez que presentan las estanterías de la mayor parte de las bibliotecas universitarias será mucho menos importante en la nueva era de información electrónica que se avecina.

El desarrollo tecnológico e informativo hará que los países de América Latina incrementen su participación en el estudio de la naturaleza a través de comunidades de científicos de cualquier parte del planeta. Todos nos podemos beneficiar.

Moselio Schaechter

San Diego State University

Cristián Orrego

San Francisco State University

Los dos autores, con amplio conocimiento y experiencia sobre el estado de la microbiología en América Latina, residen en California. Moselio Schaechter, que vivió nueve años en Ecuador, es Distinguished Professor Emeritus de la Tufts University, en Boston, en cuyo Department of Molecular Biology and Microbiology trabajó durante 33 años (de ellos, más de veinticinco dirigiéndolo). En 1985 fue presidente de la American Society for Microbiology (ASM) y de 1986 a 1994 jefe del comité de actividades internacionales de la ASM, grupo que dedica especial atención a América Latina. Cristián Orrego, nacido en Chile, es doctor en bioquímica. Ha sido también miembro del comité de actividades internacionales de la ASM y actualmente es profesor del Department of Biology de la San Francisco State University.

Correspondencia a: Moselio Schaechter, Department of Biology, San Diego State University, San Diego, CA 92182, USA. Tel.: +1-619-5744291. Fax: +1-619-5945676. E-mail: mschaech@sunstroke.sdsu.edu

Origins and evolution of antibiotic resistance

Julian Davies

*Department of Microbiology and Immunology, The University of British Columbia,
Vancouver, B.C., Canada*

Received 6 September 1995/Accepted 28 September 1995

Summary

The massive prescription of antibiotics and their non-regulated and extensive usage has resulted in the development of extensive antibiotic resistance in microorganisms; this has been of great clinical significance. Antibiotic resistance occurs not only by mutation of microbial genes which code for antibiotic uptake into cells or the binding sites for antibiotics, but mostly by the acquisition of heterologous resistance genes from external sources. The physical characteristics of the microbial community play a major role in gene exchange, but antimicrobial agents provide the selective pressure for the development of resistance and promote the transfer of resistance genes among bacteria. The control of antibiotic usage is essential to prevent the development of resistance to new antibiotics.

Key words: antibiotic resistance, gene acquisition, gene exchange, horizontal gene transfer, Enterobacteriaceae

Resumen

La prescripción masiva de antibióticos, y su utilización no regulada y extensiva, ha provocado el desarrollo de resistencia a muchos antibióticos por parte de los microorganismos; este hecho tiene gran importancia clínica. La resistencia se produce no sólo por mutación de los genes microbianos que codifican la entrada de antibiótico a las células, o los lugares de unión de un antibiótico, sino principalmente por la adquisición de genes, a partir de fuentes exógenas, que confieren resistencia heteróloga. Las características físicas de la comunidad microbiana desempeñan un papel importante en los intercambios de genes, pero los agentes antimicrobianos inducen la presión selectiva para el

Correspondence to: Julian Davies. Department of Microbiology and Immunology. The University of British Columbia. #300-6174 University Boulevard. Vancouver, B.C. V6T 1Z3 Canada. Tel.: +1-604-8223308. Fax: +1-604-8226041. E-mail: jed@unixg.ubc.ca

desarrollo de la resistencia, y estimulan la transferencia de genes resistentes entre las bacterias. El control del uso de los antibióticos ya conocidos es esencial para evitar el desarrollo de resistencias a los nuevos antibióticos que se empiezan a utilizar.

Introduction

Bacteria have been present on this planet for something like 3.5×10^9 years. During this time, the microbial population has survived many catastrophes, such as the accumulation of toxic oxygen in the earth's atmosphere, which provided the strong selective pressure for anaerobic organisms to develop the capacity for aerobic metabolism. Among the most recent catastrophes (to our knowledge) have been exposure of microbes to a variety of toxic human-made chemicals such as industrial wastes, insecticides, herbicides, and the introduction of antibiotics. Since the late 1940's humankind has released a continuous and increasing supply of antimicrobial agents into the environment (as much as 10^9 – 10^{10} kg over this period according to some estimates). However, once again bacteria have survived, in this case because of their ability to manipulate genetic information and to mutate rapidly, but more importantly to inherit,

express, and disseminate exogenous genes. As a result, very serious public health problems have been created at a time when it was thought that infectious diseases had been conquered (6). Due to the over-dependence of the medical profession on antibiotics for the treatment of infectious diseases, the appearance and spread of multiply drug-resistant bacteria has seriously eroded the efficacy of antibiotic treatment. Antibiotic-resistant bacteria have become epidemic in many countries and situations, and there are grave concerns for the continued effectiveness of antimicrobials for the treatment of infectious diseases (19). Table 1 lists the ten most important microbial pathogens identified in North America; many are multiply antibiotic-resistant. It should be noted that at the beginning of the "antibiotic era", these microbes were all susceptible to the agents which now fail to cure them. In other words, a pre-antibiotic era has been recreated (6).

TABLE 1. Top ten drug-resistant microbes*

1. Enterobacteriaceae	bacteremia, pneumonia, urinary tract infections, surgical wound infections
2. <i>Enterococcus</i>	bacteremia, urinary tract infections, surgical wound infections
3. <i>Haemophilus influenzae</i>	epiglottitis, meningitis, otitis media, pneumonia, sinusitis
4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberculosis
5. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	gonorrhea
6. <i>Plasmodium falciparum</i>	malaria (protist)
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	bacteremia, pneumonia, urinary tract infections
8. <i>Shigella dysenteriae</i>	severe diarrhea
9. <i>Staphylococcus aureus</i>	bacteremia, surgical wound infections, pneumonia
10. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	meningitis, pneumonia

* This list does not include viruses.

The questions to be addressed in this brief review concern:

- (i) the origins of antibiotic resistance genes,
- (ii) the mechanisms by which bacteria are able to gain access to resistance determinants in the environment,
- (iii) the mechanisms by which antibiotic resistance genes are disseminated (shared!).

Origins

There are many structural varieties of antibiotic molecules and many different modes of inhibitory action (12); resistance mechanisms also take a variety of biochemical forms (14) (Fig. 1). In the simplest cases, mutation in a microbial gene encoding a structural component of the antibiotic target can alter the binding site for the antibiotic and so lead to the development of resistance. This has been demonstrated in many cases (Table 2). Historically, the most significant

examples are found in the case of *Mycobacterium tuberculosis*, in which multiple and successive mutations give rise to multiply drug-resistant TB, due to independent alterations in the binding affinity of a number of different antibiotic targets (4). *M. tuberculosis* strains have been isolated that are resistant to five or more antimicrobial agents because of sequential mutations in five or more structural genes in the bacterium (15, 26). Similarly, the recent rise in resistance to the fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* is due to mutation (16, 25). Ciprofloxacin and related quinolones, which act by inhibiting DNA gyrase activity in sensitive cells, are powerful therapeutic agents for a variety of microbial infections. With extensive use of the fluoroquinolones, resistant mutations often develop during the course of infection treatment and are becoming prevalent in the microbial population, with the consequence that these antimicrobials are declining in efficacy.

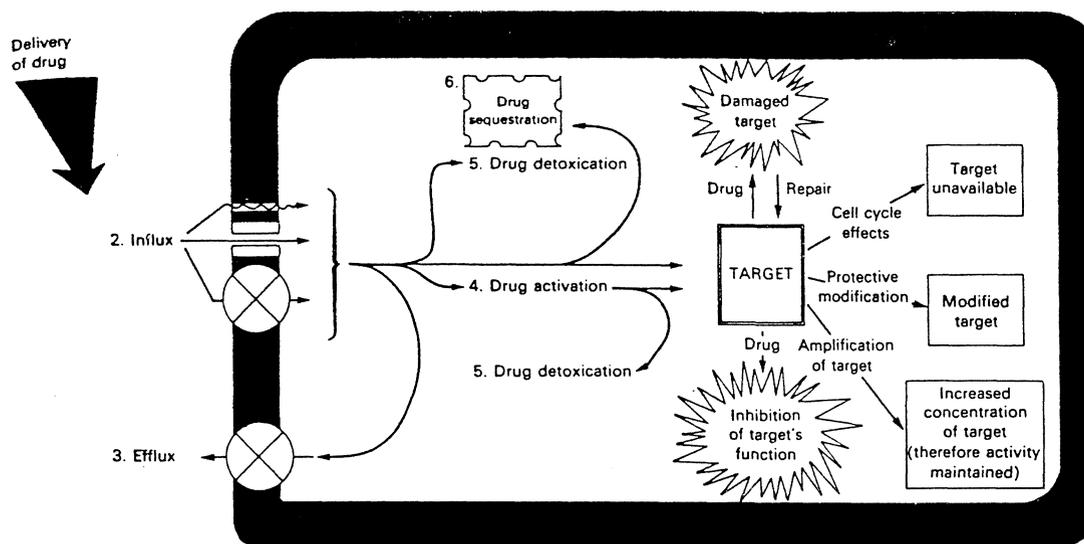


FIG. 1. Biochemical mechanisms of resistance. For more detailed information, see Hayes and Wolf (14).

TABLE 2. Routes to antibiotic resistance mechanisms

Mechanism*	Examples	Mutation	Acquisition
Reduced permeability	gentamicin	+	+
Active efflux	tetracycline	(+)	+
Target alteration	erythromycin, streptomycin	+	+
Drug inactivation	gentamycin, β -lactams	+	+
By-pass	sulphonamides		+
Immunity	bleomycin		+
Amplification	trimethoprim	+	
Sequestration	β -lactams	+	

* The known biochemical mechanisms of resistance and their development by mutation or acquisition. It should be noted that acquired antibiotic resistance determinants may evolve expanded substrate range by mutation (e.g., β -lactams).

However, the vast majority of antibiotic resistance in bacterial pathogens is not due to mutation, but to the acquisition of heterologous resistance determinants from exogenous sources (10). These are "foreign" genes of unknown origin, presumed to originate in other bacterial genera which are intrinsically resistant to antibiotics. The best example of presumed inheritance of resistance is the genes determining aminoglycoside-modifying enzymes, which appear to have their origins in the Actinomycetes and related species that produce the aminoglycoside antibiotics (2, 22). Resistance to aminoglycosides is widespread among bacterial pathogens and in all known cases is due to the acquisition of foreign genes. Similarly, the genes encoding the ribosome methylases that determine resistance to erythromycin and related macrolide antibiotics are common in *S. aureus* and other Gram-positive pathogens and are thought to have been inherited from the macrolide-producing Streptomycetes (29).

To give another example, successful antibiotic treatment of *S. aureus* has been compromised world-wide by the presence of the widely distributed methicillin-resistance determinant which comes from an unknown (apparently) single source that was inherited by the pathogen during 1961

(23). The mysterious *mec* gene cluster is almost certainly bacterial in origin, but from what organism and where and how?

The two processes of mutation and acquisition are frequently superimposed, especially in the evolution of resistance mechanisms by expansion of the substrate range of antibiotic-modifying enzymes, as is manifest in the generation of the extended-spectrum β -lactamases and resistance to the newer generation cephalosporins (5, 11).

Acquisition

Current evidence indicates that there is a large pool of antibiotic resistance genes (or functionally related genes) in the environment, and that these genes can be acquired when antibiotic-sensitive microbes are subjected to the pressure of antibiotic usage. Little was known of the mechanism by which the acquisition of resistance genes takes place other than the fact that most bacteria take up exogenous DNA naturally, but resistance genes must be acquired in functional, expressed forms to be of value to their hosts. The research of Hall and Stokes and their collaborators has shed considerable light on this question; it now appears that the

DNA segments encoding resistance to a number of different antibiotics are inserted into naturally occurring gene-expression cassettes named integrons (13). The molecular genetics of the integron elements has been extensively studied by the Australian group and others; the general structure of an integron is shown in Fig. 2. All of the components required for the acquisition and expression of coding sequences are contained in this genetic element; these include an integrase related to other site-specific recombination enzymes which promotes the insertion of resistance-encoding fragments into a specific site of the integron, just downstream from strong transcription and translation start signals (17). The subsequent incorporation of an integron cassette into an extrachromosomal replicon creates resistance plasmids. The integron model provides a good

explanation for the way in which tandemly arrayed antibiotic genes have been assembled in the form of multiply drug-resistant plasmids in many Gram-negative bacteria. In some cases, the integron structure has been shown to contain as many as six different antibiotic resistance genes, each inserted into the same site by the action of the integrase (3). A veritable "collection-box" for antibiotic resistance determinants! While this mechanism of heterologous gene acquisition has been demonstrated to occur in the Enterobacteriaceae, there is relatively little knowledge of how the process of antibiotic resistance gene acquisition occurs in Gram-positive bacteria such as *S. aureus*.

The integron mechanism of resistance-gene insertion answers the question of how acquisition occurs, but another is asked; what is the origin and evolution of the integron structure? These element

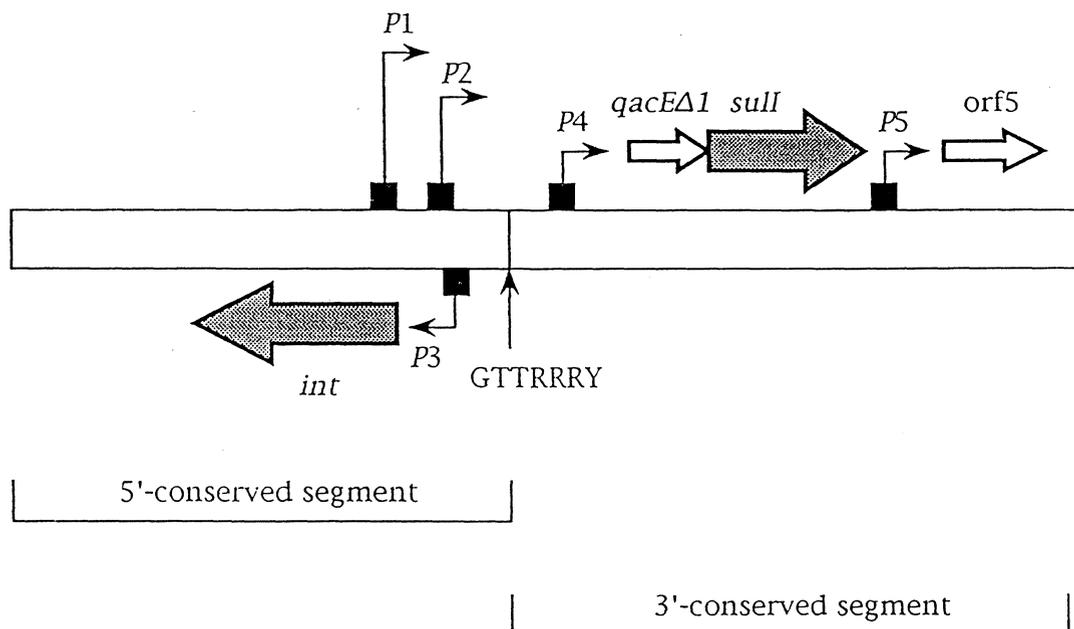


FIG. 2. The structure of an integron. The 5' segment encodes a site-specific integrase (*int*) that promotes the insertion of antibiotic resistance genes at the GTTRRY site, downstream of promoters P1 and P2. The 3' segment encodes genes for resistance to quaternary ammonium compounds (*qac*) and sulfonamides.

seem to have been custom designed for the purpose of generating resistance plasmids; an intriguing similarity to lysogenic bacteriophage is strongly implied, but no relationship has been identified. Additional information on integron function may provide clues to the origins of more complex genomes, such as the bacterial chromosome itself. Whatever the outcome, it is obvious that microbes are past masters in the processes of genetic engineering, and once resistance plasmids are constructed, they are made available to other members of the microbial community, as described below.

Gene transfer

Horizontal and vertical gene transfer in nature may take place by a variety of mechanisms which have been demonstrated in the laboratory (18) (Table 3). It is possible that only some of these processes occur in nature; on the other hand, other as yet unidentified mechanisms of microbial gene exchange are likely to occur in the environment. Bacteria exist as complex communities in nature and unfortunately the biological roles of inter-microbial interactions cannot be assessed in the laboratory; our ignorance of these processes and their importance in the maintenance of stable ecologies is truly profound! From laboratory studies at least, transformation and conjugation

are recognized as the gene exchange mechanisms that have the broadest host range (7). It has been argued that in the harsh conditions of the environment transformation may be a rare event, except under defined conditions, whereas conjugation may be favoured because the genetic material to be transferred is protected from attack by free nucleases. In addition, conjugal DNA transfer has been shown to partially overcome host restriction systems, due to the transfer of single-stranded DNA which may be refractory to endonuclease action in the recipient (20). The recent demonstrations that conjugal DNA transfer can occur between such distant genera as *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and Streptomycetes (8) would suggest that factors to promote specific mating-cell interactions (encoded by the donor strain) are not essential and that the primary role of the transfer genes in intergeneric crosses is simply to provide a biological “motor” to drive DNA into the recipient, once some form of inter-membrane association between donor and recipient microbe, a “conjugation junction”, is established. Consistent with this, electron microscopic studies (unpublished) from our laboratory suggest that structures resembling conjugation junctions can form in the absence of bacterial sex factors when different bacterial species are mixed.

The acquisition of a resistance gene(s) by a microbe may take place as a result of a cascade of multi-host transfers in natural bacterial communities before the resistance gene can be identified in a known pathogen, for example within the gastrointestinal tract. The primary donor and final recipient strains may be isolated, but it is not known what happens in between! Present understanding of the mechanisms and factors involved in gene transfer in natural microbial communities is very limited. It is probable that not only the physical characteristics of the community but also other components, such as the presence of low molecular weight effectors, play important roles

TABLE 3. Gene transfer mechanisms in microbes*

Transduction (phage)
Transformation
Conjugation
Electrotransformation
Fusion

* These processes have been demonstrated in the laboratory; their relative importance in nature is not known.

in natural gene exchanges (21). For example, antibiotics themselves have been shown to act as promoters of conjugal gene transfer and transposition (24); thus a "catch-22" situation is created in antibiotic therapy: the antimicrobial agents not only provide the selection pressure for resistance but many also promote the transfer of resistance genes among bacteria. The demonstration that use of antibiotics contributes to the resistance pool by providing resistance determinants in the form of DNA as contamination carried over from the producing organisms further complicates the situation (27, 28).

Concluding remarks

Humankind has seriously underestimated the power of microbes and their ability to survive extreme environmental insults; one should hardly have expected that more than 3×10^9 years of experience in survival would be forgotten in a mere 50 years!

Since microbes are capable, sooner or later, of developing resistance to any toxic agent, the current crisis in infectious disease therapy was predictable, but its development was largely ignored (6, 19). Now that the problem is well-entrenched, what can be done to restore the levels of efficacy of the antimicrobial agents needed for disease treatment? For those antibiotics that have been in extensive use, such as the tetracyclines, macrolides, β -lactams and aminoglycosides, we are well past the point of no return. There is simply too large a pool of resistance genes in nature. The only reasonable approach is to practice prudence in prescribing antibiotics and to place increased emphasis on infection control and hospital hygiene. The concept of employing an antibiotic in combination with a resistance-enzyme in-

hibitor has already been demonstrated successfully in the case of the β -lactams (1). Studies of agents that would effectively interfere with other resistance mechanisms and their dissemination are desirable, and the search for compounds that potentiate the activity of antibiotics deserves more attention.

For the novel antibiotics that (we hope) will be discovered and introduced in the future, every step must be taken to ensure that microbes do not have access to resistance genes and that antibiotics are used in strictly controlled treatment regimes designed to discourage the development of resistance by mutation or acquisition. Preemptive measures could also be taken; since antibiotic-producing organisms possess resistance mechanisms that are, more often than not, biochemically identical to the antibiotic-resistance mechanisms found in pathogens, studies of these resistance mechanisms could provide a forewarning of what to expect, and modified compounds refractory to resistance mechanisms could be designed (9). Finally, no antibiotic or close structural relative of any antimicrobial agent employed in human therapy should be used for any purpose other than the treatment of identified bacterial infections—and this includes prophylactic use in humans and animals and in agriculture or aquaculture. These practices must be rigorously enforced on a world-wide basis if they are to be effective in preventing the spread of antibiotic resistance.

Acknowledgements

I wish to thank Dorothy Davies for preparing the manuscript and am grateful to the National Science and Engineering Council (Canada) for financial support.

References

1. Ball, A. P., Geddes, A. P., Davey, P. G., Farrell, I. D., Brookes, G. R. (1980). Clavulanic acid and amoxicillin: a clinical, bacteriological, and pharmacological study. *Lancet* 1980(i), 620.
2. Benveniste, R., Davies, J. (1973). Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2276–2280.
3. Bissonnette, L., Roy, P. H. (1992). Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **174**, 1248–1257.
4. Bloom, B. R., Murray, C. J. L. (1992). Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **257**, 1055–1064.
5. Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211–1233.
6. Cohen, M. L. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* **257**, 1050–1055.
7. Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1447–1451.
8. Davies, J. (1990). Interspecific gene transfer: where next? *Trends Biotechnol.* **8**, 198–203.
9. Davies, J. (1992). Another look at antibiotic resistance. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1553–1559.
10. Davies, J. (1995). Vicious circles: looking back on resistance plasmids. *Genetics* **139**, 1465–1468.
11. Frère, J.-M. (1995). β -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* **16**, 385–395.
12. Gale, E. F., Cundliffe, E., Reynolds, P. E., Richmond, M. H., Waring, M. J. (ed.) (1981). *The Molecular Basis of Antibiotic Action*. John Wiley, Chichester, United Kingdom.
13. Hall, R. M., Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**, 593–600.
14. Hayes, J. D., Wolf, C. R. (1990). Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem. J.* **272**, 281–295.
15. Honoré, N., Cole, S. T. (1994). Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 238–242.
16. Kureishi, A., Diver, J. M., Beckthold, B., Schollaardt, T., Bryan, L. E. (1994). Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from resistant strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1944–1952.
17. Lévesque, C., Brassard, S., Lapointe, J., Roy, P. H. (1994). Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene* **142**, 49–54.
18. Mazodier, P., Davies, J. (1991). Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 147–171.
19. Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064–1073.
20. Read, T. D., Thomas, A. T., Wilkins, B. M. (1992). Evasion of type I and type II DNA restriction systems by IncI1 plasmid Collb-P9 during transfer by bacterial conjugation. *Mol. Microbiol.* **6**, 1933–1941.
21. Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., Williams, P. (1995). The bacterial “enigma”: cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.* **16**, 615–624.
22. Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**, 138–163.
23. Spratt, B. G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* **264**, 388–393.
24. Stevens, A. M., Shoemaker, N. B., Li, L.-Y., Salyers, A. A. (1993). Tetracycline regulation of genes on *Bacteroides* conjugative transposons. *J. Bacteriol.* **175**, 6134–6141.
25. Takenouchi, T., Ishii, C., Sugawara, M., Tokue, Y., Ohya, S. (1995). Incidence of various *gyrA* mutants in 451 *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japan and their susceptibilities to 10 fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1414–1418.
26. Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M. J., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T. (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**, 647–650.
27. Webb, V., Davies, J. (1993). Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes? *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2379–2384.
28. Webb, V., Davies, J. (1994). Accidental release of antibiotic-resistance genes. *Trends Biotechnol.* **12**, 74–75.
29. Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 577–585.

Ancestral relationships of the major eukaryotic lineages

Mitchell L. Sogin,* Hilary G. Morrison, Gregory Hinkle,
Jeffrey D. Silberman

*Center for Molecular Evolution, Marine Biological Laboratory, Woods Hole,
Massachusetts, USA*

Received 15 November 1995/Accepted 5 December 1995

Summary

Molecular systematics has revolutionized our understanding of microbial evolution. Phylogenetic frameworks relating all organisms in this biosphere can be inferred from comparisons of slowly evolving molecules such as the small and large subunit ribosomal RNAs. Unlike today's text book standard, the "Five Kingdoms" (plants, animals, fungi, protists and bacteria), molecular studies define three primary lines of descent (Eukaryotes, Eubacteria, and Archaeobacteria). Within the Eukaryotes, the "higher" kingdoms (Fungi, Plantae, and Animalia) are joined by at least two novel complex evolutionary assemblages, the "Alveolates" (ciliates, dinoflagellates and apicomplexans) and the "Stramenopiles" (diatoms, oomycetes, labyrinthulids, brown algae and chrysophytes). The separation of these eukaryotic groups (described as the eukaryotic "crown") occurred approximately 10^9 years ago and was preceded by a succession of earlier diverging protist lineages, some as ancient as the separation of the prokaryotic domains. The molecular phylogenies suggest that multiple endosymbiotic events introduced plastids into discrete eukaryotic lineages.

Key words: molecular systematics, eukaryotic lineages, 16S rRNA, phylogeny, protists

* *Correspondence to:* Mitchell L. Sogin. Center for Molecular Evolution. Marine Biological Laboratory. Woods Hole, MA 02543. USA. Tel.: +1-508-5483705. Fax: +1-508-4574727. E-mail: sogin@evol5.mbl.edu

Resumen

La sistemática molecular ha revolucionado nuestra comprensión de la evolución microbiana. La estructura filogenética que relaciona todos los organismos de la biosfera puede deducirse comparando moléculas de evolución lenta, tales como los RNA de la subunidad pequeña y grande del ribosoma. A diferencia del modelo estándar de los “Cinco Reinos” (plantas, animales, hongos, protistas y bacterias), los estudios moleculares definen tres líneas primarias de descendencia (Eucariotas, Eubacterias y Archeobacterias). Dentro de los Eucariotas, a los reinos “superiores” (Hongos, Plantas y Animales) se les unen al menos dos nuevos y complejos conjuntos evolutivos, los “Alveolados” (ciliados, dinoflagelados y apicomplejos) y los “Estramenópidos” (diatomeas, oomicetos, laberintúlidos, algas pardas y crisófitos). La separación de esos grupos eucarióticos (descritos como la “Corona” eucariótica) ocurrió hace aproximadamente 10^9 años, y fue precedido por una sucesión de linajes procarióticos divergentes más primitivos, algunos tan antiguos como la separación de los dominios procarióticos. Estudios filogenéticos moleculares sugieren que diversos linajes eucarióticos adquirieron plástidos por mecanismos endosimbióticos múltiples.

Introduction

Comparative sequence analysis lies at the heart of virtually all molecular approaches in modern biology. It affects how we think about evolution of catalytic function, development and behavior. Sequence conservation patterns dictate the design of diagnostic probes for the detection of pathogens while molecular phylogeny constrains the selection of model systems for studying disease processes. Today we are awash in genome sequence data from human and model organisms. Comparative molecular biology/evolution is the only effective means to decipher this rapidly expanding database. Conservation patterns in macromolecular sequences related by common descent provide clues about function and higher order structure, as well as information about their origins and subsequent refinement. Such analyses inspire experimental designs that can reveal new insights into biological phenomena.

The interpretation of comparative molecular analyses is contingent upon knowledge of the evo-

lutionary relationships among the studied taxa. Many plant and animal phyla are rich in morphological and fossil record information (3, 28). For these groups, systematics is possible without resorting to molecular methods. In contrast, the geological record is silent for most microbial groups; comparative morphological studies provide few clues about phylogenetic relationships for unicellular organisms. Micro-paleontologists cite a great abundance of prokaryotic micro-fossils and skeletonized protists (21), but soft-bodied taxa are not well preserved. Furthermore, microbiologists seldom agree about the phylogenetic interpretation of presumed morphological and ultra-structural homology over large evolutionary distances.

Phylogenetic descriptions for protists are particularly problematic (26). Haeckel originally formalized the kingdom Protista (13) to represent one of the three primary lines of descent (the others being the Plantae and the Animalia). The largest obvious differences between morphologies, biochemical capacities, and life styles defined

boundaries between these major taxonomic groups. Using these criteria, traditional systematists recognized fungi as relatives of plants, assigned ciliates and flagellates to the protozoa (part of the invertebrate world), treated all alga forms as plants and assigned many protists to the Fungi (1, 8, 14). These taxonomic descriptions often produced conflicting evolutionary hypotheses and fueled arguments about which protist groups should be considered under the botanical versus the zoological nomenclature codes. The taxonomists could only agree that the Protista are of central importance in understanding the evolution of modern eukaryotes.

Certainly the earliest eukaryotes and the last common ancestors to plants, animals and fungi were protists, but there is little consensus about the details of their evolutionary history. Protists are a very complex collection of organisms that inhabit diverse terrestrial and aquatic environments or parasitize other protists and metazoans. The extent of phenotypic variation within the Protista is unequalled in the biological world (22). Because of this extreme variation, there is no agreement about which features are most useful for inferring phylogenetic relationships (4, 26, 34). Furthermore, since the rate of genotypic change is not necessarily linked to phenotypic variation, measures of genetic similarity between protists cannot be determined from traditional studies of morphology, physiology, or biochemistry.

Molecular systematics and evolution of ribosomal RNAs

Over the past fifteen years, molecular tools have forever changed studies of microbial evolution by providing more robust phylogenetic frameworks based upon objective genetic criteria

(36, 37). Comparisons of small subunit ribosomal rRNA sequences (16S-like rRNAs) are particularly valuable for phylogenetic inference. The small subunit rRNA database comprises the largest collection of sequences that share a common ancestry. These genes are present in all cells where their transcripts perform similar functions. Since ribosomal RNA genes do not undergo lateral transfer between organisms, molecular trees inferred from comparisons of their nucleotide sequences accurately depict the historical evolution of their corresponding genomes (29).

Ribosomal RNA coding regions display a mosaic of conservation patterns (9, 23). Rapidly evolving regions are interspersed among domains that are moderately conserved or nearly invariant in all organisms. This conservation pattern permits rRNA genes to function as "multi-handed chronometers" of evolution. The slowly evolving regions record genetic events that occurred billions of years ago. The most conserved elements presumably reflect functional domains established in the earliest common ancestors to all living systems. The rapidly evolving elements chronicle very recent speciation events. Using comparisons of ribosomal RNAs we can infer evolutionary affinities at the kingdom level (31) or we can resolve relationships within a genus (32). Full-length small subunit and large subunit rRNA sequences contain many sites that can vary independently. All rRNAs can be folded into consensus secondary structure models (12) which contain as many as fifty helical regions. These conserved helices represent independent functional domains which can be used to test for convergent evolution. Identical trees inferred from comparisons of sequence domains that vary independently must reflect divergent evolution from a common ancestor; it is improbable that functionally distinct sequences will converge at the same rate during

evolution and produce identical tree topologies.

Since 1983, the eukaryotic small subunit rRNA database has grown from three entries to more than one thousand nearly full-length sequences. Parsimony, distance or likelihood analyses (24) of these sequences allow the construction of phylogenetic frameworks that span the major “kingdoms” of eukaryotes. The proposed relationships, however, can be controversial. Critics of the rRNA phylogenetic frameworks usually cite studies that are internally inconsistent (10, 15) or at odds with everything they “know” about the biology of the considered organisms. Explanations of implausible results include selection of the “wrong” statistical technique for recovering the “correct” phylogeny (11), incorrect sequence alignments (33), or non-uniform rates of mutation in different evolutionary lineages (18).

The article “Molecular phylogeny of the animal kingdom” by Field et al. (10) is frequently cited by critics. This heroic effort (which predates PCR techniques) is based upon the “direct” reverse transcriptase mediated sequence determinations of portions of 16S rRNAs from the major animal phyla. Several incongruent phylogenies are presented and animals are described as a polyphyletic assemblage. Although not always appreciated, this analysis emphasized the difficulty in recovering evolutionary information for taxa that represent nearly simultaneous diverging lineages. Deep internal nodes for major animal lineages are separated by fewer than a single nucleotide change per

200 positions. Furthermore, the reliability of the tight branching pattern is compromised by use of partial sequences and limitations of “direct” RNA techniques; 2–3 percent of the sequence assignments are ambiguous and sequence determinations on a single strand are inherently less accurate than redundant analyses of both DNA strands. Measures of statistical significance must be considered when interpreting close branching patterns.

A ribosomal RNA framework for eukaryotes

Within the rRNA trees in Fig. 1, there are no *significant* examples of implausible relationships that cannot be explained on technical grounds. Fig. 1A is a universal phylogenetic framework based upon a distance analysis of approximately 900 sites unambiguously aligned in all of the considered taxa. We converted structural similarities to evolutionary distances (9) and inferred the tree using the “Neighbor-Joining” technique. The rRNA sequences converge upon three major assemblages: the Bacteria, the Archaea, and the Eukarya. The small subunit rRNA sequence diversity within the eukaryotic kingdom exceeds that seen among the two prokaryotic lines of descent. Organisms without mitochondria (diplomonads, trichomonads and microsporidia) diverge early. Together with pelobionts, oxymonads, retortamonads and hypermastigids, these amitochondriate taxa com-

FIG. 1 (*facing page*). Universal and Eukaryote Phylogenetic Trees. Structural similarities for 900 sites that were unambiguously aligned in a data set of more than 800 eukaryotes and 100 prokaryotes were computed and converted to evolutionary distances using the Kimura two-parameter model. The “Neighbor-Joining” method was used to infer the unrooted universal phylogeny shown in 1A. A similar computation was used to infer an unrooted phylogeny in 1B for diverse eukaryotes, but this analysis is based upon comparisons of 1200 positions that can be unambiguously aligned. Amoeboid lineages are indicated by heavy lines. Evolutionary distances in these trees are proportional to length of line segments separating taxa.

prise a group called the Archezoa (*sic*) by Cavalier-Smith (6). The branching of these groups at the base of the eukaryotic tree is consistent with the lack of mitochondria and peroxisomes, the apparent absence of a normal Golgi apparatus, the lack of sexual life cycle stages and the relatively simple constellation of proteins associated with the cytoskeleton of diplomonads (as compared to more recently diverged taxa). Parasitic lifestyles may have played a role in the survival of the early branching eukaryotes during unfavorable environmental periods, but parasitism alone cannot explain this pattern. Free living diplomonads related to *Giardia lamblia* are known and other parasitic species including *Acanthamoebae*, *Plasmodium berghei* and *Pneumocystis carinii* display late branching patterns.

The earliest branches are followed by a collage of seemingly unrelated protist lineages. The kingdom of protists is unlike that of plants, animals, and fungi. Instead of being a cohesive phylogenetic group, the Protista describe levels of organization delineated by paraphyletic lines of descent. As shown in Fig. 1B, the evolutionary diversity of protists at the gene level overwhelms that seen within the plant, animal and fungal worlds. The early amitochondriate branches are followed first by the divergence of amoebae-flagellates and then by a polytomy of the acellular slime molds, euglenozoa (euglenoids and kinetoplastids) and later-diverging eukaryotes. The many lineages that separate after this radiation but prior to the separation of plants, animals and fungi have an amoeboid phenotype. Relatively late in evolution, there was a massive phyletic radiation. The major evolutionary assemblages which diverged nearly simultaneously include the animals-fungi, the green plants-green algae, the stramenopiles and the alveolates. These late-evolving groups define the "crown" of the eukaryotic subtree (17). Alveolates

and stramenopiles are newly recognized "kingdoms" as diverse and complex as the fungi, animals or plants (25). The Alveolates include ciliates, apicomplexans and dinoflagellates. The Stramenopiles include photosynthetic forms and oomycetes, but the deepest-branching lineages in this complex group are non-photosynthetic heterotrophs (20). All members of the group have flagella with tripartite flagellar hairs not found in any other eukaryote. The flagellar hairs may have conferred a major ecological advantage for these organisms by allowing thrust reversal when swimming and thus enhanced ability to entrap prey.

Although we can chart many large-scale features, such as the composition of major evolutionary assemblages or the identity of early diverging taxa, the eukaryotic phylogenetic framework reveals several abrupt, unresolved radiations. For example, at the base of the eukaryotic tree we are unable to establish exact branching patterns (19). Biased nucleotide compositions in the rRNA genes of some taxa and an inadequate number of informative sites compromise the resolving power of rRNAs in this region of the tree. Furthermore the rRNA frameworks do not display common ancestry with a specific prokaryotic group. Late in evolution, the divergence of major crown groups is unresolved. We have demonstrated a common evolutionary history for animals and fungi (35), but the most ancient branching patterns within the animal-fungal clade are equivocal. We have carefully explored the effect of taxon selection in phylogenetic analyses of the crown groups and are struck by the possibility that fungi may derive from the early common ancestors of sponges and cnidaria, i.e., fungi may be a group derived from the most primitive animal lineages.

The sudden proliferation of morphologically distinct lineages could reflect major environmental changes. For example, a large increase in at-

mospheric oxygen may have led to the development of new ecological niches. Perhaps a small number of lineages survived a cataclysmic event followed by rapid diversification into unoccupied habitats. Both scenarios predict that radiating patterns will be observed in earlier diverging protist lineages at a time corresponding to the separation of plants, animals, and fungi. Alternatively, the rate of phenotypic evolution might have accelerated in response to novel mechanisms for managing genetic information. Maybe the invention of homeobox-like mechanisms permitted more complicated patterns of differential gene expression and ultimately tissue differentiation in multicellular organisms. Development of "cis" splicing mechanisms for processing RNA or invention of vectors for rapidly exchanging genetic information could have led to shuffling of genetic information and accelerated rates of phenotypic change.

The rRNA framework force us to reconsider traditional views about evolution of eukaryotes. It suggests that eukaryotes may be older than once thought possible; given the amitochondriate phenotype of early-diverging lineages, the presence of oxygen is not prerequisite to forming a nucleus (30). Even though eukaryotes are not capable of nitrogen fixation, the absence of nitrates (a presumed condition of early reducing atmospheres) does not rule out the early origins of eukaryotes. Many protists consume bacteria, which provide a source of nitrates, amino acids, and nucleotide precursors. The absence of eukaryotic fossils older than two billion years and the lack of meaningful biochemical diversity are frequently cited as evidence for a recent origin of eukaryotes. Such interpretations have distorted our view of microbial evolution. The operational definition of eukaryotes in the fossil record includes a minimum size of ten microns. This criterion is obsolete

since some extant eukaryotes, e.g., *Nanochlorum eukaryotum*, are as small as one micron. Fossils from this taxon would not be recognized as eukaryotes. Furthermore, the earliest eukaryotes probably were fragile organisms not likely preserved as micro-fossils. The modest eukaryotic biochemical diversity (relative to prokaryotes) is a sampling artifact. Most biochemical studies are confined to the "higher kingdoms" but the majority of eukaryotic diversity by almost any measure is represented by protists that have not been scrutinized at the biochemical level. Molecular studies in protists have often led to observations of phenomena not found in plants, animals or fungi.

Multiple endosymbiotic origins of plastids

The molecular trees challenge older ideas about the monophyly of eukaryotic alga species and green plants. Analyses of rRNAs offer compelling evidence of multiple acquisitions of plastids. The phylogeny in Fig. 2 demonstrates that photosynthetic eukaryotes are members of a number of distinct lineages; plastids may have been introduced into separate eukaryote lineages via multiple, independent endosymbiotic events. The minimal evolution tree (27) in Fig. 2 shows bootstrap values from 1000 replicate samplings using parsimony and neighbor-joining inference techniques. *Dictyostelium discoideum* and *Phreatamoeba balamuthi* serve as out-groups in these analyses. At least five photosynthetic assemblages are apparent; they include the green plants plus chlorophytes, the dinoflagellates, the rhodophytes, the haptophytes and the photosynthetic members of the stramenopiles. If bootstrap values are interpreted as rough estimates of reliability for specific branching patterns in phylogenetic reconstructions, at least two photo-

synthetic groups are separated from all others by many non-photosynthetic lineages.

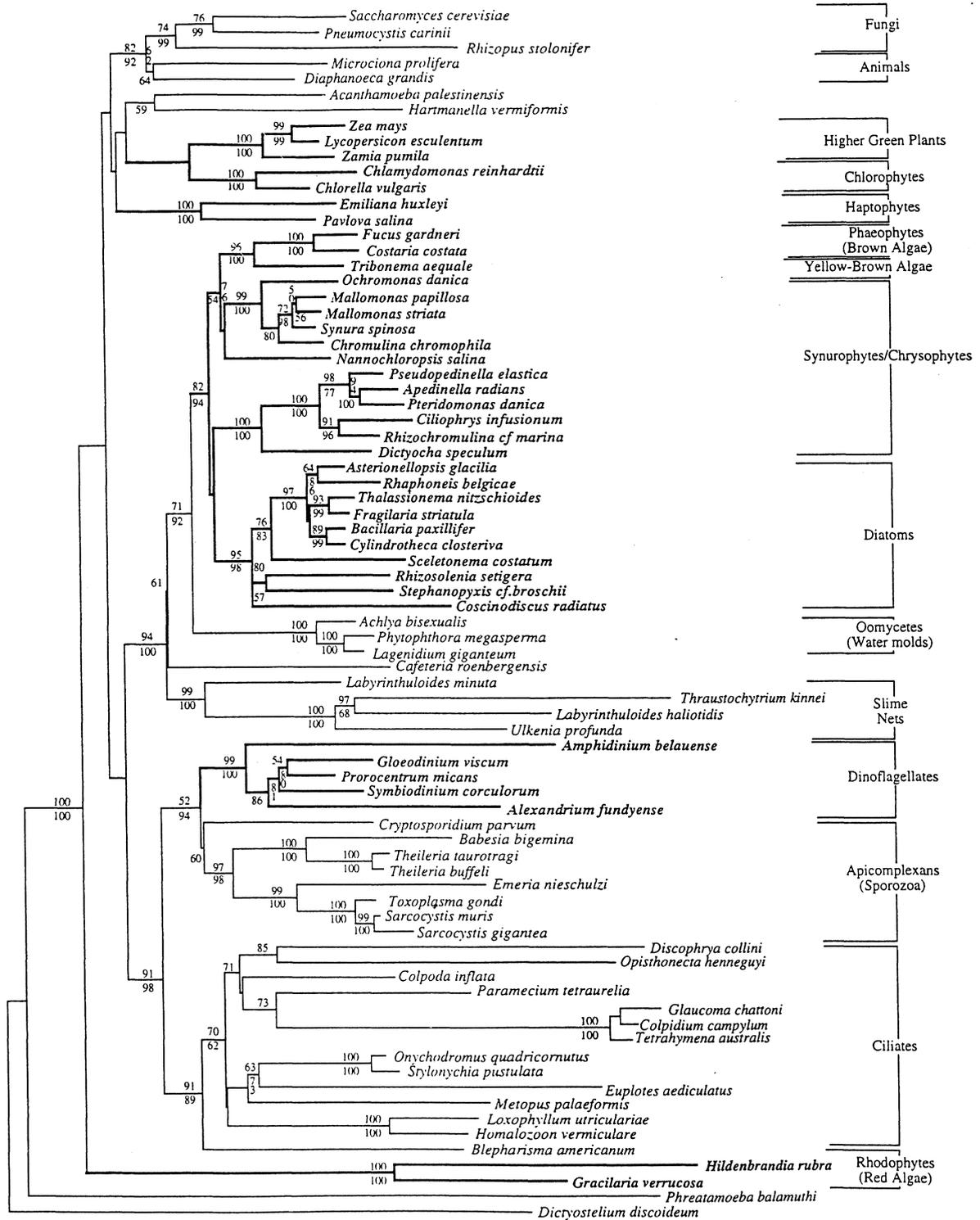
The most convincing example of independent acquisition of plastids is provided by the stramenopiles. All stramenopiles are united by bootstrap values of 94 and 100 percent in parsimony and neighbor-joining analyses. *L. minuta* and *C. roenbergensis* consistently represent the first two branches in the stramenopile line, but bootstrap values do not identify a preferred order of branching. Low bootstrap support can be attributed to short segments separating internal nodes of the tree. In biological terms, short internal nodes indicate either the rapid divergence of these lineages or a period of relatively slow genetic change. Comparisons of statistical properties for alternative tree topologies or bootstrap values associated with specific branches provide some measure of confidence in phylogenetic tree reconstructions. A complementary method for assessing the reliability of tree topologies is to include/exclude different taxa in the phylogenetic inferences. Topologies of robust phylogenetic frameworks should be insensitive to the selection of different taxa, but may display altered segment lengths between internal nodes with an attendant change in corresponding bootstrap values. We have demonstrated that the branching patterns within the stramenopiles and the alveolates are robust when different taxa are used in the phylogenetic tree reconstructions (20). The oomycete divergence occurs just prior to the

nearly simultaneous separation of diatoms, phaeophytes, synurophytes and chrysophytes. When oomycetes are deleted from the analyses, there is 100 percent bootstrap support for the divergence of the heterotrophic species *L. minuta* and *C. roenbergensis* prior to the radiation of photosynthetic taxa.

Two competing hypotheses can explain these results. Although the phenotype of the last common ancestor of the stramenopiles is difficult to identify, the rRNA phylogenetic frameworks strongly suggest that the lines leading to the bicosoecids, labyrinthulids (and possibly the oomycetes) appeared before any of the photosynthetic stramenopiles. The most parsimonious interpretation is that the last common ancestor of the stramenopiles was a heterotrophic flagellate. If true, autotrophy within the stramenopiles would have arisen independently of the other major autotrophic assemblages: the green plants, cryptomonads, dinoflagellates, haptophytes, and rhodophytes. In light of the emerging molecular data, the alternative hypothesis (independent loss of chloroplasts in bicosoecids, labyrinthulids, oomycetes and other heterotrophic stramenopiles) is no longer the most parsimonious explanation for the distribution of photosynthetic phenotypes in eukaryotic phylogenies.

Earlier phylogenetic studies based upon comparative morphology and ultrastructure include haptophytes within the chromophytes (2, 5, 7) and

FIG. 2 (facing page). Phylogeny of "Crown" groups. We use an aligned database of more than 820 eukaryotic 16S-like rRNAs for phylogenetic inferences. Structural similarities for sites that can be unambiguously aligned for these taxa (approximately 1500 sites) were converted to evolutionary distances. We employed "minimum evolution" to infer a tree in which the horizontal component of separation represents the evolutionary distance between taxa. The scale bar corresponds to 10 changes/100 positions. Photosynthetic lineages are indicated by heavy lines and bold lettering. Bootstrap support for topological elements in the tree are based upon 10,000 replicates of a neighbor-joining analysis (shown below the branches) or 200 replicates of maximum parsimony (shown above the branches). Bootstrap values below 50% are not shown.



suggest they are descendants of a pigmented ancestor. Stramenopiles and haptophytes have mitochondria with tubular cristae. Their brown or golden brown plastids contain chlorophyll *a + c* and the thylakoids are stacked in layers of three. The plastids are surrounded by rough endoplasmic reticulum confluent with the nuclear envelope. Similarities in pigmentation, biochemical pathways and chloroplast morphology suggest stramenopiles and haptophytes diverged after acquisition of the chloroplast. However, molecular trees do not support a shared history between stramenopiles and haptophytes. We do not know if each of the events represented primary endosymbioses of cyanobacteria-like species or secondary endosymbiotic events involving two eukaryotic lineages. For our purposes, the important result is that eukaryotic alga lineages should not be treated as a monophyletic group of plants because of the presence of plastids. Instead we should treat each of these photosynthetic assemblages as separate evolutionary lineages as divergent from each other as plants are from animals.

Comparisons of small subunit ribosomal RNAs from diverse eukaryotes provide a novel phylogenetic framework for eukaryotes. The genetic diversity of eukaryotes as measured by rRNA sequence diversity equals or exceeds that seen in the entire prokaryotic world. Two new complex assemblages, the alveolates and stramenopiles, join the higher kingdoms of plants, animals and fungi. Multiple endosymbiotic events led to the formation of several distinct photosynthetic eukaryotic lineages.

Despite advances in eukaryote phylogenetics and the rapid growth of molecular databases, the mystery about the origin(s) of protists persists. Ancestral roots within the prokaryotic world are unknown and the branching order of basal eukaryotic lineages is equivocal in molecular trees (16, 19). Except for the apparent lack of introns, we have only sketchy details about the genotype of early-diverging, amitochondriate protists. Extended molecular databases for a variety of genes and gene families from early-diverging protists will clarify these unsettled issues. Corresponding information from later-diverging lineages, crown group taxa and prokaryotes will resolve the major eukaryotic radiations and will some day define the relationship between bacteria and the first eukaryotes.

References

1. Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., Sussman, A. S. (1973). *The Fungi, an Advanced Treatise*, IVB. Academic Press, New York, NY.
2. Andersen, R. A. (1991). The cytoskeleton of chromophyte algae. *Protoplasma* **164**, 143–159.
3. Barnes, R. S. K. (1984). *A Synoptic Classification of Living Organisms*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
4. Cavalier-Smith, T. (1986). The kingdom Protista: origin and systematics. *In* Round, F. E., Chapman, D. J. (ed.), *Prog. Phycolog. Res.* 4., pp. 319–358. Biopress Ltd., Bristol, UK.
5. Cavalier-Smith, T. (1989). The kingdom Chromista. *In* Green, J. C., Leadbeater, B. S. C., Diver, W. L. (ed.), *The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives*, pp. 381–407, *Systematics Association special vol. 38*. Clarendon Press, Oxford.
6. Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* **57**, 953–994.
7. Christensen, T. (1989). The chromophyta, past and present. *In* Green, J. C., Leadbeater, B. S. C., Diver, W. L. (ed.), *The Chromophyte Algae: Problems*

- and Perspectives, pp. 1–12, Systematics Association special vol. 38. Clarendon Press, Oxford.
8. Copeland, H. F. (1956). Classification of the Lower Organisms. Pacific Books, Palo Alto, CA.
 9. Elwood, H. J., Olsen, G. J., Sogin, M. L. (1985). The small subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. *Mol. Biol. Evol.* **2**, 399–410.
 10. Field, K. G., Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Ghiselin, M. T., Raff, E. C., Pace, N. R., Raff, R. (1988). Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* **239**, 748–753.
 11. Ghiselin, M. T. (1989). Summary of our present knowledge of metazoan phylogeny. *In* Fernholm, B., Bremer, K., Jornvall, H. (ed.), *The Hierarchy of Life: Molecules and Morphology in Phylogenetic Analysis*, pp. 247–260. Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands.
 12. Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R., Noller, H. F. (1985). Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* **32**, 155–216.
 13. Haeckel, E. (1894). *Systematische Phylogenie der Protisten und Pflanzen*. Georg Reimer, Berlin, Germany.
 14. Honigberg, B. M., Balamuth, W., Bovee, E. C., Corliss, J., Gojdics, M., Hall, R. P., Kudo, R. R., Levine, N. D., Loeblich, A. R., Weiser, J., Wenrich, D. H. (1964). A revised classification of the Phylum Protozoa. *J. Protozool.* **11**, 7–20.
 15. Johnson, A. M., Illana, S., Hakendorf, P., Baverstock, P. R. (1988). Phylogenetic relationships of the apicomplexan protist *Sarcocystis* as determined by small subunit ribosomal RNA comparisons. *J. Parasitol.* **74**, 847–860.
 16. Keeling, P. J., Doolittle, W. F. (1995). Archaea: narrowing the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5761–5764.
 17. Knoll, A. H. (1992). The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science* **256**, 622–627.
 18. Lake, J. A. (1987). A rate-independent technique for analysis of nucleic acid sequences: evolutionary parsimony. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 167–191.
 19. Leipe, D., Gunderson, J. H., Nerad, T. A., Sogin, M. L. (1993). Small subunit ribosomal RNA of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 41–48.
 20. Leipe, D., Wainright, P. O., Gunderson, J. H., Porter, D., Patterson, D. J., Valois, F., Himmerich, S., Sogin, M. L. (1994). The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia* **33**, 369–377.
 21. Lipps, J. H. (1993). *Fossil Prokaryotes and Protists*. Blackwell Scientific Publications, Boston, MA.
 22. Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D. J. (1990). *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA.
 23. McCarroll, R., Olsen, G. J., Stahl, Y. D., Woese, C. R., Sogin, M. L. (1983). Nucleotide sequence of the *Dictyostelium discoideum* small subunit ribosomal ribonucleic acid inferred from the gene sequence: evolutionary implications. *Biochemistry* **22**, 5858–5868.
 24. Olsen, G., Matsuda, H., Hagstrom, R., Overbeek, R. (1994). FastDNAmI: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Cabios* **10**, 41–48.
 25. Patterson, D. J., Sogin, M. L. (1993). Eukaryote origins and protistan diversity. *In* Hartman, H., Matsuno, K. (ed.), *The Origin and Evolution of Prokaryotic and Eukaryotic Cells*, pp. 13–46. World Scientific Pub. Co., River Edge, NJ.
 26. Ragan, M. A., Chapman, D. J. (1978). *A Biochemical Phylogeny of the Protists*. Academic Press, New York, NY.
 27. Rzhetsky, A., Nei, M. (1992). A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 945–967.
 28. Schopf, J. W. (ed.) (1983). *Earth's Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution*. Princeton University Press, Princeton, MI.
 29. Sogin, M. L. (1989). Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Amer. Zool.* **29**, 487–499.
 30. Sogin, M. L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr. Opin. Gen. Develop.* **1**, 457–463.
 31. Sogin, M. L., Gunderson, J. H., Elwood, H. J., Alonso, R. A., Peattie, D. A. (1989). Phylogenetic significance of the Kingdom concept: an unusual

- eukaryotic 16S-like ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* **243**, 75–77.
32. Sogin, M. L., Ingold, A., Karlok, M., Nielsen, H., Engberg, J. (1986). Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major *Tetrahymena* groups. *EMBO J.* **5**, 3625–3630.
33. Swofford, D. L., Olsen, G. J. (1990). Phylogeny reconstruction. In Hillis, D. M., Moritz, C. (ed.), *Molecular Systematics*, pp. 411–501. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Ontario.
34. Taylor, F. J. R. (1993). The role of phenotypic comparisons of living protists in the determination of probable eukaryotic phylogeny. In Bengtson, S. (ed.), *Early Life on Earth. A Nobel Symposium*, pp. 312–326. Columbia University Press, New York, NY.
35. Wainright, P. O., Hinkle, G., Sogin, M. L., Stickel, S. K. (1993). The monophyletic origins of the Metazoa: an unexpected evolutionary link with Fungi. *Science* **260**, 340–343.
36. Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221–271.
37. Zuckerkandl, E., Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **8**, 357–366.

Diversity of eukaryotic microorganisms: computer-based resources, the *Handbook of Protoctista* and its *Glossary*

Lynn Margulis,^{1*} Lorraine Olendzenski,² Michael Dolan,¹ Ferren MacIntyre³

¹ *Department of Biology, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, USA*

² *Department of Molecular and Cell Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA*

³ *Expert-center for Taxonomic Identification, University of Amsterdam, the Netherlands*

Received 21 October 1995/Accepted 29 December 1995

Summary

The kingdom Protoctista comprises some 30 phyla, including the eukaryotic anaerobes that permanently lack mitochondria, the Phylum Archaeoprotista, with its three classes: (i) Archamoebae, e.g., *Pelomyxa*, *Mastigina*, (ii) Metamonada, e.g., *Giardia*, *Pyrsonympha*, and (iii) Parabasalia, e.g., *Trichomonas*, *Calonympha*, and the Phylum Microspora (Microsporidia), e.g., *Vairimorpha*. These and all algae, protozoa, labyrinthulids, “water molds” (oomycota, plasmodiophorans, hyphochytrids, chytrids, etc.) and other eukaryotes excluded from plants, animals and fungi are detailed in the *Handbook of Protoctista*. The *Illustrated Glossary of Protoctista* contains descriptions of the morphology and taxonomy of these microorganisms, including the many equivalent and homologous structures with different names. The *Glossary* has also been made into a Macintosh-compatible CD-ROM disk.

Key words: undulipodia, kinetids, sexual life cycles, amitochondriate protists, kingdom and phyla definitions

Resumen

El reino Protoctista se compone de unos 30 fílums, incluyendo los anaerobios eucarióticos que carecen permanentemente de mitocondrias, el fílum Archaeoprotista, con sus tres clases: (i) Archamoebae, p.e., *Pelomyxa*, *Mastigina*, (ii) Metamonada, p.e., *Giardia*, *Pyrsonympha*, y (iii) Parabasalia, p.e., *Trichomonas*, *Calonympha*, y el fílum Microspora (Microsporidia), p.e., *Vairimorpha*. Estos organis-

* *Correspondence to:* Lynn Margulis. Department of Biology. University of Massachusetts. Amherst, MA 01003. USA. Tel.: +1-413-5453244. Fax: +1-413-5453243. E-mail: pbi@bio.umass.edu

mos, y todas las algas, protozoos, laberintúlidos, los micotas con estados móviles (oomicotas, quítridos y similares) y otros eucariontes, excluyendo las plantas, animales y hongos, están detallados en el *Handbook of Protoctista*. El *Illustrated Glossary of Protoctista* resume la morfología y taxonomía de estos microorganismos, e incluye las diversas estructuras equivalentes y homólogas que reciben diferentes nombres según la tradición de los distintos grupos y escuelas de investigadores. El *Glossary* se presenta, además, en formato de disco CD-ROM para Macintosh.

This article is dedicated to the memory of Kenneth Estep (1954–1995).

Estimates of the number of species of protoctists (i.e., eukaryotic microorganisms and their descendants other than animals, plants and fungi) reach as many as 200,000 (3). This paper summarizes recent attempts to organize the scientific literature concerning these organisms. Their genetic systems, life history details, cell biological properties have been in confusion since they were first described by Antonie van Leeuwenhoek (1632–1723) and Christian Gottfried Ehrenberg (1795–1876). The persistent classification of all protoctists as either “animal” or “plant” has impeded understanding of their biology. The group, as compiled in the books and CD-ROM we describe here, include familiar phyla (equal to “divisions” in botany [2]) such as chrysophytes, red, green and brown algae (traditionally plants); ciliates, apicomplexa and microsporidia (traditionally “invertebrate” animals), and oomycetes, hyphochytrids and chytrids (traditionally fungi). Furthermore, many other lesser known groups are included that, since their original descriptions, have plagued professional biologists. These include xenophyophores, ellobiopsids, plasmodiophorans, labyrinthulids and more than twenty others.

Five kingdoms of life

In this paper we outline the five kingdoms of life, detail over 30 phyla of the kingdom Protoctista and discuss new literature on these organisms. All life on Earth, an estimated 30,000,000 species, can

be classified unambiguously into five higher taxa based on cell structure (nucleoid or nucleated) and developmental genetic systems.

Superkingdom PROKARYOTAE

Bacterial cell organization (2.5 nm chromosomal unit fiber, small ribosomes, continuous DNA synthesis, extracellular flagella composed of flagellin proteins powered by rotary motors).

KINGDOM BACTERIA (MONERA). Single homologous genomes. Chemoorganoheterotrophy to photolithoautotrophy, all nutritional modes represented. **Eubacteria:** Eubacterial 16S rRNA and lipids; peptidylglycan or no cell walls. Examples: actinobacteria, bacilli and other Gram-positive bacteria; chlorobia, chromatia and other phototrophs, mitochondria and plastids; spirilla, vibrios, spirochetes, and other Gram-negative bacteria. **Archaeobacteria:** Archaeobacterial 16S rRNA and ribosomes; ether-linked lipids, distinctive or no cell walls. Examples: methanogenic, thermoacidophilic, and halophilic bacteria.

Superkingdom EUKARYOTAE

Nucleated cell organization with 15 nm chromosomal unit fibers, i.e., chromatin (histones and DNA organized into eight-fold symmetrical chromatin nucleosomes, nuclear pore complexes); intermittent DNA synthesis, mitotic karyokinesis; actin-based cytokinesis; microtubule-based, intracellular motility systems, cell fusion by phagocytosis; steroid-containing membranes. Proteinaceous and carbohydrate walls. Two major modes of metabolism: photolithoautotrophy and chemoorganoheterotrophy.

KINGDOM PROTOCTISTA. Microorganisms and their larger descendants composed of multiple heterologous genomes, products of integrated bacterial symbioses. Intracellular undulipodia (underlain by kinetosome/centrioles) powered by microtubule-associated proteins in [9(2)+0] arrays. Unicellular, syncytial and multicellular members. (Examples: algae, water molds, ciliates.)

KINGDOM MYCHOTA. Preferred formal name of kingdom Fungi (Melvin Fuller, personal communication). Fungi. Haploid or dikaryotic cells, many form tubes. Osmotrophic heterochemoorganotrophs that develop from spores and display zygotic meiosis; chitinous walls; no undulipodiated cells (e.g., yeasts, mushrooms, molds [5]).

KINGDOM PLANTAE. Embryophytes, alternation of haploid gametophyte with diploid sporophyte generations. Fertilization of eggs by undulipodiated sperm or pollen nuclei produces sporophyte embryos that are retained in maternal tissue. Sporophyte meiosis produces the haploid spores from which the gametophytes develop. Plasmodesmata between cells; cellulosic walls. (Examples: bryophytes, tracheophytes.)

KINGDOM ANIMALIA. Diploids develop from products of anisogamous (sperm/egg) fertilization into blastula embryos. Ingestive nutrition, complex cell connections, e.g., desmosomes, septate junctions; muscle tissue; lack cell walls. (Examples: porifera, mollusks, vertebrates.)

Literature on protoctists

Based on original research by forty-five authors, the *Handbook of Protoctista* (8) provides taxonomic, historical, life history, nomenclatural and practical information of the biology of these organisms in a large-formatted (21.5 × 28.5 cm) professional tome. The *Handbook* is modeled after both *Bergey's Manual* (4) and *The Prokaryotes* (1) with regard to its inclusiveness. The *Handbook*

summarizes information on the occurrence, collection, maintenance and cultivation of members of each major taxon along with an assessment of the extent of the evolutionary history of each as documented in the fossil record. It includes a glossary which presents multiple definitions of words in common, and often contradictory, usage.

To make portions of the *Handbook* accessible to a larger audience, the glossary was expanded and published independently along with explanatory front matter. The lists of taxonomic and biological terms (including definitions and synonyms) were profusely illustrated. Published separately in a smaller trim size as the *Glossary* (9) it is designed for all researchers, high school and more advanced students, teachers, museum staff personnel and naturalists who deal with eukaryotic microorganisms and their multicellular descendants exclusive of plants, animals and fungi. The following issues are discussed prior to the general and taxonomic glossary entries in both books: the estimated number of protoctist taxa; the absence of any "single-celled plants" or "single-celled animals" in life on this planet; the resemblance of protoctists to lichens by analogy since all are products of co-evolved microbial symbioses; the nomenclatural morass concerning the organelles of motility (i.e., basal bodies, kinetosomes, flagella, cilia and undulipodia) and the relationship of undulipodia to meiotic sexuality. The phyla of Protoctista are organized into four groups in both of these publications: (i) those lacking undulipodia and meiotic sex, (ii) those lacking undulipodia but displaying complex life histories, including meiotic sex, (iii) those having undulipodia but lacking meiotic sexual life histories, and (iv) those displaying both undulipodia and complex meiotic life histories. The question of the "kingdom" status of "Protoctista", the value of kinetids (kinetosomes and their associated fibers and tubules) as taxonomic markers, general properties of the highly diverse protoctist life histories, the reasons for the preferred numbers of kingdoms

and kingdom criteria, the distribution of size and occurrence of non-homologous multicellularity in all phyla, and why the term "protocist" is preferable to "protist" are among the issues discussed. The necessity for drawing anastomosing phylogenies in the depiction of the evolutionary history of all protocists (11) and the intellectual tools for the evaluation of the number and level of integration of microbial symbionts are also commented upon. Many modes of nutrition are not directly related to evolutionary history, therefore the invalidity of nutritional criteria for determination of higher taxa is also discussed.

The nutrition of protocists is more diverse than that of animals, plants and fungi but more restricted than among prokaryotes. Tabulation of diverse nutritional modes serves to emphasize the intellectual vacuity of the obsolete plant vs. animal dichotomy. The problems surrounding international recognition of the kingdom Protocista and its taxa are also discussed in both books.

The contradictions and overlapping terms that confront users of botanical and zoological codes are revealed in an essay on protist nomenclature by John O. Corliss written for the *Handbook* and reprinted in the *Glossary*. A listing of the current suppliers of living protocists in culture is included in the *Glossary*. The use of electronic media is discussed in a section on the creation of a protocist database. Also reprinted in the *Glossary* is a review by Mitchell Sogin of the use of molecular biological data in attempts to understand protist evolutionary relationships.

Completing the Linnean task

The kingdom protocista compilation has been expanded to electronic media: the logical, comprehensive treatment and high quality illustrations led researchers at the Expert-center for Taxonomic Identification (ETI) to develop the

Protocist Glossary for CD-ROM (Table 1). The ETI is a non-profit foundation dedicated to improving the quantity and accessibility of taxonomic information. Associated with the University of Amsterdam, the ETI office and laboratory is located on the campus near the city museum. Funding for ETI's activities is provided by organizations such as UNESCO, which recognize that the identification of species by trained taxonomists is a crucial link in the effort to protect the diversity of the Earth's biosphere. By encapsulating and disseminating the knowledge of taxonomists ETI permits anyone, regardless of background, to identify organisms, sometimes even to species level. Each taxon is researched by professional taxonomists, entered into the World Biodiversity Database (WBD), and prepared for distribution on CD-ROM. By combining scientific text, expert illustrations, and professional photographs, ETI is able to offer products that are practical, appealing and entertaining.

Many of the ETI staff members are recipients of doctorate degrees, usually in a biological science. Their dedication to the completion of the Linnean task is remarkable, indeed most think that their activities are the most useful one can do to help fellow species survive. The WBD will eventually be on line and capable of answering questions like "which arthropods and fungi are common to Russian steppes and Argentine pampas?" This major undertaking is approached in increments—the first step is production of CD-ROMs. Each CD holds data for about 1000 species.

As the first step toward the WBD, and in keeping with its non-profit nature, ETI distributes what has become the de facto world standard taxonomic software free of charge to "ETI Partners". An ETI Partner can be any individual or group of scientists, scholars or students who contract to provide their data to ETI. The researchers or contractees supply the data then entered by ETI

TABLE 1. Table of contents of *Protoctist Glossary: An illustrated reference guide to terms and taxa** (CD-ROM)

Introduction	7. Informal names of protoctistan phyla and classes
General glossary (biological terms)	8a. Phyla of protoctists
Organism glossary (taxonomic terms)	8b. Classes of phylum Zoomastigina
Tables	8c. Classes of phylum Chlorophyta
1. Modes of nutrition for life on Earth	9. Classification: Summary of phyla and lower taxa
2. Modes of nutrition in Protoctista	Quiz
3. Units and dimensions	Quick-time movie: Leading deceased protoctist researchers and quote from A. van Leeuwenhoek's discovery of the microcosm
4. Sources of living protoctists and their culture	Index
5. Etymological roots and examples of use	References
6. Classes of the phyla of the kingdom Protoctista	

* Authors: L. Margulis, H. McKhann, L. Olendzenski (ed.).

into the WBD. Participants receive a CD-ROM containing at least their own data and in some cases that of other investigators as well. Non-profit or not, ETI still has to survive, so ETI charges whatever the market will bear for the same CD when sold to users. Disks are distributed by Springer-Verlag, or in the southern hemisphere by UNESCO. ETI welcomes inquiries from taxonomists looking for simple, fast, and effective ways of preserving specialized knowledge.

The general glossary contains over 1900 specific scientific terms and definitions. The organism glossary, which includes over 1300 taxa names and descriptions, now has been incorporated by ETI into their illustrated interactive program. All are available on a single CD-ROM disk, entitled *Protoctist Glossary: An illustrated reference guide to terms and taxa*, currently in production at ETI. Two versions will be available. The first CD-ROM, for use on a Macintosh computer system, published in 1995, is available from Ward's Natural History Establishment, Rochester, NY, USA. The second, designed to run on IBM compatible computers using Windows, will be published in 1996 or later. Hypertext links allow for easy point and click navigation between the two glossaries

(general and taxonomic) and accompanying illustrations.

In addition to these two illustrated glossaries (one of general terms and the other of taxa of organisms) the *Protoctist Glossary* CD-ROM features information about all the eukaryotic microorganisms organized into nine tables (see Table 1). The classes of the protoctist phyla including detailed information on two particularly difficult groups of eukaryotic microorganisms: "Zoomastigina" (opalinids; pseudociliates; parabasalids which includes trichomonads; kinetoplastids; reortamonads, and proteromonads) and "Chlorophyta" (green algae) are included on the disk. Informal names, modes of nutrition, ways of obtaining cultured strains of these microbes and a taxonomic summary of the lower taxa of the phyla, including some 800 genera names assigned to 400 families and 200 orders, are all provided. Morphology, habitat, nutrition, presence or absence of undulipodia, mitochondria, and plastids, the modes of reproduction and the formation of propagules such as motile zoospores or resistant cysts are described. Sexual, nuclear and cytological features, where known, and the fossil record occurrence are summarized for each phylum.

The *Glossary* CD-ROM has special features: its easy accessibility of hyperlinked information, hundreds of highly detailed illustrations and the inclusion of a quiz that tests the knowledge of the user, makes the disk an exceedingly useful teaching tool. Having the advantage of compactness, hypertext-related information is accessed with only the click of a computer mouse. The major literature references used to create the *Handbook* and *Glossary* are also included on the compact disk. The glossaries found in the CD-ROM contain over 3000 specific entries. Several hundred labelled diagrams display the morphology and life history of representative members of each phylum.

Clear distinction is made between the extracellular bacterial flagellum and the intracellular undulipodium ("cilium", i.e., "eukaryotic flagellum"). The latter, underlain by its generative structure, the kinetosome, contains over 600 proteins and is crucial for understanding protist cell morphology, sexuality, motility, sensory behaviour and other aspects of the life of protoctists.

The fossil record and the importance of protoctists for sedimentary processes, both marine and terrestrial, are underestimated by most scientists, biologists and geologists alike. The field of micropaleontology is dominated by protoctist literature; these organisms were especially prominent in the Proterozoic eon (from 2500 until 520 million years ago) prior to the appearance of the terrestrial animals, plants and fungi of the Phanerozoic eon (from 520 million years ago until the present) (10). Indeed, protoctist fossils exceed those of animals in their abundance and representation of the overall evolution of the kingdoms (6). Our purpose here is to bring to light the extensive, fascinating and important but scattered scientific literature concerning the group. By organizing information on the structure, cultivation, habitats, life histories and fossil record of the eukaryotic microorganisms into accessible form, we hope to increase the awareness of students, teachers and

researchers of the diversity and evolutionary importance of protoctists, the non-bacterial microorganisms and their descendants. The implications of this taxonomic reorganization for molecular biological analysis are presented in reference 7.

Classification of protoctists

We list here the taxa of protoctista as presented in the *Handbook* and in the *Glossary*. The major taxonomic improvement based on new data since this listing is the removal of ancestrally amitochondriate protists to their own division, the Phylum Archaeoprotista (7). This change was made because of the consensus that these anaerobic organisms evolved from eukaryotic ancestors that never symbiotically acquired mitochondria (Table 2).

The phyla of protoctists are grouped conveniently depending on their development. Their placement is determined by whether or not any of their cells bear undulipodia and if they display complex sexual cycles: (i) no undulipodia, no sex; (ii) no undulipodia, sex; (iii) reversible formation of undulipodia, no sex; (iv) reversible undulipodia, sex. No phylogenetic implications are intended but in most cases a close phylogenetic relationship between members of any given phylum obtains.

KINGDOM PROTOCTISTA

I. Phyla in which cells lack undulipodia and meiotic sexual cycles. (In these and all other taxa described, cells of members contain mitochondria unless otherwise stated.):

RHIZOPODA. Amastigote soil, freshwater, and marine heterotrophic amoebae. Typically single-celled uninucleate organisms motile by pseudopods, bacterivorous and protistivorous phagotrophs. Some have two or more nuclei; reproduction by binary fission only. Body naked or bears tests of silica, organic materials or agglutinated

sand grains (carbonate or other); many form resistant cysts. Sexuality unknown. Cosmopolitan distribution in aquatic, terrestrial and symbiotic habitats; some necrotrophic.

HAPLOSPORIDIA. Unicellular amastigote symbiotrophs including necrotrophs (pathogens), primarily histozoic or coelozoic in marine animals. Form plasmodia with dense organelles called haplosporosomes in host tissue and produce unicellular, uninucleate propagules ("spores") that lack polar capsules and polar filaments.

PARAMYXEA. Amastigote unicellular symbiotrophs of marine animals. Form propagules ("spores") with several cells enclosed inside each other arising by internal cleavage or endogenous budding within an amoeboid stem cell.

MYXOZOA (Myxosporidians). Multinucleated myxospore-forming parasites anchored to the tissues of their hosts, usually marine animals. They produce amoebulinas (i.e., uninucleate amoeboid propagules that actively penetrate host tissues, especially hollow organs). The polar filaments of myxospores are enclosed in cnidocysts. [Note: Myxozoa may be degenerate animals

(cnidaria \equiv coelenterata or others). Until a description of eggs fertilized by sperm that develop into the blastula is provided, they must be retained in kingdom Protoctista.]

MICROSPORA. Minute unicellular symbiotrophs causing single-cell tumors in a vast array of insects and other animals. No mitochondria. Propagules are "spores" which produce a polar tube deployed in the inoculation of the host with no damage to the host cell membrane. Penetration of the animal tissue occurs after microsporan travels into host cell through this unprecedented inoculation device. Cell fusion reported for some species but adequate descriptions of meiosis and fertilization details are lacking.

II. Phyla in which cells lack undulipodia but display meiotic sexual cycles at some stage in their life history:

ACRASEA. Cellular (pseudoplasmodial) slime molds with dispersed life history. Phagotrophic, bacterivorous amoeboid organisms formed by aggregation of amoebae to directly produce multicellular aerial, "spore"-bearing structures (sorocarps) in which propagules (cysts

TABLE 2. New group of protoctists: anaerobes from ancestors that lacked mitochondria

Amitochondriates (Hypochondria ¹ , Archezoa ²)	
Phylum ARCHAEPROTISTA	
Class 1. Archamoebae	
Subclass Pelobiontea (\equiv Karyoblastea), e.g., <i>Pelomyxa</i>	
Subclass Mastigamoebae, e.g., <i>Mastigina</i>	
Class 2. Metamonada ³	
Subclass Retortamonadida, e.g., <i>Retortamonas</i>	
Subclass Diplomonadida, e.g., <i>Giardia</i> , <i>Hexamita</i>	
Subclass Oxymonadida, e.g., <i>Pyrsonympha</i> , <i>Notila</i>	
Class 3. Parabasalia, e.g., <i>Trichomonas</i> , <i>Devescovina</i> , <i>Trichonympha</i>	
Phylum MICROSPORA (Microsporidia)	
e.g., <i>Nosema</i> , <i>Vairimorpha</i> , <i>Glugea</i>	

¹ D. Patterson's preferred name. ² T. Cavalier-Smith's preferred name. ³ G. Brugerolle's taxa; table based primarily on Brugerolle's analysis.

with darkened walls) form. Damp soil habitats (e.g., dead plant parts, soil, or dung).

DICTYOSTELIDA. Cellular (pseudoplasmodial) slime molds. Bactivorous amoeboid amastigote cells aggregate to form sorocarps. Damp soil, freshwater habitats. Differentiated from acrasids by cytology of the myxamoeba (slime amoeba), production of well-differentiated stalk and spore cells, formation of more complex sorocarps and alignment of aggregating myxamoebae into streams that form motile pseudoplasmodia (e.g., "slugs" or "Mexican hat stage," e.g., of *Dictyostelium* or *Minakatella*). Sexual fusion of compatible myxamoebae occurs in plasmodium formation.

RHODOPHYTA. Red seaweeds, red algae. Primarily multicellular, marine photosynthetic prototists. Life history involves alternation of generations which may include two free-living generations and a third, dependent generation. Sexuality via nonmotile male gametes that penetrate female tissue. Plastids contain chlorophyll *a* and the water-soluble accessory pigments allophycocyanin, phycocyanin, and phycoerythrin localized in phycobilisomes; thylakoids present as single lamella.

CONJUGAPHYTA. Conjugating green algae. Primarily freshwater filamentous zygonemal (conjugacean) and desmid green algae distinguished from other chlorophytes by their isogamontous conjugating sexuality and their lack of undulipodia. Reproduction by mitotic division, sexuality by conjugation involving fusion of amoeboid gametes that form synkarya which develop into resistant spores.

III. Phyla in which the cells display undulipodia at some stage in their life history but lack meiotic sexual cycles:

XENOPHYOPHORA. Heterotrophic prototists, all of which (except one group in shallow water) live in the abyssal marine benthos. Large amoeboid organisms organized as plasmodia en-

closed by a branched, tubelike organic cement. Cytoplasm contains numerous BaSO₄ crystals. Tests patched from hard parts of skeletons, sponges, or foraminifera, radiolaria spicules, and mineral grains. Life history incompletely known.

EBRIDIANs. Coastal marine free-living bimastigote solitary cells with basketlike internal skeletons consisting of siliceous rods. Reproduction by simple fission; sexuality unknown; taxonomy incertae sedis. Fossil record from lower Cenozoic to present with greatest diversity in the Miocene.

CRYPTOMONADS. Small mastigote algae. Asymmetric flattened cells with distinctive swimming motion or derived palmelloid forms. Vestibular depression (gullet) from which undulipodia emerge is anterior portion of crypt lined with refractile ejectosomes. Periplast, formed by organic plates internal to the plasma membrane, rather than external cell wall. Plastids contain chlorophyll *c* and phycobilins. Based on presence of nucleomorph, phylum is thought to have evolved from symbiosis between heterotrophic mastigotes and red algae that retain remnant nuclei and plastids.

GLAUCOCYSTOPHYTA. Miscellaneous blue-green nucleated algae. Photosynthetic, freshwater organisms containing cyanelles, intracellular organelles interpreted to be modified cyanobacterial symbionts (with chlorophyll *a* and phycobiliproteins) that retain remnants of peptidoglycan cell walls.

KARYOBLASTEAs. Giant free-living, microaerophilic, multinucleate, algivorous, freshwater amoebae. Monospecific: *Pelomyxa palustris*. Each amoeba harbors three different morphotypes of endosymbiotic bacteria in proportions that change with conditions; at least one type is methanogenic and a second perinuclear. Lack mitochondria and possibly lack Golgi apparatus. Nonmotile surface projections seem to be extreme variations on standard axonemal morphology. Pelobiontae (Now a subclass in Phylum

Archaeoprotista, see Table 2).

ELLOBIOPSIDS. Heterotrophic, coenocytic symbiotrophs including necrotrophs especially of planktic marine arthropods. Larger members arborescent with their absorptive base anchored in the host nerve tissue. The trunk breaches the cuticle and then divides dichotomously into branches (trophomeres) carrying terminal reproductive segments (gonomeres) that form bimastigote zoospores; taxonomy incertae sedis.

ZOOMASTIGINA. Diverse heterotrophic mastigotes. Undulipodiated organisms including solitary and colonial forms; freshwater or marine; free-living, symbiotrophic, or necrotrophic. Many members of classes (diplomonads, parabasalids, pyrsonymphids, retortamonads) found in anoxic environments lack mitochondria at all stages. Taxonomy of the classes (Amoebomastigotes, Bicosoecids, Choanomastigotes, Diplomonads, Kinetoplastids, Opalinids, Parabasalids, Proteromonads, Pseudociliates Pyrsonymphids, and Retortamonadids) is expected to change as more is known. Fertilization and meiosis reported in a few hypermastigote parabasalids and pyrsonymphids. (Those lacking mitochondria now removed to Archaeoprotista, see Table 2.)

EUGLENIDA. Small mastigote algae with one or two anterior undulipodia. Unilateral hairs present on the emergent portion of the locomotory undulipodium. Paramylon is cell storage carbohydrate. Most euglenids are freshwater or soil phagotrophs or osmotrophs. Approximately one-third are photosynthetic with plastids that contain chlorophylls *a* and *b* in which photosynthesis supplements heterotrophy. Stigma is outside the chloroplast. Many have a flexible proteinaceous pellicle ("wall") and move by metaboly. Cells solitary or colonial, display characteristic type of closed mitosis with conspicuous "endosome" (nucleolus). (Fig. 1.)

CHLORARACHNIDA. "Green amoebae". Phototrophic, marine organism in which an

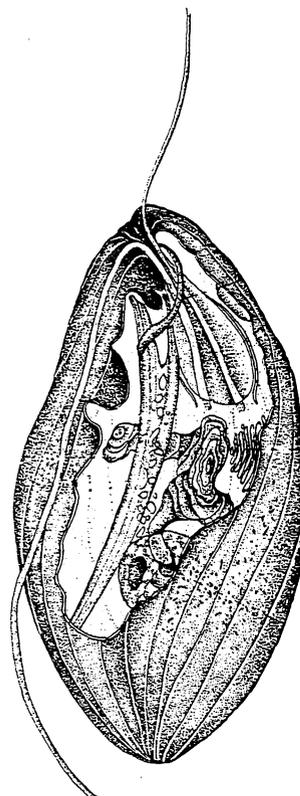


FIG. 1. Euglenida. *Anisonema*, a colorless phagotrophic euglenid with one short anterior undulipodium and one short posteriorly trailing undulipodium that lies in a ventral groove. (Modified from *Illustrated Glossary of Protoctista*, p. 157.)

amoeboid plasmodium contains individual green cells linked by a network of reticulopodia. Monospecific: *Chlorarachnion reptans*. Cells contain plastids with chlorophylls *a* and *b*. Life history incompletely known but contains a spherical, walled stage and unimastigote zoospores. Extensive periplastidial compartment indicates origin from symbiosis between amoebae and green algae.

PRYMNESIOPHYTA. Yellow-brown algae, many covered with scales of varying degrees of complexity that may be unmineralized (organic) or calcified. Photosynthetic or heterotrophic by dasmotrophy. Generally marine plankton. Includes coccolithophorids, unicellular organisms with

calcified plates (coccoliths). Many possess haptonemes, typically a filiform holdfast microtubule-containing structure associated with undulipodia. Fossil coccolithophorids date to the Jurassic period.

RAPHIDOPHYTA. Small motile algae. Wall-less heterokont mastigote or palmelloid phototrophs. Solitary cells distinguished by large Golgi apparatus extending over the anterior surface of the single nucleus. Plastids contain chlorophylls *a* and *c*. Found in freshwater, brackish and marine habitats; sexuality unknown.

EUSTIGMATOPHYTA. Mastigote algae that form zoospores with prominent red eyespot in the cell at the extreme anterior end before their single anteriorly-inserted mastigonemate undulipodium emerges. Reproducing by autospores or zoospores; sexuality unknown. Plastids contain chlorophyll *a*, beta-carotene, and violoxanthin.

ACTINOPODA. Primarily large plankton, heterotrophic unicells having long processes called axopods which develop from axoplasts. Classes include Acantharia, Heliozoa, Phaeodaria, Polycystina (Radiolaria). Some have regularly perforated silica skeletons with radial axopods emerging among fine ramified pseudopods. Acantharia have strontium sulfate skeletons. Mastigote propagules formed having two undulipodia, one emergent, and characterized by intracellular strontium sulfate crystal. Except for heliozoa, extant organisms are marine. Fossil record of polycystines dates from late Proterozoic eon. Their skeletal debris seems to be the basis of formations of extensive marine silica deposits (radiolarite) (Fig. 2).

HYPHOCHYTRIOMYCOTA. Osmotrophic or necrotrophic soil and water organisms that reproduce by zoospores. Zoospores, motile by a single, anteriorly-directed undulipodium with mastigonemes, form from a multinucleate thallus by reduction of cleavage vesicles. Growth as heterotrophic thallus "water mold" follows germi-

nation of an encysted zoospore. Autogamy reported in one species, *Anisolpidium ectocarpii*.

LABYRINTHULOMYCOTA. Slime nets (labyrinthulids) and thraustochytrids. Marine and estuarine heterotrophic protocists that produce an extracellular matrix (a wall-less ectoplasmic network), called a slime network, which absorbs nutrients and attaches the cells within it to surfaces. Ectoplasmic networks are devoid of cytoplasmic constituents; they are produced by cell organelles called bothrosomes or sagenogens. Cells divide within the network; in some genera cells show gliding motility. Reproduction by break-up of the net or by propagules (heterokont bimastigote zoospores). Reduced slime net in thraustochytrids where the extracellular material is hardened into a structure, causes superficial resemblance to a chytrid thallus. Meiotic sexuality reported in at least one labyrinthulid. Osmotrophic (e.g., saprotrophic on marine plants and algae) to weakly symbiotrophic.

PLASMIDIOPHOROMYCOTA. Soil and freshwater, obligate symbiotrophs (including necrotrophs) of many plants, fungi, and other protocists. Multinucleate unwallled protoplasts (plasmodia) develop either into sporangia, which produce zoospores with two anteriorly-directed whiplash undulipodia, or cystosori, which are resting bodies, aggregations of thick-walled, uninucleate cells. Cells show cruciform division. Meiosis inferred from presence of synaptonemal complexes in some species.

IV. Phyla in which the cells display undulipodia and sexual cycles (meiosis reducing the diploid chromosome complement followed by karyogamy to restore it) at some stage in their life history:

CHRYSOPHYTA. Golden yellow algae. Photosynthetic plastid-containing organisms with chlorophyll *a* and *c* and chrysolaminarin as storage product along with related plastid-lacking organisms. Single cells or colonial, primarily freshwater

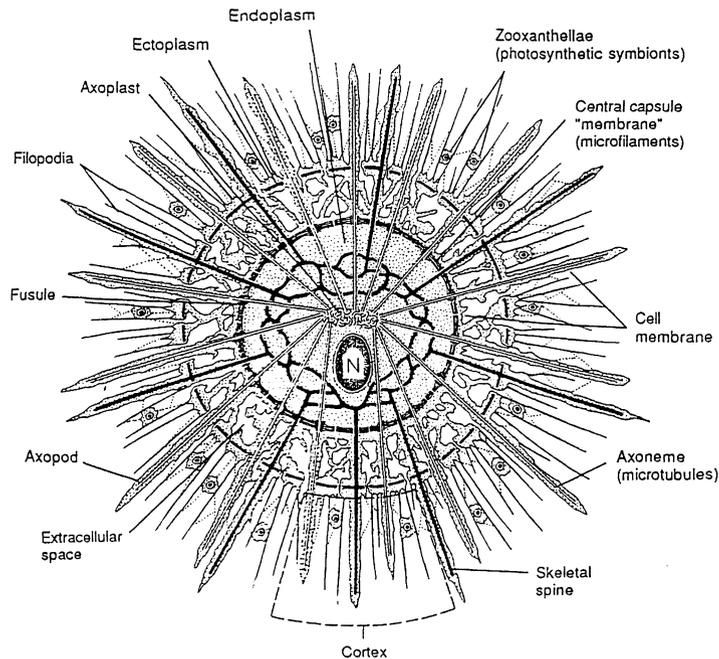


FIG. 2. Morphology of a polycystine actinopod ("Radiolaria"). N (center): nucleus. (Modified from *Illustrated Glossary of Protoctista*, p. 138.)

plankton. Includes the class Dictyochophyceae (silicomastigotes). Form swimmers with heterokont undulipodia. Fossil silicified cysts (stomatocysts) of class Chrysophyceae common, from Upper Cretaceous to Holocene.

DINOMASTIGOTA.* Bimastigotes, usu. with one girdle and one transverse undulipodium. Some lack walls, but in most amphiesmal (pellicular) plates inside membranous sacs called alveoli form intramembranous wall-like organic hard structures. Solitary or colonial cells, primarily marine plankton. Mitochondria with tubular cristae. Classified as "alveolates" with ciliates and apicomplexans. Photosynthetic forms contain plastids with chlorophylls *a* and *c*₂ and a unique xanthophyll, peridinin; many lack plastids. Distinctive chromatin organization: nucleus

(dinokaryon or mesokaryon) has permanently condensed and visible chromosomes lacking nucleosomes and the histones which comprise them. Substitution of much thymine in DNA by 5-hydroxymethyl uracil. Resistant cysts fossilize as hystrichospheres; Cambrian to present.

CILIOPHORA.* Dikaryotic, heterotrophic ciliates, primarily single motile cells with dimorphic nuclei (at least one macro- and one micronucleus, but often more) and complex cortices with distinctive kinetids. The cortex, approximately 1 μm of the outer surface of the ciliate, is composed of kinetids, unit structures of precisely patterned tubules, fibers, and alveoli. Mitochondria with tubular cristae. Files of kinetosomes, embedded in kinetids, are arranged as kineties. Physiologically active macronucleus divides amitotically, whereas

* These three phyla, dinomastigotes, ciliates and apicomplexans are now placed by D. Patterson and others in a higher taxon: alveolates, see Sogin et al., this issue, pp. 17–28.

smaller, diploid mitotic micronucleus (which synthesizes no messenger RNA) undergoes meiosis, reciprocal transfer and karyogamy in sexuality. Synkarya without cytoplasmic fusion form both in conjugation (mating with exchange of nuclei) and autogamy (fusion of nuclei in same cell). Both macro- (usually with far greater than diploid quantities of DNA) and micronuclei lack centrioles and divide by closed karyokinesis (no nuclear membrane breakdown). Most bacterivorous or protistivorous, many osmotrophic. Cosmopolitan in aqueous habitats. Some form colonies, some are secondarily photosynthetic by acquisition of algae or plastids, others heterotrophic symbiotrophs with polymorphic life histories.

APICOMPLEXA. (* See note on p. 39.) Small symbiotrophic protists parasitic in animals. Heterotrophs defined by a life history including a motile infective cell (zoite) which possesses an apical complex (with rhoptries and other specialized structures for entry of host). Alveolates with tubular mitochondrial cristae. Life history generally has three phases: growth phase (by merogony or endogeny) during which the host is infected by the zoite, a sexual phase with gamete production and fertilization to form zygotes enclosed in resistant oocysts, and a sporogenesis phase during which the sporoplasm within the oocysts divides successively to form sporozoites, the new infective forms.

CHYTRIDIOMYCOTA. Chitinous-walled, heterotrophic aquatic and soil protoctists which form undulipodiated zoospores and display absorptive nutrition; some necrotrophic in plants. Filamentous or thalloid organisms form sporangia which release undulipodiated propagules (zoospores), some of which may behave as gametes and fuse. Zoospores may transform into or fuse with the developing sporangium. Cells contain microbody-lipid globule complex.

PLASMODIAL SLIME MOLDS (MYXOMYCOTA). Phagotrophic bacterivorous, soil, dung, and plant debris-ingesting organisms that develop

from spores borne in sporophores. Spores germinate to form amoebae that develop into plasmodia (rate of karyokinesis exceeds that of cytokinesis). Conspicuous cyclosis in plasmodium. Can form mastigote and amoebae stages as well as sclerotia (dry propagules). Classes: Myxomycota, Protozelida.

GRANULORETICULOSA. Marine protists having granular reticulopods that form anastomosing networks with distinctive two-way streaming. Most enclosed by calcareous or agglutinated tests characteristic of the largest class: Foraminifera. Naked forms, reticulomyxids, in class Athalamea. Possess single, dimorphic, or many nuclei. Many contain photosynthetic symbionts. Some have complex sexual life cycles, some have undulipodiated gametes; diploid asexual reproducing phase (agamont) alternating with a haploid sexually reproducing phase (gamont), or with only one phase (apogamic or apoagamic). Tests, some macroscopic, useful as stratigraphic markers because of abundance and diversity in Paleozoic, Mesozoic and more recent marine sediment (Fig. 3).

BACILLARIOPHYTA. Diatoms. Diploid, sexual freshwater and cosmopolitan marine algae. Cells enclosed by complex siliceous walls consisting of two valves. Unicellular or colonial, diatoms reproduce by mitotic division with periodic formation of haploid, valve-less amoeboid gametes capable of whole cell fusion (syngamy followed by karyogamy). Centric, radially symmetric, or pennate, bilaterally symmetric, cells. Male gametes posteriorly undulipodiated in some centric genera. Cells non-motile or motile by gliding accompanied by secretion through slits (raphes) in cell walls and adhesion of the secreted material. Plastids with chlorophylls *a* and *c*, fucoxanthin, and other minor pigments. Extensive fossil forms, lower Cretaceous to Holocene.

CHLOROPHYTA. Green algae. Cosmopolitan, unicellular or multicellular photosynthetic organisms that form mastigote stages as prop-

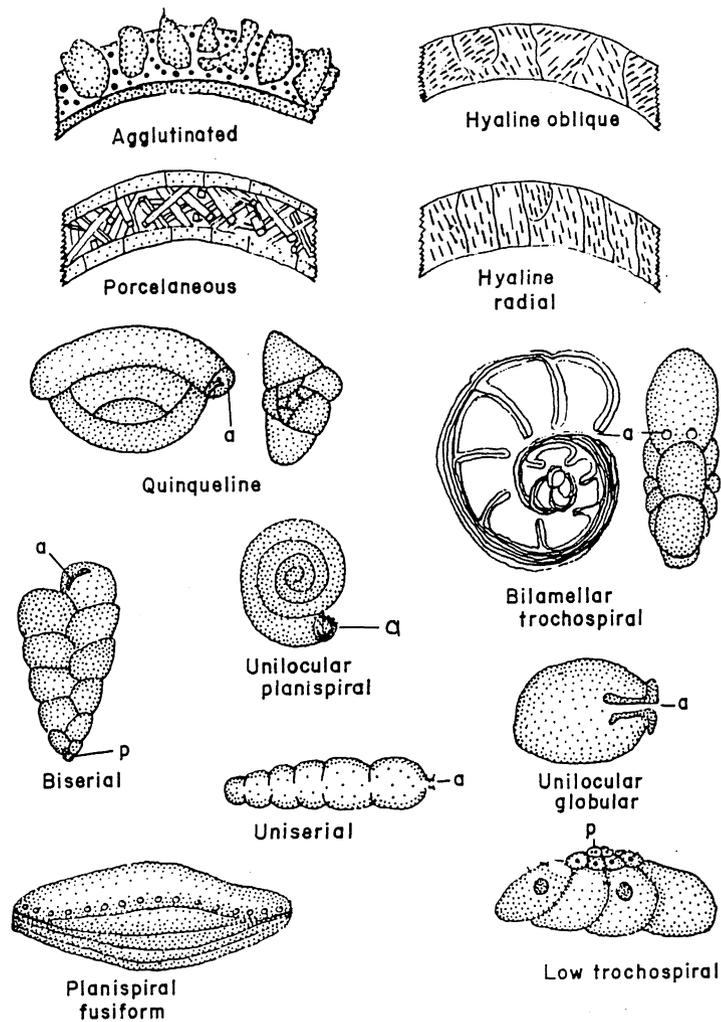


FIG. 3. Examples of test forms of foraminifera, phylum Granuloreticulosa. Abbreviations: a, aperture; p, proloculum (i.e., first chamber of foraminiferan test). (Modified from *Handbook of Protoctista*, page 532.)

agules or gametes. Plastids with thylakoid membranes containing chlorophylls *a* and *b* are surrounded by a double membrane. Primary storage material is starch. The plastid-lacking or amastigote immediate descendants of these algae included in phylum. Classes include Charophyceae, Chlorophyceae, Microthamniales, Pedinomonadales, Prasinophyceae, Prasiolales, Trentepohliales, Ulvophyceae.

OOMYCOTA. Conjugating anisogamontous “water mold” protoctists. Heterotrophic or osmo-

trophic in freshwater environments, or symbiotrophic in plants. Uninucleate or coenocytic. Undulipodiated heterokonts are zoospores, never gametes; sexuality is by conjugation of nonmotile sexually differentiated (male and “egg mold” female) hyphae.

XANTHOPHYTA. Heterokont yellow-green mastigote algae in primarily freshwater habitats. Coccoid unicells and multicellular descendants; double-membrane bounded plastids contain chlorophylls *a* and *c*. Plastids, which store fat or oil

(never starch), are surrounded by plastid endoplasmic reticulum. Reproduction by zoospores or their amastigote equivalent (hemiautospores). Sexual fusion of egg and sperm reported.

PHAEOPHYTA. Brown algae, brown seaweeds, including kelp. Most are multicellular; phylum contains largest protocists. Laminarin is storage material. Reproduce from heterokont mastigotes or zygotes formed by fusion of immotile eggs with heterokont motile male gametes. Exclusively marine organisms, usually in subtidal and intertidal habitats. May alternate diploid and haploid generations. Plastids contain chlorophylls *a*, *c*, and *c₁* and fucoxanthin.

Classification changes mandated by recent research

Since the publication of the *Handbook, Glossary* and CD-ROM several changes in the organization of our knowledge about the protocists have been warranted because of (i) new rRNA gene sequence data (see Sogin et al., this issue, pp. 17–28) and (ii) recognition that major groups of protocists never acquired proteobacteria as symbionts that became the oxygen respiratory organelles (i.e., mitochondria).

The removal of ancestrally amitochondriate protists from Phylum Zoomastigina (if undulopodiated) or from their own unique phylum (e.g., *Pelomyxa*) into a new Phylum Archaeoprotista represents the consensus that all these organisms are primitively without mitochondria and descend from the earliest evolved eukaryotes (see Table 2). The third edition of *Five Kingdoms* (Margulis and Schwartz, to be published by W. H. Freeman, New York) will reflect these changes based on new molecular evolutionary and ultrastructural data.

Acknowledgements

We thank Paula Carroll, Carmen Chica, Stephanie Hiebert, Gregory Hinkle, Heather

McKhann, Donna Reppard, Oona West and especially Kenneth Estep, for manuscript preparation. We are grateful to the Richard Lounsbury Foundation, the Exobiology Program in the Solar System Exploration Division of NASA and the University of Massachusetts Graduate School for financial support.

References

- Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, D., Harder, W., Schleifer, K.-H. (ed.) (1992). *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria. Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2nd ed., 4 vols. Springer-Verlag, New York, NY.
- Bold, H. C., Cronquist, A., Jeffrey, C., Johnson, L. A. S., Margulis, L., Merxmöller, H., Raven, P. H., Takhtajan, A. L. (1978). Proposal (10) to substitute the term "phylum" for "division" for groups treated as plants. *Taxon* **27**, 121–122.
- Corliss, J. O. (1990). Toward a nomenclatural protist perspective. In Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D. J. (ed.), *Handbook of Protoctista: the Structure, Cultivation, Habitats and Life Histories of the Eukaryotic Microorganisms and their Descendants Exclusive of Animals, Plants and Fungi*, pp. xxv–xxx. Jones and Bartlett, Boston, MA.
- Holt, J. G. (ed.) (1992). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 4 vols. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Kendrick, B. (1992). *The Fifth Kingdom*, 2nd ed. Focus Information Group Inc., Newburyport, MA.
- Lipps, J. (1993). *Fossil Prokaryotes and Protists*. Blackwell Scientific Publications, Boston, MA.
- Margulis, L. (1996) Archeal and eubacterial mergers in the origin of eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc Natl Acad Sci. USA* **93**, 1071–1076.
- Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D. J. (ed.) (1990). *Handbook of Protoctista: the Structure, Cultivation, Habitats and Life Histories of the Eukaryotic Microorganisms and Their Descendants Exclusive of Animals, Plants and Fungi*. Jones and Bartlett, Boston, MA.
- Margulis, L., McKhann, H. I., Olendzenski, L. (ed.) (1993). *Illustrated Glossary of the Protoctista*. Jones and Bartlett, Boston, MA.
- McMenamin, M. A., McMenamin, D. (1994). *Hypersea: Life on Land*. Columbia University Press, New York, NY.
- Mindell, D. (1993). Merger of taxa and the definition of monophyly. *BioSystems* **31**, 130–133.

Estudios preliminares sobre la adaptación de vectores retrovirales para la terapia génica de sustitución

Fernando Martín, Yolanda Jean-Mairet, Antonio Talavera*

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Cantoblanco, España

Recibido 10 abril 1995/Aceptado 27 diciembre 1995

Summary

We have studied the effect that exerts on the Moloney murine leukemia virus (Mo-MLV) viral cycle the deletion of the 13 bases that constitute the inverted repeat (IR) present at the external U3 region of the pre-proviral DNA. Whereas supernatants of wild type- and modified virus-producing cells contained similar amounts of viral particles, the deleted viruses showed a 100 to 1000-fold decreased infectivity. To determine how the deletion interfered with the infective capacity of the virus, different steps of the viral cycle were studied using deleted viruses. The deletion affected neither reverse transcription nor the entry of the DNA into the cell nucleus; however, the integration of the pre-proviral DNA into the host genome was reduced to undetectable levels. These results open a pathway to the construction of Mo-MLV-derived retroviral vectors for gene targeting purposes.

Key words: retrovirus, retroviral vectors, gene targeting, integration, integration defective mutants

Resumen

En este trabajo se ha estudiado el efecto que provoca, en el ciclo vital del virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), la delección específica de los 13 pares de bases que constituyen la repetición invertida (IR) de la región U3 externa del DNA pre-proviral. Los sobrenadantes de células productoras de virus normales o modificados contenían un número comparable de partículas virales, pero la infectividad de los virus modificados descendía entre dos y tres órdenes de magnitud. Para determinar

* *Correspondencia:* Antonio Talavera. Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM). 28049 Cantoblanco. España. Tel: +34-1-3978257. Fax: +34-1-3974799.

de qué forma la delección afectaba la capacidad infectiva, se estudiaron varios pasos del ciclo vital del virus mutante. La modificación no interfería con los procesos de síntesis de DNA viral, ni con su entrada en el núcleo de la célula; en cambio, la integración del DNA viral en el genoma celular descendía a niveles no detectables. Estos resultados permiten abordar la construcción de vectores derivados del Mo-MLV específicos para técnicas de sustitución génica.

Introducción

En el ciclo de los retrovirus, el RNA viral se retrotranscribe para dar un DNA lineal de doble cadena (DNA pre-proviral) que es integrado en el genoma de la célula huésped para constituir un provirus. La eficiente integración del DNA ha conducido al desarrollo de vectores retrovirales para transferencia génica y su uso en diferentes campos, tales como el marcaje de células en estudios de linaje, terapia anticancerígena, terapia génica, etc.

Una posible modalidad de transferencia génica aplicada a terapia génica es la sustitución o “puntería genética” (“gene targeting”), en la que, a diferencia de lo que ocurre con las técnicas de adición de genes, el gen endógeno es sustituido por el exógeno, lo que evita tanto los riesgos de mutagénesis insercional, activación de protooncogenes o efectos de posición, como la interferencia de productos génicos normales y defectivos en el caso de proteínas multiméricas. En la actualidad no existe ningún sistema eficiente para sustitución génica, por lo cual sería deseable obtener un sistema seguro y con alta eficacia.

Los sistemas retrovirales permiten introducir una única copia de DNA en el interior del núcleo celular, situación idónea para propiciar la sustitución génica. Sin embargo, un inconveniente de este sistema es su alta eficiencia de integración no específica. Sería, por tanto, interesante estudiar las condiciones que permitieran bloquear este tipo de integración determinada por la maquinaria enzimática propia de los sistemas retrovirales.

La enzima viral integrasa (IN) reconoce repeticiones cortas invertidas (IR) a ambos extremos del DNA producto de la retrotranscripción del RNA viral (DNA pre-proviral). La introducción de mutaciones en *cis* que delecionen las IR podría, en teoría, conducir al bloqueo de la integración. En trabajos anteriores (3) se estudió el efecto de la eliminación de parte de la IR correspondiente al extremo 3' (definido respecto a la polaridad del RNA viral) del DNA pre-proviral. Los resultados sugerían que la delección afectaba la síntesis del DNA viral, ya que eliminaba parte de una zona implicada en su iniciación. Este tipo de delección no puede, por lo tanto, ser utilizado para la construcción de vectores retrovirales dirigidos a sustitución génica (VRSG).

La eliminación de la IR del extremo 5' no debería, en principio, afectar a la retrotranscripción. En el presente trabajo se abordó la delección de esta zona y el estudio de su efecto sobre la fase temprana del ciclo de infección del retrovirus a fin de determinar la posibilidad del uso de este tipo de delección en VRSGs.

Materiales y métodos

DNA, cepas bacterianas y líneas celulares.

Para la construcción de la delección de la IR del extremo 5' del DNA viral (RID) se utilizaron el plásmido pNCA (4), que contiene el provirus de Mo-MLV, y el plásmido pTC181 (5).

Para la propagación de los plásmidos se utilizó la cepa α DH5 de *Escherichia coli* (8). Las colonias recombinantes se seleccionaron en presencia de

ampicilina (100 µg/ml) y 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) (25 µg/ml), e isopropil-tiogalactósido (IPTG) (0,125 µM).

Las líneas celulares NIH 3T3 y XC, se cultivaron en medio DMEM suplementado con glutamina, aminoácidos no esenciales, mezcla de antibióticos y antimicótico, al que se añadió un 10% de suero fetal de ternera (Gibco).

Aislamiento de virus. La delección RID se introdujo en pNCA por mutagénesis dirigida utilizando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La transfección de pNCA y pNCARID a células NIH 3T3 junto al vector de selección pSV2Neo, portador del gen de resistencia a G418 (14), se realizó por el método de la precipitación con fosfato cálcico (7). Las colonias resistentes a dicho antibiótico se seleccionaron y expandieron. Los virus contenidos en los sobrenadantes de dichas células se precipitaron con polietilenglicol 6000 durante una noche a 4°C y se centrifugaron durante 30 min a 10000 × g. El precipitado se resuspendió en tampón de disolución de virus (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; DTT 1mM; 10% glicerol).

Ensayo de placas XC para Mo-MLV. Se siguió una modificación del método desarrollado originalmente por Rowe et al. (12), añadiendo un tratamiento con tripsina (1 µg/ml) en PBS (pH 7,4) durante 15 m a 37°C (1).

“Slot-blot” del RNA viral. La extracción del RNA viral se realizó según el método de Porter (10). El RNA se fijó a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda específica radiactiva (pNCA digerido con *NheI*) marcada por el método de iniciadores al azar (6) y se sometió a autorradiografía. Las concentraciones relativas de cada muestra se analizaron por densitometría.

Análisis del DNA de las células infectadas. Se infectaron células NIH 3T3 con virus salvajes o delecionados. A diferentes tiempos se extrajeron los DNA de bajo peso molecular presentes en las fracciones cito- y nucleoplasmática,

así como el DNA genómico (9, 11). Las distintas fracciones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y los DNA se transfirieron a membranas de nylon según el método de Southern (13), y se hibridaron con la sonda específica comentada en el apartado anterior.

Resultados

Aislamiento de células productoras de virus. La línea celular de ratón NIH 3T3 fue cotransfectada con, por una parte, el plásmido pNCA o pNCARID y, por otra, con el vector de selección pSV2Neo, que confiere resistencia al antibiótico G418. Las células transfectadas se incubaron en presencia de dicho antibiótico, y las colonias resultantes se aislaron y expandieron. Los sobrenadantes de sendos clones, procedentes de la transfección con uno u otro de los plásmidos citados, se tomaron como fuente de virus normales o modificados, respectivamente, para posteriores estudios.

Ensayo de infectividad. La cuantificación de la infectividad de los retrovirus se realiza mediante métodos indirectos, ya que éstos no producen efecto citopático. El ensayo de placas XC se basa en la capacidad que poseen las células infectadas por un retrovirus competente de formar grandes sincitios con un tipo de células de rata transformadas por el virus del sarcoma de Rous, denominadas XC (12).

Cuando se aplicó este método de valoración a las poblaciones virales normal y delecionada (Tabla 1), la cantidad de sincitios obtenidos en el segundo caso fue entre cien y mil veces menor a la obtenida con virus salvaje.

Análisis del RNA viral por “slot-blot”. La pérdida de infectividad podría ser explicada, sencillamente, por ausencia de partículas virales en los sobrenadantes de células presuntamente productoras de virus delecionados, lo que implicaría que la delección *RID* impediría algún paso com-

TABLA 1. Número de sincitios obtenidos a las diferentes diluciones de sobrenadantes de células productoras de virus salvaje (WT) o delecionados (RID)

Dilución	WT	RID
10 ⁻³	ND*	6
10 ⁻⁴	ca. 200	2
10 ⁻⁵	17	0
10 ⁻⁶	2	0

* ND, no determinado.

prendido entre la expresión del provirus, el ensamblaje y transporte al medio extracelular de las partículas virales, procesos que constituyen la fase tardía del ciclo de los retrovirus. La posibilidad alternativa sería que, aun cuando la producción de partículas fuese normal, la infectividad de éstas se vería afectada por el bloqueo de las etapas tempranas del ciclo que median entre la entrada de la partícula viral en la célula y la integración del provirus. A fin de descartar una u otra posibilidad, se estudiaron las concentraciones de RNA viral en los sobrenadantes de células productoras de am-

bos tipos de virus. En la Fig. 1 se observa que los niveles de RNA viral en el sobrenadante de células productoras de virus delecionados son equiparables a los niveles obtenidos con células productoras de virus normales.

Análisis del DNA de las células infectadas. Los estudios anteriores sugieren que la disminución de la infectividad en los virus con deleción *RID* no se debe a alteraciones en la fase tardía del ciclo viral. A fin de estudiar los procesos tempranos del ciclo infectivo, es decir, la producción de DNA pre-proviral y su integración dentro del genoma celular, se analizó el material genético viral de las fracciones citoplasmática, nucleoplasmática y genómica de las células infectadas por virus salvaje o delecionado.

(i) *Estudio de la fracción citoplasmática.* El DNA de esta fracción se sometió a electroforesis en gel de agarosa, se transfirió a una membrana de nylon, se hibridó con el fragmento de 8,2 kb procedente de la digestión de pNCA con *NheI* marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. El resultado de la correspondiente autorradiografía se muestra en la Fig. 2.

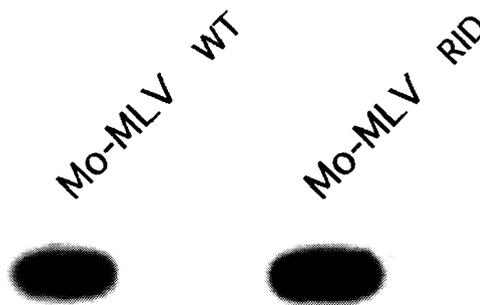


FIG. 1. Análisis del RNA viral. Volúmenes equivalentes de sobrenadante correspondiente a células productoras de virus salvaje (WT) o virus delecionado (RID) se concentraron y, una vez extraído el RNA viral, éste se fijó a una membrana de nylon y se hibridó con DNA proviral marcado radioactivamente. El resultado de la hibridación se sometió a autorradiografía.

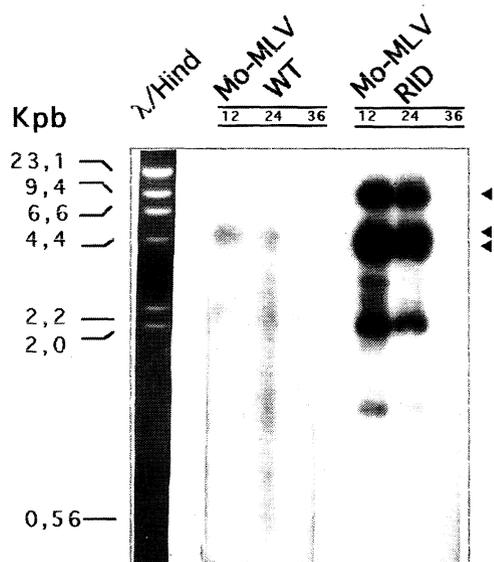


FIG. 2. Análisis del DNA de la fracción citoplasmática de células NIH 3T3 infectadas tanto con el virus salvaje (WT) como con el virus delecionado (RID). Carril 1: marcadores de tamaño molecular (λ DNA/*Hind*III) del gel de agarosa correspondiente a la autorradiografía; carriles 2, 3 y 4: fracción citoplasmática de células infectadas con el virus salvaje 12, 24 y 36 h después de la infección; carriles 5, 6 y 7: fracción citoplasmática de células infectadas con el virus modificado a los mismos tiempos.

Tanto en el virus salvaje como en el virus delecionado hay producción de DNA, lo que sugiere que la modificación realizada no afecta a la retrotranscripción. Se observa que la cantidad de DNA de ambas muestras aumenta según transcurre el tiempo hasta desaparecer bruscamente a las 36 h, momento en el que prácticamente todo el DNA viral ha desaparecido del citoplasma. Se observa también una menor cantidad de DNA en la muestra correspondiente al virus salvaje que en la muestra correspondiente al virus delecionado; ello podría deberse tanto a una mayor producción de DNA por parte de los virus modificados como a una menor velocidad de penetración, en este caso, del complejo nucleoproteico al interior del núcleo celular.

El análisis de esta fracción muestra también

las formas precursoras de la integración: lineal con dos LTR, circular con dos LTR y circular con un LTR.

(ii) *Estudio de la fracción nucleoplasmática.* Para determinar si el DNA producido en el citoplasma era introducido eficientemente en el núcleo, se analizó el DNA presente en la fracción nucleoplasmática. El resultado, que se muestra en la Fig. 3, indica que la cantidad de DNA de ambas muestras va aumentando hasta las 36 h. No hay diferencia en la producción de DNA, ya que la cantidad que se obtiene para uno y otro tipo de virus es esencialmente la misma a las 36 h, sugiriendo que en ambos casos el DNA es introducido eficientemente en el núcleo. La diferencia en la cantidad de DNA observada en la fracción citoplasmática sugiere un retraso, en el caso del virus delecionado, de la entrada de DNA pre-proviral al interior del núcleo.

(iii) *Estudio de la fracción genómica.* Para estudiar el efecto de la deleción RID sobre la integración del DNA pre-proviral, se dirigió el DNA de la fracción genómica con la endonucleasa de restricción *Nhe*I, que posee sitios de reconocimiento en ambas repeticiones terminales largas (LTRs) del provirus. Los productos de digestión se sometieron a electroforesis en agarosa y se transfirieron a una membrana de nylon que se hibridó con la sonda descrita anteriormente. El análisis de los resultados obtenidos (Fig. 4) muestra una clara diferencia entre ambos tipos de virus. En el caso del virus salvaje se observa un aumento constante del DNA integrado hasta las 36 h después de la infección. Por el contrario, los niveles de DNA integrado procedente de la infección con virus modificado fueron indetectables.

Discusión

El objetivo de este trabajo fue el estudio del efecto de la deleción *RID* sobre las diferentes fases

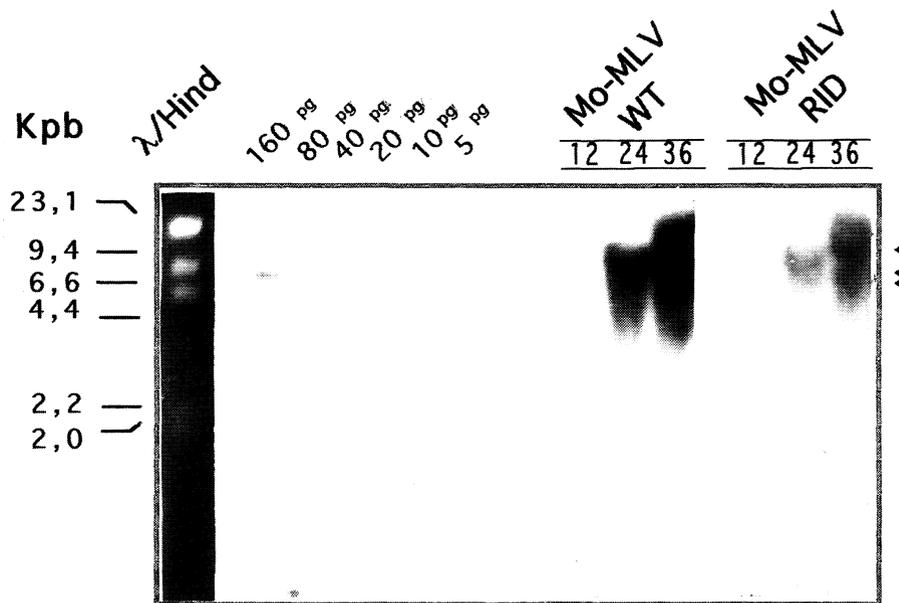


FIG. 3. Análisis de la fracción nucleoplasmática. Carril 1: marcadores de tamaño molecular (λ DNA/*Hind*III) del gel de agarosa correspondiente a la autorradiografía; carriles del 2 al 7: 160, 80, 40, 20, 10 y 5 pg de pNCA/*Nhe* I (8,2 y 2,8 kb) utilizado como patrón de cantidad de DNA; carriles 8, 9 y 10: fracción nucleoplasmática de células infectadas con virus salvaje (WT) recogidas a las 12, 24 y 36 h postinfección; carriles 11, 12 y 13: fracción nucleoplasmática de células infectadas con virus deleciónado (RID) recogido a las 12, 24 y 36 h postinfección. Las flechas a la derecha de la figura indican, por orden descendente la posición de las formas lineal, circular con dos LTRs y circular con un LTR, respectivamente del DNA pre-proviral.

del ciclo infectivo del virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), con el ulterior objetivo de su aplicación a vectores retrovirales que permitan el abordaje de la terapia génica de sustitución. Este tipo de vectores debería conservar una eficiente producción y transporte al interior del núcleo del DNA pre-proviral, exhibiendo éste, por otra parte, incapacidad de integración de tipo retroviral en el genoma celular.

Una primera aproximación a este estudio fue la comprobación del efecto de la deleción sobre la infectividad del virus. El ensayo de placas XC era apropiado para este objetivo, ya que este método de titulación se basa en la capacidad infectiva del retrovirus. Al darse una infección productiva, la célula hospedadora expresa en su membrana plasmática proteínas virales que inducen fusión con las células de rata XC y formación de sincitios. Si un virus no puede completar con normalidad

todos los pasos de su ciclo vital no se producirá tal fusión.

La cantidad de sincitios obtenidas para el virus deleciónado resultó ser entre cien y mil veces menor que la obtenida con el virus normal, sugiriendo que la deleción *RID* había afectado algún punto del ciclo infectivo. En el caso de que la fase afectada fuese tardía, la falta de infectividad podría ser una consecuencia directa de la ausencia de partículas virales en el sobrenadante de las células productoras. Para descartar esta hipótesis se realizó un "slot-blot" de RNA viral presente en el sobrenadante de células productoras. El resultado de este ensayo demostró que la cantidad de RNA que se obtiene para la muestra de virus modificado era equiparable a la obtenida para el virus salvaje.

Por otra parte, la falta de infectividad de las partículas virales podría ser debida a su incapacidad de sintetizar DNA a su entrada en la célula.

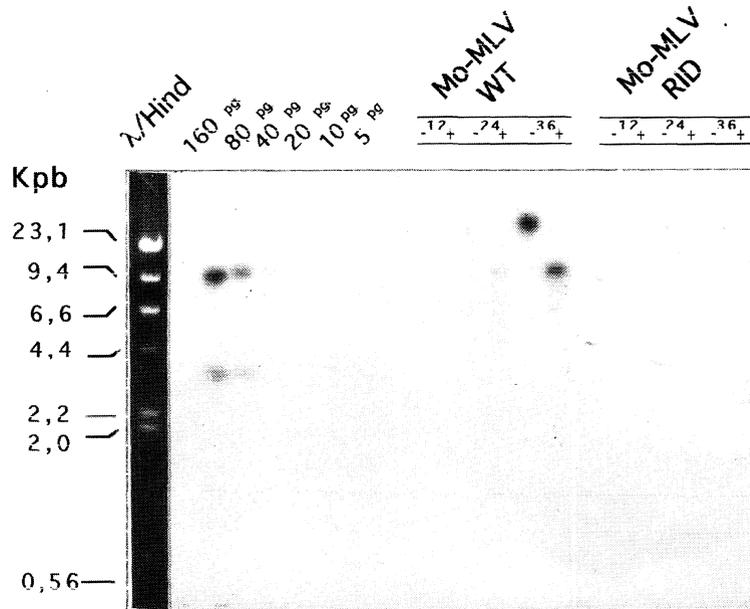


FIG. 4. Autorradiografía de la fracción genómica de células infectadas por Mo-MLV salvaje y modificado. Carril 1: marcadores de tamaño molecular (λ DNA/*Hind*III) del gel de agarosa correspondiente a la autorradiografía; carriles del 2 al 7: 160, 80, 40, 20, 10 y 5 pg de pNCA/*Nhe*I utilizado como marcador de cantidad de DNA viral; carriles del 8 al 13: DNA genómico de células infectadas con virus salvaje aislado a las 12, 24 y 36 h después de la infección, no digerido (-) o digerido con *Nhe*I (+); carriles del 14 al 19: DNA genómico de células infectadas con virus modificado aislado a los mismos tiempos.

Para responder a esta pregunta se estudió la presencia y características del DNA viral en diferentes compartimentos de las células infectadas.

El análisis del DNA viral de la fracción citoplasmática permitió determinar que la delección *RID* no impedía el proceso de retrotranscripción aunque se observó que la cantidad de DNA citoplasmático obtenida para el virus modificado era mayor que la obtenida para el virus salvaje. En ambos casos el DNA iba desapareciendo del citoplasma gradualmente a lo largo del tiempo hasta las 36 h postinfección, en que lo hacía bruscamente. Este efecto podría interpretarse de dos maneras: una mayor producción de DNA por parte del virus delecionado, o bien una velocidad de tránsito hacia el núcleo retardada de éste respecto al virus sin modificar. El estudio de la fracción nucleoplasmática permitió descartar la primera de ambas hipótesis, ya que, a las 36 h después de la

infección, los niveles de DNA de ambas muestras eran similares. Una posible explicación a este fenómeno sería que la delección afectase de alguna forma a algún factor del complejo nucleoproteico necesario para el transporte del DNA al interior del núcleo.

Un resultado inesperado obtenido en estos análisis fue el hecho de que en la fracción citoplasmática se observa la existencia de formas preintegrativas lineales, circulares con un LTR y circulares con dos LTR, formas que otros autores (2) describen solamente en el nucleoplasma.

Una vez comprobada la eficiencia de síntesis de DNA viral, se estudió la última de las etapas del ciclo temprano: integración del pre-provirus en el DNA celular. La ausencia de hibridación del DNA de la fracción genómica de las células infectadas con virus delecionado con una sonda específica del provirus sugiere que, a diferencia de lo que

ocurre con el virus salvaje, la integración del pre-provirus modificado no alcanza niveles detectables. Todos estos resultados permiten, en conjunto, abordar la adaptación a la técnica de sustitución génica de vectores derivados del Mo-MLV. Dicha adaptación consistiría en introducir la delección *RID* en vectores retrovirales comunes, ya que dicha delección cumple los requisitos anteriormente expuestos de impedir la integración del DNA pre-proviral mediada por la integrasa retroviral sin afectar esencialmente a su síntesis y posterior transporte al núcleo.

Agradecimientos

Al Dr. J. Fernández Piqueras por cedernos temporalmente espacio en su laboratorio y a los Drs. S. P. Goff y M. L. K. Collins, que nos facilitaron los plásmidos pNCA y pSV2Neo, respectivamente. Este trabajo fue financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Proyecto BIO90-0907), y por una Ayuda Institucional de la Fundación Ramón Areces.

Bibliografía

- Andersen, K. B., Skov, H. (1989). Retrovirus-induced cell fusion is enhanced by protease treatment. *J. Gen. Virol.* **70**, 1921–1927.
- Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E., Bishop, M. (1987). Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* **49**, 347–356.
- Colicelli, J., Goff, S. P. (1985). Mutants and pseudorevertants of Moloney murine leukemia virus with alterations at the integration site. *Cell* **42**, 573–580.
- Colicelli, J., Goff, S. P. (1988). Sequence and spacing requirements of a retrovirus integration site. *J. Mol. Biol.* **199**, 47–59.
- De la Fuente, A., Cisneros, E., Talavera, A. (1994). Restriction end-converting vectors with tandem repeated multiple cloning sites. *Gene* **139**, 83–86.
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266.
- Gorman, C. M. (1985). High efficiency gene transfer into mammalian cells. *In* Glover, D. M. (ed.), *DNA Cloning*, vol. 2, pp. 143–190. IRL, Oxford.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**, 365–369.
- Porter, C. D. (1991). Methods of titrating nonselectable recombinant retroviruses. *In* Collins, M. K. L. (ed.), *Practical Molecular Virology*, pp. 45–48. Humana Press, Clifton, NJ.
- Prakash, K., Ranganathan, P. N., Mettus, R., Reddy, P., Srinivasan, A., Plotkin, P. (1992). Generation of deletion mutants of Simian Immunodeficiency Virus incapable of proviral integration. *J. Virol.* **66**, 167–171.
- Rowe, W. P., Pugh, W. E., Hartley, J. W. (1970). Plaque assay techniques for Murine Leukemia Viruses. *Virology* **42**, 1136–1139.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503–517.
- Southern, P. J., Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen.* **1**, 327–341.

Importancia de *Chlamydia pneumoniae* como nuevo patógeno respiratorio

Carolina Bartolomé,* Montserrat Mata, Isabel Bernárdez

*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología,
Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España*

Recibido 28 de junio de 1995/Aceptado 29 de diciembre de 1995

Summary

The incidence of *Chlamydia pneumoniae* as a cause of respiratory tract infection was evaluated in a one-year prospective study in 142 patients with community-acquired pneumonia. An indirect immunofluorescence method which detects antibodies in acute and convalescent serum samples was used. Serological evidence of current infection was a four-fold rise in IgG antibody titer or a positive IgM fraction. *C. pneumoniae* was the causative pathogen in nine patients. This result is similar to those obtained in other studies and suggests that *C. pneumoniae* is a common etiological agent of community-acquired pneumonia in the studied area.

Key words: *Chlamydia pneumoniae*, community-acquired pneumonia, indirect immunofluorescence, patients sex and age, respiratory tract infection

Resumen

En un estudio prospectivo de un año se evaluó la incidencia de *Chlamydia pneumoniae* como causante de infección respiratoria en 142 pacientes con neumonía comunitaria. Se utilizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos en muestras de suero de la fase aguda y de convalecencia. Como demostración serológica de infección reciente se aceptó la elevación de cuatro veces el título de anticuerpos IgG o que la fracción IgM diese positivo. *C. pneumoniae* fue el patógeno causal en nueve pacientes. Este resultado es similar a los obtenidos en otros estudios y sugiere que *C. pneumoniae* es un agente etiológico común de neumonía extrahospitalaria en el área estudiada.

* *Correspondencia:* Carolina Bartolomé. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. 15706 Santiago de Compostela. España. Tel.: +34-81-563100 #3250. Fax: +34-81-596904.

Introducción

La investigación de la neumonía adquirida en la comunidad constituye un tema de permanente actualidad (15). Esto se explica por numerosos motivos, como la gran incidencia de las infecciones respiratorias (8, 12), la morbimortalidad de las mismas, que es sobre todo apreciable en las edades extremas de la vida y en individuos con algún tipo de inmunodeficiencia (4, 11, 18), y la dificultad que representa su diagnóstico microbiológico definitivo (2). Esta dificultad diagnóstica se ha hecho más patente con la aparición de gérmenes con resistencia creciente a los antimicrobianos (12), lo que obliga a un conocimiento lo más preciso posible del agente responsable, para obtener una mayor eficacia terapéutica.

Aunque clásicamente se ha considerado a *Streptococcus pneumoniae* como el principal patógeno implicado, la neumonía comunitaria puede deberse a muchos agentes etiológicos (5). Entre ellos, *Chlamydia pneumoniae* se ha incorporado progresivamente a la serie de microorganismos responsables de neumonía (según demuestran los trabajos publicados en países anglosajones y en otras regiones de nuestro país), como resultado de los estudios serológicos realizados en individuos de comunidades cerradas y de la población general (1, 3, 6, 10). Sin embargo, la información existente en nuestro medio es escasa (16), por lo que el propósito del presente trabajo fue conocer la importancia relativa de *C. pneumoniae* como agente productor de neumonía comunitaria en el área de estudio.

Material y métodos

Se incluyeron en el estudio 142 pacientes diagnosticados durante un año de neumonía de adquisición extrahospitalaria por los criterios de inclusión usualmente aceptados (3, 4). La relación

varón/mujer en la serie fue de 2:1, y la edad media (intervalo de 0,2–86 años) de $46,97 \pm 28,57$ años (media \pm desviación estándar). Se recogió una muestra de suero en la primera visita del paciente (fase aguda) y otra a las tres semanas (fase de convalecencia), que se conservaron a -40°C hasta efectuar las determinaciones necesarias.

Para el diagnóstico serológico se utilizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta comercial (Bios GmbH, München, Alemania), que emplea células infectadas fijadas en portaobjetos, así como conjugados específicos para IgG e IgM marcados con fluoresceína. Se efectuaron diluciones seriadas a partir de 1/10 y se incluyeron controles positivos y negativos según las instrucciones del fabricante. Los sueros se sometieron a un tratamiento previo a la determinación de IgM con el fin de eliminar el factor reumatoide. Se consideró criterio diagnóstico el aumento al cuádruple o superior del título de IgG, o la positividad de la fracción IgM.

En el análisis estadístico de los resultados se utilizó la prueba de χ^2 (Epiinfo, CDC, Atlanta, USA) para tablas 2×2 con los valores derivados de la fórmula no corregida, de Mantel-Haenszel y corregida de Yates, y la prueba exacta de Fisher cuando el valor esperado para cualquiera de las celdillas era menor de 5, y el programa Microstat (Ecosoft, Inc., Indianapolis, IN, USA) para el cálculo de medias y desviaciones estándar.

Resultados y discusión

Entre los 142 individuos incluidos en el estudio se detectaron 9 casos positivos, todos ellos en el grupo de adultos. Este porcentaje representa el 6,3% (IC_{95%}: 2,97–11,90%) de las neumonías estudiadas, y el 7,8% (IC_{95%}: 3,68–14,41%) de las neumonías de adultos.

De estos nueve casos positivos, seis correspondían a varones con una media de 47 años, cuatro de

los cuales presentaron además positividad en la fracción IgM de anticuerpos. Los tres casos restantes se detectaron en mujeres con una media de edad ligeramente superior (58 años); en estos casos el diagnóstico se basó exclusivamente en la existencia de seroconversión de IgG al cabo de 3 semanas, ya que la fracción IgM dio resultado negativo.

Al comparar el número de casos positivos en varones y en mujeres no se encontró una diferencia significativa. La distribución estacional se mostró uniforme a lo largo del año.

En los últimos años, se han realizado diversos estudios prospectivos sobre la neumonía adquirida en la comunidad (2, 4, 14). El número de gérmenes implicados se ha ampliado de manera considerable, debido, como ya se ha señalado, al reconocimiento de nuevos agentes y a la utilización de modernas técnicas diagnósticas (17).

El papel de *C. pneumoniae* como causa de infección respiratoria se ha estudiado desde hace poco tiempo (9). En el presente trabajo se ha identificado *C. pneumoniae* como germen responsable de neumonía en 9 de los 142 pacientes estudiados (un 6,3% de casos con infección aguda). Es interesante señalar que en un estudio previo (16), realizado en 117 pacientes con neumonía, encontramos 6 casos (5,13%; IC_{95%}: 1,8–10,65%) atribuibles a *C. pneumoniae*, resultado que quedaría dentro del intervalo de confianza del presente trabajo.

Por otra parte, al establecer un análisis comparativo mediante la prueba de χ^2 , no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas con la mayoría de los trabajos que han abordado una investigación similar a la nuestra.

Así, por ejemplo, en nuestro país, Antela et al. (4) obtuvieron datos serológicos de infección reciente por *C. pneumoniae* en 5 de 101 pacientes analizados, y Guerrero et al. (10) en 4 de las 103 neumonías estudiadas.

Fuera de nuestro entorno, conviene destacar los trabajos ya clásicos de Marrie et al. (13) y Fang et al. (7), con unos resultados de infección aguda debida a *C. pneumoniae* de 18 casos en 301 y de 22 en 359 pacientes, respectivamente.

No podemos dejar de mencionar el estudio de Almirall et al. (3), en la comarca del Maresme (Barcelona), sobre 105 pacientes, con una frecuencia de *C. pneumoniae* del 15,2%, siendo además la causa más común de neumonía adquirida en la comunidad. La diferencia significativa encontrada entre esta serie y la del presente trabajo podría explicarse por el hecho de que su grupo sólo incluyó pacientes adultos, diferencia que desaparece si se compara con el subgrupo de adultos de nuestra muestra.

Es importante mencionar que la prueba de inmunofluorescencia indirecta no es equivalente al denominado "test de microinmunofluorescencia" empleado por la mayoría de los autores (1, 6, 17), por lo que los resultados obtenidos mediante una de estas técnicas pueden ser diferentes. Hay que tener en cuenta, igualmente, la posibilidad de que se produzcan reacciones cruzadas con las otras dos especies del género *Chlamydia* (*C. psittaci* y *C. trachomatis*), ya que el método que utilizamos detecta principalmente anticuerpos específicos de género, si bien en nuestro caso no se ha producido este tipo de problema (datos no publicados).

Hemos encontrado, por tanto, un porcentaje de casos positivos para *C. pneumoniae*, aplicando un método de inmunofluorescencia indirecta, similar o ligeramente superior a la mayoría de las series publicadas. Recientemente se han iniciado los trabajos con la reacción en cadena de la polimerasa para un diagnóstico rápido y definitivo de la neumonía debida a *C. pneumoniae* (9, 17). Dado que esta técnica no está todavía disponible en todos los laboratorios de microbiología clínica, parece recomendable continuar el diagnóstico serológico mientras no se disponga de un método más eficaz.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia (XUGA20001A91).

Bibliografía

- Aldous, M. B., Grayston, J. T., Wang, S. P., Foy, H. M. (1992). Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966–1979. *J. Infect. Dis.* **166**, 646–649.
- Almirall, J., Casado, M., Valls, F., Morató, I., Agudo, A., Priu, R., Puig de la Bellacasa, J., Vidal, J., Balanzó, X. (1991). Estudio prospectivo de las neumonías extrahospitalarias atendidas en un hospital general. Error diagnóstico. *Med. Clin. (Barc.)* **97**, 250–254.
- Almirall, J., Morató, I., Riera, F., Verdager, A., Priu, R., Coll, P., Vidal, J., Murgui, L., Valls, F., Catalan, F., Balanzó, X. (1993). Incidence of community-acquired pneumonia and *Chlamydia pneumoniae* infection: a prospective multicentre study. *Eur. Respir. J.* **6**, 14–18.
- Antela, A., Guerrero, A., Meseguer, M., González-Sainz, J., Escudero, R., Pérez-Elías, M. J., Quereda, C., Hermida, J. M., Cobo, J., Montilla, P., Fortún, J., Navas, E., Buzón, L. (1993). Neumonías extrahospitalarias: estudio prospectivo de 101 pacientes adultos e inmunocompetentes durante un año. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **11**, 525–530.
- Blanquer, J., Blanquer, R., Borrás, R., Nauffal, D., Morales, P., Menéndez, R., Subías, I., Herrero, L., Redón, J., Pascual, J. (1991). Aetiology of community acquired pneumonia in Valencia, Spain: a multicentre prospective study. *Thorax* **46**, 508–511.
- Blasi, F., Boschini, A., Cosentini, R., Legnani, D., Smacchia, C., Ghira, C., Allegra, L. (1994). Outbreak of *Chlamydia pneumoniae* infection in former injection-drug users. *Chest* **105**, 812–815.
- Fang, G. D., Fine, M., Orloff, J., Arisumi, D., Yu, V. L., Kapoor, W., Grayston, J. T., Wang, S. P., Kohler, R., Muder, R. R., Yee, Y. C., Rihs, D., Vickers, R. M. (1990). New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicentre study of 359 cases. *Medicine* **69**, 307–316.
- Goldstein, F. W., Garau, J. (1994). Resistant pneumococci: a renewed threat in respiratory infections. *Scand. J. Infect. Dis.* **93** (Suppl.), 55–62.
- Grayston, J. T., Aldous, M. B., Easton, A., Wang, S. P., Kuo, C. C., Campbell, L. A., Altman, J. (1993). Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. *J. Infect. Dis.* **168**, 1231–1235.
- Guerrero, A., Wang, S. P., González-Sáenz, J., Quereda, C., Grayston, J. T. (1991). Prevalencia de la infección por *Chlamydia pneumoniae* en neumonías en una muestra de población hospitalaria española. *Med. Clin. (Barc.)* **96**, 285–286.
- Isaacs, D., Kroll, J. S. (1988). Pneumonia in childhood. *The Lancet* **1**, 1164.
- Jacoby, G. A. (1994). Prevalence and resistance mechanisms of common bacterial respiratory pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **18**, 951–957.
- Marrie, T. J., Grayston, J. T., Wang, S. P., Kuo, C. C. (1987). Pneumonia associated with the TWAR strain of *Chlamydia*. *Ann. Intern. Med.* **106**, 507–511.
- Meyer, R. D., Finch, R. G. (1992). Community-acquired pneumonia. *J. Hosp. Infect.* **22** (Suppl.), 51–59.
- Moine, P., Vercken, J. B., Chevret, S., Chastang, C., Gajdos, P. (1994). Severe community-acquired pneumonia. Etiology, epidemiology, and prognosis factors. *Chest* **105**, 1487–1495.
- Sesma, P., Mata, M., Díaz, M. D., Bartolomé, C., Bernárdez, I., Garrido, J. A. (1994). *Chlamydia pneumoniae* como agente productor de neumonía adquirida en la comunidad: un estudio prospectivo en 117 pacientes. *Res. VI Congr. Nac. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, p. 262.
- Thom, D. H., Grayston, J. T., Campbell, L. A., Kuo, C. C., Diwan, V. K., Wang, S. P. (1994). Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 785–792.
- Venkatesan, P., Gladman, J., Macfarlane, J. T., Barer, D., Berman, P., Kinnear, W., Finch, R. G. (1990). A hospital study of community acquired pneumonia in the elderly. *Thorax* **45**, 254–258.

Efecto de las condiciones nutricionales sobre la viscosidad y capacidad emulgente del biopolímero V2-7 de *Volcaniella eurihalina*

Fernando Martínez-Checa,^{1*} Concepción Calvo,¹ M. Ángeles Caba,²
M. Rita Ferrer,² Victoria Béjar,² Emilia Quesada²

¹*Instituto del Agua, Universidad de Granada, Granada*

²*Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España*

Recibido 21 abril 1995/Aceptado 29 diciembre 1995

Summary

Volcaniella eurihalina is a moderately halophilic bacterium able to produce an exopolysaccharide (EPS) under different culture conditions. Rheological behavior of 1% EPS solutions varied depending on the conditions under which EPS were produced. The maximum viscosity was reached when maltose was used as carbon source. Limitations of phosphorus and sulfur also increased its viscosity power. On the other hand, the addition of residual oil products to the culture medium enhanced the production of this biosurfactant polymer.

Key words: *Volcaniella eurihalina*, exopolysaccharides, culture conditions, rheology, biosurfactants

Resumen

Volcaniella eurihalina es una bacteria halófila moderada capaz de producir un exopolisacárido (EPS) bajo diferentes condiciones de cultivo. Las propiedades reológicas de las soluciones al 1% de los EPS variaron dependiendo de las condiciones en las que se sintetizaron dichos EPS. El máximo de viscosidad se produjo cuando se usó maltosa como fuente de carbono. Las limitaciones en fósforo y

* *Correspondencia:* Fernando Martínez-Checa. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada. España. Tel. y Fax: +34-58-243870. E-mail: fmcheca@platon.ugr.es

azufre incrementaron su poder de dar viscosidad. Por otra parte, la adición de residuos derivados del petróleo a los medios de cultivo, incrementó la capacidad biosurfactante de los EPS producidos.

Introducción

Los exopolisacáridos microbianos constituyen un buen ejemplo de cómo una sustancia de origen biológico puede ser producida y manipulada para su utilización industrial. El comportamiento reológico de dichos polímeros en solución, y su actividad surfactante, van a influir en gran medida en la futura aplicación de los polímeros aislados (12, 13).

Volcaniella eurihalina es una bacteria halofílica moderada (crece óptimamente en medios con un 3–15% de NaCl) capaz de sintetizar, a partir de una amplia variedad de fuentes de carbono y energía, cantidades significativas de exopolisacárido (10). Las soluciones del exopolisacárido producido por la cepa F2-7 de *V. eurihalina*, presentaban un comportamiento pseudoplástico estable en un amplio margen de salinidad y un aumento de viscosidad a pH ácidos (2). En el transcurso de estos estudios se observó la capacidad surfactante de este biopolímero.

En el presente trabajo, hemos realizado un estudio comparativo del comportamiento reológico del polisacárido V2-7 bajo distintas condiciones nutricionales, y el efecto que la adición, a los medios de cultivo, de ciertos residuos sólidos derivados del petróleo pueda ejercer sobre la actividad surfactante de dicho biopolímero.

Material y métodos

Microorganismo. *Volcaniella eurihalina* cepa F2-7 es el microorganismo utilizado para este estudio. Es una bacteria halofílica moderada, con un crecimiento óptimo a una concentración de

sales totales del 7,5% (p/v). Posee la capacidad de producir una gran cantidad de exopolisacárido (alrededor de 1,9 gramos por litro de cultivo), al que se denomina V2-7.

Medios y condiciones de cultivo. Uno de los medios utilizados fue el MY (7), adicionado con una mezcla de sales marinas (11) para conseguir una concentración final de sales del 7,5% (p/v). Su composición es la siguiente (g/l): glucosa, 10,0 (Panreac); proteosa peptona, 5,0 (Difco); extracto de levadura, 3,0 (Difco); extracto de malta, 3,0 (Difco); NaCl, 51,3 (Panreac); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 13,0 (Merck); $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 9,0 (Merck); KCl, 1,3 (Merck); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,2 (Merck); NaBr, 0,15 (Merck) y $NaHCO_3$, 0,05 (Merck).

La influencia de la adición de residuos sólidos derivados del petróleo en el poder emulgente del polímero V2-7 se ha estudiado adicionando dichos residuos petrolíferos a una concentración del 1% p/v al medio MY, a distintos tiempos de incubación. Estos residuos proceden de la limpieza de tanques de petróleo y son suministrados por la Empresa Tierra Protec S.L. (Málaga).

Para determinar la influencia de la fuente carbonada sobre las propiedades del polímero V2-7 se utilizó el medio definido NH. Este medio está basado en el descrito originalmente por Ng y Hu (8), en el que se realizaron las siguientes modificaciones: el etanol se sustituyó por glucosa (Panreac), el $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ por $CoNO_3 \cdot 6H_2O$ y se añadió NaCl (Panreac) para conseguir una osmolaridad adecuada; su composición es la siguiente (g/l): fuente de carbono, 10,0; KH_2PO_4 , 2,4 (Merck); K_2HPO_4 , 5,6 (Merck); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 (Merck); $(NH_4)_2SO_4$, 4,0 (Merck); NaCl, 50,0 (Merck) y 3,5 ml de una solución traza que contiene (g/l): $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,368 (Merck); $CaSO_4 \cdot 5H_2O$,

0,642 (Merck); Na_2Mo_4 , 0,604 (Merck); $\text{CoNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,594 (Merck); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,422 (Merck); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,718 (Merck) y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,696 (Merck).

De igual manera se utilizaron medios NH deficientes en Mg (se redujo la cantidad de MgSO_4 de 0,5 g/l a 0,05 g/l), deficientes en P (se sustituyó la solución tampón de fosfatos por un buffer Tris(hidroximetil-aminometano), deficientes en S (se sustituyó el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por NH_4Cl al 0,49%) y deficientes en N (se disminuyó la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 4 g/l a 0,025%).

Producción, aislamiento y purificación de los EPS. La obtención y purificación de los exopolisacáridos se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por Quesada et al. (10).

Los cultivos de *V. eurihalina* cepa F2-7 fueron incubados a 32°C en reposo durante 8 días. A continuación se centrifugaron a $36.000 \times g$ durante 60 min en una centrifuga refrigerada (Sorvall RC-SB) para obtener los sobrenadantes libres de células. A continuación, el exopolisacárido se precipitó con 3 volúmenes de etanol frío y se purificó por ultracentrifugación y diálisis frente a agua destilada. Los polímeros así obtenidos fueron finalmente liofilizados para su estudio y conservación.

Estudios reológicos. Los estudios reológicos se llevaron a cabo en soluciones acuosas al 1% p/v de los polímeros, previamente obtenidos en medio NH con distinta fuente de carbono: glucosa (Panreac), manosa (Sigma), ramnosa (Sigma), galactosa (Sigma), citrato (Sigma), lactosa (Sigma), maltosa (Sigma) y azúcar comercial, así como en medios NH deficientes en Mg, P, S o N. Igualmente se determinó el efecto de la acidificación en la viscosidad de dichas soluciones, para lo cual se utilizó CIH 1N.

Las medidas de viscosidad se realizaron en un viscosímetro Brookfield LVT, al que se acopló un adaptador para pequeñas muestras.

Estudios de emulsión. Se determinó la capacidad emulgente de los polímeros obtenidos en medios MY adicionados de residuos sólidos derivados del petróleo a distintos tiempos de incubación (0, 24, 48, 72 y 96 h). Se siguió la metodología descrita por Cameron et al. (3).

Los ensayos se llevaron a cabo en 4 ml de agua destilada adicionados de 0,2% de EPS y de un 2% de residuo petrolífero. Las emulsiones así formadas se agitaron vigorosamente y se dejaron en reposo durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se determinó la estabilidad de las emulsiones por densidad óptica (D.O.) a 660 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer (Lambda 3, Norwalk, Connecticut, EE. UU.).

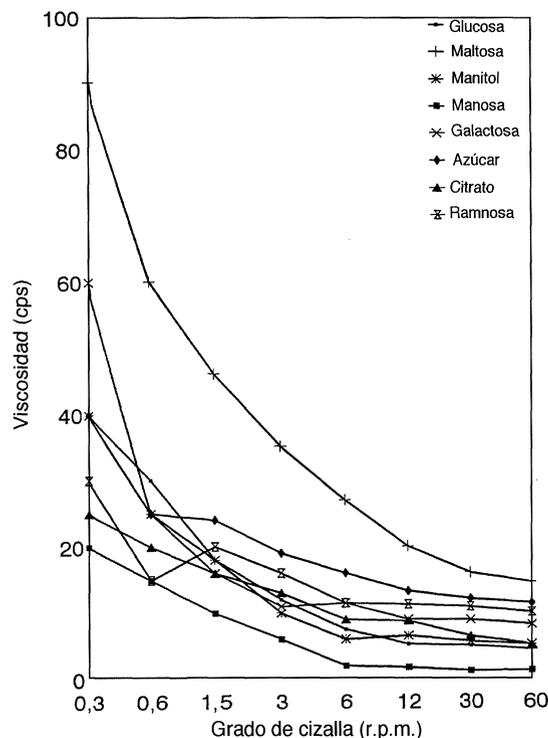


FIG. 1. Influencia de la fuente de carbono en las propiedades reológicas del exopolisacárido V2-7 de *Volcaniella eurihalina*. Abreviaturas: cps, centipoise; r.p.m., revoluciones por minuto.

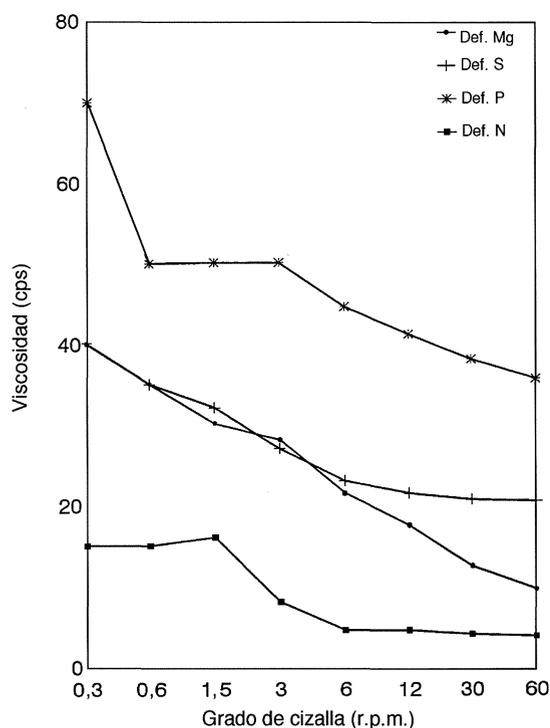


FIG. 2. Influencia de la limitación de nutrientes en las propiedades reológicas del exopolisacárido V2-7 de *Volcaniella eurihalina*. Abreviaturas: cps, centipoise; r.p.m., revoluciones por minuto.

Resultados y discusión

Las condiciones de cultivo pueden influir de forma diferente en la composición química y en las propiedades físicas de los polisacáridos bacterianos. Así, y a pesar de que la síntesis de dichos polímeros está codificada genéticamente, cambios en la fuente carbonada, deficiencias en nitrógeno, fósforo o azufre, etcétera, pueden modificar no sólo el rendimiento en la producción sino también la composición química del polímero y, en consecuencia, sus propiedades físicas, así como en el comportamiento en solución del mismo (5, 9, 6).

Los polisacáridos producidos por *Volcaniella eurihalina* cepa F2-7 en el medio definido NH presentaron distinto comportamiento reológico

según la fuente de carbono (Fig. 1), o la limitación de nutrientes (Fig. 2). En las figuras se puede observar que el valor máximo de viscosidad se alcanza cuando el polisacárido se obtiene a partir de medios con maltosa o en medios deficientes en azufre o fósforo. Sin embargo, es de destacar que el polímero producido en medios deficientes en fósforo poseía la particularidad de originar soluciones ligeramente ácidas (pH 5,76), lo que podría explicar la mayor viscosidad de las mismas.

Las soluciones del polisacárido V2-7 obtenido a partir de cultivos de *Volcaniella eurihalina* en el medio complejo MY, eran siempre más viscosas a pH ácido que a pH neutro o alcalino (2). Esta influencia del pH en la viscosidad de las soluciones, nos indujo a determinar el comportamiento

TABLA 1. Influencia del pH en la viscosidad de las soluciones al 1% de los EPS obtenidos bajo distintas condiciones nutricionales

Fuente de carbono	Viscosidad (cps)	
	pH 7	pH 4
Glucosa	18	16
Maltosa	46,1	28,1
Manitol	18	16
Lactosa	10	12
Manosa	10	8,02
Galactosa	16	16
Azúcar comercial	24	20
Citrato	10	4,01
Ramnosa	20	18
Deficiencias	pH 7	pH 4
Magnesio	30,1	22
Azufre	32,1	34,1
Fósforo*	50,1	52,1
Nitrógeno	16	6,01

La viscosidad se determinó a 25°C y a un grado de cizalla de 1,5 r.p.m.

* pH original 5,76

reológico de las soluciones ácidas de los polisacáridos producidos por la cepa F2-7 de *V. eurihalina* en las distintas condiciones nutricionales anteriormente citadas.

En general, la acidificación de las soluciones, de pH 7 a pH 4, originó una disminución en la viscosidad. Como puede comprobarse en la Tabla 1, esta disminución fue más acentuada cuando el polímero procedía de medios con maltosa o citrato como fuente carbonada, así como cuando se obtenía a partir de medios deficientes en nitrógeno. Por el contrario, los polisacáridos obtenidos en medios deficientes en azufre o en medios con lactosa como fuente de carbono, producían soluciones ligeramente más viscosas a pH ácido.

En la actualidad estamos realizando, en colaboración con la Empresa Tierra Protec S.L., el estudio sobre la actividad surfactante de biopolímeros y su posible aplicación en la degradación de residuos contaminantes derivados del petróleo. Los surfactantes de origen microbiano poseen una serie de propiedades que los convierte en una buena alternativa de los surfactantes obtenidos por síntesis química. Entre ellas se podrían destacar su biodegradabilidad y baja toxicidad, su obtención a partir de sustancias de desecho o su especificidad de acción (1, 4).

Por otro lado, la contaminación de los ecosis-

temas marinos por residuos petrolíferos es uno de los mayores problemas ecológicos de la actualidad (1). Puesto que *Volcaniella eurihalina* es una bacteria adaptada a hábitats hipersalinos y, dado que el polisacárido V2-7 ha demostrado una relativa estabilidad a las variaciones de salinidad (2), dicho estudio se ha iniciado determinando el efecto que la adición, al medio de cultivo, de residuos sólidos derivados del petróleo ejerce sobre la actividad surfactante de dicho polímero. Los resultados obtenidos demuestran que la adición de los residuos hidrocarbonados al medio MY, estimulan la producción de polisacárido con actividad emulsionante sobre dichos residuos petrolíferos. Sin embargo, pudo observarse que la adición del petróleo tras 48 h de incubación en MY, favorecía no sólo la actividad emulgente sino la estabilidad de la emulsión (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de Banat et al. (1), según la cual el consumo de glucosa como fuente de carbono inicial aumentaría la una tasa de crecimiento del microorganismo. Tras 48 h de incubación, la población bacteriana habría consumido casi totalmente dicho sustrato y habría iniciado la degradación del sustrato hidrocarbonado. Evidentemente, la producción de biosurfactante capaz de dispersar estos hidrocarburos inmiscibles, facilitaría la disponibilidad de éstos como fuente de carbono y energía.

TABLA 2. Influencia de las condiciones nutricionales en la actividad emulgente del biopolímero V2-7 de *Volcaniella eurihalina*

Tiempo de incubación al cual se adicionó el sustrato hidrocarbonado (h)	Emulsificación del sustrato hidrocarbonado (D.O. ₆₆₀)
0	0,087
24	0,091
48	0,111
72	0,042
96	0,042

Bibliografía

1. Banat, I. M., Samarah, N., Murad, M., Horne, R., Bunerjee, S. (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 80–88.
2. Calvo, C., Ferrer, M. R., Martínez-Checa, F., Béjar, V., Quesada, E. (1995). Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurihalina* F2-7. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **5**, 113–119.
3. Cameron, D. R., Cooper, D. G., Neufeld, R. J. (1988). The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1420–1425.
4. Cooper, D. G. (1986). Biosurfactants. *Microbiol. Sciences.* **3**, 145–149.
5. Dasinger, B. L., McArthur, H. A. I., Lengen, J. P., Smogowicz, A. A., Miller, J. W., O'Neill, J. J., Horton, D., Costa, J. B. (1994). Composition and rheological properties of extracellular polysaccharide 105-4 produced by *Pseudomonas* sp. strain ATCC 35923. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1364–1366.
6. De la Vega, M. G., Cejudo, F. J., Panque, A. (1991). Production of exocellular polysaccharide by *Azotobacter chroococcum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **30**, 273–284.
7. Moraine, R. A., Rogovin, P. (1966). Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotech. Bioengin.* **8**, 511–524.
8. Ng, T. K., Hu, W. S. (1989). Adherence of emulsan-producing *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrophobic liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 480–485.
9. Novak, J. S., Tannenbaum, S. W., Nakas, J. P. (1992). Heteropolysaccharide formation by *Arthrobacter viscosus* grown on xylose oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3501–3507.
10. Quesada, E., Béjar, V., Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia.* **49**, 1037–1041.
11. Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic populations in hypersaline environments of different salt concentration. *Microb. Ecol.* **7**, 235–243.
12. Sutherland, I. W. (1986). Industrially useful microbial polysaccharides. *Microbiol. Sciences.* **3**, 5–8.
13. Ventosa, A., Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 85–94.

Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*

Juan M. Rodríguez,^{1*} Helen M. Dodd²

¹ *Departamento de Nutrición y Bromatología III, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España*

² *Department of Genetics and Microbiology, BBSRC Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom*

Received 9 October 1995/Accepted 29 December 1995

Summary

In the past, the genetic determinants for nisin biosynthesis were thought to be plasmid-located. However, it has been shown that production of nisin, immunity to nisin, and other properties such as the fermentation of sucrose, are encoded on 70 kb conjugative transposons that are chromosomally located. The extrachromosomal location of the nisin genes has not been substantiated by experiments that unequivocally show plasmid transfer. Two natural variants of nisin have been identified, nisin A and nisin Z, encoded by the genes *nisA* and *nisZ*, respectively. Both genes have been cloned and sequenced and differ only in a single base pair. Approximately 12 kb downstream from the structural gene has been cloned and sequenced, and a further 10 genes involved in the biosynthesis of nisin have been identified. The *nisB* and *nisC* gene products are involved in nisin maturation, the *nisT* in its secretion and the *nisP* in its processing. The *nisR* and *nisK* gene products have a regulatory role and the *nisI*, *nisF*, *nisE* and *nisG* are involved in immunity to nisin. All these genes display significant homology to the corresponding genes of the related lantibiotics subtilin and epidermin.

Key words: *Lactococcus lactis*, nisin, bacteriocins, lantibiotics, lactic acid bacteria

Resumen

Anteriormente se pensaba que los determinantes genéticos de la biosíntesis de la nisina estaban localizados en un plásmido. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la producción de

* *Correspondence to:* Juan Miguel Rodríguez. Departamento de Nutrición y Bromatología III. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. España. Tel.: +34-1-3943750. Fax: +34-1-3943743. E-mail: jmrodrig@eucmax.sim.ucm.es

nisina, la inmunidad a la nisina, y otras propiedades como la fermentación de la sacarosa, están codificadas en transposones conjugativos de 70 kb situados en el cromosoma de las células productoras. Los experimentos de transferencia inequívoca de plásmidos no han podido sustentar la hipotética localización extracromosómica de los genes de la nisina. Existen dos variantes naturales de la nisina, la nisina A y la nisina Z, codificadas en los genes *nisA* y *nisZ*, respectivamente. Ambos genes han sido clonados y secuenciados y difieren únicamente en un par de bases. Posteriormente, se han secuenciado y clonado 12 kb por detrás del gen estructural, habiéndose identificado otros 10 genes relacionados con la biosíntesis de la nisina. Los genes *nisB* y *nisC* están implicados en la maduración de la nisina, el *nisT* en su secreción, el *nisP* en su procesado, los *nisR* y *nisK* en la regulación de su biosíntesis, y los *nisI*, *nisF*, *nisE* y *nisG* en la inmunidad a la misma. Todos estos genes muestran notables homologías con los genes correspondientes de los lantibióticos subtilina y epidermina.

Introduction

Nisin is a 34-amino acid antimicrobial peptide produced by some strains of *Lactococcus lactis*. This bacteriocin is widely used in the food industry to inhibit the growth of pathogenic and spoilage Gram-positive bacteria (7). Nisin molecule contains, as shown in Fig. 1, unusual amino acids, including one lanthionine, four β -metil-lanthionine, one dehydrobutyrine (DHB), and two dehydroalanine (DHA) residues (7). DHA and DHB arise from dehydration of serine and threonine. Condensation of DHA or DHB with cysteine generates thio-ether bonds and the amino acids lanthionine and β -metillanthionine, respectively. These modifications are the result of the extensive post-translational modifications that the ribosomally synthesized precursor peptide undergoes.

Over the last decades, the location of nisin genetic determinants has been the subject of a considerable debate. The first studies on nisin genetics were performed by Kozak et al. (26) who observed that the use of plasmid curing techniques notably increased the frequency of nisin production loss in *L. lactis*. These studies led to speculation that nisin biosynthesis was encoded by a plasmid.

Formerly, Hirsch and Grinsted (18) had pointed

that all nisin-producing strains fermented sucrose, suggesting that both phenotypes were genetically linked. This observation was confirmed by two kind of experiments. Firstly, the use of curing techniques showed that loss of the ability to ferment sucrose was always coupled with loss of nisin production (15, 17, 38); secondly, both phenotypes were invariably co-transferred after conjugation (15, 17, 28, 38). These experiments gave the first evidences of the existence of conjugative elements "nisin-sucrose" although they did not proporcionate any conclusive information on the nature of such elements. All authors cited above identified potential "nisin-sucrose" plasmids; however, transformation of *L. lactis* with the proposed plasmids could not show, in any case, that link. Moreover, some plasmid-free nisin-producing strains had already been isolated (14). Finally, the loss of nisin production by curing techniques could not be considered as a determinant factor supporting the plasmid hypothesis because, at that time, there was not any information on the effect of such techniques on chromosomally located genetic elements.

This review describes the dramatic advance that nisin genetics has suffered over the last five years which has led to the location and study of the different genes belonging to the nisin gene cluster.

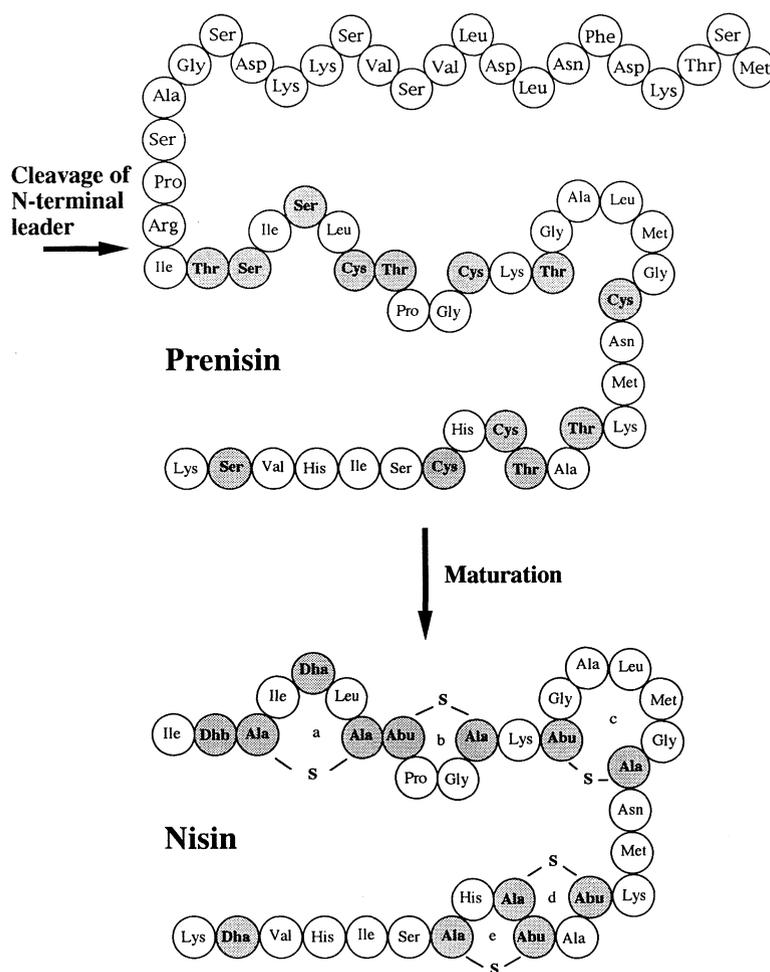


FIG. 1. Structure of the prenisin A and nisin A molecules. The shaded residues in the prenisin molecule are those that undergo the modification reactions described in the text. a-e, lanthionine rings; Dha, dehydroalanine; Dhb, dehydrobutyrine.

Nisin structural gene (*nisA*)

Originally, three independent research groups sequenced and cloned, almost simultaneously, the nisin structural gene (*nisA*) from three different *L. lactis* strains (4, 8, 22). The strategy of the three groups was based on the use of degenerate oligonucleotides to analyze the DNA of the nisin-producing *Lactococcus lactis*. In all cases, the probes were designed from the prenisin amino acid sequence proposed by Ingram (20). The *nisA* gene sequence was identical in the three strains

studied although differences were observed in the flanking sequences. The nisin precursor derived from the nucleotide sequence of the *nisA* gene was a 57 residues polypeptide totally coincident with the model of Ingram. These studies confirmed that the mature nisin molecule resulted from the modification of a ribosomally synthesized precursor. Later, the structural gene of nisin Z, a natural nisin variant, was also cloned and sequenced (27). The His27Asn substitution in nisin Z, with respect to nisin A, was the result of a cytosine to adenosine transversion in the nucleotide sequence.

The cloning and sequencing of the structural genes of other type A lantibiotics as epidermin, subtilin, gallidermin, Pep5 and lacticin 481 has allowed the comparison of their respective precursor molecules. Jung (21) analyzed the nucleotide sequences of the so far known prelantibiotics and deduced a number of similarities in their structures and properties. All leader sequences were very hydrophilic and strongly charged, they contained no cysteine and, most probably, folded into an amphiphilic in lipophilic environments. On the contrary, the prolantibiotic sequences were more lipophilic and its secondary structure is characterized by a preference of β -turns and absence of α -helices. Finally, the processing sites of the prelantibiotics, where the leader peptidases cleave the mature lantibiotic from the leader sequence, were highly conserved and located in a well-accessible and hydrophilic turn.

Identification of the transposons Tn5301 and Tn5276

Although the work of Buchman et al. (4), leading to the first sequence of the *nisA*, did not give any information about the nature of the “nisin-sucrose” genetic element, as the *nisA* gene was detected in a total genomic library of *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, Steen et al. (39) suggested that the *nisA* gene should be located on the chromosome of *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, since such gene hybridized with restriction fragments too big to be plasmid encoded. However, Kaletta and Entian (22) found the *nisA* to be located on purified plasmid DNA from *L. lactis* 6F3. The discrepancy in the *nisA* gene location was attributed to strain divergence or to the different purification methods applied.

Dodd et al. (8) found a strong indication for the chromosomal location of the *nisA* gene in a nisin-producing transconjugant (FI5876) derived from a

mating between *L. lactis* subsp. *lactis* NCFB 894 and MG1614 (15). Approximately 800 bp upstream the *nisA* gene, a copy of the insertion sequence IS904 was identified (Fig. 2). A detailed analysis of the genomic relationship between this copy of IS904 and the *nisA* gene in different nisin-producing transconjugants gave the first formal proof of the physical location of nisin determinants in the chromosome of *L. lactis* strains (8). In the same study, the non-nisin producing recipient strain, *L. lactis* MG1614, was compared by Southern hybridization with its nisin-producing transconjugants, which demonstrated the chromosomal integration of the *nisA* gene together with the copy of IS904. This was shown to be close to one end of the transferred DNA, leading to speculation that the genetic determinants for nisin biosynthesis and sucrose fermentation were located on a conjugative transposon. DNA sequencing upstream from IS904 identified a 6 bp terminal direct repeat (5'-TTTTTG-3') that defined the termini of a novel 70 kb conjugative transposon designated Tn5301 (19). Only one copy of IS904 was located 249 bp from the left border of Tn5301. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) separation of *Sma*I-digested fragments of chromosomal DNA from nisin-producing *L. lactis* strains was used to establish the exact location and size of Tn5301 (19).

Subsequently, other research groups obtained the same conclusions studying different nisin-producing strains (28, 39). In *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO R5, an IS element almost identical to IS904 was found at the same location and hence it was named iso-IS904 or IS1068 (30). In this strain, Rauch and De Vos (28) reported the existence of another conjugative transposon, Tn5276, which genetic organization and terminal direct repeats were identical to those of Tn5301. In fact, the characteristics of these two transposons are so similar that no traits distinguishing them have yet been discovered. Although both

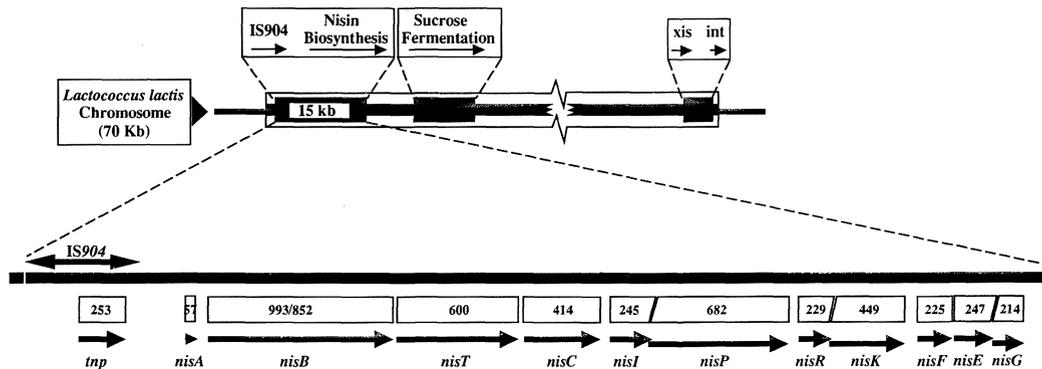


FIG. 2. Organization of the genes for nisin biosynthesis on the *Lactococcus lactis* chromosome.

transposons may integrate into different sites on the chromosome of *L. lactis*, there is a strong preference for type I sites, or insertion hot spots, where they integrate in a specific orientation (28).

The sucrose-6-phosphate hydrolase structural gene (*sacA*) was found approximately 20 kb downstream the *nisA* gene (31). The right end of the transposon encodes *xis* and *int* genes that promote reciprocal site-specific recombination at pre-existing *attB* sites in a manner similar to temperate bacteriophages (29). Additional phenotypes associated with the “nisin–sucrose” conjugative transposons include resistance to bacteriophages (17) and the production of N⁵-(carboxyethyl) ornithine synthase (9). However, these phenotypes have a considerable variability among nisin-producing strains and their transconjugants (9, 15, 17).

Both Tn5301 and Tn5276 conform with the definition of conjugative transposons (28). They are DNA fragments that can integrate into different chromosome sites, they encode additional functions to those strictly required for transposition, and they are self-transmissible. As described in early studies, *L. lactis* strains may lose the nisin production ability, either spontaneously or after an

inducing treatment. Such loss is probably the result of the excision and loss of the “nisin–sucrose” transposon. A similar loss has also been described for the conjugative Tn916 from *Enterococcus faecalis* (16).

Tn5301 and Tn5276 show some novel characteristics with respect to other conjugative transposons. Firstly, all conjugative transposons described until the identification of Tn5301, contained the *tetM* gene conferring tetracycline resistance. Secondly, conjugative transposons differ from other transposons in that they have no terminal repeats and, after insertion, no duplication of the target sequence takes place (10); however, duplication of the target sequence occurs after Tn5301 and Tn5276 insertion. Tn5301 and Tn5276 share the precise nature of excision observed in other conjugative transposons. The precise manner of this excision event suggests the involvement of a circular intermediate molecule in the movement of these transposons. Once excised, such an intermediate could transpose to a new location in the same cell, undergo conjugal transposition to a different cell, or be lost from daughter cells during segregation. The formation of such molecule would involve a recombination event between the two ends of the element (10).

Organization of the nisin gene cluster

In addition to the structural gene for prenisin (*nisA*), other genes are required for the biosynthesis of this complex bacteriocin. These include genes encoding proteins involved in the modification of the precursor, proteolytic cleavage of the N-terminal leader, secretion of the peptide, nisin immunity and regulatory functions. Analysis of the related peptides epidermin (1, 34) and subtilin (5, 24, 25) has revealed the presence of a number of genes, closely associated to the respective structural genes, which are essential for biosynthesis of the

respective lantibiotics. Although it is known that genes involved in lantibiotic biosynthesis are arranged in clusters, it is not clear whether these clusters constitute true operons as there are more than just one promoter controlling the different genes. However, there are indications that lantibiotic genes are coordinately transcribed as a single mRNA molecule (39). Van der Meer et al. (42) have reported the cloning of a 12 kb fragment of Tn5276 that encodes all proteins required for nisin biosynthesis in *L. lactis*. The organization of the nisin gene cluster in the *L. lactis* chromosome and the more relevant characteristics of the pro-

TABLE 1. Nisin genes, encoded proteins and other genetic characteristics of the nisin gene cluster

Feature	Size (bp)	Encoded protein	Size (aa)	Description
IS904/IS1068	759	Tnp	253	Insertion sequence preceding the nisin gene cluster
Promoter				<i>nisA</i> promoter
<i>nisA/nisZ</i>	171	Prenisin	57	Structural gene for nisin precursor
<i>IR</i>	20			Inverted repeat. Proposed mRNA processing site
<i>nisB</i>	2556/2982	NisB	852/993	NisB is involved in prenisin maturation
<i>IR</i>	25			Proposed transcription terminator
<i>nisT</i>	1803	NisT	600	NisT translocates prenisin
<i>nisC</i>	1257	NisC	418	NisC is involved in prenisin maturation
<i>nisI</i>	738	NisI	245	NisI confers immunity to nisin
<i>nisP</i>	2049	NisP	683	NisP cleaves the leader sequence of the nisin precursor
Promoter				<i>nisR</i> and <i>nisK</i> promoter
<i>nisR</i>	690	NisR	229	NisR and NisK form a two component regulator system NisR is the response regulator
<i>nisK</i>	1341	NisK	447	NisK is the histidine kinase of the regulator system
<i>IR</i>	16			Proposed transcription terminator
Promoter				<i>nisF</i> , <i>nisE</i> and <i>nisG</i> promoter
<i>nisF</i>	675	NisF	225	NisF is involved in immunity to nisin
<i>nisE</i>	726/741	NisE	242/247	NisE is involved in immunity to nisin
<i>nisG</i>	642	NisG	214	NisG is involved in immunity to nisin

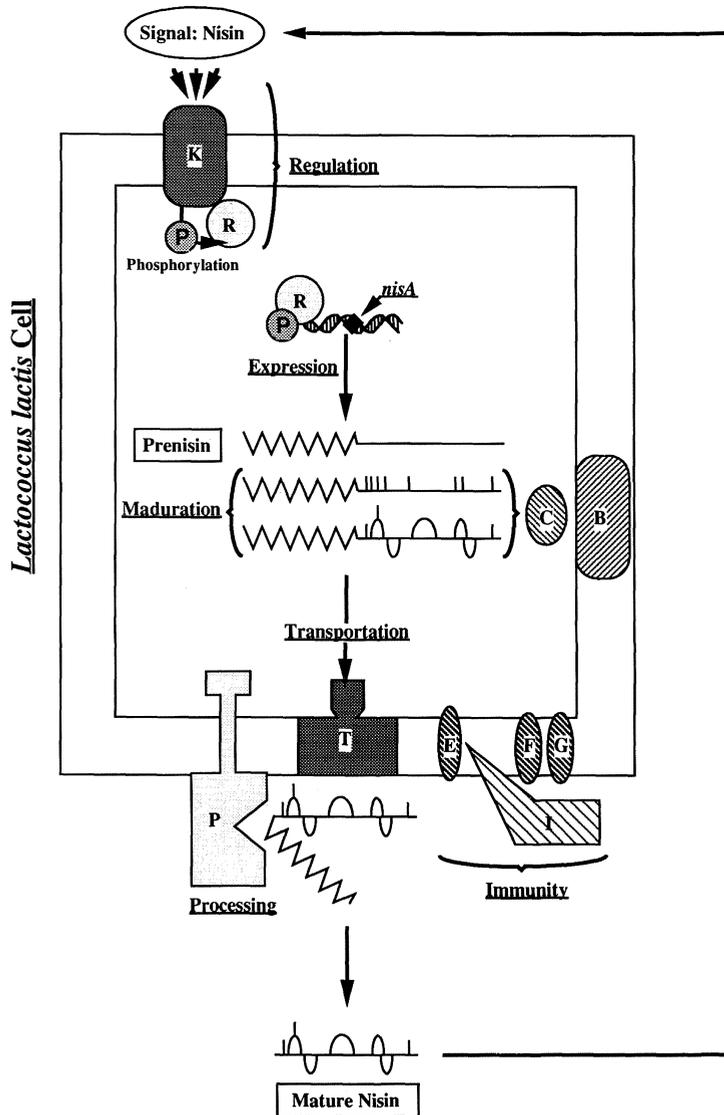


FIG. 3. Schematic model for nisin biosynthesis. See text for details. B, NisB; T, NisT; C, NisC; I, NisI; P, NisP; R, NisR; K, NisK; F, NisF; E, NisE; G, NisG.

teins that they encode are shown in Fig. 2 and Table 1, respectively. The nomenclature of the nisin genes follows the criteria established by De Vos et al. (6). Fig. 3 represents a nisin biosynthesis model, reflecting the functions of the different proteins encoded by the nisin gene cluster.

***nisB* gene**

The start of a second gene, *nisB*, was discovered a short distance (108 bp) downstream from the end of the *nisA* gene (4, 8, 22). Although the *nisB* sequence is largely identical in the different nisin-producing *L. lactis* strains, there are small

differences at the 3' end of the gene, leading to significant changes in the C-terminal fragment of the expressed proteins. The *nisB* gene described in *L. lactis* ATCC 11454 (39) is 2556 bp in length, which encode an 852 amino acid protein of 100.5 kDa. In *L. lactis* 6F3, a frameshift caused by an additional nucleotide at coordinate 2520 of the *nisB* gene results in this gene having a much larger 117 kDa protein of 993 amino acids (11). In both cases, in front of the ATG start codon, a probable Shine-Dalgarno sequence (5'-GAGAGG) is within appropriate distance. No significant differences in nisin production by these two independent lactococcal isolates have been reported, suggesting that the C-terminal end of the NisB protein does not have a vital functional role in the biosynthesis of this molecule.

The NisB proteins are strong candidates for the expected enzymatic modification of prenisin (11, 39). Over the entire sequence, NisB was homologous to the proteins SpaB (26.2% homology) and EpiB (23.6% homology), which are essential for the biosynthesis of the lantibiotics subtilin (24) and epidermin (34), respectively. In the data bases, no homologies to previously described proteins have been found for the NisB, SpaB and EpiB proteins, which may indicate that they correspond to new enzymatic functions such as those reactions involved in the post-translational modifications of lantibiotics.

The NisB protein contains several potential transmembrane helical regions with amphipatic character, which provides evidence for a membrane-associated protein. This has been confirmed using vesicles isolated from *L. lactis* (11). The NisB protein always cosedimented with the vesicle fraction and was eluted from the vesicles only after a sodium dodecyl sulphate (SDS) treatment. Furthermore, Western blot analysis, using antibodies raised against a NisB/TrpE fusion protein, showed that the NisB protein was tightly associated with the vesicle fraction of *L. lactis* (11). This result

was consistent with a membrane location for the NisB protein and supported the proposal that nisin maturation, as with other lantibiotics, occurs while the peptide is associated with the membrane (34). From these observations, it was concluded that NisB is a membrane associated protein, with the lack of an N-terminal leader sequence suggesting that the anchorage is on the cytoplasmatic side of the membrane (39).

The expression of the NisB protein occurs about 30 minutes after the start of prenisin expression. So, nisin activity coincides with NisB expression, reinforcing the role of NisB in the maturation of the prepeptide. Even after overnight incubation in the stationary phase, prenisin and NisB are still present at about 60% of the maximum level. This fact indicates that nisin synthesis and modification reactions continuously occurs in that phase of growth, opening new production possibilities by using immobilized nisin-producing cells (12).

***nisT* gene**

The *nisT* gene is located immediately downstream of the *nisB* stop codon, the precise intercistronic distance ranging from 14 to 311 bp because of the variation in the 3' end portion of the *nisB* gene in the different strains studied (11). The *nisT* open reading frame (ORF) starts with an ATG codon preceded by a 5'-TGAGGA sequence which may serve as a ribosome binding site (11). Potential -10 and -35 promoter regions similar to those previously described for *L. lactis* were also present in front of the *nisT* gene.

The *nisT* gene encodes a protein of 600 amino acids with a molecular mass of 69 kDa. NisT shares strong homology (43,8 %) to SpaT, a protein involved in subtilin biosynthesis (11, 24). Additionally, there is a strong homology of NisT and SpaT with several ATP-dependent transport

proteins such as the transport protein for hemolysin (HlyB) of *Escherichia coli*, the LktB protein for leukotoxin A of *Pasteurella haemolytica*, the CyaB protein for cyclolysin of *Bordetella pertussis*, the ComA protein of *Streptococcus pneumoniae* and the protein responsible for human cystic fibrosis disease. All these secretory proteins contain potential membrane-spanning helices within regions of hydrophobicity suggesting a membrane location (7). The strong similarities with proteins involved in the secretion of polypeptides, polysaccharides, and anti-drug tumours (3) indicate that NisT may be involved in nisin transport.

Gene disruption of *spaT*, the gene encoding the SpaT protein, has demonstrated the role of SpaT in the transport of subtilin (24). The resulting mutants are still able to produce subtilin but with several anomalies. The *spaT* mutants stopped growth much earlier than the wild type and agglutinated, forming mycelium-like aggregates. Therefore, it is assumed that a defect in subtilin transport cause a strong intracellular accumulation of subtilin which can be responsible for the observed phenotypes. The idea that this protein interferes strongly with cellular metabolism is supported by the fact that expression of NisT in *E. coli* is also very toxic (11).

***nisC* gene**

The *nisC* gene overlaps with the 3' end of *nisT*. Although there are three possible ATG translational initiation codons, only the third one is preceded by an appropriate Shine-Dalgarno sequence (5'-TGAGGA). Assuming that the third ATG codon is the translational start site, *nisC* encodes a protein of 414 amino acid residues with a molecular mass of 47.3 kDa. There is a strong homology of NisC to proteins SpaC (24) and EpiC (1, 34), identified as essential for the biosynthesis of subtilin

and epidermin, respectively. Hydrophobicity plots also reveal strong similarities among the three proteins (11). As no similarities to other previously described proteins have been found, it is thought that, as happened with Nis B, NisC may play an essential role in the enzymatic modification of prenisin.

***nisI* gene**

The ORF of the *nisI* gene overlaps with the TGA stop codon of *nisC* (12). The *nisI* gene starts with an ATG codon preceded by a potential ribosome-binding site (TGAAAGGAGG) with almost perfect homology to the consensus ribosome-binding site for *Lactococcus lactis* (TGAAAGGAGGT). The *nisI* gene encodes a protein of 245 amino acids with a molecular size of 27.8 kDa. The sequence of its N-terminus strongly resembles that of N-terminal signal peptide sequences of lipoproteins from *E. coli*, *Bacillus* species and *L. lactis* (12). Bacterial lipoproteins are exported proteins anchored to the cellular or outer membrane by lipid moieties. The lipids are covalently linked to the cysteine residue at the distal N terminus of the secreted protein (45). The N-terminal part of NisI has the typical tripartite structure of signal peptides, with a positively charged NH₂ terminus, a hydrophobic core, and a cleavage region (43).

The expression of *nisI* in a nisin-sensitive nonproducer confers increased nisin resistance to this strain, clearly showing that NisI is involved in immunity against exogenously supplied nisin (12). The understanding of nisin immunity is of major importance to spread nisin application in the food industry. Although nisin is the most studied bacteriocin of lactic acid bacteria, little is known about nisin immunity. The existence of specific self-protection mechanisms needed to overcome the action of their own products is a common

feature of bacteriocin-producing cells. Immunity proteins predominantly hydrophobic and with three or four potential membrane-spanning domains have been described for channel-forming colicins such as colicin E1 and colicin A (37). A protein, SpaI, similar to NisI and involved on the self-protection mechanism against subtilin has also been identified (23). In the case of the lantibiotic Pep5 from *Staphylococcus epidermidis* 5, the gene *pepI* encodes an immunity peptide of 69 amino acid residues with no sequence similarities to NisI and SpaI (32). Finally, a gene, *nsr*, conferring resistance against nisin has been isolated from *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC3, which is a nisin nonproducer (13). The 318 amino acid Nsr protein is predicted to be membrane associated as a result of its hydrophobic N terminus. However, the level of resistance is only 10% of that of a nisin-producing strain. Hybridization analysis using a *nsr* gene probe have shown that no homologous gene is present in the genome of nisin-producing *L. lactis* strains (13). These results reveal that the Nsr protein only provides an acquired resistance, thus differing considerably from the immunity that nisin-producing strains enjoy.

nisP gene

The *nisP* gene is found within 1 bp of the end of the *nisI* ORF (12, 42). The *nisP* gene starts with a GTG codon preceded by a consensus ribosome-binding site at position -11 to -8 (AGGA) and ends with a TGA codon. The *nisP* gene encodes a protein of 682 amino acid residues, corresponding to a molecular size of 74 kDa. The NisP protein has characteristic similarities to serine proteases, especially with the group of subtilisin-like proteases, such as the major intracellular serine protease ISP-1 from *Bacillus subtilis*, the thermitase from *Thermoactinomyces vulgaris*, and the putative epidermin leader peptidase EpiP (34). The characteristic conserved amino acids of the active and

catalytic sites of this group are also observed in NisP. The three active-site residues Asp-259, His-306 and Ser-512, together with the oxyanion hole residue Asn-407, are essential for the function of this protein (36). The catalytic domain of NisP shows the greatest similarities to the corresponding segment of EpiP (42% identity and 60% similarity in 350 residues); however, the N-terminal pre-pro sequences of NisP and EpiP are not significantly similar, while the C-terminal extension found in NisP is completely absent in EpiP (12).

All the facts indicate that NisP is a subtilisin-like protease involved in processing of the secreted leader peptide. In vitro, NisP, whether produced in *L. lactis* strains or in *E. coli* cells expressing the *nisP* gene under control of the T7 promoter, cleaves off the leader peptide sequence from purified precursor nisin (42). Molecular modelling studies, based on the homology of NisP with thermitase and subtilisin, suggest that the amino acid sequence around the cleavage site of the precursor peptide would fit specifically in the substrate-binding region of the mature NisP protease. The primary sequence of NisP reveals that it is synthesized as a precursor protein and thus, the pro-NisP protein would have to undergo a maturation process to become an active protease (42). The maturation process of the NisP protease could be similar to that of the cell envelope proteinase of *L. lactis* SK11, requiring PrtM as helper protein (44), or it could be autocatalytically processed as is common in this family of serine proteases (36). After translocation, the mature and active NisP remains anchored in the cell membrane similarly to the *L. lactis* cell envelope proteinase (44).

The NisP protein, belonging to the nisin gene cluster, acts as receptor for other lantibiotic, carnocin UI49. So, nisin-producing *L. lactis* strains are approximately 10-fold more sensitive to carnocin UI49 than any other lactic acid bacteria (41).

nisR and *nisK* genes

The *nisP* gene is followed by two additional ORFs, *nisR* and *nisK* (12, 42). The *nisR* gene is located 49 bp downstream the end of *nisP* stop codon and starts with a GTG codon, which is preceded by a potential ribosome-binding site (GGAGG) at a distance within the range (-5 to -9) usually observed for *L. lactis* genes (42). The *nisR* gene encodes a polypeptide of 229 residues with a molecular mass of 26.7 kDa. The *nisR* ORF overlaps with a further ORF, *nisK*. It starts with an ATG codon, ends with TAA as a stop codon, and encodes a protein of 447 amino acids with a deduced molecular size of 51.3 kDa (12). An inverted repeat of 16 bp within the noncoding region between the *nisK* and the *nisF* ORFs has been identified. This unusual DNA sequence, possibly forming a stem-loop structure, may serve as a terminator of transcription at the end of *nisK* (35).

The NisR and NisK proteins have strong similarities to proteins of two-component regulatory systems (40). For NisR, the maximum degree of homology (41.3%) is found between NisR and SpaR, the response regulator of subtilin biosynthesis (25). High similarities are also observed with members of the OmpR-like response regulators, such as PhoP from *B. subtilis*, PhoP from *Salmonella typhimurium*, OmpR from *E. coli* and PhoB from *Pseudomonas aeruginosa*. The N-terminal sequences of about 110 residues, where phosphorylation of a conserved Asp residue by the corresponding histidine kinase takes place, show the highest degree of amino acid identity in all these regulatory components of sensory transduction systems (40). The active-site residues are conserved in all members of the family, and, by sequence analysis, in NisR are predicted to be Asp-10, Asp-53 (the phosphorylation site), and Lys-102 (33).

With respect to NisK, this protein is signifi-

cantly similar to the histidine kinases of two-component regulatory systems, which act as membrane-located sensors of environmental signals (40). Sequence similarities among histidine kinases are mainly restricted to their C-terminal parts, which is located on the inner side of the cytoplasmatic membrane. These parts contain a conserved His residue (His-238 in NisK) where autophosphorylation occurs, a conserved Asp residue (Asp-349 in NisK), and a Gly-rich stretch at the C-terminal end (from amino acid 380 to the extreme C-terminal end). NisK is similar to EnvZ and PhoM from *E. coli* and to PhoR and SpaK from *B. subtilis* (25). Additionally, the characteristic histidine kinase hydrophobicity plot is very similar for both NisK and SpaK (12). At the N terminus, two hydrophobic regions, which possibly are transmembrane domains, are interrupted by a hydrophilic stretch that may correspond to the extracellular located sensor domain. The C-terminal part is also hydrophilic and may be the signal-transducing domain with kinase activity (12).

It seems that the interaction between nisin and the NisK protein is the responsible of the autoregulation of nisin biosynthesis in *L. lactis* by a signal transduction mechanism. Thus, nisin itself would act as the inducing molecule to switch on the nisin gene cluster. At present, great attention is focused on the study of nisin biosynthesis induction and regulation.

nisF, *nisE* and *nisG* genes

Recently, further nisin cluster genes, *nisF*, *nisE* and *nisG* have been located approximately 12 kb downstream of the nisin structural gene, *nisA* (35). The *nisF* gene encodes a protein of 225 amino acids with a calculated molecular mass of 24.7 kDa. The *nisF* ORF starts 102 bp downstream of the end of *nisK* and it is preceded by a putative

ribosome binding site at an appropriate distance from the ATG start codon. Upstream of *nisF*, a -10 and -35 promoter region similar to others described for *L. lactis* has been found, indicating that *nisF*, *nisE* and *nisG* have their own promoter. The gene *nisE* starts immediately downstream of *nisF*, and encodes a protein of 242 or 247 amino acids depending on which of the two AGT codons existing at the beginning of the gene is considered as the start one. The correct distance of the second ATG from consensus lactococcal ribosome binding sites strongly favors it as the start codon. The last gene of the nisin gene cluster is *nisG*, which start overlaps with the 3' end of *nisE*. The *nisG* probably encodes a protein of 214 amino acids with a deduced molecular mass of 24.2 kDa.

Besides the *nisI* gene, the *nisF*, *nisE* and *nisG* genes may also be involved in immunity to nisin because, although gene disruption mutants carrying mutations in these three genes are still able to produce nisin, they are also more sensitive to nisin when compared with the wild-type strain (35).

Proteins NisF and NisE share strong homology to members of the family of ATP-binding cassette (ABC) transporters (35). The complete NisF protein is 45.5% similar to the N-terminal domain of the SpaF protein while NisE is similar to the C-terminal part of SpaF. The hydrophobicity analysis of NisF and NisE together resembles that of the entire SpaF, an ABC transporter involved in immunity to subtilin (23). There is an additional similarity of NisF-NisE to the MbcF-MbcE transporter of *E. coli*, which is involved in immunity to microcin B17 (37). Nisin, subtilin and several colicins have a common mode of action, depolarizing the energy-transducing cytoplasmic membrane through the formation of aqueous channels. Since the channel-forming activity of nisin depends on the orientation of the transmembrane potential (2), it can only act from the outside of the cells. In this context, the ABC transporter can play a role in the self-protection mechanism against

nisin by active transport of the mature lantibiotic to the inside of the cells and subsequent degradation, protecting the cells from damage caused by their own products (35).

NisG is a predominantly hydrophobic protein similar to the immunity proteins described for different colicins which are believed to interact directly with the channel-forming domains of their respective colicins (37). For example, the hydrophobicity plots of the NisG and the colicin N immunity protein have a very similar configuration (35). It is thought that, as an alternative to the hydrophobic domain function in a putative ABC transporter, NisG might act in a manner similar to that of the colicin immunity proteins by interaction with pore-forming nisin molecules (35).

Open reading frames downstream of *nisG*

Approximately 1 kb downstream of *nisG*, three open reading frames with the opposite orientation have been identified (35). The largest ORF encodes a 318 amino acid protein which N terminus is identical to the 27 N-terminal amino acids of the putative sucrose regulator (SacR). Two further reading frames, ISXA and ISXB, show homologies to the lactococcal insertion element IS98J (35). No suitable Shine-Dalgarno sequence has been found for ISXA, suggesting that this insertion element is not functional.

The identification of a sucrose operon gene, *sacR*, downstream the *nisG* gene suggests that all genes of the nisin gene cluster have already been identified. Thus, the complete gene cluster for nisin biosynthesis would comprise 15 kb of DNA. Further research is needed for a better understanding of the exact mechanisms by which the different proteins encoded in the nisin gene cluster participate in nisin biosynthesis. The better knowledge of nisin biosynthesis will lead to the extension of nisin applications in the food industry.

References

1. Augustin, J., Rosenstein, R., Wieland, B., Schneider, U., Schnell, N., Engelke, G., Entian, K. D., Götz, F. (1992). Genetic analysis of epidermin biosynthetic genes and epidermin-negative mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Eur. J. Biochem.* **204**, 1149–1154.
2. Benz, R., Jung, G., Sahl, H. G. (1991). Mechanism of channel formation by lantibiotics in black lipid membranes. *In* Jung, G., Sahl, H. G. (ed.), *Nisin and Novel Lantibiotics*, pp. 350–372. ESCOM, Leiden The Netherlands.
3. Blight, M. A., Holland, I. B. (1990). Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators. *Mol. Microbiol.* **4**, 873–880.
4. Buchman, W. B., Banerjee, S., Hansen, J. N. (1988). Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**, 16260–16266.
5. Chung, Y. J., Steen, M. T., Hansen, J. N. (1992). The subtilin gene of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 is encoded in an operon that contains a homolog of the hemolysin B transport protein. *J. Bacteriol.* **174**, 1417–1422.
6. De Vos, W. M., Jung, G., Sahl, H. G. (1991). Appendix: definitions and nomenclature of lantibiotics. *In* Jung, G., Sahl, H. G. (ed.), *Nisin and Novel Lantibiotics*, pp. 457–464. ESCOM, Leiden, The Netherlands.
7. Dodd, H. M., Gasson, M. J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *In* Gasson, M. J., De Vos, W. M. (ed.), *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, pp. 211–251. Blackie, London, United Kingdom.
8. Dodd, H. M., Horn, N., Gasson, M. J. (1990). Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 555–566.
9. Donkersloot, J. A., Thompson, J. (1990). Simultaneous loss of N⁵-(carboxyethyl)ornithine synthase, nisin production, and sucrose fermenting ability by *Lactococcus lactis* K1. *J. Bacteriol.* **172**, 4122–4126.
10. Drysdale, D., Dodd, H. M. (1992). Analysis of the transposition of Tn5301, the nisin/sucrose element encoded by *Lactococcus lactis*. BIO390 Research Project Report. AFRC Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom.
11. Engelke, G., Gutochowski-Eckel, Z., Hammelman, M., Entian, K. D. (1992). Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane location of the NisB protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3730–3743.
12. Engelke, G., Gutochowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelman, M., Entian, K. D. (1994). Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 814–825.
13. Froseth, B. R., McKay, L. L. (1991). Molecular characterization of the nisin resistance region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC3. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 804–811.
14. Fuchs, P. G., Zajdel, J., Dobrzanski, W. T. (1975). Possible plasmid nature of the determinant for production of the antibiotic nisin in some strains of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* **88**, 189–192.
15. Gasson, M. J. (1984). Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production in *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**, 7–10.
16. Gawron-Burke, C., Clewell, D. B. (1982). A transposon in *Enterococcus faecalis* with fertility properties. *Nature* **300**, 281–284.
17. Gonzalez, C. F., Kunka, B. S. (1985). Transfer of sucrose-fermenting ability and nisin production phenotype among lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 627–633.
18. Hirsch, A., Grinsted, E. (1951). The differentiation of the lactic streptococci and their antibiotics. *J. Dairy Res.* **18**, 198–204.
19. Horn, N., Swindell, S., Dodd, H. M., Gasson, M. J. (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 129–135.
20. Ingram, L. (1970). A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochem. Biophys. Acta* **224**, 263–265.
21. Jung, G. (1991). Lantibiotics: a survey. *In* Jung, G., Sahl, H. G. (ed.), *Nisin and Novel Lantibiotics*, pp. 1–34. ESCOM, Leiden, The Netherlands.
22. Kaletta, C., Entian, K. D. (1989). Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* **171**, 1597–1601.
23. Klein, C., Entian, K. D. (1994). Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2793–2801.
24. Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N., Entian, K. D. (1992). Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 132–142.

25. Klein, C., Kaletta, C., Entian, K. D. (1993). Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidinekinase/response regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 296–303.
26. Kozak, W., Rajchert-Trzpił, M., Dobrzanski, W. T. (1974). The effect of proflavin, ethidium bromide and elevated temperature on the appearance of nisin-negative clones in nisin-producing strains of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* **83**, 295–302.
27. Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J., De Vos, W. M. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* **201**, 581–584.
28. Rauch, P. J. G., De Vos, W. M. (1992). Characterization of the novel nisin–sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **174**, 1280–1287.
29. Rauch, P. J. G., De Vos, W. M. (1994). Identification and characterization of genes involved in excision of the *Lactococcus lactis* conjugative transposon Tn5276. *J. Bacteriol.* **176**, 2165–2171.
30. Rauch, P. J. G., Beerthuyzen, M. M., De Vos, W. M. (1990). Nucleotide sequence of IS904 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain NIZO R5. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4253–4254.
31. Rauch, P. J. G., Beerthuyzen, M. M., De Vos, W. M. (1994). Distribution and evolution of nisin–sucrose elements in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1798–1804.
32. Reis, M., Sahl, H. G. (1991). Genetic analysis of the producer self-protection mechanism ('immunity') against Pep5. *In* Jung, G., Sahl, H.G. (ed.), *Nisin and Novel Lantibiotics*, pp. 320–331. ESCOM, Leiden, The Netherlands.
33. Sanders, D. A., Koshland, D. E. (1988). Receptor interactions through phosphorylation and methylation pathways in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8425–8429.
34. Schnell, N., Engelke, G., Augustin, J., Rosenstein, R., Ungermann, V., Götz, F., Entian, K. D. (1992). Analysis of genes involved in the biosynthesis of lantibiotic epidermin. *Eur. J. Biochem.* **204**, 57–68.
35. Siegers, K., Entian, K. D. (1995). Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1082–1089.
36. Siezen, R. J., De Vos, W. M., Leunissen, A. M., Dijkstra, B. W. (1991). Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Eng.* **4**, 719–737.
37. Song, H. Y., Cramer, W. A. (1991). Membrane topology of Cole1 gene products: the immunity protein. *J. Bacteriol.* **173**, 2935–2943.
38. Steele, J. L., McKay, L. L. (1986). Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 57–64.
39. Steen, M. T., Chung, Y. J., Hansen, J. N. (1991). Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1181–1188.
40. Stock, J. B., Ninfa, A. J., Stock, A. M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 450–490.
41. Stoffels, G., Gudmundsdottir, A., Abee, T. (1994). Membrane-associated proteins encoded by the nisin gene cluster may function as a receptor for the lantibiotic carmocin UI49. *Microbiology* **140**, 1443–1450.
42. Van der Meer, J. R., Polman, J., Beethuyzen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., De Vos, W. M. (1993). Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**, 2578–2588.
43. Von Heijne, G. (1988). The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein Eng.* **2**, 531–534.
44. Vos, P., Van Asseldonk, M., Van Jeveren, F., Siezen, R., Simons, G., De Vos, W. M. (1989). A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *J. Bacteriol.* **171**, 2795–2802.
45. Wu, H. C., Hayashi, S. (1986). Lipoprotein secretion in bacteria. *In* Leive, L. (ed.), *Microbiology-1986*, pp. 260–265. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Optimization of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia3

Gonzalo Platas,^{1*} Inmaculada Meseguer,² Ricardo Amils¹

¹ Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, España

² Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, España

Received 5 September 1995/Accepted 22 December 1995

Summary

The optimal conditions for the production of the halocin H1, a 31 kDa bacteriocin-like molecule produced by the extreme halophilic Archaea *Haloferax mediterranei* Xia3 active against Gram-negative haloarchaea, was characterized. The physico-chemical conditions required for the optimal production of halocin H1 are similar to those found in the habitat in which the microorganism was isolated: 20% salt concentration and temperature range between 37 and 42°C. Optimal antimicrobial activity was obtained using 0.5% of N-Z amine E as nutrient.

Key words: *Haloferax mediterranei*, haloarchaea, halocin, bacteriocin, production optimization

Resumen

Se han caracterizado las condiciones óptimas para la obtención de la halocina H1, una substancia de tipo bacteriocina de 31 kDa producida por la arquea halofílica extrema *Haloferax mediterranei* Xia3, activa contra haloarqueas Gram-negativas. Las condiciones físico-químicas óptimas requeridas para la producción de la halocina H1 han resultado ser similares a las del hábitat en el que fue aislada: 20% de concentración salina y un rango de temperatura entre 37 y 42°C. El máximo de actividad antimicrobiana se obtuvo utilizando 0.5% de N-Z amine E como nutriente.

* Correspondence to: Gonzalo Platas. Present address: Centro de Investigación Básica España. Merck, Sharp & Dohme de España. Josefa Valcárcel, 38. 28027 Madrid. España. Tel.: +34-1-3210702. Fax: +34-1-3210614. E-mail: gonzalo_platas@merck.com

Introduction

The term bacteriocin is applied to describe a wide range of biologically active proteins of bacterial origin that exhibit antimicrobial properties against other bacterial species, usually closely related to the producer organism (2). During the last decade, many research groups have devoted a great deal of effort to the study of this type of compound due to their potential use as preserving agents in the food industry, preventing the proliferation of bacterial food-borne pathogens, and, also, to prevent certain infectious diseases, following strategies based on bacterial interference (5).

Both Gram-positive and Gram-negative bacteria produce this type of compound, although the bacteriocins of each group show different characteristics (7). Bacteriocins produced by Gram-negative bacteria are, in general, high molecular weight proteins codified in plasmids, with a very narrow profile of activity against other Gram-negative bacteria. The absorption of these molecules depends on the presence of specific receptors in the sensitive cells and their induction is achieved by the use of UV light treatment or intercalating agents, such as acridine orange or ethidium bromide. As a general rule, the release of these bacteriocins is coupled with the death of the producer cell.

In general, bacteriocins produced by Gram-positive bacteria have low molecular weight and a wide antimicrobial spectrum. In most cases, they do not require the presence of a specific receptor. The producer cells are usually resistant to the action of these proteins. Also, their induction is not produced by SOS response activators. Recently, the bacteriocins produced by Gram-positive bacteria were named BLIS (bacteriocin like inhibitory substances) to facilitate their distinction from the bacteriocins produced by Gram-negative bacteria (18).

Halocins are one group of bacteriocins produced by members of the class haloarchaea, extreme halophilic Archaea that inhabit hypersaline environments. They share characteristics with both Gram-positive and Gram-negative bacteriocins: like BLIS, they are not induced by intercalating agents and are lethal for a large number of haloarchaea; but, like Gram-negative bacteriocins, they seem to be absorbed by specific receptors (11) and present a moderately high molecular weight. Although the synthesis of these substances seems to be very common among haloarchaea (10, 20), only three of these compounds have been properly characterized (9, 12, 19).

The special characteristics of some of these molecules, such as their hypersensitivity to low salt concentration, has made their purification and characterization difficult. Common purification techniques, such as salting out, can not be used to recover active enriched fractions. For this reason, the most suitable procedure for sample concentration is to use ultrafiltration, although this method always produces a considerable loss in the amount of halocin recovered (Platas et al., XV National Congress of Microbiology, Madrid, September 1995). This fact, together with the low yield of antimicrobial activity obtained using standard halophilic media, requires its purification to be started with high volumes of supernatant (9), which complicates the scaling up procedures required for industrial production.

Halocin H1, the subject of this study, is a protein of 31 kDa produced by the haloarchaea *Haloferax mediterranei* Xia3, that affects a wide spectrum of Gram-negative haloarchaea (10). Its mode of action seems to be related to changes in the permeability of cellular envelopes of sensitive strains (12). It is a thermosensitive, salt-dependent protein, irreversibly inactivated by temperatures over 50°C and requiring concentrations above 10% (w/v) for the preservation of its antimicrobial activity.

The procedures used to establish the optimal conditions for the production of halocin H1 are described in this paper.

Materials and methods

Growth media. The growth of the different haloarchaea used in this work was performed using media with high ionic strength in the conditions described by Rodríguez-Valera et al. (14). Different nutrients were purchased from the following manufacturers: Sheffield (N-Z amine A, N-Z amine E, amicasa, and edamine), Oxoid (yeast extract, malt extract) and Difco (bactopectone, beef extract, brain heart infusion, casamino acids, casein and nutrient broth). These nutrient sources were selected for their solubility which would facilitate the monitoring of growth by measuring the O.D. at 620 nm. Except in the cases specified in the text, these nutrients were added to the basal salt solution in a concentration of 5 g/l (0.5%).

Medium A corresponds to a sea water (SW) 20% salt medium supplemented with 0.5% of yeast extract, and medium B to SW 20% supplemented with 0.5% of N-Z amine E.

Bacterial strains and growth conditions. The two Archaea used in this study were *Haloferax mediterranei* Xia3, the producer of halocin H1 (from the haloarchaea collection of the Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Alicante), and *Halobacterium halobium* NRC 817. The growth conditions, except for those cases specified in the text, were the following: 250 ml Erlenmeyer flasks, filled with 100 ml of broth, were inoculated with 1 ml of the culture in stationary phase and placed in a Kühner cabinet at 220 rpm, at 37°C. The maximum antimicrobial activity of the samples were found, in all the cases, at the stationary phase of growth.

Sensitivity assay. The sensitivity assay

method used in this work has been reported elsewhere (9). It consists of applying 50 µl of sterile dilution of the sample to be evaluated onto the agar surface of a double layer Petri dish composed of SW 25% supplemented with 0.5% yeast extract and 2% agar, previously seeded with the sensitive organism. The antimicrobial activity was measured as arbitrary units (AU) (8).

Production of the halocin at different saline conditions. *H. mediterranei* Xia3 was grown in media at different salt concentrations: SW 15%, SW 20%, SW 25% and SW 30%, supplemented with 0.5% of yeast extract. Measures of pH, O.D. at 620 nm and antimicrobial activity were taken every 8 h for 80 h.

Production of halocin in different nutrient sources. SW 20% was supplemented with 0.5% of the different nutrient sources mentioned above.

Optimization of the cultivation conditions. (i) To determine the optimal temperature for halocin production, six identical flasks were incubated at 24, 28, 32, 37, 42 and 50°C respectively. (ii) The influence of the source of inoculum on the antimicrobial activity produced was observed by inoculating identical flasks with 100 ml of medium B with stationary cultures grown, respectively, in media A and B. (iii) The influence of oxygen concentration was studied inoculating 700 ml of medium B with 7 ml of a stationary grown culture in medium B. This stock solution was distributed among seven 250 ml flasks, in aliquots of different volumes (12.5, 25, 50, 75, 100, 125 and 150 ml). The samples were incubated at 37°C and 220 rpm. (iv) The effect of light on the production of the halocin was observed by comparing a culture exposed to light with an unexposed control covered with aluminum foil. (v) The concentration dependence on the N-Z amine E induction of antimicrobial activity was measured using SW 20% media supplemented with increasing amounts of the nutrient. (vi) Medium B was supplemented

with different concentrations of edamin and N-Z amine A, to test the effect of combining different nutrient sources on halocin production. In all cases, optical density, pH and antimicrobial activity were determined at regular 8 h intervals.

Results

Production of halocin at different saline conditions. The growth profiles obtained at different ionic strengths are shown in Fig. 1. Optimal growth was obtained at SW 15%, followed by SW 20% and SW 25% respectively. At SW 30%, cell development was rather low. The culture appearance also changed depending on the salt concentration of the growth media. Cells grown in SW

15% showed a reddish pigmentation that disappeared at higher salt concentrations. This phenomenon has been previously described (13), one possible explanation being the inhibition of pigmentation formation at high ionic strength. Also, the viscosity of the culture increased with the salinity due to a higher production of exopolysaccharide (1). Fig. 1 shows that optimal antimicrobial activity was obtained at SW 20%.

Growth on different nutrient sources. As shown in Table 1, there is a noticeable effect on the growth and antimicrobial activity depending on the nutrient sources in which *H. mediterranei* Xia3 was grown. The highest activity was obtained by addition of N-Z amine E, four times the activity obtained with N-Z amine A, brain heart infusion, edamine, and ten times the activity obtained with

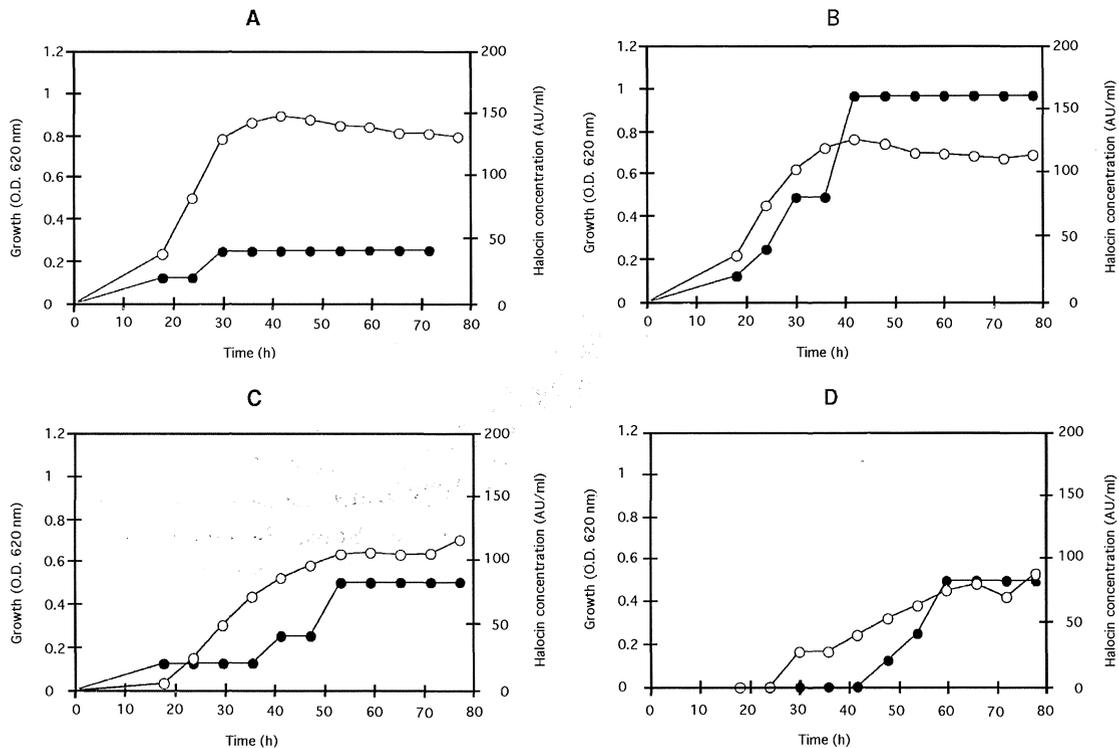


FIG. 1. Cell growth profiles and production of halocin in *Haloferax mediterranei* Xia3 growing at different saline concentrations. Panels: A, SW 15%; B, SW 20%; C, SW 25%; and D, SW 30%. (○) Growth, (●) Halocin concentration.

TABLE 1. Halocin HI production with different nutrient sources

Nutrient source (producer)	Origin	Type of hidrolisis	Amino acid nitrogen	Total nitrogen	O.D.* (620 nm)	Antimicrobial activity (AU/ml)
Nutrient broth (Difco)	Meat	Infusion			0.27	160
Bactopeptone (Difco)	Meat	Enzymatic	3.1	16.5	0	0
Beef extract (Difco)	Meat	Infusion	3.8	11.2	0.31	0
Brain heart infusion (Difco)	Meat	Infusion			0.31	320
Amicase (Sheffield)	Casein	Acid	9.8	12.8	0.30	20
Casamino-acids (Difco)	Casein	Acid	8.8	10.5	0.14	80
Casein hidrolysate (Difco)	Casein	Enzymatic			0.56	320
N-Z amine A (Sheffield)	Casein	Enzymatic	6.5	13.1	0.89	320
N-Z amine E (Sheffield)	Casein	Enzymatic	4.5	13.2	0.85	1280
Edamin (Sheffield)	Lactoalbumin	Enzymatic	6.9	12.3	0.84	320
Malt extract (Oxoid)	Malt	Extract	0.6	1.1	0	0
Yeast extract (Oxoid)	Yeast	Extract	5.1	9.8	0.75	160
Yeast extract 1% (Oxoid)	Yeast	Extract	5.1	9.8	1.32	160

* The growth (O.D. at 620 nm) and the antimicrobial activity were determined at 72 h of cultivation.

the standard yeast extract medium (medium A). Interestingly enough, bactopectone and malt extract inhibit the growth of *Haloferax mediterranei* Xia3.

Optimization of the cultivation conditions. To optimize the production of antimicrobial activity, the influence of several variables, usually affecting cellular growth, were studied. Temperature, as shown in Fig. 2, modifies the cellular growth rate as well as the production of halocin.

Temperatures between 32 and 42°C allowed high antimicrobial activity to be obtained. This variable also affects the time required to reach the stationary phase.

As shown in Fig. 3, the concentration of N-Z amine E also, alters significantly the growth of *H. mediterranei* Xia3. At concentrations over 2%, this microorganism is unable to grow. Moreover, the optimal halocin production is obtained

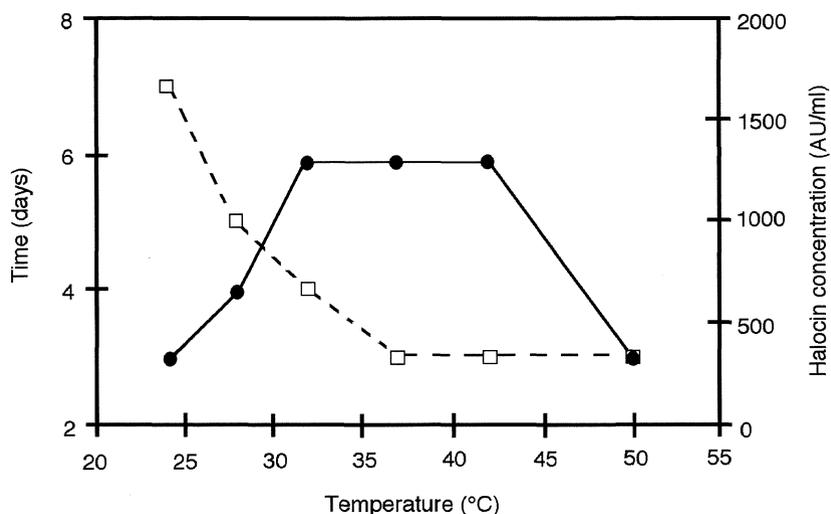


FIG. 2. Influence of growth temperature on the time required for reaching stationary phase (a growth measure of $O.D._{620} = 0.9$) (□), and on halocin production (●).

between 0.5 and 1% of N-Z amine E which does not exactly correspond to the concentrations promoting optimal cell growth (between 1 and 1.5%).

Other factors studied, such as oxygenation, inoculum influence, presence of light or the supplementing of medium B with other nutrient sources, did not show any important effect on the production of halocin.

According to the previous data, the optimal conditions for production of halocin H1 were fixed as: saline concentration of SW 20%, 0.5% of N-Z amine E, incubation at 37°C and 220 rpm for 60 h. In these conditions, the cultivation profile obtained is presented in Fig. 4.

Discussion

In solar salterns, the prokaryotic populations are distributed according to the salt concentration. At low salt concentrations, halotolerant Bacteria represent the dominant taxa, while, at higher concentrations, Haloarchaea were the most abundant population (16).

H. mediterranei was initially isolated from the

salt ponds of “Braç del port”, in Santa Pola, Alicante (Spain) (13). Some environmental studies (15) performed in this ecosystem showed that the members of this species are the most abundant haloarchaea inhabiting saline concentrations from 10 to 20% (w/v) (80% of the total number of haloarchaea isolated). The mean temperature in salterns varies according to the salt concentration, and the average temperature measured at noon (ranging from 30°C, in the less concentrated ponds, to 45°C in the most concentrated ones [15]). The nutrient composition of these salt ponds is rich in nitrogen.

The results presented in this work, in terms of growth and halocin production, are in agreement with these ecological data. As mentioned before, the maximal growth rate was detected when the microorganism grew in between 15 to 20% w/v of salt, environmental conditions more adequate for Halobacteriaceae. Nevertheless, the optimal production of halocin was observed at SW 20%, within the boundaries of its ecological preference. One possible explanation of this apparent contradiction is that, with these intermediate saline conditions, the preeminence of one species may de-

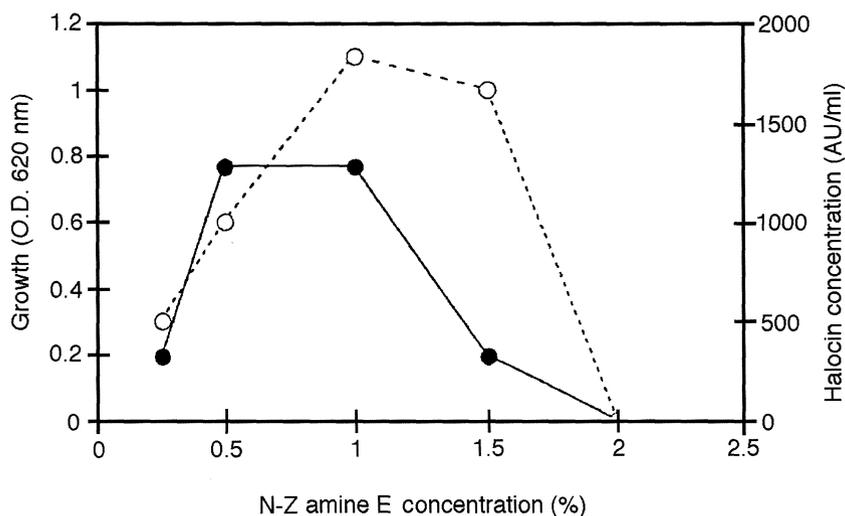


FIG. 3. Influence of N-Z amine E concentration in the halocin H1 produced by *Haloferax mediterranei* Xia3 at 72 h of incubation. (○) Growth, (●) halocin concentration.

pend, to a greater extent, upon its ability to compete with an increasing number of other haloarchaea, rather than on the supply of nutrients. On the other hand, it has also been observed that *H. mediterranei* is able to grow exclusively from a culture of *H. halobium* NRC 817 in the absence of any nutritive source (unpublished results), suggesting that this microorganism may play a predatory role in these ecosystems.

The optimal temperature for halocin production also agrees with the data recorded in field studies. In the natural environment, temperature is a factor of solar radiation. The presence of light-driven mechanisms, such as bacteriorhodopsin, shows the importance that light has for these microorganisms. To test whether the presence of light affected the production of halocin, two twin flasks seeded with the culture were grown at the same temperature one in the presence and the second one in the absence of light. The results showed that light did not have a noticeable influence on the growth rate nor on halocin production in the conditions used for the assay. (Data not shown)

As shown in Fig. 3, temperature certainly influences both cell growth and halocin production. It is also important to notice that the appearance of antimicrobial activity is related to incubation temperature and not to the fact that the culture achieves stationary phase. A possible explanation could be whether the expression of the gene controlling halocin production is regulated by temperature, which is unlikely, or by an indirect mechanism. For example, it is known that halocin H4, produced by *H. mediterranei* ATCC 33500, is synthesized as a precursor (Shand, personal communication) that is processed to its active form. The occurrence of thermophilic extracellular proteases produced by this species is also well documented (6, 17). Taking both observations together, it could be possible to explain the results presented in Fig. 2 as the effect of a different enzymatic processing of a precursor. At low temperatures, the efficiency of the protease would be lower, affecting in this way the production of the active form of halocin, while, at high temperatures, an activation of the enzyme may produce the active form of the antimicrobial agent.

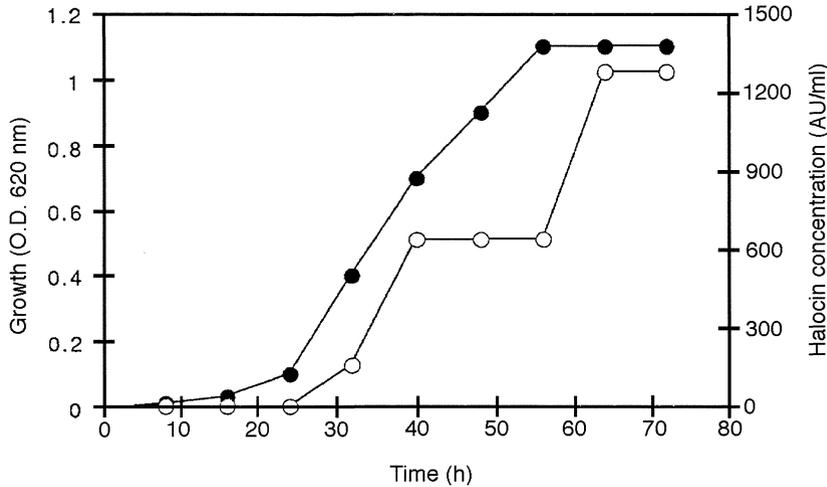


FIG. 4. Growth and production of halocin H1 at optimal cultivation conditions. (○) Growth, (●) halocin concentration.

Another factor also studied was the influence of oxygenation. It is well known that oxygen limitation can influence, to a considerable extent, the growth rate and metabolism of microorganisms (3). The diffusion of oxygen in saline environments is impeded by the high ionic strength. For this reason, the effects that different degrees of oxygenation may have on these microorganisms were studied. The results obtained did not show any relation between growth or bacteriocin production and the oxygenation level of the cell cultures. This lack of effect could be explained by the presence of gas vesicles (13) that should allow the culture to be surrounded by enriched levels of oxygen.

One of the most interesting results obtained in this work is the different levels of production of halocin achieved by *H. mediterranei* Xia3 grown in the presence of different nutritive sources. The effect of the different sources on the growth of this microorganism could be explained in terms of their origin.

Meat derived substrates induce poor growth, and, for that reason, poor antimicrobial activity. These results could be explained by the presence of some inhibitory substances in these nutrients. In

this respect, bile acids have been reported to induce lysis in haloarchaea (6).

The absence of growth observed when the culture is incubated in the presence of malt extract, could also be explained as a consequence of its high carbohydrate content (nearly 70% is glucose polymers, disaccharides, maltose or polysaccharides dextrin) compared to its nitrogen content.

The casein-derived sources tested caused a significant difference in its performance depending on the type of hydrolysis applied for their production. Acid hydrolysis induced both poor growth and low antimicrobial activity, while enzymatic hydrolysis induced high levels of bacteriocin production. The yeast-derived sources produce good growth levels, but low antimicrobial effects.

Among the different nutrient sources tested, *H. mediterranei* Xia3 showed a marked preference for N-Z amine E for the production of halocin. An explanation for these results could be based on the fact that N-Z amine E has the lowest content in amino acid nitrogen of this group. As mentioned before, indirect data support the hypothesis that the production of halocin might be related to the production of one protease (12). Experimental

results have shown that the concentration and appearance of both protease and antimicrobial activities during growth, share the same profile (data not shown).

In the early stages of growth, since no proteolytic enzymatic activity has been synthesized, *H. mediterranei* would use amino acids as its primary carbon, nitrogen and energy source. When the concentration of these compounds begins to be scarce, the bacterium would require the use of proteases to degrade the remaining casein-digested molecules into their components. If the proportion of amino acids were lower, the protease would be produced earlier and the halocin would be synthesized for a longer time, prior to reaching stationary phase. Interestingly enough, the use of N-Z amine E has also been reported in the formulation of the production media used for the syntheses of: (i) peptide antibiotics in bacteria like *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*, (ii) toxins in *Staphylococcus aureus*, and (iii) several other antibiotics, like sulfomycin, epithienamycin or gentamycins produced by different species of Actinomycetes.

As can be observed in Fig. 3, the concentration of N-Z amine E also influences the growth profile. The optical density, recorded at increasing amounts of this compound, reaches a maximum at 1 to 1.5%, decreasing drastically in higher concentrations. On the other hand, it is possible to isolate single colonies able to grow at 2% N-Z amine E by direct plating in this medium. Their morphological aspect differ from the colonies cultured in 0.5% of this medium. They present much slower growth rates and appear to be more mucous due to an increase in the production of exopolisaccharides. The secretion of these types of polymers is carried out as a response to conditions that may produce physical stress to the cells (4).

References

1. Anton, J., Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F. (1988). Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. Appl. Environ. Microbiol. **54**, 2381–2386.
2. Bruno, C., Montville, J. T. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **59**, 3003–3010.
3. Clark, G. J., Langley, D., Bushell, M. E. (1995). Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: Investigation with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. Microbiol. **141**, 663–669.
4. Geesey, G. G. (1982). Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. ASM News **48**, 9–14.
5. Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. **59**, 171–200.
6. Kamekura, M., Seno, Y. (1991). Lysis of halobacteria with bile acids and proteolytic enzymes of halophilic archaeobacteria. In Rodríguez-Valera, F. (ed.), General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms, NATO ASI series, pp. 359–365. Plenum Press, New York, NY.
7. Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **12**, 39–86.
8. Mayr-Harting, A., Hedges, A. J., Berkeley, R. C. W. (1972). Methods for studying bacteriocins. In Norris, J. R., Ribbons (ed.), Methods in Microbiology, vol 7A, pp. 315–322. Academic Press, New York, NY.
9. Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F. (1985). Production and purification of halocin H4. FEMS Microbiol. Lett. **28**, 177–182.
10. Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A. (1986). Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. FEMS Microbiol. Lett. **36**, 177–182.
11. Meseguer, I., Torreblanca, M., Konishi, T. (1995). Specific inhibition of the halobacterial Na⁺/H⁺ antiporter by halocin H6. J. Biol. Chem. **270**, 6450–6455.
12. Platas, G. (1995). Caracterización de la actividad antimicrobiana de la haloarquea *Haloferax mediterranei* Xia3. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
13. Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Kushner, D. J. (1983). *Halobacterium mediterranei* spec. nov. a

- new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 369–381.
14. Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1980). Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. *J. Gen. Microbiol.* **119**, 535–538.
 15. Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb. Ecol.* **7**, 235–243.
 16. Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J. F. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in multi-pond saltern. *Microb. Ecol.* **11**, 107–115.
 17. Stepanov, V. M., Rudenskaya, G. N., Revina, L. P., Gryaznova, Y. B., Lysogorskaya, E. N., Filopova, I. Y., Ivanova, I. I. (1992). A serine proteinase of an archaeobacterium, *Halobacterium mediterranei*. *Biochem. J.* **285**, 281–286.
 18. Tagg, J. R. (1992). Bacteriocins of Gram-positive bacteria: an opinion regarding their nature, nomenclature and number. In James, R., Lazdunski, C., Pattus, F. (ed.), *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*, NATO ASI series, vol H65, pp. 33–35. Springer Verlag, Berlin, Germany.
 19. Torreblanca, M., Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F. (1989). Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2655–2661.
 20. Torreblanca, M., Meseguer, I., Ventosa, A. (1994). Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 201–205.

Dipodascus magnusii (Saccharomycetes) contains multiple glucose-6-phosphate dehydrogenases with different NAD⁺/NADP⁺ dependencies

Blanka Králová,* Olga Valentová, Katerina Demnerová, Ludmila Silhánková

Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic

Received 22 June 1995/Accepted 6 November 1995

Summary

A cell-free extract of a morphologically unstable strain of *Dipodascus magnusii* contained six proteins with activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). Two of these proteins displayed only NADP⁺-dependent activity, two could utilize both NAD⁺ and NADP⁺, but had higher activity with NAD⁺, and two possessed only NAD⁺-dependent activity. When the cultivation was carried out in the presence of monoiodoacetic acid, only two proteins with G6PDH activity were produced, one of them NAD⁺-dependent and the other NADP⁺-dependent. In all cases, NAD⁺-dependent activity was less stable in the presence of proteinases than was the NADP⁺-dependent activity.

Key words: *Dipodascus magnusii*, glucose-6-P dehydrogenase, NAD/NADP, FPLC, enzyme activity

Resumen

Un extracto libre de células de una cepa morfológicamente inestable de *Dipodascus magnusii* contenía seis proteínas con una actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Dos de estas proteínas mostraban sólo actividad NADP⁺-dependiente, dos podían utilizar tanto NAD⁺ como NADP⁺, pero tenían mayor actividad con NAD⁺, y dos presentaban sólo actividad NAD⁺-dependiente. Cuando el microorganismo se cultivó en presencia de ácido monoiodoacético, sólo se produjeron dos proteínas con actividad G6PDH, una de ellas NAD⁺-dependiente y la otra NADP⁺-dependiente. En todos los casos, la actividad NAD⁺-dependiente era menos estable en presencia de proteinasas que la NADP⁺-dependiente.

* Correspondence to: Blanka Králová. Department of Biochemistry and Microbiology. Institute of Chemical Technology. Technická 1905. 166 28 Prague 6. Czech Republic. Tel.: +42-2-24353077. Fax: +42-2-3119990. E-mail: blanka.kralova@vscht.cz

Introduction

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (D-glucose-6-phosphate: NAD(P)⁺ oxidoreductase E.C.1.1.1.49) or G6PDH catalyzes the oxidation of D-glucose-6-phosphate into D-glucose-6-phospho-D-lactone-6-phosphate using NAD(P)⁺ as an acceptor of a hydrogen ion. This reaction participates in two important catabolic processes: in the hexose monophosphate shunt and in the Entner-Doudoroff metabolic pathway. In some bacterial species two separate G6PDHs exist, each associated with one of these metabolic routes, whereas in other species a single G6PDH serves both functions.

Whilst G6PDHs present in bacterial species differ in their coenzyme specificity or preference (2), G6PDH in most fungi seems to be mainly NADP⁺-specific. However, previously we have found that the yeast-like organisms *Geotrichum candidum* and *Dipodascus magnusii* can use both NAD⁺ and NADP⁺ for G6PDH activity (10).

Materials and methods

Microorganism and its cultivation.

Dipodascus magnusii (syn. *Endomyces magnusii*) strain DBM 48 was obtained from the Yeast Collection of the Department of Biochemistry and Microbiology of the Institute of Chemical Technology in Prague. It was grown in two successive stages at 28°C for 24 h in a medium containing (per litre): glucose, 10 g; yeast extract, 5 g; peptone, 30 g; and casein hydrolysate, 5 g. The first stage (30 ml) was used as the inoculum for 200 ml of fresh medium in the second stage.

Preparation of crude enzyme extract. Cells were harvested by centrifugation, washed twice with water, disrupted using an X-press (Biox, LKB Sweden) after deep freezing of the cell paste. Broken cells were extracted with an aqueous two-phase system (polyethylene glycol 3000, 1 g;

K₂HPO₄, 1.3 g; disrupted cells, 2 g in 10 ml of water). After 15 min shaking followed by a short period of standing until the upper and lower phases had separated, cell residues were removed and the lower salt phase was used as a crude extract.

Desalting of crude extract. The lower phase of the two-phase system was desalted by gel permeation chromatography using a PD-10 column (Pharmacia). Proteinase activity was inhibited by the addition of EDTA to give a final concentration of 0.02 M.

Analytical methods. G6PDH activity was measured by monitoring the changes in absorbance at 340 nm in a mixture of triethanolamine buffer (pH 7.6) 2.6 ml, 0.1 M MgCl₂ 0.2 ml, 35 mM glucose-6-phosphate in 0.1 ml of TEA buffer, 11 mM NAD or NADP 0.1 ml, sample 0.01 ml. Changes of absorbance caused by NAD(P)H formation were measured for five min at one min intervals starting with the addition of the sample.

Proteinase activity was established by using gelatin cross-linked with glutaraldehyde and nigrosin (7). A chromogenic substrate (10 mg) was suspended in 2 ml 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6 and kept at 40°C for 20 min, when 1 ml of sample was added. After 30 min the reaction was stopped by separating the remaining substrate (filtration). Absorbance at 570 nm was proportional to proteinase activity. One unit of activity (U) was defined as an increase of absorbance by 0.1.

The dry weight of the suspension of disintegrated cells was estimated gravimetrically after drying 3 ml of suspension at 100°C to constant weight. No correction for separable cell remnants and whole cells was made.

The protein content of cell free extract was determined by the method of Lowry (3).

FPLC chromatography was carried out using a medium-pressure system (FPLC LKB-Pharmacia) with anion-exchange chromatography on an anion-exchanger MONO Q HR.

Results

When measuring the G6PDH activity in the extract of cells of *D. magnusii* strain DBM 48 we found that NAD⁺-dependent activity was present together with NADP⁺-dependent activity. The ratio of NAD⁺- and NADP⁺-dependent activities with different cell batches varied widely from 0.1 to 0.83 due mostly to the variability in NAD⁺-dependent activity (Table 1).

The strain used showed a high instability of colony morphology. The original culture was grown on malt extract agar by spreading very low rough colonies (type A) formed by the mycelium of thin and thick hyphae with a relatively low amount of blastospores (spores originated by budding). However, secondary very small higher rough colonies (type B) were also produced. These contained, besides the mycelium formed only by thick hyphae, pseudomycelium and a larger amount of blastospores or arthrospores (spores formed by breaking apart of hyphae).

When the cells from low rough colonies (type A) were used to inoculate liquid medium, they produced cells which contained variable quantities of NADP⁺-dependent activity, alongside

NAD⁺-dependent activity which varied between 32 and 83% of the amount of NADP⁺-dependent activity. In comparison, the cells obtained in liquid culture from high rough colonies (type B) contained a much lower amount of NAD⁺-dependent activity and a relatively constant proportion (10–17%) of both activities. This finding is in agreement with the morphological instability of the colonial types.

When the type A cells were cultivated in liquid medium, spontaneous dissociation of cells took place and both types of cells were isolated from the biomass after the cultivation. Their ratio depended on the cultivation conditions (temperature, aeration, composition of the medium). On the other hand, B type cells did not dissociate even under variable cultivation conditions, and after cultivation only B type cells were found in the biomass. In all experiments type A cells produced more NAD⁺-dependent activity than did type B cells.

When the crude extract of cells, obtained after cultivation originally inoculated with cells type A, but containing both types of cells, was analyzed by FPLC anion exchange chromatography on MONO Q, six separate proteins with G6PDH activities were detected (Fig. 1a). Two of those proteins

TABLE 1. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity in cell-free extracts of *Dipodascus magnusii* DBM 48. Values represent data from nine separate cultures

Culture	G6PDH activity (nkat/g dry weight)		Ratio of NAD/NADP activities
	NADP	NAD	
1	402	334	0.83
2	264	176	0.66
3	260	134	0.51
4	300	96	0.32
5	281	62	0.22
6	498	83	0.17
7	403	53	0.13
8	417	55	0.13
9	498	50	0.10

were active only with NADP⁺, two others only with NAD⁺, and two proteins could use both NAD⁺ or NADP⁺ but had greater activity with NAD⁺.

In crude extracts of cells of our strain of *D. magnusii*, grown in a complete liquid medium containing 1 mmol of iodoacetic acid, where only cells type A were detected, only one protein with NAD⁺-dependent activity and another with NADP⁺-dependent, but relatively low, activity were found after the same chromatographic process as described above (Fig. 1b). These two enzymes had elution volumes which were the same as corre-

sponding NAD⁺- and NADP⁺-dependent activities in cultures grown without iodoacetic acid (Figs. 1a and 1b).

An extract of cells type B gave a similar chromatographic profile as the extract of mixed cells (compare Figs. 1a and 1c), except that only one enzyme, specific for NADP⁺, was present, corresponding to the second enzyme eluted from the column. Otherwise the enzyme activities were the same, although the ratio NAD⁺/NADP⁺-dependent activities was rather low.

We found rather high proteinase activity in

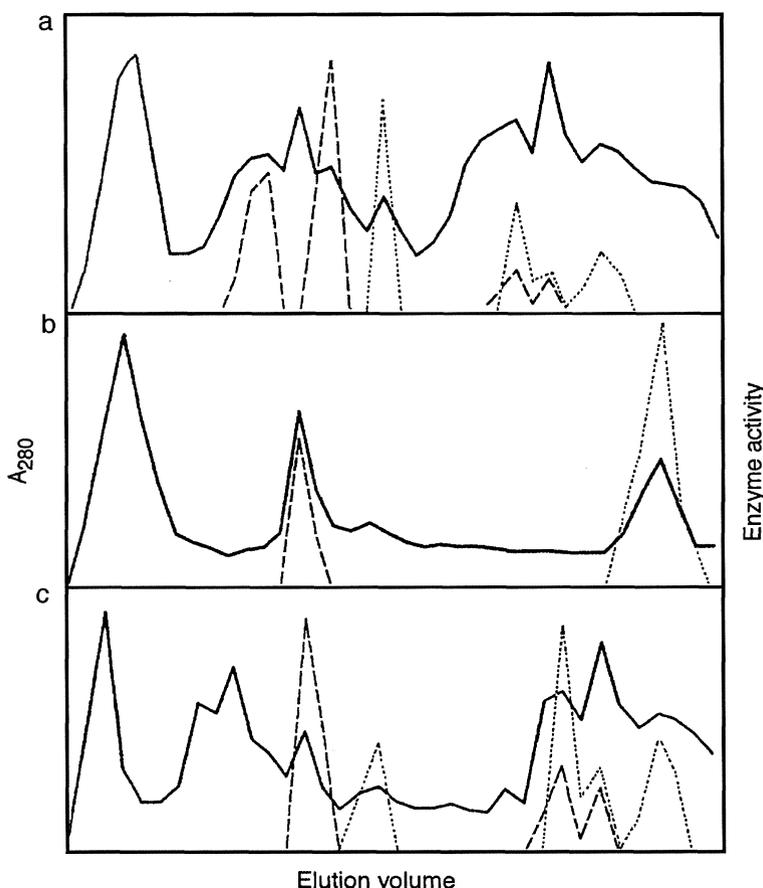


FIG. 1. FPLC anion exchange chromatography of: (a) cell-free extract prepared from mixed cultures (type A and type B) of *Dipodascus magnusii*; (b) cell-free extract of cells type A of *Dipodascus magnusii* (cultivated with monoiodoacetic acid); (c) cell-free extract from cells type B of *Dipodascus magnusii*. Column: MONO Q HR. Starting buffer: 0.05 M TEA pH 7.6. Sample: desalted crude extract with inhibited proteinase activity (with EDTA). Elution: linear gradient of 0–1 mol/l NaCl in starting buffer. A₂₈₀ —————; NADP — — —; NAD

TABLE 2. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in cell free extracts of *Dipodascus magnusii*

		G6PDH activity				Proteinase activity
		Total (nkat)		Specific (nkat/mg protein)		(U)
NADP ⁺ dependent	phase	A	B	A	B	
	a	403	260	8.95	5.8	5.5
	b	220	180	15.82	13.0	43.0
	c	387	240	9.6	5.95	0.2
NAD ⁺ dependent	phase	A	B	A	B	
	a	53	134	1.17	2.97	5.5
	b	1.6	3.6	0.12	0.26	43.0
	c	47	121	1.16	3.0	0.2

A, B, cells from colonies type A or type B.

a, lower salt phase of two phase systems; b, desalted lower phase; c, desalted lower phase with 0.02 mol/l EDTA.

crude cell extracts, which in vitro was inhibited with EDTA (Table 2). NAD⁺-dependent activity proved to be less resistant to proteinase action than the NADP⁺-dependent one. On the other hand, during preservation of frozen crude extracts with inhibited proteinase, NAD⁺-dependent activity was not only more stable than NADP⁺-dependent activity, but its value increased during the first few days of frozen storage.

Discussion

Since a close connection between colony morphology and the activity of NADP⁺-dependent G6PDH has been described in another fungus, *Neurospora crassa*, by Scott and Tatum (8), we suspected that variability in NAD⁺/NADP⁺ activity ratio produced by our strain might be connected to its morphological instability. In *N. crassa*, mutations in any of three independent loci led simultaneously to changes in colony morphology and defects in NADP⁺-dependent G6PDH. In order to verify a correlation between colony morphology and G6PDH con-

tent we studied cultures with only one type of colonies.

In the experiments described above we did not obtain uniform culture of cells type A, which was always mixed with the cells of B type. Therefore, we tried to suppress the growth of cells type B. As colony morphology of cells type A mutant of *D. magnusii* resembles the strongly rough mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, which are resistant to the common inhibitory action of monoiodoacetic acid (9), we checked whether cells A of *D. magnusii* had the same resistance. As our experiments confirmed this supposition, monoiodoacetic acid could be used for suppressing growth of cells type B, whereas cells type A grew. After cultivation of cells type A in the presence of monoiodoacetic acid only one type of cells (type A) was obtained, although the growth of type A decreased slightly, too.

It is difficult to say, however, whether iodoacetic acid acted only as a selective agent of a certain genotype or also as an inhibitor of glycolysis and of all enzymes with active -SH groups, and thus inhibited the synthesis or activity of certain G6PDH enzymes.

The major finding of this work is that *D. magnusii* DBM 48 contains three types of glucose-6-phosphate dehydrogenase with varying cofactor requirements: (i) NAD⁺-dependent activity, (ii) NADP⁺-dependent activity, (iii) one using both NAD⁺ and NADP⁺, but yielding higher activity with NAD⁺.

Proteins with NADP-dependent activity might be dimers or tetramers of individual subunits, similar to those found in genera *Saccharomyces*, *Candida* and *Neurospora* (2). The variability of proteins with G6PDH activities might have been due to other factors. The proteinase activity which we found in crude cell extracts, though inhibited in vitro with EDTA, could cause the protein variability (or dissociation of aggregates) in cells during cultivation.

Enzymes using NAD⁺ are less stable during the extraction and separation procedure, but more stable during storage (-20°C) in cell extract in which proteinases were inhibited. It is possible that during preservation further destruction of intact cells or subcellular structures took place, perhaps due to the residual activity of proteinases present and more NAD⁺-dependent activity was released. From our results we suppose that NAD⁺-dependent G6PDH is not easily separable from cell structures (membranes ev. subcellular particles) and is partly protected by them.

In cell extract of yeasts usually only NADP⁺-dependent G6PDH activity was referred to. Low stability of NAD⁺-dependent G6PDH, together with the fact that it is less easy to separate from cell structures, might be the reason why NAD⁺-dependent enzyme was usually not found in yeast cell extracts and was also much rarer in other microbial cell extracts.

References

1. Kotorman, M., Simon, L. M., Szajani, B. (1994). Coenzyme production using immobilized enzymes. Immobilization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from baker's yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 974–982.
2. Levy, H. R. (1979). Glucose-6-phosphate dehydrogenases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **48**, 97–192.
3. Lowry, O. H., Rosenborough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
4. Miyawaki, O., Yano, T. (1993). Electrochemical bioreactor with immobilized glucose-6-phosphate dehydrogenase on the rotating graphic disc electrode modified with phenazine methosulphate. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 525–530.
5. Nakamura, Y., Tanaka, A., Hori, T. (1995). The electron-transfer effect of coenzymes NAD(P)⁺/NAD(P)H in conjugated transmembrane oxidoreductase reactions. *Bull. Chem. Soc. Japan* **68**, 990–993.
6. Ragunathan, S., Levy, H. R. (1994). Purification and characterization of the NAD⁺-preferring glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter Hansenii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 360–367.
7. Safárik, I. (1987). A modified procedure for the preparation of insoluble chromogenic substrates for the determination of proteolytic activity. *J. Biochem. Biophys. Met.* **14**, 355–357.
8. Scott, W. A., Tatum, E. L. (1970). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and *Neurospora* morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 515–522.
9. Silhánková, L. (1969). Suppression of rough phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *A. van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **35**, C11–12.
10. Silhánková, L., Novotná, S., Králová, B. (1992). Activity of NAD⁺-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast-like organisms. *Biotechnol. Lett.* **14**, 67–71.
11. Yao, T., Matsumoto, Y., Wasa, T. (1989). Specific detection of nicotinamide coenzymes by liquid chromatography and amperometric detection with immobilized glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Anal. Chim. Acta* **218**, 129–132.

Separation and partial purification of β -glucosidase and two endoglucanases in *Aspergillus niveus*

Saad J. Taj-Aldeen,^{1*} Khalid I. Alkenany²

¹ *Department of Biology, College of Science, University of Babylon, Hilla, Iraq*

² *Technical Institute, Basrah, Iraq*

Received 28 July 1995/Accepted 27 December 1995

Summary

The thermotolerant *Aspergillus niveus* strain RMF 7883 was grown in Czapek medium, with filter paper cellulose. The proportion of mycelial-bound to extracellular enzymes was studied. Most of the β -glucosidase (80.9%) and endoglucanases (78.3%) activities were extracellular. The extracellular endoglucanases and β -glucosidase were separated and partially purified by Sephadex G-100 gel filtration, followed by ion exchange chromatography on CM-trisacryl M. Two extracellular endoglucanases, EG I and EG II (130 kDa and 35 kDa, respectively), and β -glucosidase (194 kDa) were isolated from culture filtrate.

Key words: *Aspergillus niveus*, β -glucosidase, endoglucanases, enzyme purification, extracellular enzymes

Resumen

La cepa termotolerante RMF 7883 de *Aspergillus niveus* fue cultivada en medio Czapek, que contenía papel de filtro de celulosa. Se estudió la proporción existente entre las enzimas ligadas al micelio y las extracelulares. La mayor parte de las actividades β -glucosidasa (80,9%) y endoglucanasa (78,3%) eran extracelulares. Dichas enzimas fueron separadas y purificadas parcialmente por filtración en Sephadex

* *Correspondence to:* Saad J. Taj-Aldeen. Department of Biology. College of Science. University of Babylon. P. O. Box 4. Hilla. Iraq.

G-100, seguido por cromatografía de intercambio iónico en CM-trisacryl M. Dos endoglucanasas extracelulares, EG I y EG II (130 kDa y 35 kDa, respectivamente), y una β -glucosidasa (194 kDa) fueron aisladas del filtrado del cultivo.

Introduction

It is generally accepted that degradation of cellulose by cellulase activity of fungal origin results from the synergistic action of at least three enzymes: endoglucanases (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) and β -glucosidase (EC 3.2.1.21). These enzymes were purified and characterized in different fungi including *Talaromyces emersonii* (10, 11), *Trichoderma reesei* (5) and *Sporotrichum thermophile* (3), with the aim of understanding the mode of action or substrate specificity of each of the cellulase components.

The thermotolerant fungus *Aspergillus niveus* produces an extracellular cellulase system capable of degrading crystalline cellulose such as cotton (19). The cellulase system of this organism is significant due to its potential activity in the conversion of lignocellulosic substrates to fermentable sugars (18). This article describes the separation and partial purification technique that demonstrate the presence of one β -glucosidase and two forms of endoglucanases in *Aspergillus niveus*.

Materials and methods

Organism. *Aspergillus niveus* Blochwitz was isolated from desert soil (19). The identification of this species was confirmed by Prof. M. Christensen (Department of Botany, University of Wyoming, USA). The culture was lyophilized and deposited under permanent code number RMF 7883 at Prof. Christensen's laboratory.

Enzyme production and culture technique. Cultures were grown in 1-liter shake flasks containing 400 ml of Czapek medium of the following composition (per liter): 3 g NaNO_3 , 1 g K_2HPO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g KCl, 0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ and 10 g Whatman filter paper No. 1. The medium was buffered with 40 mM KH_2PO_4 and 3 g/l potassium phthalate (18). Fungal spores from 7-day old slants were used to inoculate flask culture media (6×10^8 total spores per flask). Cultures were incubated in an orbital incubator at 120 strokes/min at 35°C. Mycelia were harvested at intervals by centrifugation at room temperature at $2200 \times g$ for 10 min. The supernatant was used for the determination of extracellular enzyme activity. For determination of intracellular enzyme activity, mycelial pellets were first washed with 50 mM Na-citrate pH 5 buffer, then sonicated with a Fisher sonic dismembrator model 300. The cells were sonicated six times in an ice bath for 1 min with resting intervals of 2 min, then centrifuged at $2200 \times g$ for 10 min. The debris was washed with the same buffer and the supernatants were pooled until the equivalent volume of the original culture was reached. The extracellular activities reported in IU per ml of culture filtrate were compared with intracellular activities reported as IU per ml of sonicated mycelium in buffer (16). Sodium azide (final concentration 0.02% w/v) was added to all assay buffers to reduce contamination. The supernatant fluid containing the enzymes from 14-day old cultures was kept refrigerated (4°C) until used in the purification experiments.

Enzyme assays. Endoglucanases, filter paper degrading activity (FPA) and β -glucosidase were assayed by standard procedures (17, 18).

Enzyme concentration. Culture fluid was further clarified using Whatman 0.45 μ m WCN filters and concentrated by adding two volumes of cold acetone (-18°C) to 1/50 of its original volume, then kept refrigerated for 30 min and centrifuged at $2200 \times g$ for 10 min. The precipitate was dissolved in 10 ml Na-citrate buffer pH 5. The crude enzyme showed no detectable loss of activity during prolonged storage at 4°C (19). The concentrated enzyme was used in the following purification steps.

Sephadex G-100 gel filtration. A column of Sephadex G-100 (70×2.6 cm, Pharmacia, Sweden) equilibrated with 50mM citrate buffer pH 5 was loaded with enzyme (2.5 mg protein) and eluted with the same buffer. One hundred fractions, each containing 5 ml, were collected.

Two major and one minor peaks appeared in the eluted fractions of Sephadex G-100 gel filtration. The first major peak was designated as β -glucosidase and the second as EG I, while the third (minor peak) was designated as EG II.

CM-trisacryl M chromatography. (i) The active pooled fraction of β -glucosidase was concentrated by cold acetone (0.15 mg protein) and applied to CM-trisacryl M column (15×2.5 cm, LKB, Sweden) previously equilibrated with 50 mM citrate buffer pH 5. The enzyme was eluted with a linear gradient of NaCl up to 0.5 M, the volume of the gradient was 200 ml; the flow rate was 30 ml/h while fractions of 3 ml were collected. After loading, the column was washed with 200 ml citrate buffer pH 5/0.5 M NaCl. (ii) Fractions of the major and minor peaks (EG I + EG II) were concentrated by cold acetone (0.36 mg protein) and applied to CM-trisacryl M column. The enzymes were eluted as above.

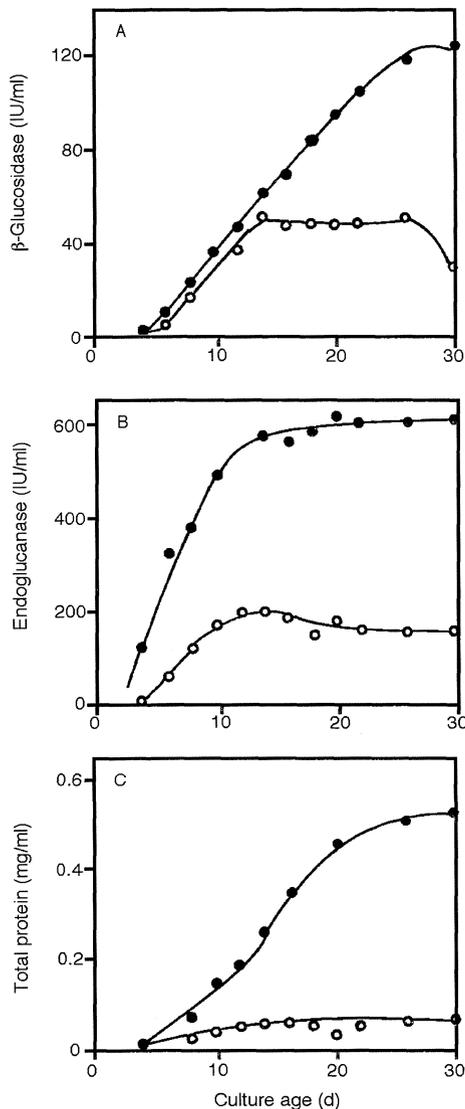


FIG. 1. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niveus*. A, β -glucosidase; B, endoglucanase; C, total protein. Cultures were grown in 1-liter shake flasks containing 400 ml of Czapek medium. (○) Intracellular; (●) extracellular activities. Samples were with drawn from triplicate sets of flasks for assay.

Molecular weight determination. Molecular weights of the purified EG I and EG II enzymes were estimated by gel filtration chromatography. A column (70×2.6 cm) containing Sephadex

G-100 equilibrated with citrate buffer pH 5 was used. The column was calibrated using standard markers of known molecular weight, namely blue dextran (2000 kDa), cytochrome *c* (13 kDa), pepsin (35 kDa), bovine albumin (67 kDa) and yeast hexokinase (100 kDa). The purified enzymes and marker proteins (2.5 mg each) were applied to the column in 1 ml Na-citrate buffer pH 5.

A column of Ultrogel AcA 34 (70 × 2.5 cm) was used to determine the molecular weight of β -glucosidase. Molecular weight markers were chymotrypsin (25kDa), yeast hexokinase (100kDa), aldolase (161 kDa) and pyruvate kinase (237 kDa). The elution of the marker proteins and the enzymes was determined by A_{280} and by activity, respectively. Elution data were plotted as V_e/V_o against

log molecular weight (21).

Protein determination. Cellular protein was determined by taking 1 ml of liquid culture and centrifuging at 2200 g for 10 min. The mycelial pellets were washed twice with distilled water. One ml of 1 M NaOH was added, shaken vigorously, boiled in a water bath for 10 min and then cooled. Extracellular protein participated after addition of 1 ml 10% (w/v) trichloroacetic (TCA) to 1 ml of culture fluid. The mixture was kept refrigerated (4°C) overnight and centrifuged at room temperature at 2200 × g for 10 min. Cellular and extracellular proteins were estimated using the method of Lowry et al. (8), with bovine serum albumin as standard.

Chemicals. Yeast hexokinase (100 kDa), pep-

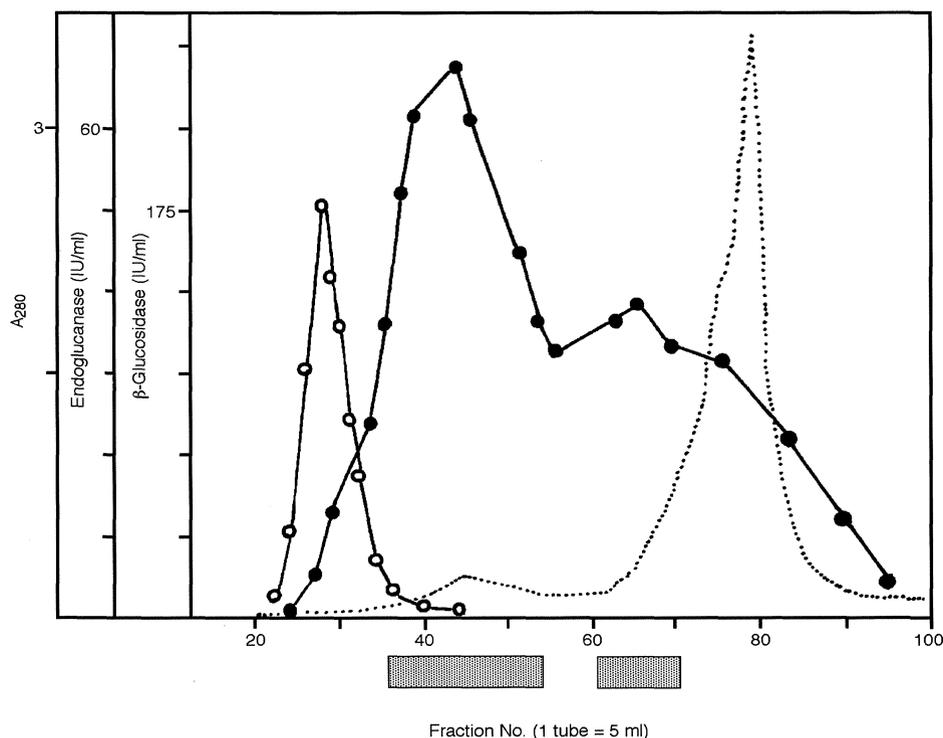


FIG. 2. Sephadex G-100 chromatography of cellulase from *Aspergillus niveus*. β -Glucosidase (○) activity was determined with ONPG; endoglucanase (●) activity was determined with CMC. The different fractions were also analysed for filter paper activity (▨), protein A_{280} (.....).

sin (35 kDa), chymotrypsin (25 kDa) and cytochrome c (13 kDa) were obtained from Fluka AG, Switzerland. Pyruvate kinase (237 kDa), aldolase (161 kDa) and bovine albumin (67 kDa) were from Koch-Light Labs, England. Sephadex G-100 (Pharmacia) and CM-trisacryl M were from LKB (Sweden). All other chemicals were of analytical grade from Koch-Light, Fluka or E. Merck (Germany).

Results and discussion

Production of enzymes. *Aspergillus niveus* RMF 7883 is a potentially cellulolytic organism. Its highest enzyme activity was obtained after cultivation on a laboratory culture medium based on Czapek medium composition containing 1% (w/v) cellulose and supplemented with K-phthalate as buffering agent to control pH

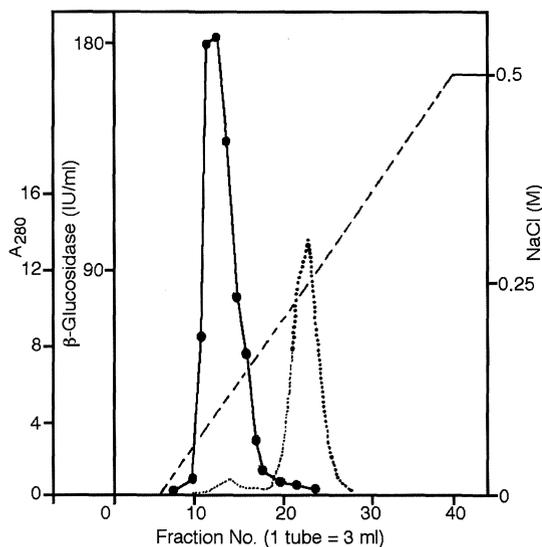


FIG. 3. Purification of the β -glucosidase fraction from Sephadex G-100 by CM-trisacryl M ion exchange chromatography (column 15×2.6 cm). β -Glucosidase (●) was eluted with a NaCl gradient (—) up to 0.5 M. A_{280} (.....).

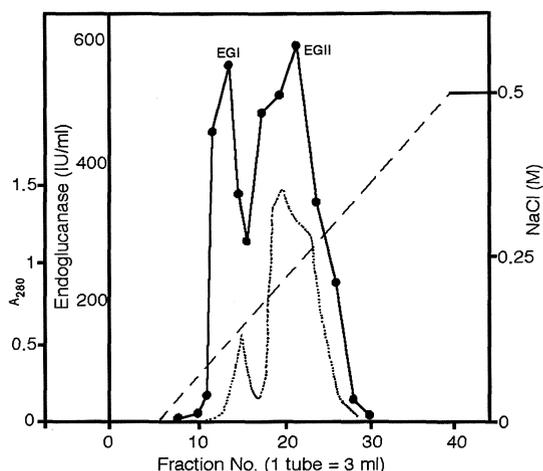


FIG. 4. Purification of the endoglucanase fraction from Sephadex G-100 by CM-trisacryl M ion exchange chromatography (column 15×2.6 cm). Endoglucanases I and II (●) were eluted with a NaCl gradient (—) up to 0.5 M. A_{280} (.....).

within one unit of the initial pH 5.2 (18). The enzyme production was followed over a 30-day period in shake flask cultures. Extracellular β -glucosidase level increased until the end of the incubation period; maximum activity was 123.8 IU/ml. Intracellular activity was equivalent to the extracellular activity until day 14 (maximum activity was 52.9 IU/ml) and started to decline after day 26 of incubation (Fig. 1A). The proportion of mycelial-bound to cell free enzyme was studied. After 30 days most of the β -glucosidase activity (80.9%) was extracellular. However, during the early stages of incubation (e.g., day 14) the extracellular activity was 54%. β -Glucosidase often remains cell bound in microorganisms such as *Chaetomium thermophile* (7), *Trichoderma koningii* (4), *Aspergillus* spp. (15) and *Microbispora bispora* (20). In *Trichoderma reesei* Rut C30, most of the β -glucosidase activity (81%) was located extracellularly (16).

Extracellular endoglucanases reached a maximum activity of 575 IU/ml at day 14 of

TABLE 1. Summary of enzyme purification from *Aspergillus niveus*

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (IU)*		
			BG	EG	FPA
1st. Crude enzyme	500	79	14730	399735	3520
2nd. Sephadex G-100					
Fraction I (tubes 22–35)	140	3.08	10678	–	–
Fraction II (tubes 36–64)	290	13.92	–	151232	648
3rd. CM-trisacryl M					
Fraction I (tubes 10–18)	27	0.54	1961.8	–	–
Fraction II (tubes 9–17)	27	0.159	–	12416	3.51
(tubes 18–30)	39	0.663	–	13301	14.82

* IU, international units; BG, β -glucosidase; EG, endoglucanase; FPA, filter paper activity.

incubation, compared to intracellular activity of 205 IU/ml (Fig. 1B). Most of the endoglucanases was extracellular (78.3%). The level of enzyme activity depends on growth rates and total protein yield as well as enzyme synthesis. Extracellular protein level was consistent with enzymes synthesis, whereas growth of the organism (measured by means of the cellular protein measurement (Fig. 1C) reached its maximum at day 14 and then remained constant until the end of the incubation period. Percentages of intracellular β -glucosidase and endoglucanases were higher in the early phase compared to the late growth phase, thus indicating synthesis and release of these enzymes into the medium.

Purification of enzymes. When the crude enzyme was subjected to gel chromatography on a column of Sephadex G-100, the cellulolytic activity was separated into three peaks. A typical elution profile is shown in Fig. 2. The first major peak had β -glucosidase activity, whereas the endoglucanases containing fractions (two peaks) was identified by the use of specific substrate, carboxymethylcellulose-Na salt; they also showed a filter paper degrading activity. The correspond-

ing fractions were pooled and, after concentration by cold acetone (-18°C), were further purified from contaminating proteins by ion exchange chromatography. β -Glucosidase fraction was applied to a column of CM-trisacryl M and eluted as one peak with NaCl gradient up to 0.5 M (Fig. 3) with most of the protein emerging as a single peak.

All the endoglucanases-containing fractions were pooled and applied to the CM-trisacryl M ion exchange column. Two major peaks, designated EG I and EG II, were eluted with a NaCl gradient up to 0.5 M (Fig. 4). The purification scheme is summarized in Table 1. It is possible that the activity of the purified proteins depends on some other proteins in the culture filtrate, and the low activity of the purified fractions is caused by the presence of only traces of the hypothetical accessory proteins.

The number of enzymes reported in the literature varies, depending on the organism, isolation methods and analytic procedures employed. The existence of more than one form of cellulase has been found in *Trichoderma reesei* Rut C30. Cellulase enzymes were readily separated into four

components, including two types of specific endoglucanases, which act on internal glycosidic bonds of cellulose (7). In *Talaromyces emersonii*, at least two forms of endoglucanases were detected by polyacrylamide gel electrophoresis during growth on corn steep liquor/ NH_4NO_3 medium (10).

The two endoglucanases of *A. niveus* differ in their molecular weights. However, whether they are artifacts formed as a result of proteolytic action or they are natural products is unknown. Modification of cellulases via proteolysis in the culture broth has been reported. For example, in *Schizophyllum commune*, a second endoglucanase arises through extracellular proteolytic cleavage of the primary enzyme (14), while proteolytic activation of cellulases has been observed in *Phanerochaete chrysosporium* (2). In contrast, no major proteolytic modification of *Trichoderma reesei* Rut C30 cellulase was determined (1). On the other hand, the multiplicity of enzyme can be due to multiple genes (12).

The molecular weights of partially purified EG I and EG II were 130 and 35 kDa respectively. For comparison, the molecular weight of commercially purified endoglucanases enzyme from *A. niger* was 31 kDa (13), which is very close to the EG II enzyme of *A. niveus*.

The purified β -glucosidase (194 kDa) was completely free from any cellulase activity. In *A. fumigatus* the molecular weight of β -glucosidase was 380 kDa (6). For the β -glucosidase I, II, III and IV of *Talaromyces emersonii* the molecular weights were 135, 100, 457 and 57 kDa, respectively (10). The results indicate that endoglucanases exist as two proteins that also display filter paper activity. Further studies are needed to elucidate the presence of accessory proteins in the culture filtrate and the role of both enzymes. The purification of enzymes to homogeneity is re-

quired to establish the physiological significance of multiple forms and locations of the different cellulases in *A. niveus*.

Acknowledgements

Our thanks are due to Professor Ian D. Reid (Pulp and Paper Research Institute of Canada) for his invaluable comments on an early version of the manuscript.

References

1. Dunne, C. P. (1982). Relationship between extracellular proteases and the cellulase complex of *Trichoderma reesei*. In Chibata, I., Fukui, S., Wingard Jr., L. B. (ed.), Enzyme Engineering, pp. 355–356. Plenum Press, New York, NY.
2. Eriksson, K.-E., Petersson, L. G. (1982). Purification and characterization of two acidic proteases from the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochem. **124**, 635–642.
3. Fracheboud, D., Canevacchini, G. (1989). Isolation, purification and properties of the exocellulase from *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. Enzyme Microb. Technol. **11**, 220–229.
4. Halliwell, G., Lovelady, J. (1981). Utilization of carboxymethylcellulose and enzyme synthesis by *Trichoderma koningii*. J. Gen. Microbiol. **126**, 211–217.
5. Henrissat, B., Drguez, H., Viet, C., Schulein, M. (1985). Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. Bio/Technol. **3**, 722–726.
6. Kitpreechavanich, V., Hayashi, M., Nagai, S. (1986). Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. Agric. Biol. Chem. **50**, 1703–1711.
7. Kyriacou, A., Mackenzie, C. R., Neufeld, R. J. (1987). Detection and characterization of the α -specific and nonspecific endoglucanase of *Trichoderma reesei*: evidence demonstrating endoglucanase activity by cellobiohydrolase, II. Enzyme Microb. Technol. **9**, 25–32.
8. Lowry, J. O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, R. L.,

- Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
9. Lusic, A. J., Becker, R. R. (1973). β -glucosidase of *Chaetomium thermophyle*. *Biochim. Biophys. Acta* **329**, 5–16.
10. McHale, A., Coughlan, M. P. (1981). The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*: I-Purification and characterization of the extracellular and intracellular β -glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta* **662**, 152–159.
11. McHale, A., Coughlan, M. P. (1981). The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*: II-Identification of the various components produced during growth on cellulosic media. *Biochim. Biophys. Acta* **662**, 145–151.
12. Millet, J., Petre, D., Beguin, P., Raynaud, O., Aubert, J.-P. (1985). Cloning of ten distinct DNA fragments of *Clostridium thermocellum* coding for cellulases. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**, 145–149.
13. Okada, G. (1985). Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1257–1265.
14. Paice, M. G., Desrochers, M., Rho, D., Jurasek, L., Roy, C., Rollin, C. F., de Miguel, E., Yaguchi, M. (1984). Two forms of endoglucanase from the basidiomycete *Schizophyllum commune* and their relationship to other β -1,4-glycoside hydrolases. *Bio/Technol.* **2**, 535–539.
15. Sternberg, D., Vijayakumar, P., Reese, E. T. (1977). β -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can. J. Microbiol.* **23**, 139–147.
16. Taj-Aldeen, S. J. (1993). Effect of starch on the induction of β -glucosidase in *Trichoderma reesei* Rut C30. *Mycol. Res.* **97**, 318–320.
17. Taj-Aldeen, S. J., Al-habbeeb, E. K., Abdulla, S. K. (1990). Cellulolytic activity of coprophilous fungi. *Cryp. Bot.* **2**, 25–29.
18. Taj-Aldeen, S. J., Alkenany, K. I. (1993). Properties of the cellulolytic system from *Aspergillus niveus*. *Mycol. Res.* **97**, 15–22.
19. Taj-Aldeen, S. J., Jaffar, W. N. (1992). Cellulase activity of a thermotolerant *Aspergillus niveus* isolated from desert soil. *Mycol. Res.* **96**, 14–18.
20. Warldon Jr., C. R., Becker-Vallone, C. A., Eveleigh, D. E. (1986). Isolation and characterization of a cellulolytic actinomycete *Microbispora bispora*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 477–486.
21. Whitaker, J. R. (1963). Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.* **35**, 1950–1953.

A second *Escherichia coli* gene with similarity to *gapA*

Elena Hidalgo,† Ana Limón, Juan Aguilar*

*Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona,
Barcelona, Spain*

Received 17 October 1995/Accepted 29 December 1995

Summary

An open reading frame has been found downstream of the *ald* gene at 31 min in the *Escherichia coli* chromosome and has been designated *gapC* because of its high similarity with *gapA* (min 39, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), and with *gapB* (min 62, a gene with high similarity to *gapA*, encoding erythrose-4-phosphate dehydrogenase). The *gapC* gene (min 31) encodes a polypeptide of 204 amino acids, 126 residues shorter than glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In this 204-codon open reading frame several amino acids important for catalysis are conserved. However, the cofactor binding site is lost. The results illustrate a case of a gene, encoding a glycolytic enzyme, for which at least three copies maintaining a certain degree of similarity are apparent in the *E. coli* genome. It seems likely that the genes encode products with different cellular functions. The origin of these three copies of the *gap* gene by horizontal transfer or by duplication of an ancestral gene is discussed.

Key words: *Escherichia coli*, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase, gene duplication, horizontal transfer, *gap* gene

Resumen

Se ha definido un marco abierto de lectura contiguo al gen *ald*, situado en el minuto 31 del cromosoma de *Escherichia coli*, al que se ha designado *gapC* por su gran similitud con *gapA* (min 39, gen que codifica la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), y *gapB* (min 62, otro gen que presenta gran similitud

* *Correspondence to:* Juan Aguilar. Unidad de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal, 643. 08028 Barcelona. España. Tel.: +34-3-4024521. Fax: +34-3-4021896. E-mail: jaguilar@far.ub.es

† *Present address:* Department of Molecular and Cellular Toxicology. Harvard School of Public Health. 655 Huntington Ave. Boston, MA 02115. USA.

con *gapA* y que codifica la enzima eritrosa 4-fosfato deshidrogenasa). El gen *gapC* (min 31) codifica un polipéptido de 204 aminoácidos, 126 residuos más corto que la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Varios aminoácidos importantes para la catálisis se hallan conservados en el polipéptido de 204 residuos; sin embargo, se ha perdido el lugar de unión al cofactor. Los resultados presentados ilustran el caso de un gen, que codifica una enzima glicolítica, para el que aparecen por lo menos tres copias que mantienen un notable grado de similitud en el genoma de *E. coli*. Parece probable que estos genes codifiquen productos con diferentes funciones celulares. Se discute el posible origen evolutivo de las tres copias del gen *gap* por transferencia horizontal o por duplicación génica.

Introduction

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is encoded in the *Escherichia coli* chromosome by the *gapA* gene, which has been mapped at minute 39 (13). This gene encodes a functional enzyme constitutively expressed, as is usual for the glycolytic enzymes. The *gapA* gene has been cloned (8), sequenced (7), and the predicted amino acid sequence compared with other bacterial and mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. In their studies, Branlant and Branlant (7) reported and analyzed the complete *gap* sequence and upstream putative regulatory sequences. Later, Alefounder and Perham (1) reported that a gene cluster encoding glycolytic enzymes mapped at minute 62. This cluster included a gene, *gapB*, with similarity to the *gap* gene, now designated *gapA*. This gene *gapB*, cloned and expressed in vitro, has been proven to produce a protein identified as erythrose-4-phosphate dehydrogenase (25).

The predicted sequence of the *gapA* gene product is more similar to eukaryotic dehydrogenases than to those of prokaryotes, whereas *gapB* has a sequence that reflects a bacterial ancestry. As noted by Smith et al. (24), the acquisition of a second glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapA*) by an ancestor of *E. coli* constitutes one reasonably firm case for horizontal gene transfer from eukaryotes to prokaryotes. Alternatively, Zhao et al. (25) propose that *E. coli gapA* and *gapB* arose by duplication of an ancestral eubacterial

gene. The different function of *gapB* would explain why it does not fit easily into bacterial phylogeny schemes based on *gap* genes. In this report we present another gene in the *E. coli* genome with similarity to *gapA*. This gene, designated *gapC*, has been mapped at minute 31, close to the *ald* gene, which encodes an aldehyde dehydrogenase (4, 9).

Materials and methods

Strain used and growth conditions. The strain used was an *Escherichia coli* K12 derivative, ECL1 (16), also known as E15 (3), and was routinely grown aerobically on Luria-Bertani broth, or minimal medium which consisted of a basal inorganic medium (6) containing 10 mM rhamnose.

DNA manipulation and sequencing. Plasmid DNA was prepared by the boiling method (20). For large scale preparation, a crude DNA sample was subjected to purification by cesium chloride-ethidium bromide density gradient centrifugation, or on a column (Qiagen GmbH, Düsseldorf, Germany). Single-stranded DNA was isolated by a method outlined by Stratagene Corp., La Jolla, CA, USA. DNA manipulations were performed essentially as described by Sambrook et al. (20). The DNA sequence was determined by using the dideoxy-chain termination procedure of Sanger et al. (21). Double-stranded plasmid DNA was used as template. Plasmid purified by CsCl gradient

centrifugation was used for the construction of ordered deletions by using the Erase-a-Base system (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Sequencing gel compressions were resolved as described previously (11). PCR amplification was performed following the methods of Innis et al. (15).

The GenBank data base was searched with the BLAST (2) and TFASTA (18) algorithms. Alignment of the three polypeptides was performed with the CLUSTAL V program (12).

Primer extension. Primer extension analysis was performed by using the procedure of Hu and Davidson (14). The procedure involved hybridization of mRNA to a single stranded DNA template and annealing of the radiolabeled DNA primer to the template at a site upstream from the 5' end of the mRNA. Extension of the primer by T4 DNA polymerase should stop at the 5' end of the hybridized mRNA; therefore, the 3' end of the growing DNA chain marks its position. Total RNA from strain ECL1 was prepared as described in Belasco et al. (5). T4 DNA polymerase was purchased from Promega.

Results and discussion

In a previous study we used plasmid pALD1.1 (Fig. 1) as a template to determine the sequence of the coding region of the *ald* gene (11) of wild type *E. coli* K12 (previously mapped to 31 min). In the present study the sequence of pALD1.1 was extended upstream of the *ald* gene to the *EcoRI* site (pALD1.2) and downstream of the *ald* gene to 260 bp beyond the *HindIII* site (pALD1.3). The DNA sequence of both strands was determined and two open reading frames (ORF) were identified in these fragments: one, ORF A, upstream of *ald* and transcribed in the same direction; the other, ORF B, downstream of *ald* and transcribed in the opposite direction (Fig. 1). Comparison of the amino acid sequence of ORF A with EMBL data bank gave no significant similarity with any other gene sequence. However, comparison of ORF B showed significant similarity to the *gapA* gene encoding a functional enzyme that is constitutively expressed in most conditions, as is usual for glycolytic enzymes. ORF B also showed significant similarity with *gapB* which, as indicated above,

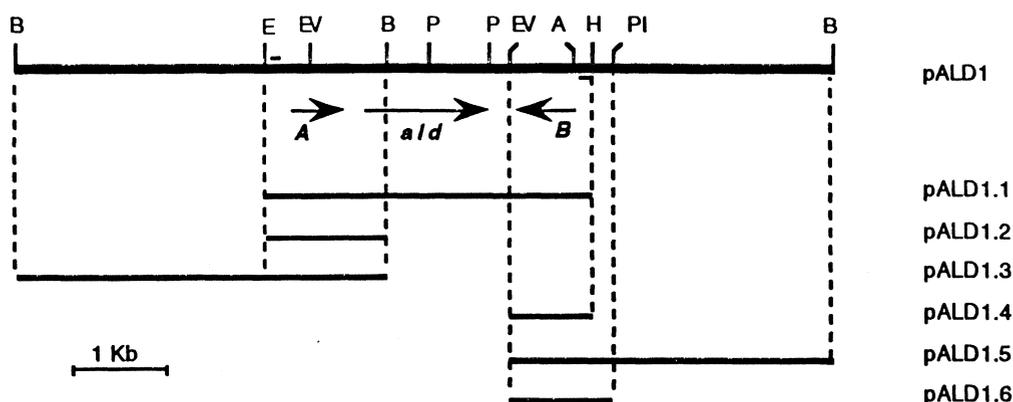


FIG. 1. Physical and genetic maps of the inserts in pALD1 and its derivatives. Thick and thin continuous lines represent the DNA insert in each plasmid. Positions of the oligonucleotides used for PCR amplification are indicated by two dashes. Arrows indicate the extension and direction of ORFs. Restriction sites: A, *AvaI*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; H, *HindIII*; P, *PstI*; PI, *PvuI*.

seems not to be expressed in vivo. ORF B was thus designated as *gapC*.

The presence in the wild type genome of this *gap* homologous fragment was ascertained using two oligonucleotides (see Fig. 1) to amplify by PCR the insert of plasmid pALD1.1. These same oligonucleotides were used to amplify the corresponding fragment from *E. coli* genomic DNA. The products of PCR amplification were observed to be the same size when run in an

agarose gel electrophoresis, indicating the presence of the region in both the plasmid and the chromosome (not shown).

The gene *gapC* corresponds to a 612 nucleotide ORF which has the capacity to encode a 204 amino acid polypeptide (Fig. 2) with a calculated molecular mass of 21682 Da, 126 amino acids less than the polypeptide encoded by the gene *gapA*. No apparent ribosome binding site is present upstream of this ORF while, downstream, there is an

```

-450  TTGATGAGTGGCCGATCGCTACGTGGGAAGAAACCACGAACTCCATTGCGCAATACGCTGCGATAACCAGTAAAAAGACCAGCCAGTGA
                                     ^
-360  ATGCTGATTTGTAACCTTGAATATCTATTTTCCATAACAATTTCTGCTTTAACATAATTTTCCGTTAACATAACGGGCTTTTCTCAAATT
-270  TCATTAATAATTTGTTACCCGTTTCAGTACGTTACGTTTCTACTGTGAGAATGGAGATTGCCCATCCCGCCATCTCTGGTCTTAAGCTTGGAA
-180  AGGATCAATTTTCATCCGAACGTTCCGTGACAGGAGAAAACCATGAGTAAAGTTGGTATTTAACGGTTTTGGTCGTATCGGTCGACTGGTGT
-90   TGGGTCGATTACTTTGAAGTCAAAAGCAACATAGACGTTGTCGCTATTAATGATCTCACTTCCCCATAAAATCTCGCCTACCTGCTGAAAC
1     ATGATTCAAACACGGACCATTTCCCGTGGAGCGTTGATTTTACGGAAGATTCACCTTATCGTTGATGGGAAAAGTATCGCGGTTTACGCCG
    M I Q T T D H S P G A L I L R K I H L S L M G K V S R F T P
    10                               20                               30
91   AAAAAAGAGGCTAAAAATATCCGTGGAAGCGAAAGGTGCAGAAAATCAATTGTCGAATGTACTGGCTTTTATACCTCCGCCCGAGAAATCG
    K K R L K I F R G K R K V Q K S L S N V L A F I P P P E K S
    40                               50                               60
181  CAGGCGCATCTTGTAGCTGGTGCAGAAGGTGTTGATTTCCGCCCTGCCGGTGAATAAAAACTATCGTTTATAACGTCAATGACGAC
    Q A H L D A G A K K V L I S A P A G E M K T I V Y N V N D D
    70                               80                               90
271  ACTCTGGATGGCAACGACACCAATGTTTCCGTGGCGTCATGCACCACTAACTGTCTTGCGCCGATGGCCAAAGCCTTGCAATGACAGTTTC
    T L D G N D T I V S V A S C T T N C L A P M A K A L H D S F
    100                              110                              120
361  GGGATAGAAGTCGGCAGCATGACGACCAATTCATGCCATACTGGCACCCAGTCACTGGTGGATGGCCCGCGTGGTAAAGATTTACGTGCT
    G I E V G T M T T I H A Y T G T Q S L V D G P R G K D L R A
    130                              140                              150
451  TCACGCGCAGCGGCAGAAAATATCATTTCCCCACACTACGGGGCGGCAAAAGCCATTGGTCTGGTGATCCCGGAACTGAGCGGCAAACTG
    S R A A A E N I I P H T T G A A K A I G L V I P E L S G K L
    160                              170                              180
541  AAAGGTCAATGCGCAACGCGTGCCGGTGAAAACAGGTTCCGGTCACTGAACTGGTATCGAATTCCTCGGAAAAAGTACTGCCGAAGAGGTGA
    K G H A Q R V P V K T G S V T E L V S I L G K K *
    190                              200
631  ATAACGCACCTTAAACAAGCAACCACCAATAACGAGTCATTTGGTTATACCGATGAAGAAATAGTCTCTTCCGATATCATTTGGCAGCCATT
721  TCGGTTCCGGTGTTTGATGCCACGCAACGGAAATACCGCCGTGGCGGATTTACAAC

```

FIG. 2. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *gapC* and its flanking sequences. Nucleotides in bold indicate the *Hind*III restriction site, and the arrowhead the transcription initiation site. The inverted repeat proposed to act as a transcriptional terminator is underlined. The asterisk indicates the stop codon. The number of amino acid residues are shown under the sequence while the nucleotide number is indicated in the left margin. The sequence reported has been deposited with the GenBank Data Library under accession No. L09067.

inverted repeat located 100 nucleotides after the TGA translational stop codon. This sequence could form a stable stem-loop structure with a calculated free energy of stabilization of 16.2 kcal, and might act as a transcriptional terminator (Fig. 2).

In spite of the difference in protein size, our comparison of the *gapC* and *gapA* gene products yielded 47% identity, while comparison between the *gapB* and *gapA* products yielded 36% identity for the entire polypeptides. Alignment of the three polypeptides gave 14% identity and 21% of conservative amino acid changes in a 340 residue consensus length. Comparison of *gap* genes of *E. coli* with *gap* genes from other species utilizing the CLUSTAL program allowed us to construct a phylogenetic tree for the *gap* genes (Fig. 3). The corresponding dendrogram showed how the divergence of *gapB* from *gapA* was earlier than the divergence of *gapC* from *gapA* and how *gapA* was closer to eukaryotic *gap* genes than *gapB*.

Several conserved amino acid sequences are apparent in the central section of the three

polypeptides shown in Fig. 4, including the sequence ASCTTNC (position 148 to 154 of *gapA* polypeptide) and the amino acid residues H, Q, and R (positions 177, 183 and 232 of *gapA* polypeptide respectively) which are essential for the enzymatic activity (17).

The codon usage of *gapA*, *gapB* and *gapC* ORFs appears rather random. Even though there is a general preference for a pyrimidine at the third base position and some of the features predicted for *E. coli* genes may be observed, a more precise analysis of the codon usage does not result in significant differences.

The site of transcription initiation of *gapC* was determined by primer extension analysis with a mRNA preparation obtained from cells of strain ECL1 grown aerobically on rhamnose. The DNA template used in this experiment was derived from plasmid pALD1.4 and the primer was a ³²P-labeled sequencing primer complementary to the vector polylinker region. The samples were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis in

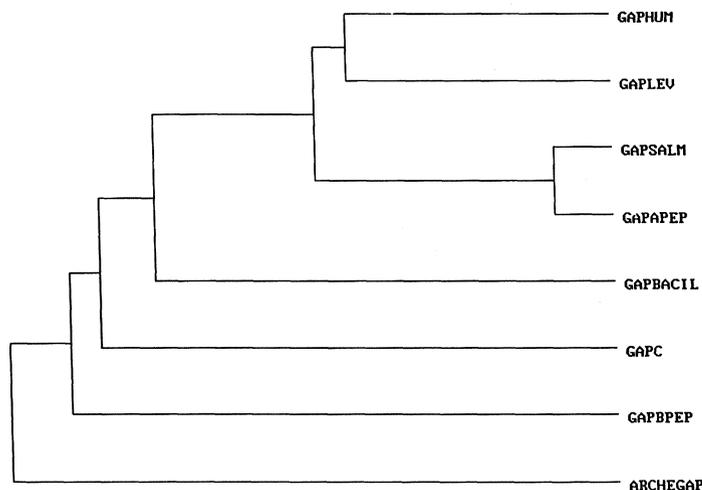


FIG. 3. Phylogenetic tree using amino acid sequences corresponding to the following glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases or similar peptides: Human, GAPHUM; *Saccharomyces cerevisiae*, GAPLEU; salmon, GAPSALM; *E. coli gapA*, GAPPEP; *Bacillus subtilis*, GAPBACIL; *E. coli gapC*, GAPC; *E. coli gapB*, GAPBPEP; Archaeobacteria *Pyrococcus woesei*, ARCHEGAP. Analysis was performed on a CLUSTAL V alignment (12).

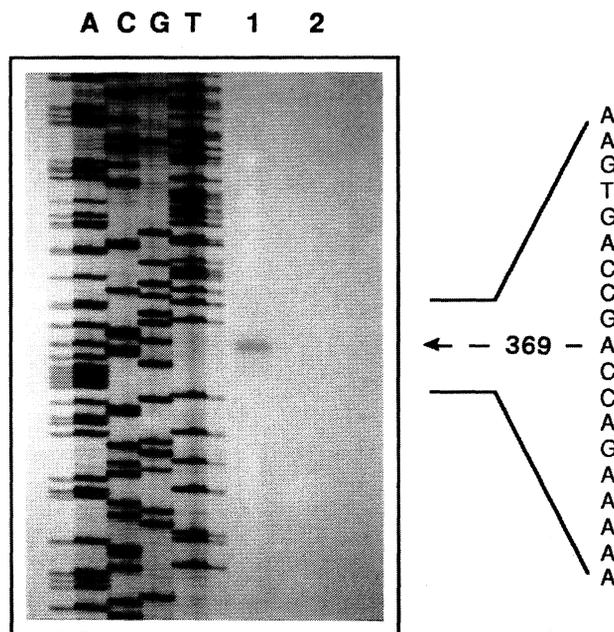


FIG. 5. Identification of the 5'-end of the *gapC* transcript. The primer-extended products (lane 1) were electrophoresed with a sequencing ladder (lanes A, C, G, and T) generated by using the same template and primer. A control reaction without RNA was run in lane 2. A portion of the nucleotide sequence deduced from the sequencing lanes is shown on the right, with the last nucleotide extended indicated by an arrow at position -369, which corresponds to a position of transcription initiation corresponding to the G at position -368.

Zhao et al. (25) has led these authors to revise the horizontal transfer hypothesis. Upon analysis of gap gene products and functions in other species, they suggested that both *gapA* and *gapB* arose by duplication of an ancestral eubacterial gene which would have had the functions depicted in its different evolved derivatives. This proposal could obviously be extended to *gapC*.

Acknowledgements

This work was supported by grant PB94-0829 from the DGICYT of Spain. E. H. and A. L. were recipients of a predoctoral fellowship (FPI) from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain. We acknowledge the help of Robin Rycroft for editorial assistance.

References

1. Alefounder, P. R., Perham, R. N. (1989). Identification, molecular cloning and sequence analysis of a gene cluster encoding the class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase, 3-phosphoglycerate kinase and a putative second glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **3**, 723-732.
2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
3. Bachmann, B. J. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**, 130-197.
4. Baldomà, L., Aguilar, J. (1987). Involvement of lactaldehyde dehydrogenase in several metabolic pathways of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **262**, 13991-13996.
5. Belasco, J. G., Beatty, J. T., Adams, C. W., von Gabain, A., Cohen, S. N. (1985). Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata*

- results from segmental differences in stability within the polycistronic *rxcA* transcript. *Cell* **40**, 1171–1181.
6. Boronat, A., Aguilar, J. (1979). Rhamnose-induced propanediol oxidoreductase in *Escherichia coli*: purification, properties, and comparison with the fucose-induced enzyme. *J. Bacteriol.* **140**, 320–326.
 7. Branlant, G., Branlant, C. (1985). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli gap* gene. Different evolutionary behaviour of the NAD⁺-binding domain and of the catalytic domain of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **150**, 61–66.
 8. Branlant, G., Flesh, G., Branlant, C. (1983). Molecular cloning of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes of the *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*. *Gene* **25**, 1–7.
 9. Chen, Y. M., Zhu, Y., Lin, E. C. C. (1987). NAD-linked aldehyde dehydrogenase for aerobic utilization of L-fucose and L-rhamnose by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 3289–3294.
 10. Fraenkel, D. G. (1987). Glycolysis, pentose phosphate pathway and Entner-Doudoroff pathway. In Neidhart, F. C. (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, pp 142–150. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 11. Hidalgo, E., Chen, Y. M., Lin, E. C. C., Aguilar, J. (1991). Molecular cloning and DNA sequencing of the gene *ald* encoding lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 6118–6123.
 12. Higgins, D. G., Bleasby, A. J., Fuchs, R. (1992). CLUSTAL V: Improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* **8**, 189–191.
 13. Hillman, J. D., Fraenkel, D. G. (1975). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **122**, 1175–1179.
 14. Hu, M. C. T., Davidson, N. (1986) Mapping transcriptional start points on cloned genomic DNA with T4 DNA polymerase: a precise and convenient technique. *Gene* **42**, 21–29.
 15. Innis, A. M., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (1990). PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, New York, NY.
 16. Lin, E. C. C. (1976). Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **80**, 535–578.
 17. Nowak, K., Wolny, M., Banás, T. (1981). The complete amino acid sequence of human muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett.* **134**, 143–146.
 18. Pearson, W. R., Lipman, D. J. (1988). Improved tool for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 2444–2448.
 19. Riley, M. (1993). Functions of the gene products of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **57**, 862–952.
 20. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 21. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.
 22. Scrutton, N. S., Berry, A., Perham, R. N. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* **343**, 38–43.
 23. Singh, R., Green, M. R. (1993). Sequence specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science* **259**, 365–368.
 24. Smith, M. W., Feng, D. F., Doolittle, R. F. (1992). Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfers. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 489–492.
 25. Zhao, G., Pease, A. J., Bharani, N., Winkler, M. E. (1995) Biochemical characterization of *gapB*-encoded erythrose 4-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12 and its possible role in pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **177**, 2804–2812.

Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, III. De 1977 a 1983

Concepción García Mendoza

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España

Summary

This is the third article of the series about the history of the SEM. It comprises the period from 1977 to 1983. During that period, the 7th and 8th SEM national congresses took place in Cádiz (1979) and Madrid (1981) respectively, and other scientific meetings and activities of the specialized sections were organized. The executive committees of the SEM over that period are listed. SEM membership during that period increased significantly.

Resumen

Este artículo, tercero de la serie, continúa la breve historia de la SEM. Corresponde al período comprendido entre 1977 y 1983. Durante estos años, se realizaron los Congresos Nacionales VII (Cádiz, 1979) y VIII (Madrid, 1981). Se celebraron diversas reuniones científicas y continuaron las actividades de los distintos Grupos Especializados. Se menciona la composición de las sucesivas Juntas Directivas. El número de socios de la SEM aumentó en estos años de una manera significativa.

Bienio 1977–1979

En la Junta General Ordinaria del año 1977, celebrada durante el Congreso Nacional de Santiago de Compostela, se informó sobre las activida-

des más relevantes llevadas a cabo por la Sociedad durante los dos años transcurridos desde la anterior Asamblea, así como las de cada Grupo Especializado consolidado. El Grupo de Micología, sin conseguir su total estructuración por falta de nú-

Correspondencia: Concepción García Mendoza. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Velázquez, 144. 28006 Madrid. España. Tel.: +34-1-5611800. Fax: +34-1-5627518.

mero suficiente de interesados, solicitó la creación de una nueva Comisión Gestora, con Rafael Sentandreu Ramón al frente de la misma. Con respecto a la desvinculación de la SEM de la dirección de la revista *Microbiología Española* y a la creación de la nueva revista *Biología Microbiana*, tema ya iniciado el año anterior en la reunión celebrada con ocasión del I Congreso de la FESBE, se estableció un amplio debate, en el que se mostraron muy diversas opiniones.

Una vez más, al plantearse la renovación parcial de la Junta Directiva, se acordó que, en lugar de una única candidatura, se presentaran varias, de forma que se eligiera la más adecuada para la Sociedad. Se informó de la nueva puesta en marcha de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en Bilbao, a cargo de Federico Uruburu, haciéndose constar la felicitación de los presentes por tal iniciativa. Con respecto al lugar de celebración del siguiente Congreso Nacional, aunque existía el preacuerdo de organizarlo junto con las otras Sociedades integrantes de la FESBE, una mayoría de socios opinó que deberían potenciarse los congresos de cada Sociedad por separado, opinión que suscribía también la recién constituida FEMS. Finalmente, se acordó que el siguiente Congreso tuviera lugar en Cádiz, en 1979, y que lo organizara José Mira Gutiérrez, quien ya había presentado su candidatura en anteriores ocasiones.

Continuando sus actividades, la Junta Directiva de ese período debatió el significado y función de la Microbiología en España, tema suscitado durante el Coloquio sobre Educación Microbiológica que había tenido lugar en el VI Congreso Nacional. Se llegó a la conclusión de que la Sociedad tenía esencialmente carácter científico y que, subsidiariamente, podían plantearse problemas profesionales a través de la elaboración de informes de carácter técnico.

Los Grupos Especializados y Regionales mostraron diferentes grados de actividad, como venía sucediendo anteriormente. El Grupo de Microbio-

logía Clínica proyectó celebrar, en 1978, una reunión sobre "Degradación de aminoglucósidos por enzimas bacterianas", organizada por Rafael Gómez Lus en Zaragoza; el Grupo de Microbiología Industrial estaba estructurando su I Reunión sobre "Fermentaciones industriales", a cargo de José Garrido y Baldomero Íñigo Leal; y el Grupo de Microbiología del Suelo seguía en fase de gestación, a cargo de José Miguel Barea. En cuanto a los Grupos Regionales, mientras el de Cataluña y Baleares apenas mostraba actividad, el del Noroeste estaba organizando su V Reunión Científica en Salamanca para 1978, bajo la dirección de Rafael Sentandreu, sobre "Morfogénesis y biología microbiana". También preparaba otra reunión sobre "Problemas con infecciones quirúrgicas", a cargo de Benito Regueiro, en Santiago de Compostela, que se hacía extensiva al Grupo de Microbiología Clínica. La CECT, por su parte, había ingresado en la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC) y, para refrendar su puesta en marcha oficial, estaba editando su primer catálogo.

Ante tal cúmulo de actividades, se hacía cada vez más imperiosa la necesidad de organizar la estructura administrativa de la Sociedad, tema ya discutido en anteriores ocasiones, pero todavía no resuelto. Una posible solución, en opinión del entonces Presidente, Fernando Baquero, sería compartir dependencias y gastos de una secretaría común con las Sociedades que integraban la FESBE, para lo cual se harían las gestiones pertinentes. A su vez, la nueva revista *Biología Microbiana*, cuya cabecera ya se había registrado, no empezaba a arrancar por falta de originales. Por ello, en un principio, se pensó que podría fusionarse con el *Boletín Informativo*, e incluir las contribuciones presentadas en las Reuniones de los Grupos Especializados.

Con respecto a la renovación parcial de la Junta Directiva de la SEM, correspondiente a 1978, sólo se había recibido una candidatura incompleta, por

lo que la Junta tuvo que completarla para cubrir todos los cargos requeridos. Después de las votaciones preceptivas, entraron a formar parte de la misma las siguientes personas: Presidente, Rafael Gómez Lus; Vicepresidente, César Nombela Cano; Tesorero, Rubens López García; Bibliotecario, Jorge López Tello; y Vocales, Carlos Hardisson Rumeu y Luis Arcalís Arce. A petición de Benito Regueiro, se añadió un Vocal temporal a la Junta Directiva. Dicha propuesta fue aceptada y se eligió al Presidente del Comité Organizador del Congreso Nacional, que en ese momento era José Mira Gutiérrez. Esta propuesta sigue en vigor hasta la fecha. (En la Tabla 1 puede verse la lista de Presidentes, Vicepresidentes y Secretarios de la SEM, desde su fundación hasta hoy.)

El Presidente saliente, Fernando Baquero, que había actuado como representante de la Sociedad en la comisión para la elaboración de la Ley de Especialidades Médicas, informó sobre la inclusión de la Microbiología como especialidad de la Licenciatura de Medicina. Igualmente, solicitó a la Junta que incluyese esa materia en la especialización de los ATS. Para sucesivas intervenciones de la Sociedad en dicha Comisión, se nombraron representantes de la misma a Antonio Rodríguez Noriega y Ramón Díaz García.

Recién constituida esta nueva Junta Directiva, su Secretario, Emilio Muñoz, dimitió de este cargo por haber accedido a mayores responsabilidades dentro del CSIC. Igualmente, el Tesorero, Rubens López, presentó su dimisión al comprobar la enor-

TABLA 1. Lista de Presidentes, Vicepresidentes y Secretarios de la SEM

Presidentes	Vicepresidentes ¹	Secretarios
Juan Marcilla Arrazola (1946–1951)	Gerardo Clavero del Campo (1946–1958)	Lorenzo Vilas López (1946–1967)
Antonio Ruiz Falcó (1951–1956)	Román de Vicente Jordana (1967–1969)	Miguel Rubio Huertos (1967–1969)
Arnaldo Socías Amorós (1956–1957)	Agustín Pumarola Busquets (1969–1978)	Julio Pérez Silva (1969–1971)
Gerardo Clavero del Campo (1957–1967)	César Nombela Cano (1978–1983)	Antonio Portolés Alonso (1971–1977)
Gonzalo Urgoiti Somavilla (1967–1971)	Miguel Gobernado Serrano (1983–1991)	Emilio Muñoz Ruiz (1977–1978)
David Vázquez Martínez (1971–1974)	Rafael Rotger Anglada (1991–...)	Eulalia Cabezas de Herrera Sánchez (1978–1985)
Fernando Baquero Mochales (1974–1978)		Concepción García Mendoza (1985–1993)
Rafael Gómez Lus (1978–1983)		Juan Antonio Leal Ojeda (1993–...)
César Nombela Cano (1983–1991)		
Francisco Ruiz Berraquero (1991–...)		

¹ De 1958 a 1967, el cargo estuvo sin ocupar.

me tarea burocrática que implicaba dicho cargo, por lo que la Junta Directiva, haciendo uso de sus atribuciones de acuerdo con los Estatutos, nombró a Eulalia Cabezas de Herrera, Secretaria, y a Concepción García Mendoza, Tesorera, con el acuerdo de que ambas personas, actuando conjuntamente, pusieran en marcha la estructura administrativa de la Sociedad.

Una de las primeras iniciativas de esta Junta Directiva fue la de potenciar las relaciones internacionales de la Sociedad, con la presencia activa de sus representantes en todas las reuniones de la IUMS y de la FEMS, en las que en los últimos años se había participado poco. Referente a los Grupos Especializados y Regionales, Rafael Sentandreu se ofreció para tratar de reorganizar el Grupo de Micología. Considerando además que él mismo estaba preparando en Valencia, para 1981, el VII Simposio Internacional sobre Levaduras, a propuesta del Comité Internacional de esta especialidad, la Junta Directiva le designó gestor del citado Grupo, con la colaboración de Carlos Ramírez. Por su parte, Juan Francisco Martín, que se encargaba del Grupo de Microbiología Industrial, fue nombrado representante de la SEM en la Federación de Sociedades de Biotecnología, a la cual ya se encontraba adscrito el grupo por él gestionado. La propuesta de creación de un nuevo Grupo Regional de Aragón, Navarra, Rioja y Soria vino a sumarse a los ya consolidados o en fase de gestión, con la siguiente Junta Gestora: Jesús María Repáraz, Ramón Díaz, Andrés Moreda, Avelino Rodríguez Moure y Juan-José Marcén.

Prosiguiendo sus actividades, la nueva Secretaria procedió a la creación de un fichero actualizado de socios (Fig. 1), que incluía sus respectivas especialidades profesionales. Así mismo, la Tesorera se dedicó a la reorganización de la contabilidad, decidiendo la domiciliación bancaria obligatoria para el cobro de la cuota

social. Dicha propuesta había sido aprobada con anterioridad, pero no se había puesto en práctica.

La actividad de los Grupos Especializados y Regionales se puso de manifiesto una vez más. Se celebró la VI Reunión Científica del Grupo del Noroeste (Santander, 1979) sobre "Patogénesis microbiana", a cargo de José Miguel Ortiz Melón y Antolín Mellado Pollo. Por su parte, el Grupo de Fitopatología, que había organizado en Valencia la reunión correspondiente a su grupo, bajo la dirección de Agustín Alfaro, estaba gestionando la siguiente para 1979, en Córdoba, a cargo de Rafael Jiménez Díaz. Los Presidentes de los demás Grupos Especializados, continuando con la norma establecida en el VI Congreso Nacional, estaban organizando las respectivas Mesas Redondas de su especialidad para el siguiente Congreso, que tendría lugar en Cádiz, también en 1979, y diferentes reuniones para 1980. Así, el Grupo de Microbiología de Alimentos estaba preparando su II Reunión Científica en Valencia, gestionada por Enrique Hernández, y el Grupo de Microbiología Industrial hacía lo propio por parte de José Garrido Márquez, en Arganda del Rey (Madrid). Con respecto al Grupo de Cataluña y Baleares, que se había mostrado muy poco activo en los últimos tiempos, se decidió, de acuerdo con su Presidente y Secretario, Ramón Parés y Luis Arcalís respectivamente, que promovieran la renovación de su Junta Directiva.

En cuanto a las relaciones internacionales, ante la falta de representación española en las últimas reuniones del Consejo de Delegados de la FEMS, se decidió nombrar delegados de la Sociedad en la próxima reunión de Colonia (República Federal Alemana) a Carlos Hardisson y a Juan Francisco Martín, que iban a asistir al correspondiente Simposio de la FEMS. Fue también en estos momentos cuando empezaron a utilizarse las siglas SEM.

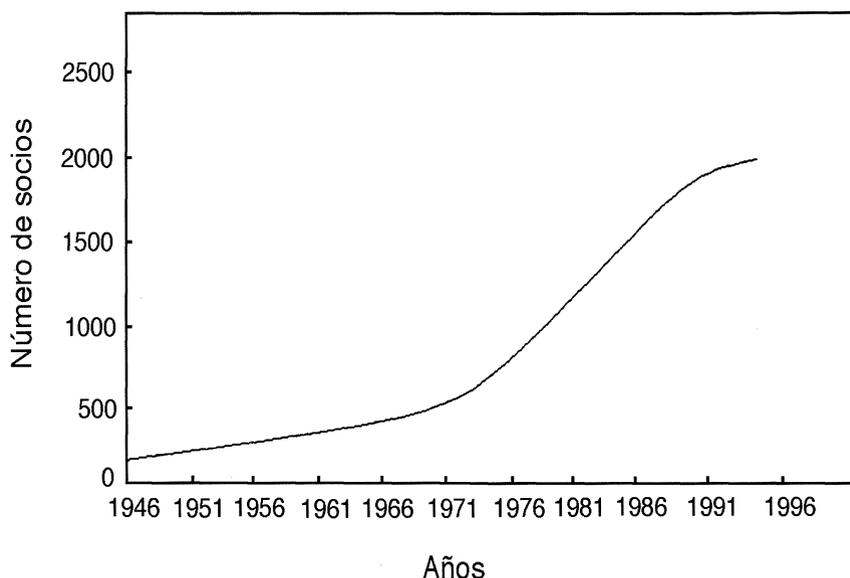


FIG. 1. Curva de crecimiento del número de socios de la SEM, desde 1947 hasta 1995.

VII Congreso Nacional de Microbiología

Bienio 1979–1981

Fue organizado por José Mira Gutiérrez en la Facultad de Medicina de Cádiz, durante los días 24 al 27 de septiembre de 1979. La conferencia inaugural fue pronunciada por Luis S. Granjel. El Congreso incluyó ocho Simposios sobre los temas: “Morfogénesis en microorganismos eucariotas”, “Microbiología de la leche”, “Plásmidos”, “Microbiología industrial”, “Variabilidad genética en virus”, “Mycoplasmas”, “Actualidades en micología” y “Anaerobios”, a cargo de diferentes especialistas nacionales y extranjeros; tres Mesas Redondas, sobre “Enseñanza de la microbiología”, “Relaciones huésped-parásito en patología vegetal” y “Diagnóstico inmunológico de la aspergilosis”; y once secciones de comunicaciones libres. Se presentaron más de quinientas aportaciones científicas en el conjunto de todas las sesiones y hubo una asistencia de más de setecientos microbiólogos. Se abordaron, por primera vez, además de los temas científicos más avanzados, los orígenes e historia de la Microbiología en España.

Durante el VII Congreso Nacional se celebró en Cádiz la correspondiente Asamblea de la SEM, en la que se enumeraron los logros conseguidos durante el bienio anterior. Se particularizaron los de cada Grupo Especializado y Regional, representados por sus respectivos Presidentes, a los que se incorporó Rafael Sentandreu en su calidad de Presidente del Grupo de Micología, recién constituido. En cuanto al lanzamiento de la revista *Biología Microbiana*, no se pudo precisar la fecha de su inicio ante la falta de originales. Respecto al lugar de celebración del siguiente Congreso Nacional, se decidió que tuviese lugar en Madrid y que fuese organizado por César Nombela. La puesta en marcha de la secretaría administrativa y el necesario saneamiento financiero de la SEM, por parte de las entonces Secretaria y Tesorera, habían comenzado a dar su fruto, facilitando a los organizadores del Congreso de Cádiz toda la información y documentación que habían requerido.

La Ponencia sobre Enseñanza de la Microbiología, que se acababa de celebrar en este Congreso, suscitó una importante discusión sobre el papel de la SEM ante la Comisión Nacional de Especialidades Médicas a través de sus dos representantes, Antonio Rodríguez Noriega y Ramón Díaz García. Ante la confusión planteada sobre si dichos representantes sólo habían actuado en defensa de la Microbiología Médica y no de toda la Microbiología, se decidió, a instancias del Vicepresidente de la Sociedad, César Nombela, tratar este tema en una Junta Extraordinaria a celebrar en Madrid. Convocada dicha Junta Extraordinaria, a la cual se invitó a dichos representantes en la citada Comisión Nacional, el Presidente de la Sociedad, Rafael Gómez Lus, expuso el único punto del orden del día. Se trataba de precisar si dicha comisión se había limitado a elaborar un programa para el acceso a la Especialidad de Microbiología y Parasitología de los licenciados en Medicina, o si, además, también se había discutido la situación actual de la Microbiología en España. Se solicitó a los representantes de nuestra Sociedad que manifestasen cuál había sido su postura ante dicha comisión. Después de una larga discusión al respecto, motivada por la restricción que implicaba el cambio de nombre de la especialidad a Microbiología Médica, con el consiguiente perjuicio para los microbiólogos no médicos, los representantes abandonaron la reunión y uno de ellos, Ramón Díaz, presentó su dimisión. Seguidamente, Rafael Sentandreu propuso que, en lo sucesivo, los representantes de la SEM no fueran de igual profesión, porque así se abarcaría el espectro total de la Microbiología, como correspondía a nuestra Sociedad. Esta propuesta fue aceptada por mayoría y se nombró al citado Rafael Sentandreu sustituto de Ramón Díaz.

Continuando las actividades habituales de la Sociedad, la Junta Directiva, tras el paréntesis transcurrecido sin la publicación tanto de la revista *Biología Microbiana* por falta de originales, como del *Boletín Informativo*, acordó la reanudación de este último,

misión que se encargó al Grupo de Virus, por la experiencia de haber lanzado su propio Boletín, y más particularmente a su Secretaria, Pilar Pérez Breña. También este Grupo estaba realizando entonces la traducción de una publicación del International Committee on Taxonomy of Viruses sobre la nomenclatura de los virus.

Los Grupos Especializados y Regionales continuaban con sus actividades y el Grupo de Micología, recién constituido, estaba preparando su I Reunión Científica, solicitando su Presidente, Rafael Sentandreu, el patrocinio de la SEM para el antes mencionado VII Simposio Internacional sobre Levaduras, que estaba organizando. El Grupo de Aragón, Rioja, Navarra y Soria, ya totalmente constituido, había nombrado Presidente del mismo a Avelino Rodríguez Moure. El Grupo de Microbiología de Alimentos había celebrado su II Reunión en Valencia, en 1980, bajo la dirección de Enrique Hernández. El Grupo había renovado su Junta Directiva, nombrando Presidente a Bernabé Sanz. El Grupo de Microbiología Industrial también había celebrado su I Reunión en 1980, en Arganda del Rey (Madrid), bajo la dirección de José Garrido. El Grupo de Fitopatología, en su V Reunión, celebrada en Córdoba, había planteado la posibilidad de constituirse como Sociedad Española de Fitopatología, haciéndolo saber a la Junta Directiva de la SEM antes de que tuviese lugar la siguiente reunión en Zaragoza, en 1980, organizada por Carlos e Ignacio Palazón Español.

En cuanto a las gestiones administrativas para consolidar la infraestructura de la SEM, se regularizó la situación de nuestra Sociedad frente al Ministerio de Hacienda, obteniéndose el número de identificación fiscal, imprescindible para que la Sociedad contase con personalidad jurídica propia en sus gestiones económicas. Así mismo se incluyó el fichero de socios en el ordenador del Centro de Cálculo del CSIC, con la consiguiente posibilidad de suministrar datos informatizados a quien los requiriese.

El Presidente del Grupo de Virología, Rafael Nájera, tuvo que dejar este cargo debido a su traslado temporal a la Organización Mundial de la Salud. Fue sustituido por Miguel Rubio, quien propuso a la Junta Directiva que la SEM se asociara de nuevo con el Instituto «Jaime Ferrán» para la edición conjunta de la revista *Microbiología Española*, ante la falta de publicación de la revista *Biología Microbiana* por parte de la Sociedad. Esta propuesta fue debatida ampliamente. Se acordó que, si se aceptaba, la SEM formaría parte tanto del Consejo de Dirección como del Comité de Redacción de *Microbiología Española*, de forma que cada Grupo Especializado se encargase de la revisión de los trabajos de su especialidad.

A requerimiento del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática, se acordó nombrar representante de la SEM ante dicho Comité a Alberto Ramos Cormenzana. También se designó a José Miguel Barea representante en la Comisión Internacional de Ecología Microbiana (ICOME), de la IUMS. Con motivo de la siguiente reunión de la Junta Directiva de la FEMS, a celebrar en Zurich, se decidió que la Secretaria representase en lo sucesivo a la Sociedad ante la FEMS. Igualmente, se acordó la adopción de unas normas para el funcionamiento de los comités científicos de los congresos, relativos a la selección de las comunicaciones a presentar. También se decidió que cualquier gestión ante los organismos oficiales correspondiese sólo a la SEM, previo acuerdo de su Junta Directiva. Paralelamente se discutió la participación de nuestra Sociedad en la FESBE, que estaba organizando su II Congreso en Madrid, en 1981, bajo la dirección de Antonio Fernández de Molina y Antonio G. García.

Correspondiendo la renovación parcial de la Junta Directiva a principios de 1981, y solicitadas las candidaturas a los socios, se recibieron dos propuestas completas diferentes, que fueron aceptadas por la Junta. Después de la votación preceptiva fueron proclamados: Secretaria, Eulalia Ca-

bezas de Herrera Sánchez, y Vocales, José Ramón Díaz Ruiz, Julio Pérez Silva, Ricardo Guerrero Moreno, Rafael Vila Aguilar y José María Arias Peñalver.

Próxima la celebración del VIII Congreso Nacional en Madrid, en 1981, su organizador César Nombela informó acerca de la participación en el mismo de una nutrida representación de microbiólogos de la Asociación Mexicana de Microbiología. A su vez habían invitado a la SEM a participar en su próximo Congreso de Microbiología, que tendría lugar en Guanajuato, en 1982. Todos los Grupos Especializados organizaron sus respectivas Mesas Redondas para dicho VIII Congreso Nacional, excepto dos: el de Microbiología del Suelo—que también podía versar sobre Fijación del Nitrógeno—, que no llegaba a consolidarse, y el de Cataluña y Baleares, que no mostraba actividad. El Grupo de Fitopatología, que había decidido, por mayoría de sus miembros, constituirse en Sociedad Española de Fitopatología, realizó su última intervención como Grupo en el Congreso Nacional. También se celebró en estas fechas el II Congreso de la FESBE (Madrid, 1981), en el que intervino una nutrida representación de la SEM, dado que nuestra Sociedad era una de las integrantes de esta Federación.

Aceptada la propuesta de reanudar la colaboración entre la SEM y la revista *Microbiología Española*, se decidió que la dirección sería compartida entre el Director del Instituto «Jaime Ferrán» y el Presidente de nuestra Sociedad, y se nombraron Vocales; por nuestra parte, a Carlos Hardisson, Rafael Vila Aguilar y Ricardo Guerrero. También se aceptó la vinculación de la CECT a la SEM, a propuesta de Federico Uruburu. Finalmente, algunos miembros del Grupo Especializado de Microbiología Clínica fundaron la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), con lo que se estaba restando actividad al Grupo de la SEM. La SEIMC inició poco después la publicación de su propia revista.

VIII Congreso Nacional de Microbiología

El VIII Congreso Nacional se celebró en la Facultad de Farmacia de Madrid, del 28 de septiembre al 1 de octubre de 1981 (Fig. 2). Fue organizado por César Nombela Cano. La conferencia inaugural corrió a cargo de Carlos Hardisson, siendo pronunciada la de clausura por José Ángel García Rodríguez. El Congreso incluyó tres Simposios: “Mecanismos moleculares de la infección vírica”, “Bases genéticas y fisiológicas de la resistencia y patogenicidad bacterianas” y “Bases de la morfogénesis y patogenicidad de los hongos”; doce Mesas Redondas: “Enseñanza de la Microbiología; control de calidad en microbiología”, “Antibioterapia y su influencia sobre la ecología microbiana-hospitalaria”, “Ingeniería genética”, “Patología de plantas hortícolas en España”, “Últimos avances en la detección y diagnóstico de virus”, “Actividad antimicrobiana del ácido pipemídico”, “Diagnóstico microbiológico de las ETS”, “Nuevos avances en ecología microbiana”, “Microbiología industrial”, “Antivíricos”, “Antifúngicos y bases farmacocinéticas en quimioterapia”, y “Taxonomía bacteriana”; y cincuenta sesiones de comunicaciones libres. Se presentaron alrededor de seiscientos aportaciones en forma oral o en paneles. Prácticamente toda la Microbiología española estuvo representada en este Congreso, que contó con la presencia de eminentes científicos extranjeros y, particularmente, con una nutrida representación de destacados miembros de la Asociación Mexicana de Microbiología.

Bienio 1981–1983

En la Junta General correspondiente, celebrada en Madrid durante el VIII Congreso Nacional, se expusieron las actividades más importantes correspondientes al bienio 1979–81, tanto de ca-

rácter general, como había sido el aumento de relaciones con organizaciones extranjeras y la pertenencia a comités internacionales (FEMS, IUMS, EFB, ICRO, ICOME, etc.), como de cada Grupo Especializado y Regional en particular. Durante el tiempo reseñado, se reanudó la publicación del *Boletín Informativo*, se aceptó la propuesta de la revista *Microbiología Española* para volver a ser editada conjuntamente entre el CSIC y la SEM, y la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) solicitó vincularse a nuestra Sociedad.

En relación con el lugar de celebración del siguiente Congreso Nacional, se decidió que fuese en Valladolid y que lo organizara Antonio Rodríguez Torres. Finalmente, el Presidente leyó una nota en la que se informaba sobre la creación de la nueva SEIMC y las circunstancias que habían concurrido en su formación.

Volviendo a sus actividades cotidianas, la Junta Directiva nombró a César Nombela, Carlos Hardisson y Juan Francisco Martín miembros del Consejo de Redacción de *Microbiología Española*, por parte de la SEM. Además, tras la dimisión de Antonio Rodríguez Noriega representante de la Sociedad en la Comisión de Especialidades Médicas, nombró a José Ángel García Rodríguez para tal cargo.

Los Grupos Especializados y Regionales continuaron sus actividades y así, José Ángel García Rodríguez, que estaba organizando en Salamanca (para el año 1982) el II Simposio Europeo sobre Bacterias Anaerobias de Interés Médico, solicitó el patrocinio de la SEM. El Grupo de Micología preparaba su I Reunión en Alcalá de Henares, a cargo de Fernando Laborda, con la colaboración de la Asociación Española de Especialistas en Micología, y el Grupo de Microbiología Industrial estaba estructurando su II Reunión en Sevilla, organizada por José Antonio Fiesta Ros de Ursinos. Por su parte, el Grupo de Microbiología de Alimentos estaba igualmente preparando su III Reunión, en León, bajo la dirección de Benito

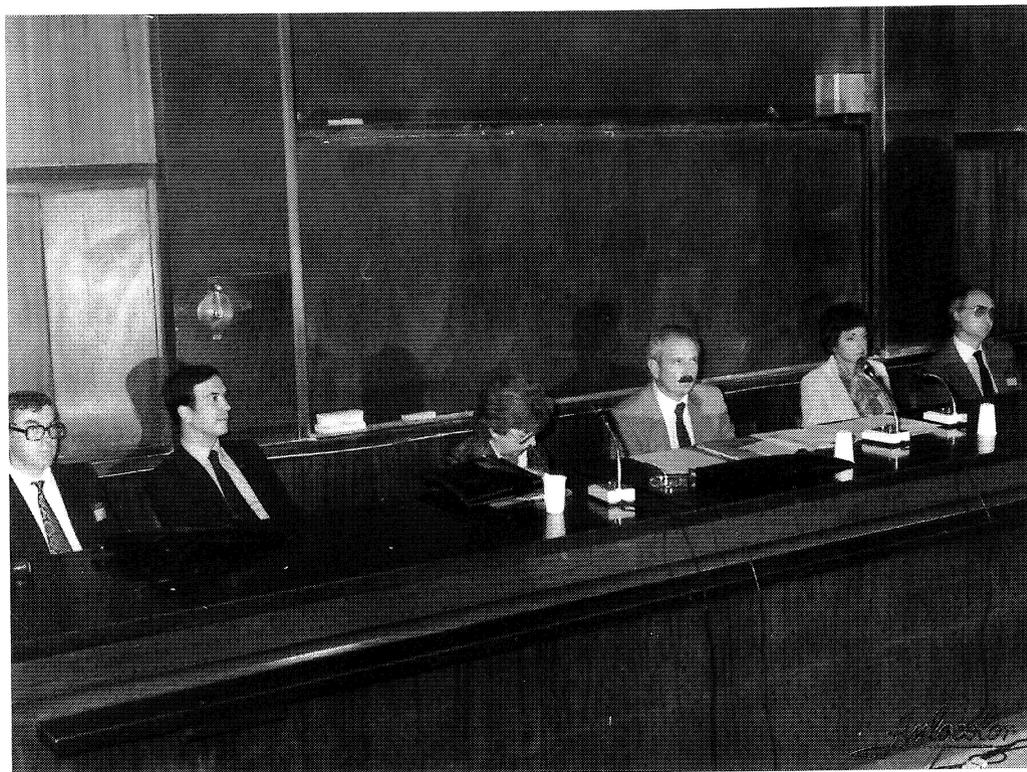


FIG. 2. Junta General Ordinaria celebrada en Madrid durante el VIII Congreso Nacional de Microbiología (1981). De izquierda a derecha, Rafael Sentandreu, Carlos Hardisson, Eulalia Cabezas de Herrera, Rafael Gómez Lus, Concepción García Mendoza y José Ángel García Rodríguez.

Moreno. En el Grupo de Virología se acababa de reincorporar, como Presidente, Rafael Nájera, quien informó de la preparación de una nueva edición de la Taxonomía de los Virus. El Grupo de Aragón, Rioja, Navarra y Soria también iniciaba sus actividades, y estaba preparando dos reuniones, una sobre "Brucelosis" y otra sobre "Hidatidosis".

Próxima la celebración del XII Congreso Internacional de Microbiología en Boston, en 1982 (III Congreso Interseccional después de la división de la IAMS en tres secciones, en 1970, y su posterior transformación en IUMS, iniciada en 1977 y finalizada en 1980), el entonces Presidente, Rafael Gómez Lus, asistió como delegado de la SEM a la reunión de las sociedades constituyentes de la IUMS. En relación con la FEMS, se había obteni-

do su aval para celebrar un simposio sobre "Yeast and fungal cell walls", a cargo de Julio R. Villanueva, en Salamanca; congreso que finalmente tendría lugar en Madrid, en 1984, organizado por César Nombela, con el título de "Microbial cell wall synthesis and autolysis". La invitación de la Asociación Mexicana de Microbiología para que la SEM participara en su XII Congreso, se materializó con la intervención en el mismo de los siguientes microbiólogos españoles invitados: César Nombela, Rafael Sentandreu, Carlos Hardisson, Margarita Salas, Eladio Viñuela, Juan Ortín, Monique Novaes-Ledieu, Eulalia Cabezas de Herrera, Concepción García Mendoza, José Miguel Ortíz Melón, Ernesto García López, José Ángel García Rodríguez, Fernando Baquero y

José Olivares, cuya asistencia sirvió además para suscribir varios proyectos de cooperación científica entre España y México.

En la renovación parcial de la Junta Directiva, que tuvo lugar a finales de 1982, resultaron elegidos: Presidente, César Nombela Cano; Vicepresidente, Miguel Gobernado Serrano; y Vocales, Carlos Hardisson Rumeu y José María Arias Peñalver. En el balance de la gestión del Presidente saliente se apreció que este período se había caracterizado por la expansión de la Sociedad en todos los ámbitos: infraestructura y organización, duplicación del número de socios, creación de nuevos Grupos Especializados, reanudación de la publicación tanto de la revista *Microbiología Española* como del *Boletín Informativo*, y mayor participación en los organismos internacionales. En cuanto a la nueva Junta Directiva, al pasar César Nombela a la Presidencia de la SEM y, por tanto, a la codirección de *Microbiología Española*, dejaba vacante la vocalía del Consejo de Redacción de la revista, por lo que se acordó nombrar a Miguel Gobernado para la especialidad de Microbiología Médica. Seguidamente, el nuevo Presidente expuso su programa de actuación en la SEM, que consistió, en primer lugar, en hacer una revisión de los Estatutos para adaptarlos mejor al momento, así como establecer unas normas para el nombramiento de Socios de

Honor y/o medallas de la SEM. De esta revisión y normas se encargó Ricardo Guerrero, con la colaboración de Sara Isabel Pérez Prieto. Igualmente, el Presidente solicitó que se realizaran las renovaciones pertinentes de las Juntas Directivas de los Grupos Especializados y Regionales. A este respecto, el Grupo de Fitopatología se estaba disolviendo por la baja de sus socios, al haberse constituido la Sociedad Española de Fitopatología, la cual siempre había actuado de forma procedente con la SEM. Dada la situación del Grupo de Microbiología Clínica, cuyo Presidente, Evelio Perea, y Secretario, Rogelio Martín Álvarez, habían dimitido, se nombró una Junta Gestora, constituida por Miguel Gobernado, José Ángel García Rodríguez y Antonio Rodríguez Torres. Esta Junta, después de una reunión con una buena mayoría del Grupo, nombró Presidente en funciones a Luis Arcalís Arce, para que tratase de revitalizarlo. Paralelamente, surgió la propuesta de José María Arias sobre la creación del nuevo Grupo de Taxonomía Bacteriana, para lo cual se proyectaba organizar una reunión sobre Filogenia, a cargo de Alberto Ramos Cormenzana. Finalmente, el Presidente propuso convocar un concurso para seleccionar un anagrama para la SEM, tal como había sugerido anteriormente José Ángel García Rodríguez. El fallo del mismo tendría lugar durante el Congreso Nacional de Valladolid, en 1983.

Aquí termina la tercera entrega de la breve historia de la SEM. En el próximo número de la revista seguiremos contando los acontecimientos que tuvieron lugar desde 1983 hasta 1987 en nuestra Sociedad.

La revista de la SEM, de 1947 a 1995

David Isamat, Antoni Navarrete, Ana Fernández de Castillo*

Redacción de la revista Microbiología SEM, Barcelona, España

Este artículo es un resumen de la historia de la revista de la SEM, desde su inicio, en 1947, hasta el año 1995, inclusive. Pretende ser tan sólo un complemento de la “Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología”, que se viene publicando en números sucesivos de nuestra revista desde septiembre de 1995. Contiene diversos datos que fueron expuestos en forma de póster en el XV Congreso Nacional de Microbiología, celebrado en Madrid del 25 al 28 de septiembre de 1995. Como se verá en el artículo, la revista de la SEM tiene dos épocas: Microbiología Española, que se publicó conjuntamente con el Instituto «Jaime Ferrán», del CSIC, desde 1947 a 1984, y Microbiología SEM, que se viene publicando desde 1985 hasta hoy. (La revista Microbiología Española continuó publicándose, sólo por el Instituto «Jaime Ferrán», durante los años 1985 y 1986.) Mientras que las colecciones de la segunda época suelen estar completas, hay pocas colecciones enteras de la primera época, e incluso las que existen están en lugares que muchos socios desconocen. Solicitamos, desde estas páginas, que las personas o instituciones que tengan colecciones completas, o casi completas, de Microbiología Española, lo comuniquen a la secretaria de la SEM o a la redacción de la revista, con objeto de que se pueda hacer un listado para su posible consulta por las personas interesadas en la historia de nuestra Sociedad, o en el desarrollo de la microbiología en España durante los últimos cincuenta años.

Summary

The official journal of the Spanish Society for Microbiology (SEM) was first published in 1947, under the name *Microbiología Española*. Until 1984 the journal was published by the SEM jointly with the Institute «Jaime Ferrán» (from the National Research Council, CSIC). In 1985 SEM started by itself to publish a new journal named *Microbiología SEM*, which may be considered the continuation of the former. From 1985 on the journal has increased both the quality and variety of its articles. At the beginning, most articles were in Spanish. Gradually, articles in English have been majority, to increase international readership. Currently the journal is published quarterly, with more than 500 pages per year.

* *Correspondencia:* Ana Fernández de Castillo. Revista *Microbiología SEM*. Apartado 16009. 08080 Barcelona. España. Tel.: +34-3-4482373. Fax: +34-3-3341079.

Resumen

La revista de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) inició su publicación en 1947, con el nombre de *Microbiología Española*. Hasta 1984 la revista fue editada por la SEM y por el Instituto «Jaime Ferrán» (CSIC). Desde 1985, la SEM publicó una nueva revista, *Microbiología SEM*, que puede considerarse la continuación de la primera. Desde 1985, la revista ha ido aumentando la calidad y variedad de sus artículos. Al principio, la revista publicaba la mayor parte de sus artículos en español. Progresivamente, los artículos en inglés han pasado a ser mayoría, con objeto de aumentar la difusión internacional. En la actualidad la revista se publica trimestralmente, con más de 500 páginas por año.

Introducción

Este artículo pretende hacer unos comentarios sobre la revista que edita la Sociedad Española de Microbiología (SEM). Hemos hecho un rápido recorrido por los números publicados, sus diversas etapas, sus varios editores-jefe (a partir de 1985) y su transformación a lo largo de los años. Hemos podido ver cómo ha ido cambiando la revista y cómo, poco a poco, ha ido mejorando gradualmente, desde el primer número, el 1947, hasta el último, de 1995, que cierra el período que hemos considerado. Hemos registrado el número de artículos publicados, el número de páginas de cada volumen, los temas más frecuentes de los artículos y la proporción de artículos en inglés y en español.

Breve historia de la revista *Microbiología Española*

En 1947 se fundó la revista *Microbiología Española*. En esa época, era editada conjuntamente por el Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología (del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC) y por nuestra Sociedad. Alcanzó un cierto prestigio y se citaba en varios índices internacionales. Le cabe el honor de contener el artículo donde se propone la creación del nuevo género *Bordetella*. Este artículo (de Manuel Moreno López, *Microbiol. Esp.* **5**, 177–181 [1952])

aparece citado en multitud de trabajos y libros de taxonomía. La época de mayor fuerza de la revista fueron los años entre 1953 y 1962, llegándose en dos de ellos (1955 y 1956) a publicar más de 500 páginas (Tabla 1). Sin embargo, a partir de entonces fue decayendo lentamente, hasta el punto de que en 1985 la SEM dejó de colaborar con el Instituto «Jaime Ferrán» e inició la publicación, por separado, de la revista actual. El Instituto «Jaime Ferrán» aún publicó dos números más de *Microbiología Española*, independientemente de la SEM, en los años 1985 y 1986. El año 1985 se reorganizó el CSIC y desapareció, entre otros, el Instituto «Jaime Ferrán». El último número, que apareció en noviembre de 1986, constaba de 5 artículos, 39 páginas y contenía el epitafio, triste pero digno, de la revista: "...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."

Quedan pocas colecciones completas de *Microbiología Española*. El estudio detallado de sus artículos, temas y autores —todavía no realizado— proporcionaría una visión, a veces descorazonadora, a veces esperanzada, de una microbiología autárquica, alejada de las corrientes internacionales. Pero no podemos olvidar que eso era

consecuencia de la situación del país en las décadas de 1940 y de 1950. No obstante, a pesar del aislamiento, se aprecian los tímidos intentos de abrirse al exterior, el interés en convocar y aprender de científicos extranjeros de reconocido prestigio, y el esfuerzo por parte de algunos de los microbiólogos más jóvenes —en aquella época— de salir al extranjero a perfeccionar conocimientos y de volver al país a poner en práctica lo aprendido. Sin duda, los fundamentos del magnífico edificio de la microbiología española que se fue levantando en las décadas de 1970 y 80 se apoyan en parte en esos cimientos, por muy frágiles que pudieran parecer. Además de otros méritos, no podemos negar a aquella primera época de la microbiología española los de la continuidad y la esperanza.

Microbiología Española se proponía sacar cuatro números individuales al año, pero eso se logró pocas veces (por ejemplo, en 1953). Cada volumen (año) tenía oficialmente cuatro números, pero lo más frecuente era que éstos no aparecieran sueltos, sino agrupados de dos en dos. De 1947 a 1952 hubo uno o dos números dobles por año (con la excepción de 1948, año en que no se publicó la revista), que podían ser el 3–4 o el 2–3. Por otra parte, hay dos cosas que hacen difícil saber cuántas veces por año apareció realmente la revista: la primera es que las bibliotecas suelen quitar las cubiertas de los números individuales al encuadernar el volumen de cada año; la segunda es que entre los años 1958 y 1967 la revista publicó un único índice, que correspondía a todo el año. Por ello hemos puesto 4 números en la columna corres-

TABLA 1. Volúmenes y números de la revista
Microbiología Española (1947–1986)

Vol.	Núm.	Año	Art.	Pág.
01	4	1947	15	317
02	4	1949	11	283
03	4	1950	16	247
04	4	1951	13	209
05	4	1952	12	213
06	4	1953	17	414
07	4	1954	16	328
08	4	1955	14	523
09	4	1956	26	504
10	4	1957	23	485
11	4	1958	24	431
12	4	1959	23	438
13	4	1960	24	414
14	4	1961	22	268
15	4	1962	23	307
16	4	1963	27	280
17	4	1964	21	254
18	4	1965	16	250
19	4	1966	24	346
20	4	1967	18	250
21	4	1968	20	240
22	4	1969	25	286
23	4	1970	23	306
24	4	1971	24	302
25	3	1972	25	289
26	3	1973	17	199
27	2	1974	19	326
28	4	1975	15	178
29 ^a	“4”	1976	13	156
30–31 ^b	1	1977–78	15	142
32–33 ^b	1	1979–80	12	123
34	1	1981	9	90
35	1	1982	6	76
36	2	1983	14	132
37	2	1984	13	119
38 ^c	2	1985	15	125
39 ^c	1	1986	5	39

^a La indicación “4” señala que parece que se publicaron los cuatro “números” de una sola vez. A partir de ese año hemos indicado las veces que se publicó realmente. Los dos números de cada uno de los años 1983, 1984 y 1985 fueron todos dobles.

^b Los volúmenes 30–31 y el 32–33, se publicaron en un solo número cada uno, que cubrieron los años 1977–1978 y 1979–1980, respectivamente.

^c En 1985 y en 1986 *Microbiología Española* y *Microbiología SEM* se publicaron independientemente (véase la Tabla 2).

pondiente (Tabla 1), hasta el año 1976. A partir de éste se hace evidente que la revista tiene serias dificultades para publicar incluso un solo volumen-número anual.

La nonata *Biología Microbiana*

La idea de lanzar una nueva publicación ya se había discutido en la Junta Directiva de la SEM celebrada con ocasión del I Congreso de la Fede-

ración Española de Sociedades de Biología Experimental (FESBE, Madrid, 1976), siendo presidente de la SEM Fernando Baquero. Se acordó denominarla *Biología Microbiana*, y se nombró editor-jefe (director) de la misma a Jorge López Tello, que ocupaba el cargo de bibliotecario en la Junta Directiva de la SEM. Dicha revista podría aparecer después de la celebración del siguiente Congreso Nacional (Santiago de Compostela, 1977; véase García Mendoza, *Microbiología SEM* 11 [4], p. 497). Se continuó tratando el tema en ese congreso. Diversas personas intervinieron en esta fase de preparación, y entre ellas podemos mencionar a Antonio Portolés, del CSIC (Centro de Investigaciones Biológicas). El nombre de *Biología Microbiana* llegó a registrarse oficialmente. Pero, debido principalmente a la falta de originales, la idea de la nueva revista no llegó a hacerse realidad. Como último recurso, se pensó incluso en fusionarla con el *Boletín Informativo*.

En la serie de artículos "Breve historia de la SEM", de Concepción García Mendoza, que se viene publicando en esta revista, se mencionan distintos acontecimientos relacionados con la primera época de la revista (*Microbiología Española*), y con la preparación y continuada dilación de la puesta en marcha de *Biología Microbiana*. Pero no habiéndose podido plasmar la idea de esta nueva revista, la Junta Directiva de la SEM, en una reunión que se celebró en 1980, decidió seguir colaborando con el Instituto «Jaime Ferrán» en la publicación de *Microbiología Española*. Se acordó que, a partir de entonces, la SEM debería formar parte tanto del Consejo de Dirección como del Comité de Redacción, y participaría en todas las decisiones que se tomaran (véase García Mendoza, en este número, p. 113). Pero a partir de 1985 la situación de coedición de la revista *Microbiología Española* se hizo insostenible, por lo que se decidió, esta vez con éxito, lanzar la nueva revista. A última hora, se cambió el nombre de *Biología Microbiana* (que a algunas personas les

TABLA 2. Volúmenes y números de la revista *Microbiología SEM* (1985–1995)

Año	Vol.	Núm.	Artíc.	Pág.
1985 ^a	01	2	10	94
1986	02	2	14	119
1987	03	3	20	201
1988	04	3	19	170
1989	05	2	15	116
1990	06	2	13	110
1991	07	2	15	133
1992	08	2	14	126
1993 ^b	09	3	31	262
1994 ^c	10	4	44	462
1995 ^d	11	4	59	532

^a En 1985 la SEM pasó a editar la revista *Microbiología SEM* y la numeración empezó de nuevo. El primer año sólo se publicó una revista, pero fue un número doble.

^b El primer número que se publicó ese año fue extraordinario (febrero, 1993). Se dedicó monográficamente a los alimentos, y se basó en la VIII Reunión de Microbiología de los Alimentos (Cáceres, septiembre de 1992).

^c El primer número del año 1994 fue doble, y se dedicó al XIV Congreso Nacional (Zaragoza, septiembre de 1993).

^d En el año 1995, el primer número que se publicó (marzo) fue un número monográfico sobre alimentos, basado en el IX Congreso de Microbiología de los Alimentos (Lérida, octubre de 1994). El segundo (junio) fue también monográfico, y se dedicó al origen y evolución temprana de la vida. El tercero (septiembre), que se entregó al empezar el XV Congreso Nacional, contenía, además de 8 artículos de longitud normal, 11 miniartículos (de 3 ó 4 páginas), correspondientes a ponencias que se iban a presentar en el Congreso.

parecía demasiado “básico” y poco clínico), por el más general de *Microbiología*. Este nombre también se registró, con la fuerte oposición de algunas personas del «Jaime Ferrán». Dado que el nombre se prestaba a confusión, porque había en el mundo otras revistas con ese mismo título, se hizo costumbre añadirle las siglas de la Sociedad, que aparecían en la portada.

La revista *Microbiología SEM*

El diseño y formato de cada número de *Microbiología SEM* era el habitual en revistas similares del momento. La idea se hizo realidad gracias a César Nombela, de la Universidad Complutense de Madrid (Facultad de Farmacia), por aquel entonces presidente de la SEM, y a Rubens López y su equipo (Ernesto García y Concepción Ronda, entre otros), que empezaron a trabajar con denu-

do. Se inició un poco como una aventura, ya que era un reto empezar una nueva revista partiendo casi de cero. Se decidió, después de muchas discusiones, que fuera bilingüe: se podrían publicar artículos en inglés o en español. Se decidió también redactar unas normas para los autores y que el editor-jefe fuera reelegible cada cuatro años. Se nombró un comité editorial y se escogieron expertos en cada especialidad, para que fuesen coordinadores de cada grupo específico. Cada número incluiría, como mínimo, una “minireview”, generalmente en inglés, sobre algún tema de interés microbiológico. Los originales se someterían a evaluación por el sistema de “peer review”: se enviarían a dos revisores, que decidirían si los artículos eran aptos para su publicación (Tabla 2).

El primer editor-jefe de *Microbiología SEM*, de 1985 a 1989, fue Rubens López, del CSIC (Centro de Investigaciones Biológicas). Su pequeño cubículo en el edificio del CIB (Velázquez 144,

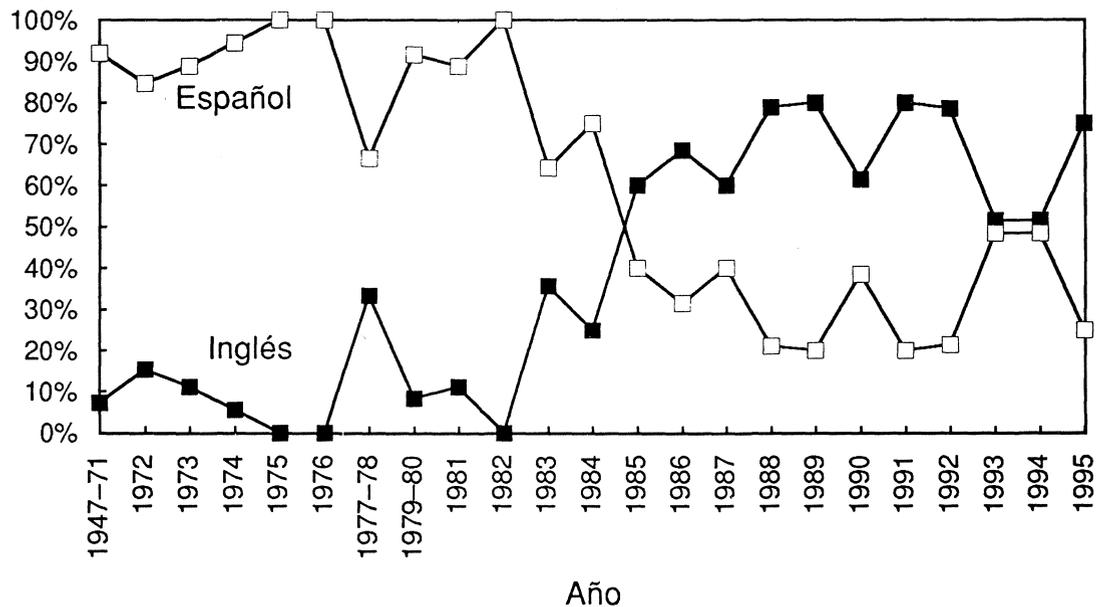


FIG. 1. Porcentaje de artículos publicados en inglés y español por la revista de la SEM: *Microbiología Española* (1947–1984) y *Microbiología SEM* (1985–1995). En el período de 1947 a 1971 de la primera revista, la gran mayoría de los artículos están en español.

Madrid) tuvo que multiplicar increíblemente su espacio, hasta convertirse en un remedo del camarote de los hermanos Marx, rebosante no de camareros, platos y flores sino de archivadores, carpetas, originales de artículos, gráficas y fotos. Rubens López y su equipo pusieron en práctica las orientaciones citadas y dieron, desde el principio, un buen nivel a la revista.

El primer número, que era doble, tuvo una gestación de unos nueve meses (apareció en septiembre de 1985), y llenó de gozo tanto a sus progenitores directos (Rubens López y su equipo), como a los padrinos (la SEM), y, por qué no decirlo, a los esforzados autores de los diez primeros artículos, que eran minirrevisiones. Por su carácter fundador, mencionaremos los nombres y centros (abreviados) de los autores “senior” o correspondientes de cada uno de los artículos: G. Larriba (Microb., Univ. Extremadura), C. García Mendoza (J. Ferrán, CSIC), F. Rodríguez-Valera (Microb., Univ. Alicante), R. López (Inmunol. Biol. Microb., CSIC), J. L. García (Antibióticos, Madrid), R. Guerrero (Microb., Autón. Barcelona), B. Gómez-Miranda (Inmunol. Biol. Microb., CSIC), J. Barbé (Microb., Autón. Barcelona), A. Ramos Cormenzana (Microb., Univ. Granada) y M. López-Brea (Hptal. de la Princesa, Autón. Madrid). Esos autores, y sus coautores, tuvieron la osadía —o no pudieron vencer el acoso del entusiasta y convencido Rubens López— de enviar un artículo para el número pionero y aceptaron publicar en una revista no solamente “mala por definición, ya que era española”, sino además novel.

Ya desde el principio era evidente el cambio total de aspecto y contenido de *Microbiología SEM*, con respecto a *Microbiología Española*. También en la lengua de los artículos: 6 de los 10 trabajos antes mencionados estaban en inglés (Fig. 1). En los años siguientes se publicaron de dos a tres números por año, que contenían generalmente 7 u 8 artículos cada uno. El número total de páginas por año iba de 116 a 201. No obstante, publicar en

una revista nacional seguía estando “mal visto” por diversas personas y organismos, que no comprendían que si un país quiere tener una ciencia fuerte, debe, además de competir en las revistas internacionales importantes, publicar y elevar el nivel de las propias —pocas, pero buenas—, para hacerlas también internacionales.

De 1990 a 1993 el editor-jefe fue Juan A. Ordóñez, de la Universidad Complutense de Madrid (Facultad de Veterinaria). La novedad más destacada de este período fue el inicio de la publicación de números monográficos. Normalmente aparecieron dos números por año, que contenían de 6 a 9 artículos cada uno. El número de páginas por año estaba entre 110 y 133, excepto en 1993, en el que se llegó a 262, con 31 artículos en total, debido a que ese año, además de dos números normales, se publicó el primer número extraordinario de la revista, dedicado a microbiología de los alimentos. Esta reducción en el número de artículos y de páginas se debía a que llegaban menos originales y a que bastantes de los recibidos, aproximadamente el 45%, no eran aceptados. Como se ha dicho, todos los números incluían como mínimo una minirrevisión, que generalmente tenía que pedirse a los autores —ya que la calidad de las que llegaban no siempre era la requerida—. En septiembre de 1992, se publicó el Directorio de socios de la SEM, de 106 páginas y con el mismo formato que la revista.

En 1994 pasó a ocupar el cargo de editor-jefe Ricard Guerrero, de la Universidad de Barcelona (Facultad de Biología). La revista siguió con el mismo aspecto externo y estilo tipográfico que había tenido hasta entonces, pero se introdujeron cambios en la presentación y contenido de los artículos. El primer número se dedicó al XIV Congreso Nacional (Zaragoza, septiembre de 1993). El número de artículos recibidos aumentó considerablemente y, dado que la calidad también aumentó, los números de la revista pasaron a ser más voluminosos. En esta última etapa se incorporaron

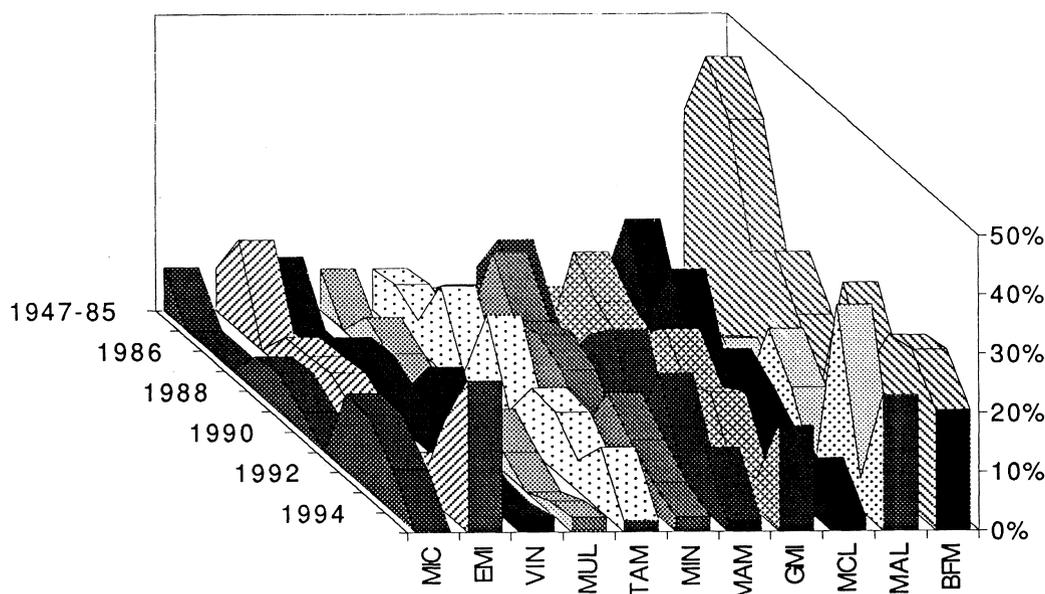


FIG. 2. Porcentaje de artículos publicados, según temática, por la revista de la SEM (*Microbiología Española*, 1947-1984, y *Microbiología SEM*, 1985-1995). Abreviaturas: MIC, Micología; EMI, Ecología microbiana; VIN, Virología e inmunología; MUL, Morfología y ultraestructura; TAM, Taxonomía microbiana; MIN, Microbiología industrial; MAM, Microbiología ambiental; GMI, Genética microbiana; MCL, Microbiología clínica; MAL, Microbiología de los alimentos; BFM, Bioquímica y fisiología microbiana.

revisiones de libros y artículos de opinión. En 1994 se publicaron cuatro números, el primero de ellos doble, con un total de 44 artículos y 462 páginas. En 1995 se han publicado 4 números, con 59 artículos, que ocuparon 532 páginas. Dos de los números de 1995 han sido monográficos: el de marzo, de nuevo sobre microbiología de los alimentos, y el de junio, dedicado al origen y evolución temprana de la vida, escrito íntegramente en inglés. Este último número se ha distribuido en diversas universidades, centros de investigación y bibliotecas norteamericanas, lo que constituye una buena tarjeta de visita de nuestra Sociedad. En el número de septiembre de 1995 (que se entregó al empezar el XV Congreso Nacional), se experimentó por primera vez la publicación abreviada de algunas de las ponencias que iban a presentarse en el congreso. Se recibieron y publicaron 11 ponencias, que se publicaron con 3 ó 4 páginas cada una. (Véase la Tabla 2.)

Tendencias en la revista de la SEM

Desde que en 1947 se inició su publicación, hasta nuestros días, la revista de la SEM ha variado en cuanto a calidad, número de artículos publicados, número de páginas de cada número, lengua predominante en la que se publican los artículos y porcentaje de artículos dedicados a cada una de las especialidades.

El número de artículos publicados en la revista *Microbiología Española* fue en los primeros años de unos 15 por volumen. A partir de 1955, la cantidad de artículos fue aumentando, hasta llegar a 27 en 1963. La media de artículos desde entonces hasta 1974 fue de unos 22 por volumen. A partir de ese año, la revista entró en un período de decadencia y la cantidad de artículos y de páginas también disminuyó.

A partir de 1985, cuando la SEM empezó la nueva revista, el número de artículos aumentó:

desde 1985 a 1987 subió hasta llegar a 20 en un año. Después disminuyó, hasta 13, en 1990. A partir de 1991 la cantidad de artículos volvió a aumentar, hasta alcanzar el máximo absoluto de 59 en 1995.

La cantidad de páginas también ha mostrado variaciones considerables, pero esto se puede atribuir, principalmente, a la diferente extensión que tenían los artículos. Muchos de ellos, aunque con un texto muy corto, presentaban un gran número de tablas y figuras que los acompañaban. El número de tablas y figuras de los primeros volúmenes de la revista (años 50), en relación con la extensión de los textos, era excesivo. Un artículo podía llegar a tener diez tablas y ocho figuras, por ejemplo, con sólo tres o cuatro páginas de texto.

En la Fig. 2 se presenta el porcentaje de artículos publicados por año en la revista *Microbiología SEM*, según las especialidades temáticas. En 1993 se observa un gran pico (un 30% sobre el total de la publicación del año), debido al número extraordinario dedicado a la VIII Reunión Científica de Microbiología de los Alimentos (Cáceres, 1992). En el resto de las especialidades se aprecia una serie de altibajos, los cuales no parecen indicar ninguna tendencia clara. Algunas especialidades, como la microbiología clínica y la morfología, muestran un descenso desde 1990.

En cuanto al porcentaje de artículos escritos en inglés y español, se observa claramente el paso de una situación de predominancia de la lengua castellana (entre 1947 y 1976), a una situación inversa (véase la Fig. 1). El hecho de que los autores escriban los artículos en inglés permite que la revista llegue a un público más amplio. Además, hay más revisores potenciales que pueden evaluar los artículos.

Características actuales de la revista

El aspecto de la revista ha sufrido diversos cambios desde su inicio hasta nuestros días. En sus cuatro primeros años, 1947 a 1951 (en 1948

no aparece ningún número) la portada tiene el árbol luliano del CSIC (véase G. Mendoza, *Microbiología SEM* 11 [3], p. 361). A partir de 1952 la portada muestra el rostro de perfil del Dr. Ferrán (uno de los dos coeditores era el Instituto del CSIC de ese nombre), y esa figura se mantendría hasta el fin de la primera revista, en 1986. La cubierta era de cartulina de color crudo y tenía un tamaño de 17 × 24 cm. En 1982 cambió la presentación: la cubierta se hizo algo más dura, plastificada y de color amarillo, con distinta tipografía; el papel mejoró; el perfil del Dr. Ferrán se mantuvo, aunque algo desplazado hacia abajo. El tamaño siguió siendo el mismo. En la Fig. 3 se presenta la portada del último número de *Microbiología Española* (noviembre de 1986) publicado solamente por el Instituto «Jaime Ferrán».

En el año 1985, cuando apareció *Microbiología SEM*, se hizo un cambio más importante. Desapareció la imagen del Dr. Ferrán de la portada y cambió su presentación, que pasó a ser de color azul turquesa y más moderna. El tamaño aumentó (19 × 26 cm). Desde el primer número de *Microbiología SEM* la portada no ha cambiado, y es como la del ejemplar que el lector tiene en las manos.

Desde los comienzos de *Microbiología SEM*, se seleccionaban los artículos, y se corregían para que tuviesen un estilo lo más parecido a las demás revistas de microbiología existentes. El número de tablas y figuras de cada artículo también cambió. Se redujo al mínimo el número de tablas que no cupiesen en una página entera, y también se redujo el número de figuras.

A partir de 1994, el cambio más destacado ha sido la preparación completa de los artículos en la misma redacción de la revista, mediante correcciones sucesivas de los originales aceptados. Se realiza la corrección de textos, la maquetación y “edición” de los mismos. Anteriormente, la imprenta componía los textos, los maquetaba y corregía repetidamente los artículos, lo cual introducía multitud de errores y retardaba enormemente el proceso. Ello era debido tanto a la dificultad del

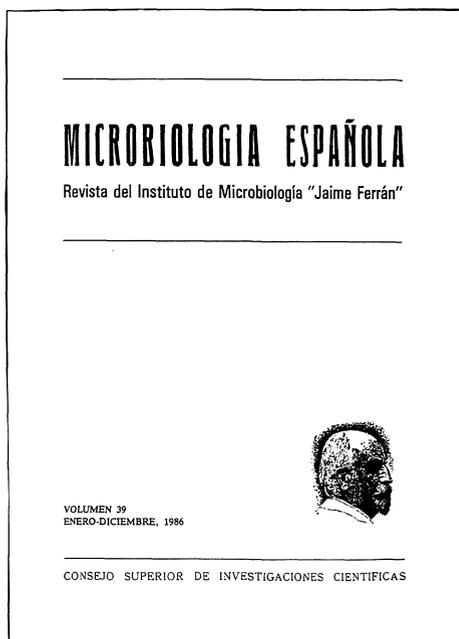


FIG. 3. Portada del último número de *Microbiología Española* (1986).

trabajo (temas microbiológicos especializados) como a la dificultad de la lengua de muchos de ellos (el inglés, al cual no están acostumbradas la mayor parte de las imprentas españolas). Actualmente los artículos se llevan acabados a la editorial, a la que se entrega los disquetes de ordenador con los artículos ya maquetados para su impresión inmediata. Esto aumenta significativamente el trabajo de la redacción de la revista, pero evita los continuos errores que introducía la imprenta en los originales y en las sucesivas pruebas corregidas. El formato externo no se cambió, pero sí se introdujeron nuevos tipos de artículos. Muchos originales son reelaborados en la redacción, tanto en su forma como en su contenido, dando una extensión más homogénea a los artículos, disminuyendo el número de figuras y tablas y simplificando unas y otras al máximo, al estilo de las revistas internacionales. También se tiene en cuenta la distribución de las tablas y figuras a lo largo del artículo. Se pretende, y a veces hasta se consigue, que los artículos tengan un aspecto que invite a su lectura,

incluso por las personas no directamente relacionadas con el tema del trabajo.

Para aprovechar mejor el espacio de la revista, durante 1994 y 1995 se hicieron diversas pruebas de composición a dos columnas. El ensayo resultó satisfactorio, por lo que se decidió que, a partir de 1996, se publicaría así todo el número. Esto permite ahorrar hasta un 20% de papel. Esto es especialmente importante, ya que la revista tiene una tirada de unos 2400 ejemplares. Esta cifra puede parecer pequeña pero, si prescindimos de las revistas de la American Society for Microbiology (EE. UU.), o de la Society for General Microbiology (Gran Bretaña), es en realidad una de las más altas de las publicaciones de microbiología del mundo. Algunas revistas de gran prestigio (y elevado precio, por ser de editoriales privadas) en nuestro campo tienen unas tiradas muy inferiores a la de nuestra.

En un futuro próximo se espera que *Microbiología SEM* siga creciendo en el número y calidad de los artículos, acercándose todo lo posible a los niveles de las revistas internacionales más conocidas.

Agradecimientos

Queremos dar las gracias a Rubens López, Juan A. Ordóñez y Ricard Guerrero por la ayuda prestada y por sus consejos a la hora de escribir este artículo. A Concepción García Mendoza, autora de la "breve historia de la SEM" que ha servido de hilo conductor de nuestro relato. A Dimas Fernández Galiano, que donó bastantes números de *Microbiología Española* a la redacción de la revista. A Juan A. Leal y Begonia Gómez Miranda, buenos conocedores del desarrollo y vicisitudes de la revista. Y, finalmente, a Sara I. Pérez Prieto, que ha completado los datos que nos faltaban en la Tabla 1. También agradecemos las diversas sugerencias que nos hicieron muchos socios de la SEM durante el XV Congreso Nacional de Microbiología, que han servido para precisar algunos de los temas tratados en este artículo.

Colecciones de la revista **MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA**

Se ruega a las personas o instituciones que posean colecciones completas, o bastante completas, de la revista *Microbiología Española*, publicada desde 1947 hasta 1986, que se pongan en contacto con la redacción de *Microbiología SEM*. Es nuestra intención confeccionar un listado para su posible consulta por las personas interesadas en la historia de nuestra Sociedad, o en el desarrollo de la microbiología en España durante los últimos cincuenta años.

Las personas que tengan alguna información sobre el tema pueden dirigirse a:

Ana Fernández de Castillo
Revista *Microbiología SEM*

Apartado 16009
08080 Barcelona

Tel.: +34-3-4482373. Fax: +34-3-3341079. E-mail: guerrero@bcn.servicom.es

Trends in Microbial Ecology

Proceedings of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology (ISME-6)

Edited by R. Guerrero and C. Pedrós-Alió

Spanish Society for Microbiology, 1993. Hardcover (ISBN 84-604-7996-X), xxii + 718 pp.

Provides the most recent advances in Microbial Ecology covering many fields of interest. This book contains 143 contributions from Invited Lectures and Symposia presented at the ISME-6

“... As a guide to most of the active research centres, and to who was doing what in 1992, this volume is a very useful compendium. But unlike many symposium volumes, this book is more than just that. Evidently a great deal of thought and care went into the organization of both the meeting and this summary to ensure a well-balanced outcome. The result is a most useful introduction to almost every aspect of Microbial Ecology for final-year undergraduates, research students, and newly recruited research workers in the field. And old hands too are bound to find much that is new and fascinating in this treasure trove of delights.”

D. Lloyd, University of Wales, Cardiff, UK
Microbiology Europe, vol. 4 No. 1 January/February 1996

Contents: Introduction; Part A. Physiological Ecology; Part B. Interactions among populations; Part C. Commun. Ecology; Part D. Systematics and Evolution of Microorg.; Part E. Applied Microbial Ecology

Price: PTA 8,400 (US\$ 67.00)

For information: **Revista *Microbiología SEM***. Apartado 16009. E-08080 Barcelona. Spain

Tel.: +34-3-4482373. Fax: +34-3-3341079. E-mail: guerrero@bcn.servicom.es

Language, gender and science*

Evelyn Fox Keller

*Program in Science Technology and Society, Massachusetts Institute of Technology,
Cambridge, Massachusetts, USA*

Scientists like to think of themselves as the ultimate experts on the nature of science—on the meaning of objectivity, the basis of scientific claims, the status of science in society, i.e., on how science works. But over the last 30–40 years, a not so quiet revolution has occurred in our understanding of scientific activity, putting into question some of scientists' most cherished beliefs about their enterprise. In the midst of this revolution, feminist scholars introduced a particular set of questions about the influence of gender ideologies on the history of science. It is my purpose in this lecture to review one particular line of questioning that has led me from concerns about gender and science to a problem of increasing interest to historians and philosophers of science, namely, that of the role of language in scientific inquiry.

As biologists use the term, "gender" is synonymous with sex, a biological category. But for feminists, "gender" is a term introduced in order to "contest the naturalization of sexual difference". As feminists use the term, "gender" is a social,

rather than a biological, category. It inheres not in the bodies of individual men and women, but in the cultural norms of the societies in which biological males and females grow into men and women. "Gender", here, refers to popular beliefs about the meaning of "masculine" and "feminine". The question for feminists is, how do such beliefs matter? Most obviously, they effect how girls and boys develop in a particular society. But such beliefs also have a force on how we see the world beyond men and women. By the mid 1970's, feminists had come to see gender ideology as a cultural force of far greater potency than the older concept of "stereotype"; they came to see that beliefs about gender act as silent organizers of our social and natural worlds—even of those worlds that women rarely enter. Just think for a moment how deeply marked by gender are such familiar dichotomies as public/private; rational/intuitive; thinking/feeling; active/passive; objective/subjective; science/art; order/disorder, and at the same time, think about how pervasively the same di-

* Abridged version of a lecture given in Barcelona on November 23, 1995, under the auspices of the Department of Culture of the Autonomous Government of Catalonia. (Edited by Marta Causa, School of Biology of the University of Barcelona.)

Correspondence to: Evelyn Fox Keller. Program in Science Technology and Society. Massachusetts Institute of Technology. 77 Massachusetts Ave. Cambridge, MA 02139. USA. Tel.: +1-617-2538722. Fax: +1-617-2588634.

chotomies work to structure our world. I call this marking of the non-sexual world—a marking produced by cultural beliefs, not by genes—the symbolic work of gender.

The focus of "gender and science" was not on the presence or absence of women in science, but on the ways in which traditional images of gender may (however unwittingly) have shaped the scientific enterprise itself, to ask about cognitive, emotional, and human resources lost to science by virtue of their being labelled as "feminine," and on those grounds alone, excluded. I might stress that the intent behind this inquiry (at least my intent) was from the beginning a friendly one—friendly both to science and to women. My aim was to liberate both science and women from the shackles of a debilitating ideology of gender. The first job, of course, was to demonstrate how certain categories, rather basic to science, have historically been delineated by sometimes implicit and often explicit resource to gender. The next step, was to ask how these core categories might be differently delineated without recourse to gender, or by recourse to different gender ideologies. On an abstract level, this was also not very difficult, and I refer those who are interested to my book on this subject. But the real challenge was to show how any of this mattered to the doing of science. Can the metaphors we invoke to describe our venture, to represent either the objects of our study, or our very modes of analysis, have an effect on the knowledge we obtain?

Is not the precision of scientific language, its capacity to directly speak the facts of nature, precisely what distinguishes it from the vagaries and imprecision of ordinary language? When one looks closely, one sees that metaphor is not restricted to ordinary language; rather, it pervades all language, including scientific language. Simple logic, however, suggests that words are far too limited a resource, in whatever combinations, to permit a faithful representation of even our own

experience, much less of the vast domain of natural phenomena. The metaphor of science as "mirror of nature" may be useful to scientists, but it cannot be taken to be correct. Every experimental scientist knows is what an awful lot of work it takes to get nature to fit the laws of nature.

But even if we were to give up the hope of a pure, uni-vocal language, of a language that merely reflects what we find, a question still remains. It remains to be shown how the ways in which we as scientists talk can shape what we actually do, and hence what we can hope to find. So, in the rest of my talk I want to give some relatively simple examples that take the discussion of metaphor more directly into the scientific realm to try show how metaphor—gendered or otherwise—can carry our cultural values into the practice of science—how, e.g., it can serve to motivate the doing of particular experiments or the construction of particular technical devices. The first example is particularly simple, and it has directly to do with gender: It concerns the ways in which biologists have traditionally described, and in consonance with their descriptions, have studied, the process of fertilization.

Traditionally, the sperm has been described as active, and the egg as passive. The experimental work provided chemical and mechanical accounts for the motility of the sperm; for their adhesion to the cell membrane, and for their ability to effect membrane fusion. The activity of the egg, assumed non-existent, required no mechanism, and hence was not sought. In contemporary textbooks, fertilization is more likely to be cast in the language of equal opportunity with scientists both seeking and finding mechanisms in which the egg too must be said to be active. Can it be merely an accident that the shift in what counts as a scientifically effective metaphor coincides so closely in time with the shift in what counts as a socially effective metaphor? I suggest that this story illustrates just the ways in which language can shape

our thinking and acting. It frames our attention, our perception, and the fields in which can envision ways to move.

My next example concerns not the relation between egg and sperm (or at least not directly), but the relations between genetics and embryology during the inter-war period, and what I call the "Discourse of Gene Action." The discourse of gene action attributes to the gene a kind of omnipotence—not only causal primacy, but autonomy, and perhaps especially, agency. Development is controlled by the action of genes. Everything else in the cell is said to be mere surplus.

Geneticists may have been short on evidence—they knew nothing about what a gene was, much less about how it "acted"—, but they had an immensely productive way of talking that enabled them to get on with their work without worrying about what they did not know, that framed their questions and guided their choices, both of experiments worth doing and of organism worth studying. But it cost a 30 year long eclipse of the fundamental problem of embryology.

Over the last 15–20 years, that problem has returned to center stage. And with its return, has come a change in discourse. As we have learned more about how genes actually work in complex organisms, talk about "gene action" has subtly transmuted into talk about "gene activation," with the locus of control shifting from genes themselves to the complex biochemical dynamics (protein-protein and protein-nucleic acid interactions) of cells in constant communication with each other. *Scientific American* glosses this shift as the "news" that "organisms control most of their genes."

New metaphors abound. Fred Nijhout has even suggested that it would be better to think of genes "as suppliers of the material needs of development," as "passive sources of materials upon which a cell can draw." Nijhout's proposal may be extreme. But there is no question that a new way of

talking is in the air, in keeping with the emergence of a new biology: Molecular biologists seem to have "discovered the organism".

As long as one believed that the genetic message of the zygote produces the organism, that the cytoplasm is merely a passive substrate, why would one go to all that trouble? By the 1970's, however, the discourse of gene action had already begun to lose its hold. Let me very briefly sketch some of the many different kinds of changes, above and beyond the obvious technical progress, that I think contributed to its decline.

As perceived by the embryologist, the nucleus is very small, but as perceived by the geneticist, it virtually fills the entire cell. In this sketch, the nucleus and cytoplasm are employed as tropes for the two disciplines—each lends to their object of study a size in direct proportion to their perceived self-importance. In like fashion, the two disciplines lent to each object, nucleus and cytoplasm, their own self-attributes of agency, autonomy, and power.

Many of the debates about the relative importance of nucleus and cytoplasm in inheritance also reflect older debates about the relative importance (or activity) of maternal and paternal contributions to reproduction, where the overwhelming historical tendency has been to attribute activity and motive force to the male contribution, while relegating the female contribution to the role of passive, facilitating environment.

By the 70's, the entire world had changed, and so did the ways that seem natural to talk. Embryology was no longer a rival, and gender equity was all the rage. And overlain on and interwoven with these external changes were, of course, the extraordinary developments internal to molecular biology, especially the techniques of recombinant DNA.

Here, in this story, unlike the first story I told, gender figures in a relatively minor role. In other stories I might tell about language and science, it

would figure even less saliently, in some, probably not at all, almost 20 years ago. When I and my colleagues in feminist theory first began to think about gender and science, our aim was to bring into the open a silent and occluded dimension of the history and philosophy of science. It was not our assumption that gender was the critical factor in either social or scientific development, only that it was a widely overlooked factor that often proves surprisingly important. Thinking about gender provided an entire generation of feminist scholars with a new analytic perspective, raising new questions, enriching older ones. For many, it led us into new directions, into thinking about other kinds of issues. For me, it led to thinking about language, hence my suggested title, from gender and science to language and science.

But before I leave the subject of gender completely behind, let me turn very briefly to a question that I'm sure is in the back of at least some of your minds. What about the actual women? Many people have commented on the relatively large number of women in Developmental Biology, Nusslein-Volhard being only one. Furthermore, if one looks at the maternal effect mutants identified over the years, especially in the early years, one sees that more than half of them were identified by women. Why should this be so? Could it be (as I'm sure some of you expect me to say) that women are naturally drawn to the study of embryology? That they are natural allies of the egg? Since I seem to be ending with a position statement, let me say that I don't think so, any more than I believe that women have a natural affinity for nature.

Of course, some women may be so drawn, but probably more as a consequence of the cultural insistence on equating women with reproduction, or on equating women with nature, and less because of their actual sex. Others of course will be

propelled in just the opposite direction, in, as it were, natural rebellion against the coercion of cultural stereotypes. My guess is that the large number of women in Developmental Biology we see today has a lot to do with timing—i.e., with the fact that the increase in number of women entering biology coincided in time with the rise of Developmental Biology as a field. Some of it has to do with the success of Nusslein-Volhard and the women she trained. As to the women who labored over the identification of maternal effect mutants in the earlier part of the century—well, as I've said, that was hard often back-breaking work, and widely assumed to be unrewarding. What more natural job to assign to women?

Several books by Evelyn Fox Keller

1. *A Feeling for the Organism: The Life and Work of Barbara McClintock*. W. H. Freeman, 1983 (2nd ed., 1993). Published in Spanish, French, Dutch, Italian, and Japanese.
2. *Reflections on Gender and Science*. Yale University Press, New Haven, 1985. Introduction published in *The Boston Review*, December 1984. Published in German, Italian, Japanese, Dutch and Finnish.
3. *Women, Science and the Body*. Co-edited by Mary Jacobus and Sally Shuttleworth, Methuen (Routledge), New York, NY, 1989.
4. *Conflicts in Feminism*. Co-edited by Marianne Hirsch, Routledge, New York, NY, 1990.
5. *Keywords in Evolutionary Biology*. Co-edited by Elisabeth Lloyd, Harvard University Press, Cambridge, MA, 1992.
6. *Secrets of Life, Secrets of Death: Essays on Language, Gender, and Science*. Routledge, New York, NY, 1992.
7. *Refiguring Life: Metaphors of Twentieth Century Biology*. Columbia University Press, New York, NY, 1995.
8. *Feminism and Science*. Co-edited by Helen Longino, Oxford University Press, forthcoming.

Maneras de hacer ciencia*

Ricard Guerrero

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

“¿A cuánto, el descubrimiento?”

Una mañana del otoño de 1919, aparecieron por el Laboratorio Municipal de Barcelona, situado, como hoy, en los aledaños del Parque de la Ciudadela, tres respetables y muy serios señores que se dieron a conocer como concejales del Ayuntamiento. Pertenecían, según dijeron, a la Comisión de Higiene y Sanidad. Preguntaron por el director, Ramon Turró, y, como no había llegado todavía, les atendió un joven médico del Laboratorio, Pere Domingo. Los visitantes se presentaron y hablaron de cosas triviales, hasta que uno de ellos se disparó así: “El motivo de nuestra visita es hasta cierto punto oficial: destinada a saber qué cosas han descubierto ustedes con la subvención destinada a realizar investigaciones concedida por el Ayuntamiento.” ... “Lo que queremos es que nos diga, en la forma más concreta posible, qué cosas han descubierto aquí, con el dinero presupuestado, al objeto de que nosotros podamos saber cuánto nos ha costado el descubrimiento en cuestión, y ver si vale la pena o no seguir en ello.”

Como el joven médico consideró que la cosa se estaba poniendo fea, mudó su indignación en ironía

para decir: “Mire, señor; la verdad es que todo eso de los descubrimientos es algo muy reservado que sólo el doctor Turró conoce. Es él quien los guarda bajo llave a medida que se van produciendo... Pero, aquí, todos los días hacemos descubrimientos muy importantes. Hoy mismo estamos a punto de terminar uno y si ustedes tienen paciencia y se esperan un poco, quizá tengan la oportunidad de ser los primeros en contemplarlo...”

Los ediles se sentaron obedientemente, pero se quedaron sin ver el descubrimiento del día. A los pocos minutos llegó don Ramon, se puso una bata, cosa rara en él, y finalmente resolvió la situación..., llamando por teléfono al alcalde.

Aunque pueda sorprender, esta narración sigue fielmente —incluyendo el tono irónico y lenguaje coloquial— la descripción que hace de la curiosa visita uno de sus protagonistas, el doctor Pere Domingo. Ocurrió en un centro de gran prestigio de la época (el Laboratorio Municipal de Barcelona), y a investigadores de reconocida capacidad de trabajo y organización (Domingo y Turró), pero refleja el sentir de muchas personas, desde políticos a gente de la calle, sobre el retorno económico

* Resumen de un artículo aparecido en la revista *Quark. Ciencia, Medicina, Comunicación y Cultura*, Barcelona, enero-marzo 1996, 2, 6–15.

inmediato que la investigación debe aportar a la sociedad que la mantiene.

El proceso de adquisición de conocimientos científicos es denominado, casi por antonomasia, investigación. Se suele dividir el campo y objetivos de esta investigación en dos aspectos, a veces aparentemente contrapuestos: ciencia pura o básica y ciencia práctica o aplicada. Esta separación existe solamente cuando se trata de analizar los factores intencionales que intervienen en su iniciación y desarrollo, pero al llegar a su conclusión cada conocimiento nuevo puede tener tanto un aspecto básico como una proyección práctica. Decía Pasteur que no existe ciencia aplicada sino aplicación de la ciencia, y con su trabajo investigador corroboró exhaustivamente su afirmación: trabajando siempre sobre aspectos aplicados aportó ideas totalmente nuevas al conocimiento de los microorganismos y de la vida en general.

La investigación “pura”, por otra parte, pasa a la aplicación cuando resulta de utilidad para un sector amplio de la sociedad, o para un país o grupo de poder en no importa qué circunstancias. Disponemos de muchos ejemplos que confirman esta idea, desde el descubrimiento y uso de los antibióticos, para salvar vidas, hasta la preparación de ingenios nucleares o armas bacteriológicas y víricas con intención de matar. La utilización de los descubrimientos no está bajo el control de los científicos que contribuyeron a desarrollarlos.

Un gran desconocido: Ludwick Fleck

“Sin duda, la ciencia ha pasado a estar al servicio de la política y de la industria, en detrimento de su misión cultural. En casi todos los países del mundo, políticos e industriales tienen a los científicos a su disposición, decidiendo a menudo sobre su trabajo y a veces incluso sobre sus creencias y convicciones. Esto ocurre porque algunas actividades científicas modernas requieren grandes

recursos económicos. Un factor aún más peligroso es el oportunismo cada vez mayor de muchos científicos, principalmente jóvenes, para los cuales la ciencia es sólo una manera moderna de acceder a un trabajo rentable.” Con este comentario sobre el estado de la ciencia inicia Ludwick Fleck un artículo publicado en *Science* en 1960. Un comentario que, treinta y cinco años más tarde, resulta tremendamente actual, como lo es su afirmación —en el mismo artículo— de que la “verdad” y la “objetividad” son ideales sagrados, pero demasiado ingenuos, al tiempo que complicados y desprovistos de grandeza para algunos científicos. Lo que en ciencia se entiende como “verdad”, se construye a partir de las técnicas de investigación, de la interpretación de unos resultados, y de unos factores circunstanciales que apoyan lo que el investigador proclama como cierto.

Muchos lectores se preguntarán, ¿quién es este Fleck? Ludwick Fleck nació en 1896 en la ciudad polaca de Lwów, de la región de Galizia. Estudió medicina y había adquirido, además, una sólida formación general. Entre los años de la primera y la segunda guerra mundial pudo desarrollar y exponer su capacidad analítica en un ambiente especialmente receptivo a la cultura, al debate intelectual y al pensamiento. En Lwów, donde ejercía como médico, en lo que hoy diríamos una especialización en serología y microbiología, formó parte de los círculos intelectuales que se desarrollaban en medio de un gran liberalismo de ideas, abierto a las discusiones y con un carácter marcadamente interdisciplinario. Resultado de su labor como investigador, Fleck había publicado hasta 1939 treinta y siete trabajos científicos, especialmente sobre el diagnóstico de diversas enfermedades bacterianas, el tifus exantemático y la sífilis entre ellas, y la capacidad de aglutinación de determinados leucocitos. En 1941 fue separado de sus puestos de trabajo e internado en el gueto de su ciudad. En febrero de 1943 se le trasladó a Auschwitz y en enero siguiente a Buchenwald,

donde fue obligado a producir vacunas contra el tifus. Tanto él como su mujer y su hijo sobrevivieron en el campo de concentración. Todos los demás familiares perecieron durante la guerra. Trabajó en Polonia hasta 1957, y en ese año, ya gravemente enfermo, se trasladó a Israel, donde murió en 1961.

El colectivo en la investigación científica

Dentro de las numerosas obras dedicadas a la filosofía de la ciencia y al análisis de sus teorías durante este siglo, algunas constituyen trabajos clásicos de obligada referencia. Entre ellos cabe destacar la extensa contribución de Karl Popper, y muy especialmente su libro seminal *La lógica de la investigación científica*, publicado en Viena en el otoño de 1934 (con fecha de 1935).

No tuvo, sin embargo, el mismo reconocimiento una obra que merece similar aprecio. Se trata de *La génesis y el desarrollo de un hecho científico* de Fleck. Sólo tardíamente se ha asistido a la recuperación de este trabajo, merecedor de figurar entre los estudios clásicos de teoría de la ciencia. Está publicado en español por Alianza Editorial, 1986.

El libro, una extensa monografía, fue publicado en alemán en 1935, en Basilea. Las ideas principales sobre teoría de la ciencia se basaban en dos artículos de tema epistemológico publicados en 1927 y 1929, mucho antes de que Fleck pudiera leer la obra de Popper. El libro trata dos grupos de temas: el estudio de un aspecto clásico de la historia de la medicina, el desarrollo del concepto de sífilis, y las consecuencias para la teoría del conocimiento que tiene ese estudio. Cuatro largos capítulos en total.

La obra no tuvo la repercusión que merecía por los condicionantes de la época. Su autor era un judío polaco y, aunque lo escribió en alemán —lengua que dominaba como la propia— el libro vio la luz cuando se iniciaba la expansión del

nazismo. Después de la guerra, la lengua científica internacional pasó a ser, casi exclusivamente, el inglés. En 1962, el año siguiente al que murió Fleck, se publicaba en Chicago un libro que vendría a recordar su obra. Se trataba de *La estructura de las revoluciones científicas* y su autor, Thomas S. Kuhn, menciona la influencia que el libro de Fleck había ejercido sobre su pensamiento. El gran interés que despertó la obra de Kuhn, también en la línea de análisis del desarrollo científico, atrajo mucho después un pálido reconocimiento de la obra de Fleck que desde entonces ha sido objeto de estudio, especialmente por parte del grupo de filosofía de la ciencia de la Boston University.

La conexión de la medicina con los aspectos teórico-experimentales hace que Fleck dirija su atención al carácter cooperativo e interdisciplinario de la investigación, algo contrario a la concepción tradicional, que se ocupaba sólo del realizador de la investigación, del innovador genial. Fleck, destaca la cara social de la investigación científica, el fruto de un colectivo. De especial importancia es su análisis de la estructura interna de cada disciplina, y el reconocimiento en la investigación médica de la génesis de los criterios específicos de cada época, que son los que en buena medida configuran la orientación de la investigación.

Fleck desarrolla *La génesis y el desarrollo de un hecho científico* sobre un caso de la historia de la medicina, el concepto de sífilis, que ha quedado establecido a través de un largo período, que finaliza en el medievo. El trabajo colectivo de Wasserman, que condujo a los primeros procedimientos diagnósticos, demuestra por una parte la estructura colectiva del trabajo y por otra la relación de éste con factores externos a la ciencia.

El médico polaco rechaza la teoría del conocimiento dominante porque está preñada de individualismo. Para Fleck la investigación médica se realiza en grupo; se apoya en lo realizado previamente por otros. Concibe la ciencia como un proceso esencialmente colectivo. Acuña los con-

ceptos de “colectivo de pensamiento”, que es la unidad social de la comunidad de científicos de una disciplina y de “estilo de pensamiento”, que son las presuposiciones acordes con una idea sobre las que el colectivo construye su edificio teórico. Los hábitos propios del estilo de pensamiento influyen en la constatación de las características de lo observado, lo que lleva a la conclusión de que la observación está mediatizada por el estilo y el colectivo de pensamiento. En su concepción Fleck se vale de los postulados de la psicología gestáltica, que comparte con Popper, en su combate del neopositivismo a ultranza. Lo que es, no lo es sin más; la praxis, la experiencia, está influyendo en la percepción y en la observación.

Dos cosas que demuestra Fleck son el carácter colectivo de la investigación (médica, en su caso) y la dependencia de la ciencia de factores externos a ella. En el caso de la sífilis, se daba una presión social que unía una idea precientífica a unos componentes éticos. El resultado fue un potencial investigador en un determinado momento dirigido hacia ese campo.

¿Qué hay en la contribución de Fleck para que se la considere de tal importancia? La introducción de elementos de reflexión, el reconocimiento de la influencia de gran cantidad de factores externos e internos en la concepción científica, en la elección del objeto de investigación, en la interpretación de los resultados, en la atribución de éstos. En oponer colectividad a individualidad. En reconocer, en fin, los cambios que se producen en la hipótesis de partida a través de los resultados parciales, en el valor de los ensayos-errores que se van introduciendo a lo largo del proceso investigador.

Ciencia y competencia

Durante siglos, la mayoría de descubrimientos científicos fueron el resultado del trabajo de observación y experimentación de una sola persona,

actuando de manera aislada. Esa persona solía ser rica, o tenía una manera distinta de ganarse la vida, lo que le permitía dedicarse a la investigación y despreocuparse de actividades rentables de sostenimiento. Leonardo se ofrecía a sus patronos potenciales no como artista ni investigador, sino como hábil constructor de máquinas de guerra y sistemas inexpugnables de defensa. Leeuwenhoek no era rico, pero tenía un negocio de paños y una sinecura en el ayuntamiento de su ciudad, Delft, lo que le permitía tener la mayor parte del tiempo libre.

Hoy en día, en cambio, los investigadores viven de su trabajo, y realmente cuestan caros a la sociedad. Por otra parte, la investigación que produce los resultados más espectaculares suele ser obra de un grupo de personas que trabajan en colaboración o incluso de un conjunto más o menos numeroso de grupos que pueden desarrollar su investigación en centros geográficamente muy alejados. Ello responde principalmente a motivos prácticos. Por una parte, muchos trabajos de investigación avanzada son multidisciplinares; implican la participación de especialistas en diferentes campos. Además, las características de algunos programas de investigación, como la obtención de nuevos fármacos o la determinación del genoma de un organismo, aunque requieren muchas horas de trabajo experimental, se realizan en una especie de carrera contra reloj. La participación de muchas personas, e incluso de muchos grupos, en un mismo proyecto permite obtener resultados en menos tiempo.

Otro aspecto que ha cambiado es el lugar donde se realiza el trabajo científico. En muchos casos, el laboratorio ha pasado de ser un rincón apartado del propio hogar, universidad u hospital, a situarse en unas instalaciones presentables, y contar, a veces, con las últimas novedades tecnológicas. El científico de finales del siglo xx suele llevar a cabo su labor investigadora en un departamento universitario, en un centro público de investigación o en

una empresa. En cuanto a la financiación de los proyectos, excepto en el caso de la empresa privada, suele basarse en subvenciones, cuya concesión dependerá no sólo del interés del proyecto a realizar sino también del prestigio del investigador, del grupo al que está adscrito y del centro donde se hace el trabajo.

En la sociedad competitiva de finales del siglo xx, buscando una manera de “medir” la excelencia del trabajo de un científico o de un grupo de trabajo, han surgido los llamados “factores de impacto” y los “índices de citación”, que pretenden ser medidas objetivas del éxito de la investigación. El factor de impacto determina la importancia de una publicación científica e, indirectamente, de los artículos que publica, ya que se calcula dividiendo el número de citas que genera en un período de dos años por el número de artículos publicados durante el mismo período. Sin embargo, son muchas las críticas que ha ocasionado este sistema. La sección de correspondencia de la revista *Nature* ha sido un foro donde este año se ha discutido lo adecuado —o inadecuado, según la opinión— de juzgar la labor de un científico o de un grupo investigador solamente a partir del factor de impacto de las revistas donde publican el resultado de sus trabajos. Como advierten algunos autores, el hecho de que un artículo sea citado repetidamente garantiza que ha logrado una mayor difusión, pero no necesariamente que el trabajo descrito sea de máxima calidad. La ciencia no deja de ser un producto de la actividad humana y, como tal, se somete a las influencias del mercado.

El respaldo de un centro también es un factor de peso a la hora de juzgar las solicitudes de subvenciones y los resultados de un proyecto. Por el contrario, la comunidad científica desconfía —y muchas veces tiene razón de hacerlo así— de la investigación realizada sin la supervisión de una entidad. Probablemente ésta sea la causa de que la figura del investigador solitario sea en nuestros días tan poco frecuente. Lo cual no significa que

no se dé. James E. Lovelock, químico atmosférico británico, es un ejemplo de científico independiente, un profesional “liberal” de la ciencia, que se dedica a investigar sobre lo que a él le gusta e interesa, no sobre los proyectos que puedan aportar más subvenciones a sus realizadores. En un artículo publicado en *New Scientist* en 1979, Lovelock describe su trayectoria científica desde la época de formación hasta que decidió desligarse de vínculos con instituciones. En el mismo artículo, y a partir de su propia experiencia, da una serie de consejos a las personas que, como él, deseen seguir la vía de la independencia. Entre otras afirmaciones, destaca la inutilidad de solicitar subvenciones o de presentar propuestas de trabajo por iniciativa propia. El científico independiente ha de dejar que le pidan los proyectos, no pedirlos él; si nadie lo hace —afirma Lovelock— significa que su carrera científica debe tomar otro rumbo.

Ciencia y sociedad

Hay un tipo de libertad que no va ligado a la práctica de la ciencia en un lugar u otro, y es la independencia del pensamiento y de la actitud del investigador. Fleming decía que “No son los salones de mármol los que proporcionan la grandeza intelectual, sino el espíritu y el cerebro del trabajador”. Este aspecto ha sido la base del discurso pronunciado por Sir Michael Atiyah, matemático británico presidente de la Royal Society de Londres de 1991 a 1995, al término de su mandato al frente de dicha entidad. Atiyah hizo un llamamiento a los científicos, pidiéndoles que sean críticos con el sistema siempre que lo consideren necesario. Sólo así se recuperará la confianza de un público que acusa a la comunidad científica de muchos de los males que aquejan a nuestras sociedades actuales. El propio Atiyah lanza la primera piedra al expresar su preocupación por la posición del gobierno británico frente a problemas como el ar-

mamento internacional o el destino de los fondos destinados a investigación.

También de Gran Bretaña, nos llega una profunda reflexión sobre la situación actual de la ciencia y de la comunicación científica. Es su autor John Maddox, que ha dejado recientemente la dirección de *Nature*, como ya anunció hace meses. El comentario del 30 de noviembre y el último y extenso editorial que Maddox ha escrito para dicha revista, publicado en el número del 7 de diciembre de 1995, son una exposición de su pensamiento sobre los peligros actuales que acechan a la comunidad científica y a sus relaciones con la sociedad. Algo que ya avanzó en la conferencia que pronunció en el congreso de comunicación científica celebrado en Barcelona en julio de 1995. Maddox, como Atiyah, se muestra preocupado por la falta de confianza que la comunidad científica inspira. Resulta un tanto paradójico que se dé esa desconfianza hacia el investigador y descubridor precisamente al terminar un siglo que ha sido testigo de los mayores avances tecnológicos de la historia de la humanidad, y a lo largo del cual se han mejorado notablemente las condiciones de vida. Las raíces de ese descrédito pueden surgir del propio desarrollo científico, que creó, sin pretenderlo, exageradas expectativas. No siempre se consigue la aplicación práctica de los descubrimientos; el fracaso puede responder no sólo a problemas tecnológicos, sino también a problemas sociales. Maddox opina que otra causa de la desconfianza hacia la ciencia parte del temor a los cambios que implica toda innovación. Finalmente, la aceptación de determinadas teorías, como la evolución, implica para algunas personas un duro ataque a la “dignidad” del ser humano. Y los propios avances tecnológicos contribuyen al derrumbamiento de algunas teorías que se daban por ciertas, lo cual crea desconcierto entre el público. Maddox cree que hay que evitar el excesivo opti-

mismo en relación a los descubrimientos tecnológicos. Para ello, la ciencia experimental y la tecnología tienen que apoyarse en otros campos del conocimiento, como las ciencias sociales. El público en general ha de comprender que el investigador no está lanzando un reto a las creencias de los ciudadanos, sean o no éstas religiosas. El desarrollo científico puede llegar a explicar fenómenos antes inexplicables, o que se creía tenían una causa diferente. Y eso no ha de procurar incomodidad ni desconfianza, sino más bien lo contrario. Hay que aceptar las explicaciones que la ciencia ofrece en cada momento, pero siempre bajo condición de que se hace “mientras no se demuestre lo contrario”. En esa declaración de humildad está la grandeza de la ciencia.

Las revoluciones científicas, los cambios de “estilo de pensamiento” (Fleck), o de “paradigma” (Kuhn), adolecen de una inicial confusión, entre otras cosas, porque son consideradas desviaciones o herejías de la ciencia anterior establecida. Pero no debe extrañarnos. La ciencia es la única ideología que permite —incluso obliga— a sus seguidores a criticar —y desacreditar, si pueden— a los líderes y fundadores. Las nuevas ciencias, en general, suelen tener dificultades para demostrar la conexión existente entre su teoría y los hechos u observaciones que las hicieron alumbrar. Esta situación no difiere de lo que ha sucedido con otras teorías científicas novedosas. Así ocurrió también con la “hipótesis” de la evolución por medio de la selección natural, o con la “hipótesis” microbiana de la enfermedad. Darwin y Pasteur tuvieron que enfrentarse con gran oposición, tratar de demostrar que sus ideas se conformaban perfectamente con las observaciones disponibles, justificar los nuevos descubrimientos que se iban haciendo, explicar en fin cualquier dato previo o contemporáneo con más obligaciones demostrativas que las ideas contrarias imperantes.

Revisión de libros

Microbial Diversity and Ecosystem Function

D. Allsopp, R. R. Colwell,

D. L. Hawksworth (ed.)

CAB International, Oxon, 1995. 482 pp.
ISBN 0-85198-898-9.

Biodiversity and Global Change

O. T. Solbrig, H. M. van Emden,

P. G. W. J. van Oordt (ed.)

CAB International, Oxon, 1994. 227 pp.
ISBN 0-85198-931-4. (First published in 1992 by IUBS.)

El programa DIVERSITAS, que se propone identificar todos los aspectos científicos relacionados con la naturaleza y significado de la biodiversidad, se originó a partir de una reunión de expertos organizada por la International Union of Biological Sciences (IUBS), que tuvo lugar en Washington en junio de 1989. Actualmente comprende seis grandes temas: Función de la biodiversidad en el ecosistema, Orígenes, mantenimiento y pérdida de la biodiversidad, Catalogación y supervisión de la biodiversidad, Biodiversidad de organismos silvestres emparentados con organismos domésticos, Biodiversidad microbiana, y Biodiversidad marina.

Afrontar un tema tan complejo como es la biodiversidad no es una tarea sencilla; es-

pecialmente si el objeto del estudio es la diversidad microbiana. En el libro *Microbial Diversity and Ecosystem Function*, en el cual han participado numerosos autores, no sólo se trata con rigor la diversidad microbiana, sino que también se discuten, de forma amplia y clara, diversos temas relacionados con el funcionamiento de los ecosistemas microbianos. Incluye además aspectos básicos, como el concepto de microorganismo y de especie microbiana, esta vez afrontados con una nueva perspectiva.

La obra *Biodiversity and Global Change*, por otra parte, trata el tema de forma mucho más general, aunque sus contenidos son paralelos a los del libro anterior. Su principal atractivo es que incluye artículos escritos por autores de gran prestigio: James Lovelock, Robert May, David Hawksworth, Pierre Lasserre, Vladimir Sokolov, etcétera.

Ambos libros se dirigen, principalmente, a especialistas en ecología microbiana, microbiólogos y licenciados en biología y otros profesionales de las ciencias de la vida. No obstante, pueden ser una magnífica referencia para todos aquellos profesionales, relacionados o no con las ciencias de la vida, que estén interesados en profundizar en el conocimiento y la comprensión del concepto de biodiversidad, así como en el funcionamiento y dinámica de los ecosistemas microbianos. Como complemento, puede añadirse la lectura de la obra *Entendre la biodiversitat*, de Xavier Bellés, que también se comenta en este número de la revista (p. 145).

El libro *Microbial Diversity and Ecosystem Function* contiene 30 artículos, muchos de ellos escritos por microbiólogos muy conocidos. Se divide en siete partes, cada una de las cuales contiene diversos artículos tratados por un especialista. La primera parte se centra en los conceptos de especie microbiana y de biodiversidad. La segunda hace un análisis detallado sobre la extensión de la diversidad microbiana y su evaluación en el hábitat. La tercera y la cuarta partes tratan ampliamente del papel de los microorganismos en la ecología global y en el mantenimiento de los ecosistemas. Destacan la aplicación de la biodiversidad a la biotecnología ambiental, así como al tratamiento biológico de los suelos y sedimentos contaminados. La quinta parte comenta diversos aspectos de los microorganismos. Se destaca el especial estudio de la ecología y diversidad de los microorganismos de ambientes extremos, centrándose en algunos aspectos de la biología molecular de las bacterias alcalófilas y de los hongos termófilos. La sexta, hace una revisión del seguimiento y del inventariado de los microorganismos, dando mayor relevancia a aspectos como el tratamiento estadístico, los distintos métodos de "cribado" para la selección de microorganismos en el suelo, la biodiversidad viral, el estudio de la diversidad en procariotas usando la taxonomía, y las diversas iniciativas sobre la biodiversidad tomadas por los organismos internacionales con competencias en su evaluación. La última parte comenta ampliamente los recursos básicos en microbiología. Se discute el papel de las colecciones de cultivos como referencia, el uso legal o comercial que puede hacerse de la diversidad de los microorganismos, haciendo énfasis en los derechos de propiedad intelectual, y en la ampliación y desarrollo de los nuevos recursos de la diversidad microbiana.

Debemos destacar el artículo dedicado a la transmisión de la información que aporta la biodiversidad y a las iniciativas existentes en la actua-

lidad, como son la red de talleres de información sobre la biodiversidad. También se hace mención al papel que, en un futuro próximo, desempeñará el *Manual de Bergey* en la difusión del conocimiento de la diversidad microbiana, y se anuncia su futura edición en formato electrónico.

El libro *Biodiversity and Global Change* se divide en cuatro partes y, al igual que el anterior, presenta artículos de diversos autores. Pero esta obra no solamente trata la diversidad microbiana, sino que afronta el tema de la diversidad de todos los organismos. Algunos de sus artículos comentan aspectos como la función de la diversidad en los ecosistemas marinos, la diversidad de los mamíferos en el funcionamiento de los ecosistemas, la conservación de la biodiversidad, la biodiversidad a nivel molecular, la dinámica de los sistemas, la diversidad genética y el cambio global. También se hace mención de las perspectivas de futuro de la biodiversidad. Otro de los atractivos de esta obra es la calidad de los autores, entre los que destaca Lovelock, con un artículo sobre los aspectos geofísicos de la biodiversidad.

Ambas obras son especialmente adecuadas para la puesta al día de los interesados en el tema de la biodiversidad. Ofrecen una completa información sobre la biodiversidad general y microbiana, sus métodos de estudio, el uso que puede hacerse de ellas y algunos aspectos legales relacionados con este uso, como son los derechos de propiedad intelectual y sus posibles aplicaciones.

Todo ello hace que estas obras sean de referencia obligada para los microbiólogos interesados en el conocimiento de la diversidad microbiana, especialmente si trabajan en taxonomía o en ecología microbianas. Ambos libros están magníficamente presentados, con tablas e ilustraciones que ayudan a una mejor comprensión de los temas expuestos en cada uno de los artículos.

David Isamat
Universidad de Barcelona

Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed.

Patricia Cunniff (ed.)

AOAC International, Arlington, VA, 1995. 2 volúmenes. ISBN 0-935584-54-4.

La antigua Association of Official Analytical Chemists, ahora bajo la denominación de AOAC International, ha publicado la decimosexta edición de su compendio de métodos, que lleva por título *Official Methods of Analysis*. El objetivo de esta asociación —integrada por científicos y organizaciones procedentes tanto del sector público como del privado— es promover la validación de métodos y la calidad de las determinaciones en las ciencias analíticas en general.

Desde que se publicó la primera edición, en el año 1920—entonces la asociación se denominaba Association of Official Agricultural Chemists—, los métodos para el análisis de alimentos y sus ingredientes han sufrido considerables modificaciones, que han afectado tanto la base científica de los procedimientos como la cantidad y variedad de productos a analizar. Las sucesivas ediciones han ido ampliando el número de métodos y los objetos y productos sometidos a los análisis que se detallan en la obra.

La decimosexta edición incluye más de 150 métodos nuevos y más de 100 métodos revisados recientemente. Muchos de los métodos existentes han sido modificados para ampliar sus campos de aplicación y mejorar su precisión. Otros se han eliminado, debido a que han quedado en desuso al ser superados por nuevos procedimientos, que incorporan técnicas o productos que se han mostrado más eficaces. Las actualizaciones incorporadas permiten una puesta al día por parte de químicos y microbiólogos de la industria, y de los centros de investigación, para responder a las

necesidades que se plantean en los casos prácticos que deben resolverse.

Las técnicas analíticas dominantes continúan siendo las basadas en la cromatografía, tanto líquida como de gases. Sin embargo, cada vez más se están incorporando nuevas tecnologías a los recientes métodos (inmunoensayo, hibridación de ácidos nucleicos, PCR, etc.). Se ha incrementado el número de métodos dedicados al control de los patógenos de alimentos tales como *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, coliformes en general y *Vibrio*. Éste es un punto de especial interés en nuestro entorno, donde la garantía sanitaria de los diferentes productos alimenticios en sus diversas modalidades —frescos, congelados, envasados, etc.— tiene que superar no solamente los controles estándar sino, en ocasiones, un sentimiento de desconfianza del consumidor. Óbviamente, es éste un tema donde pueden intervenir intereses comerciales y particulares. Ello es motivo para que no deba existir la menor duda sobre el sometimiento de los productos a todos los análisis necesarios que garanticen sus condiciones de higiene y sanidad.

Otro punto de especial interés, éste mucho más generalizado, es el que afecta a la seguridad de los propios métodos, de las condiciones del entorno y de las personas que los llevan a cabo, en un intento de prevenir situaciones no deseadas en el manejo de determinadas sustancias y material. Este aspecto es tratado con atención en toda la obra y así, además de notas incorporadas en la descripción de cada método, se incluye un apéndice final sobre la seguridad en el laboratorio y una sección sobre la manipulación de microorganismos, un tema que cada vez recibirá más atención debido a los resultados de la investigación en ingeniería genética de microorganismos de aplicación industrial, agrícola, etc.

El formato de los dos volúmenes que constituyen esta publicación —dos grandes carpetas de

anillas— permite tener al día los métodos con las actualizaciones periódicas que edita la AOAC. También resulta fácil seleccionar o eliminar los métodos que han quedado desfasados. Para los analistas informatizados que así lo prefieran, esta edición se encuentra disponible en CD-ROM, sistema con el que la búsqueda y selección de los métodos deseados puede realizarse con rapidez y facilidad, posiblemente mayor que con el manejo de las dos voluminosas carpetas.

Los métodos se describen con todo lujo de detalles. Una nota inicial, breve y concisa, da cuenta del fundamento científico de cada determinación. Los aparatos y reactivos se describen con detalle, y se incluyen las direcciones postales de algunos suministradores. También es detallada y correcta la explicación sobre la preparación de las muestras previa al análisis —aspecto frecuentemente olvidado en la mayoría de manuales metodológicos. Los cálculos y fórmulas para completar el análisis resultan de fácil comprensión. Un apartado de referencias —a destacar el de *Chemical Abstracts*— ofrece otras citas donde buscar más información sobre los métodos.

Las aproximadamente 1000 páginas de la publicación se reúnen en 50 capítulos, divididos en dos “volúmenes” (carpetas). En el primer volumen se recogen los métodos según la disciplina o la característica a analizar. Los capítulos del primer volumen están dedicados a: agricultura, fertilizantes, plantas, comida para animales, desinfectantes, plaguicidas, metales y elementos traza en alimentos, agua, sales, radiactividad, toxicología veterinaria, cosméticos, microbiología (un extenso capítulo, el 17, de más de 11 páginas) y drogas. El segundo volumen trata sobre las diversas familias de productos a analizar. En él encontramos métodos de análisis de: licores destilados, productos de panadería, bebidas fermentadas, vinos, bebidas sin alcohol y concentrados, café, té, cacao, cereales, derivados de la leche, huevos, pescado, aromas, frutas, gelatinas y pos-

tres, carne, aceites, productos vegetales procesados, especias y condimentos, azúcares, vitaminas, colorantes, aditivos alimentarios, toxinas naturales y alimentos infantiles.

El capítulo dedicado a la microbiología se divide en 13 apartados. Estos son: análisis de huevos y sus derivados, alimentos congelados o precocinados, coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, esterilidad “comercial” de alimentos envasados —entendiendo por esterilidad “comercial” la eliminación por calor de microorganismos viables de importancia para la salud pública—, *Clostridium*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Vibrio*, virus y células somáticas.

Ofrecen también especial interés aquellos métodos que utilizan microorganismos para analizar la cantidad o efectividad de diferentes compuestos químicos. Son los casos descritos en el capítulo 45, donde se detalla el análisis de vitaminas (por ejemplo, cobalamina, ácido fólico, niacina, ácido pantoteico, riboflavina, vitamina B₆) mediante métodos microbiológicos. Otros casos son el análisis de antibióticos en alimentos para animales (Cap. 5) y el análisis de desinfectantes (Cap. 6). Puede apreciarse la amplia gama de actividades pertenecientes a sectores sanitarios, industriales y productivos que abarca la obra.

El libro se completa con unos apéndices sobre (A) Soluciones estándar y materiales de referencia, (B) Seguridad en el laboratorio y (C) Tablas de referencia. Los extensos índices son completos y fáciles de usar.

Finalmente, la decimosexta edición del *Official Methods of Analysis* resulta una publicación extremadamente útil en laboratorios de análisis químicos y microbiológicos y en centros de investigación. Es especialmente adecuada su utilización en la preparación de análisis de alimentos, bebidas y aguas y en pruebas toxicológicas.

Jordi Mas-Castellà
Universitat de Barcelona

Orígenes de la vida En el centenario de Aleksandr Ivanovich Oparin

Federico Morán, Juli Peretó,

Álvaro Moreno (coordinadores)

Editorial Complutense, S. A., Madrid, 1995.
335 pp. ISBN 84-89365-26-1.

Orígenes de la vida recoge la mayoría de conferencias impartidas en dos cursos de verano de 1994, celebrados en la Universidad Internacional Menéndez Pelayo de Valencia y en la Universidad del País Vasco de San Sebastián. Ambos cursos recordaron el centenario del nacimiento de Aleksandr Ivanovich Oparin. Y lo hicieron presentando la situación actual de una materia científica que tuvo en Oparin a un pionero, con ideas innovadoras y revolucionarias. Desde las ideas de Oparin sobre el origen de la vida hasta el conocimiento actual del tema se ha realizado un largo proceso, que ha permitido averiguar muchas de las etapas que dieron como resultado el surgimiento y evolución del fenómeno llamado Vida. Se trata de un arduo recorrido por muchos campos del conocimiento, que provienen de diversas disciplinas científicas, desde la cosmología hasta la paleontología, incluyendo la bioquímica comparada o la biología molecular, y muchas más.

La recopilación de todas estas ideas en un breve espacio no ha dado como producto un libro complejo ni de difícil comprensión, como cabría esperar. Por el contrario, se ha conseguido una obra que pone al día la información disponible sobre el origen de la vida de una manera amena. El libro se dirige a un público amplio, que comprende desde estudiantes que se inician en el estudio del origen de la vida, hasta científicos con un amplio conocimiento de sus respectivas materias.

Componen el libro cuatro grandes partes, que esquematizan los distintos pasos que hicieron posible el establecimiento de la vida en nuestro planeta, su posterior evolución y los límites de la

propia vida. La primera parte tiene cuatro artículos, que recogen las diferentes teorías o supuestos que hicieron posible lo que llamamos hoy evolución prebiótica: la síntesis prebiótica de compuestos orgánicos como paso hacia el origen de la vida, el mundo del RNA y la evolución in vitro, la evolución precelular y el origen de la célula. En la segunda parte (que tiene dos artículos) se trata de la evolución y optimización del metabolismo, y del diseño de rutas metabólicas. Se explican las ideas que, teóricamente, dieron ocasión a la evolución del metabolismo y a su diseño, y también habla de la discusión de si el número de etapas y de carbonos de los intermediarios afecta el flujo total de la ruta y el tiempo de transición.

La tercera parte tiene tres artículos, que presentan tres aspectos esenciales de la evolución temprana de la vida, como son la simbiosis (que ha dado la posibilidad de moldear muchos organismos), la ecopoyesis (aparición de los primeros ecosistemas) y las características de los fósiles de los primeros ecosistemas. En la parte final (también compuesta de tres artículos) se asocian las posibles teorías que explican las fronteras de la vida y el origen de ésta. Trata de la semántica molecular, del origen de la vida y la teoría del cierre semántico, y de la evolución cosmoquímica. La vida constituye un conjunto muy diverso de formas, pero tras ellas aparece una organización básica común. Es necesario retroceder en el tiempo para discutir la formación cósmica de los elementos, en un universo que es esencialmente orgánico, y que está preparado para la aparición de la vida cuando se dan las condiciones adecuadas.

Como resumen, puede decirse que este libro es una de las mejores obras publicadas originalmente en español sobre la aparición y evolución temprana de la vida. Se trata de una obra básica para saber qué hizo posible el paso de la no-vida a la vida, y qué derroteros siguió una vez establecida en nuestro planeta.

Antoni Navarrete
Universidad de Barcelona

Ecology and Evolution in Anoxic Worlds

Tom Fenchel, Bland J. Finlay

Oxford University Press, Oxford Series in Ecology and Evolution, Oxford, 1995. 276 pp. ISBN 0-19-854838-9.

Durante estos últimos años, nuestro conocimiento sobre la vida precámbrica ha experimentado un progreso considerable y alentador. Son varios los factores que han contribuido a ello; se pueden destacar, entre otros, el descubrimiento de fósiles de origen procariótico y eucariótico de gran antigüedad, la interpretación de los estromatolitos y el estudio de los tapetes microbianos (sus representantes contemporáneos), la implicación de la endosimbiosis en la teoría evolutiva y la nueva visión de la filogenia (principalmente, la que se refiere a microorganismos). La vida se originó en un ambiente anaerobio; el oxígeno atmosférico es el resultado de un proceso de evolución biológica. No cabe duda de que para entender la vida en sus orígenes es esencial disponer de una profunda comprensión del funcionamiento de los ambientes anaerobios.

Con tal propósito, los autores sintetizan en este libro la ecología, la evolución y la biodiversidad de los hábitats carentes de oxígeno. Se trata de una obra que interesará tanto a ecólogos microbianos y generales como a los expertos en evolución, ya que en ella se analizan aspectos que están poco actualizados en sus diferentes áreas de trabajo, o en los que ha habido un gran número de descubrimientos recientes de gran interés y trascendencia para la biología.

En el libro se tratan básicamente: (i) las diversas características físico-químico-históricas de estos ambientes anóxico y la persistencia de las condiciones anóxicas en determinados hábitats actuales; (ii) los diferentes tipos de metabolismo anaerobio seleccionados en ellos, tanto en

procariotas como en eucariotas (haciendo hincapié en los diversos mecanismos de fermentación, respiración anaerobia, metanogénesis, fototrofia anoxigénica y fagotrofia) y los mecanismos que explican y permiten la coexistencia de diversos tipos de metabolismo en un mismo (aparentemente) hábitat, teniendo en cuenta, sobre todo, las peculiares interacciones sintróficas que se establecen); (iii) la estructura ecológica de diferentes comunidades de hábitats anóxicos, y (iv) las relaciones que existen entre el mundo anóxico y el óxico, que permiten comprender los mecanismos por los cuales la vida puede convertirse en una fuerza geológica.

Sus más de 250 páginas, gráficas, esquemas y reacciones acompañan un texto especializado, pero de fácil comprensión, que permite, por un lado, adquirir una idea general de la historia natural de los ambientes anaerobios, de sus habitantes y de sus relaciones, y, a la vez, realizar un análisis más profundo de los mecanismos de funcionamiento (aunque algunas premisas estén basadas en hipótesis), apoyándose siempre en una bibliografía actualizada.

Esta obra cumple los objetivos de la serie donde se publica, que da prioridad a textos de interés conceptual, en los que, a partir de datos y observaciones experimentales, se mezclan teoría y datos para conseguir un progreso substancial en el tema considerado. Finalmente, diremos que el libro muestra que quedan por dilucidar múltiples incógnitas, y sirve de base para la comprensión de los ecosistemas anaerobios que, a pesar de resultar tan complejos y fascinantes, han sido muy poco estudiados. Esperemos que, en el futuro, la investigación del mundo anaerobio ocupe el lugar que merece, por su importancia evolutiva, en las investigaciones sobre las diversas formas de vida que existen o han existido sobre la Tierra.

*Ugo d'Ambrosio
Universidad de Barcelona*

Microcosmos

Cuatro mil millones de años de evolución desde nuestros ancestros microbianos

Lynn Margulis, Dorion Sagan

Tusquets Editores, S.A., Colección Metatemas, Barcelona, 1995. 317 pp. ISBN 84-7223-842-3.

El Prof. Lewis Thomas (1913–1993) presenta este libro como un tratado distinto y sorprendente sobre la evolución de la biosfera, una nueva manera de contemplar el mundo, que resume sólidas investigaciones con un lenguaje divulgativo. Los autores manifiestan con entusiasmo su visión bacteriocéntrica del Cosmos, lo que resultará novedoso para la comunidad científica y el público culto a quienes parece dirigirse la obra. Tras la buena acogida de la primera edición en los Estados Unidos, los autores introducen un prólogo a modo de reconsideración general de la obra. Niegan que los seres humanos estemos en conflicto fundamental con la Naturaleza, y que seamos esenciales para la biosfera. Consideran que la atenta mirada al microcosmos nos desvela una nueva visión de la historia evolutiva.

La introducción se centra en una cita de Darwin, que contempla todo ser vivo como un *microcosmos* formado por una multitud de organismos. Los autores, además de extraer de allí el título de la obra, se proponen discutir la naturaleza de estos pequeños universos. Las bacterias fueron los únicos habitantes de la Tierra durante más de 2000 millones de años, e inventaron todos los sistemas químicos esenciales para la vida. Los humanos convivimos con las bacterias, albergamos mitocondrias y, en nuestro interior, se reproduce el mismo DNA primitivo procariótico.

Los autores amplían su discurso a través de trece capítulos, que pueden agruparse en cuatro bloques cronológicos: Geología, Bacterias, Protistas y Organismos pluricelulares.

El primer bloque, que se refiere a la evolución prebiótica de la Tierra, dedica un capítulo a la evolución geológica y otro a la síntesis abiótica de moléculas orgánicas. En el segundo bloque discuten el origen y la evolución de las bacterias durante los tiempos en que eran los únicos seres vivos del planeta. Los autores presentan el origen de las bacterias como un acontecimiento definitivo, que condiciona todas las posteriores formas de vida. El ser humano, que alberga en su interior cien células bacterianas por cada célula humana, es un pasajero innecesario para la vida en la Tierra. En el cuarto capítulo se describen los retos ambientales que condujeron a la aparición de mecanismos bacterianos cada vez más eficientes. El capítulo quinto está dedicado a la sexualidad como mecanismo de intercambio genético. Los autores destacan la sexualidad bacteriana frente a la de los seres eucarióticos, por su independencia de la reproducción y por la transmisión horizontal. Esto supone que en el mundo bacteriano no existan verdaderas *especies* y que las bacterias sobrevivan con escaso número de genes, ya que pueden acceder a la red mundial de información genética con los mecanismos de transformación, transducción y conjugación. *El Holocausto del oxígeno*, sexto y último capítulo de este bloque, comienza con la descripción de la crisis de contaminación más importante de la historia de la Tierra: el cambio de una atmósfera reductora a otra oxidante, gracias a la acumulación de oxígeno. Este gas es el residuo tóxico de una nueva vía metabólica, la fotosíntesis aerobia. El éxito inicial se vio ensombrecido por la destrucción masiva de poblaciones bacterianas para las cuales resultó letal el oxígeno. La reacción más inesperada a esta peligrosa acumulación de oxígeno fue la aparición de un tipo de bacterias que lo incluyeron en una nueva vía metabólica: la respiración aerobia. En la parte externa de la atmósfera terrestre se formó un escudo de ozono, que detuvo la radiación solar de alta energía.

En los cuatro capítulos siguientes se describen las células eucariotas y las relaciones simbióticas que las hicieron viables. El capítulo séptimo presenta la brusca aparición de nuevas células, cuyo abundante DNA se acumuló en cromosomas rodeados de una membrana nuclear, en el interior de un citoplasma complejo. En el siguiente capítulo, *Conviviendo*, se detallan las posibles asociaciones bacterianas que dieron lugar a los seres con núcleo. En el capítulo noveno se conjetura que las antiguas espiroquetas pudieron ser el origen de todos los sistemas de microtúbulos, desde las estructuras extracelulares de movimiento hasta los centriolos y fibras que forman el huso mitótico. De ser cierta esta suposición, la simbiosis debió de tener lugar en eras muy tempranas, y su culminación fue la célula nerviosa. El siguiente capítulo está dedicado a la sexualidad de los eucariotas. Los autores creen que la meiosis es como hacer inventario genético, que el principio de recombinación impregna toda forma de vida en la Tierra y que el estafalario apareamiento cromosómico puede no ser más ventajoso que la simple clonación.

Los tres últimos capítulos comprenden la aventura de los seres pluricelulares. En el capítulo once los autores presentan las posibles líneas evolutivas de los seres con tejidos. Algas del tipo de *Volvox* darían lugar a formas resistentes a la desecación, almacenando agua en estructuras rígidas; los bosques de helechos, provistos de semillas, serían desplazados por las coníferas; el último episodio evolutivo fue la aparición de las plantas con flores. Los primeros animales podrían haber sido los de la fauna de Ediacara, aunque es en el Cámbrico cuando aparecen registros fósiles de seres con esqueletos externos. Los hongos representarían una tercera vía especializada en la colonización de ambientes terrestres.

El capítulo titulado *El hombre egocéntrico* trata de la evolución de los cordados hasta nuestra especie y del desarrollo de las poblaciones huma-

nas. El último y largo capítulo, *El futuro supercosmos*, plantea la hipotética expansión extraterrestre de la vida. Ante las teorías catastrofistas, los autores recuerdan que los fenómenos explosivos nunca han causado la destrucción total de la biosfera, sino que han sido afrontados por la biota con innovaciones, como si en cada crisis la biosfera retrocediera un paso y avanzara dos. La vida en la Tierra desaparecerá con el colapso final del Sol; para entonces es probable que seres terrestres hayan emigrado a otros astros, formando el *Macrococosmos*. Las últimas páginas discurren por la hipótesis *Gaia*, el modelo global de la biosfera formulado inicialmente en 1969 por James Lovelock y desarrollado en años posteriores.

La obra se completa con un epílogo en el que el Prof. Ricard Guerrero hace un breve resumen de la hipótesis *Gaia*, explicando los conceptos de homeostasis y de homeorresis, que dan lugar a la coevolución de la vida y la biosfera. Como broche final, escribe Guerrero una frase lapidaria: “No dominamos la Naturaleza, ni lo hemos hecho nunca.”

Es probable que este libro marque el comienzo de una época en la que, frente a los conocimientos parciales de especialistas dispersos, se vayan extendiendo conceptos microbiológicos globales entre amplios grupos de población. Las profundas ideas de los autores, complementadas por la fluida y elegante prosa castellana de la traductora, Mercè Piqueras, hacen disfrutar de un texto que es un estímulo para la imaginación y un placer para los amantes de la lectura. Los microbiólogos no debemos rechazar la posibilidad de divulgar, entre la población general, la sorprendente aventura del *Microcosmos*. Lynn Margulis y Dorion Sagan, inflamados por el entusiasmo, nos han entregado una obra que, aun con lagunas y suposiciones discutibles, rebosa de indudable belleza.

Juan-José Marcén
Ayuntamiento de Zaragoza

Entendre la biodiversitat

Xavier Bellés

Edicions de la Magrana, L'Esparver Ciència, Barcelona, 1996. 162 pp. ISBN 84-7410-856-X.

Aunque no sea habitual en esta sección comentar obras en catalán, la presente revisión se debe a que este trabajo es uno de los primeros libros originales que aparecen en España sobre el tema. El gran interés que está despertando en el mundo científico este tema queda patente por los diversos libros que han aparecido recientemente. (Véanse, por ejemplo, los dos que se revisan en este número de la revista, pp. 137–138.)

La diversidad microbiana, que es sin duda alguna la más desconocida por nosotros, requiere de un estudio profundo, y es importante que lo hagamos lo antes posible. Sólo en un gramo de suelo forestal se han contabilizado, mediante técnicas de biología molecular, 4000 genomas diferentes (¡lo que sobrepasa el número total de especies de procariontes descritas en la última edición del *Manual de Bergey!*).

Todo naturalista está fascinado por la elevadísima variedad de formas vivas conocidas (alrededor de 1,5 millones), aún sabiendo que el número real de especies existentes es con seguridad mucho mayor (entre unos 5 y unos 30 millones). La diversidad es una característica de la vida en general y puede estudiarse en sus diferentes niveles de organización. Las estimaciones y extrapolaciones actuales, basadas en la poca información que se posee, nos muestran que como mínimo se requerirían más de 6 siglos para registrar la totalidad de especies que habita el planeta, si el efecto destructor realizado por la humanidad fuese mucho menor. Pero tal efecto es excesivo y conlleva una disminución importante de biodiversidad (se estima que en los próximos 100 años alrededor de la mitad de las especies de la Tierra se extinguirá por ignorancia o codicia).

Xavier Bellés, entomólogo y profesor de investigación del CSIC, nos brinda con este libro la

oportunidad de comprender la biodiversidad, sin tratar de abarcarla en toda su magnitud; más bien pretende tener carácter divulgativo, permitiendo que vaya dirigido a una amplia gama de lectores. De sus páginas se desprenden las nociones básicas necesarias, requeridas para que se cree una concienciación del público en general y, en particular, en aquellas personas que actualmente controlan la información y que por tanto tienen en sus manos la economía mundial.

Empieza con conceptos y conflictos básicos con los que se enfrenta la biodiversidad, seguidos de la historia de la creación de la misma (dónde se dieron y siguen siendo importantes procesos ecológicos como los de especiación, sucesión, competencia, depredación y simbiosis). Posteriormente, se tratan los factores perturbadores, principalmente antropogénicos, como son la destrucción de hábitats, la contaminación, la introducción de especies o su sobreexplotación (agrícola, ganadera, cinegética o pesquera).

Las pérdidas de biodiversidad, a causa de extinciones rápidas, se exponen en el siguiente capítulo, desde las producidas por la humanidad primitiva, pasando por la sociedad agro-ganadera, que conllevó la domesticación de plantas y animales, hasta el momento actual, en el que somos capaces no sólo de destruir sino también de almacenar la diversidad en bancos de genes y de patentar especies manipuladas genéticamente.

Las consecuencias de dichas pérdidas, que no son triviales, se explican en el capítulo siguiente, y a continuación se tratan cuestiones de biodiversidad aplicada (de gran importancia en el mundo de la industria) y humana (la cual también padece una regresión alarmante). Recomendamos, sin duda, esta pequeña obra a todas las personas interesadas en la conservación del planeta y, en especial, a los microbiólogos dedicados a estudios ecológicos y taxonómicos.

Ugo D'Ambrosio
Universidad de Barcelona



Centro de Documentación en Acuicultura

CSIC

Centro de Información y Documentación Científica (CINDOC)

Este Directorio constituye la cuarta versión impresa del banco de datos elaborado por el Centro de Documentación en Acuicultura. Recoge información sobre empresas y centros de investigación que desarrollan su actividad en el sector de la Acuicultura, o en apoyo de este sector, en España.

Contenido

Centros de Investigación (Universidades, Ministerios, Comunidades Autónomas y Administraciones Locales), Empresas (Relación alfabética, Empresas agrupadas por sector de actividad), Especies censadas (Índice nombre científico/nombre común, Índice nombre común/nombre científico), Índice alfabético de Centros de Investigación, Índice de Centros por Comunidades Autónomas, Índice de Empresas por Comunidades Autónomas.

Enviar el cupón de petición (o fotocopia) acompañado de su pago a:

CENTRO DE DOCUMENTACIÓN EN ACUICULTURA
CINDOC
C/ Joaquín Costa, 22. 28002 Madrid
Tel.: 91-5635482. Fax: 91-5642644.

Precio: 4.680 PTA
ISBN: 84-00-07475-0
295 páginas



CUPÓN DE PETICIÓN

Pago mediante: Cheque a nombre del CINDOC
 Giro postal (en este caso, adjunte resguardo del mismo)

Nombre:

Dirección:

.....

.....

Código postal: Población: País:

Teléfono: Fax: E-mail:

CORRECCIONES

Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, I y II

Concepción García Mendoza

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España

Volumen 11(3), página 362, tercera línea, y página 364, cuarta línea. En lugar de “J. Olivé Suñé” y “J. Oliver Suñé”, respectivamente, debería leerse “B. Oliver Suñé”.

Volumen 11(4), página 497, líneas 31 y 32. En lugar de “organizada por Bernabé Sanz”, debería leerse “organizada por Cándida González, aunque cediese la presidencia de la citada Reunión a Bernabé Sanz”.

III Congreso Nacional de Micología

Peñíscola (Castellón)

24–27 de septiembre de 1996

Organización: Sección Departamental de Microbiología. Fac. de Farmacia. Univ. de Valencia

Presidente del Comité Organizador: Dr. Rafael Sentandreu

Programa científico

El programa científico constará de diversos simposios, conferencias, comunicaciones libres y mesas redondas. **Simposios:** 1.- Morfogénesis en hongos microscópicos, a) Transducción de señales y expresión génica, b) Aspectos bioquímicos y citológicos. 2.- Micología aplicada, a) Epidemiología y diagnóstico de las fungemias, b) Antifúngicos. Nuevas estrategias. 3.- Micología clínica. Nuevas propiedades terapéuticas de las micosis. **Mesas redondas:** Micología aplicada; Antifúngicos; Onicomycosis; Micosis sistémicas; Hongos: Control biológico; Epidemiología de las micosis. **Comunicaciones libres:** Metabolismo y Fisiología; Micología médica y veterinaria; Micología aplicada; Genética y Biología Molecular; Morfogénesis y diferenciación; Micología básica; Otros temas.

Para recibir información, pueden dirigirse a:

Secretaría del III Congreso de Micología

Sección Departamental de Microbiología. Facultad de Farmacia

Av. Vicente Andrés Estellés, s/n.

46100 Burjassot (Valencia) Tel.: 96-3864299. Fax: 96-3864682.

X Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

Valencia

16–18 de septiembre de 1996

Sede del Congreso: EXPO HOTEL

Av. Pío XII, 4. 46009 Valencia. Tel.: 96-3470909. Fax: 96-3483181.

Avance del programa científico

Mesas Redondas: El sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos; Patógenos emergentes en alimentos; Biotecnología de alimentos fermentados; Nuevos métodos de detección, tipificación y seguimiento de microorganismos en alimentos.

Para recibir información sobre el programa científico, pueden dirigirse a:

Daniel Ramón Vidal

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

Apartado 73. 46100 Burjassot (Valencia)

Fax: 96-3636301. E-mail: dramon@iata.csic.es

Para información general, la Secretaría Técnica es: **GRUPO GEYSECO**

Universidad, 4, 1º. 46003 Valencia

Tel. y Fax: 96-3942558.

Instructions to authors

Microbiología SEM (the official journal of the Spanish Society for Microbiology, SEM) publishes original research articles, research notes and reviews covering all aspects of microbiology. All submissions should be written in English (preferably) or Spanish. The decision to accept manuscripts is made by the Editorial Board. Submission of an article 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 will be given for reproduction of papers published in this journal if the source is credited.

ORGANIZATION AND FORMAT OF THE MANUSCRIPTS. Type every portion of the manuscript double-space with wide margin at the left on UNE A-4 format sheets. Only one side of the sheet should be used and the pages should be numbered sequentially. Articles must be restricted to a maximum of 16 printed pages, including figures and tables (this corresponds to approximately 25 typewritten pages).

The front page should include title, name(s) of the author(s), institution affiliation(s) and complete address(es). Three to five "key words" should also be included. Articles should be divided into: Abstracts in English and in Spanish (not exceeding 250 words each), Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgments, and References. Results and Discussion can be combined.

Abbreviations and symbols should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission. The *Système International d'Unités* (SI) is to be used throughout.

Cite each listed reference by number in the text. References should be numbered and arranged in alphabetical order as indicated in the following examples:

Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Seeberg, E., Nissez-Meyer, J., Strike, P. (1976). *denV* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosilate specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* **35**, 790-797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria. The role for autolysins. *In* Nombela, C. (ed.), *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, pp. 3-12. Elsevier Science Pub., Amsterdam.

References to thesis, manuscripts not yet accepted for publication or meetings should be indicated in the text as follows: (García, P. et al. 1985, in preparation), (Smith, T. 1985. Ph. D. thesis, University of Massachusetts, Amherst) or (Suárez, A., González, F. 1975. V Congr. Nac. Microbiol., p. 1845).

Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the article 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. Legends for line-drawings and photoprints must be typed double-space on a separate sheet. The size of the photographs should not exceed the printing area (13 × 20 cm). All elements in the drawing should be prepared to withstand reductions. Drawings and line figures should be drawn in black ink on tracing paper and should be prepared as indicated for the photographs. Colored illustrations are not accepted.

Tables should be compiled on separate sheets with a descriptive title and numbered independently of the figures using Arabic numerals. Please indicate with a soft pencil the approximate location of tables and figures in the left margin of the pages of the manuscript.

NOTES. Notes should be restricted to 6 typewritten pages and are intended to present experimental observations and descriptions of techniques or methodological changes of interest. They should be written according to the instructions given for articles, but without the heading divisions, and their abstracts should not exceed 50 words. Figures and tables should be restricted to a maximum of 2 figures and 1 table or vice versa.

MINIREVIEWS. Minireview articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write them. However, if some authors are interested in publishing minireviews, these can be submitted for publication. They should be between 12 and 20 double-spaced typewritten pages, including the space needed for figures and tables.

PROOFS CORRECTION. On acceptance of the article, galley proofs will be sent to the corresponding author to check for typesetting accuracy. The corrected proofs should be duly returned within one week's time. If delayed beyond this time the proofs will be published as they have been sent. Broader changes implying recomposition of the text will be at the author's expense. Twenty five offprints of each article are supplied free of charge. Additional reprints will be billed at cost price if requested upon returning the corrected galley proofs.

Articles must be submitted, original and two copies on paper, to the following address: *Microbiología SEM*. Apartado 16009, 08080 Barcelona, Spain, or to one of the members of the Editorial Board according to the discipline represented. If the article is accepted for publication, a version in diskette will be requested.

Normas para los autores

Microbiología SEM (la revista científica de la Sociedad Española de Microbiología, SEM) acepta artículos y notas de investigación originales dentro del campo de la microbiología y, ocasionalmente, artículos de revisión. Textos en inglés (preferentemente) o español. La aceptación corresponde al Consejo Editorial. Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquier otra revista. Los originales publicados en *Microbiología SEM* podrán ser reproducidos siempre que se indique su origen.

PRESENTACIÓN DE LOS ORIGINALES. Los artículos estarán escritos a máquina, a doble espacio, en hojas UNE A-4 por una sola cara, numeradas correlativamente y con un amplio margen en la parte izquierda. No deberán exceder de 16 páginas impresas, incluyendo tablas y figuras (lo que corresponde aproximadamente a 25 hojas mecanografiadas). Los artículos incluirán una primera página en la que se indicará por este orden: Título del artículo, nombre y apellido del autor o autores, centro en el que se ha realizado el trabajo y dirección completa del mismo, así como de tres a cinco “palabras clave”. En los artículos en español se deberá incluir una versión inglesa del título. Los artículos constarán de: Resúmenes en inglés y en español (de no más de 250 palabras cada uno), Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Bibliografía. Las secciones de Resultados y Discusión se podrán juntar en una sola.

Las abreviaturas, símbolos y siglas deberán seguir las recomendaciones de la Comisión IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica. Deberá emplearse siempre el Sistema Internacional de Unidades (SI).

La bibliografía será citada en el texto mediante números y se dispondrá numerada y en orden alfabético de acuerdo con los ejemplos que se ofrecen a continuación:

Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Seeberg, E., Niszez-Meyer, J., Strike, P. (1976). *denV* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylate specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* **35**, 790–797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria. The role for autolysins. *In* Nombela, C. (ed.), *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, pp. 3–12. Elsevier Science Pub., Amsterdam.

Las referencias a tesis doctorales, originales no aceptados todavía o comunicaciones presentadas a congresos, deben incluirse en el texto del artículo de acuerdo con los siguientes ejemplos: (García, P. et al. 1985, en preparación), (Smith, T. 1985. Tesis doctoral University of Massachusetts, Amherst) o (Suárez, A., González, F. 1975. *Res. V Congr. Nac. Microbiol.*, p. 1845).

Las fotografías, que deberán estar preparadas para su reproducción directa, se limitarán 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. En los artículos en español las figuras incluirán asimismo un texto en inglés. El tamaño de las fotografías no excederá de 13 x 20 cm. Las dimensiones de los rótulos deberán ser las adecuadas para ser legibles en caso de que se reduzca la fotografía. La presentación de dibujos en tinta china y papel vegetal seguirá las mismas normas. No se admitirán fotografías en color.

Las tablas se enviarán en hojas aparte, numeradas independientemente de las figuras, con números arábigos y deberán llevar el correspondiente título explicativo. Los autores deberán indicar a lápiz en el margen del texto la situación aproximada en donde deben aparecer las tablas y figuras.

NOTAS. Las Notas, que no deberán exceder de seis páginas mecanografiadas, incluyendo figuras y tablas, 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 artículos, pero suprimiendo las divisiones con encabezamiento. Los resúmenes no serán superiores a 50 palabras. Sólo incluirán, como máximo, dos figuras y una tabla, o viceversa.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN. Los artículos de Revisión versarán sobre temas de microbiología de gran interés, y su redacción se solicitará a especialistas. Sin embargo, si algún autor está interesado en publicar artículos de Revisión, éstos tendrán que ser supervisados. Los originales deberán comprender aproximadamente de 12 a 20 páginas (incluidas figuras y tablas), mecanografiadas a doble espacio.

CORRECCIÓN DE PRUEBAS. Los autores recibirán pruebas de imprenta, que deberán estar de vuelta en la redacción en el plazo de una semana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, éstas serán publicadas tal como han sido enviadas a los autores. Las correcciones se limitarán a errores tipográficos, gramaticales o de datos incorrectos. Modificaciones más importantes, que impliquen recomposición del texto, deberán ser abonadas por los autores. Se enviarán 25 separatas gratuitas por artículo; si se desearan más, deberá indicarse por escrito cuando se devuelvan la pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

El artículo, original y dos copias en papel, se enviará a la siguiente dirección: *Microbiología SEM*. Apartado 16009, 08080 Barcelona, o al miembro del Consejo Editorial de la revista que esté más relacionado con el contenido del artículo. Posteriormente, caso de ser aceptado, se pedirá también una versión en disco de ordenador.

Editorial Board addresses

From p. 4

Harlyn O. Halvorson
Policy Center for Marine Biosciences and
Technology
University of Massachusetts-Darmouth
North Darmouth, MA 02747-2300. USA

M. Benjamín Manzanal
Dpto. Interfac. de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Oviedo
33071 Oviedo. Spain

Juan Iriberry
Departamento de Microbiología
Universidad del País Vasco
Apartado 644
48080 Bilbao. Spain

David A. A. Mossel
Eijkman Found. for Medical Research
P. O. Box 6025
3503 PA Utrecht
The Netherlands

Germán Larriba
Departamento de Microbiología
Universidad de Extremadura
06071 Badajoz. Spain

José Olivares
Estación experimental del Zaidín, CSIC
Profesor Albareda, 1
18008 Granada. Spain

Paloma Liras
Área de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de León
24071 León. Spain

Juan A. Ordóñez
Dpto. de Higiene y Microb. Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid. Spain

José M. López Pila
Institute for Environmental Hygiene
Corrensplatz, 1
D-1000 Berlin 33. Germany

J. Claudio Pérez Díaz
Servicio de Microbiología
Hospital Ramón y Cajal
28035 Madrid. Spain

Rubens López
Centro de Investigaciones Biológicas
CSIC
Velázquez, 144
28006 Madrid. Spain

Manuel de la Rosa
Servicio de Microbiología
Hospital Virgen de las Nieves
Av. Coronel Muñoz, 2
18014 Granada. Spain

Editorial Board addresses

Harold W. Rossmore
Department of Biological Sciences
Wayne State University
Detroit, MI 48202. USA

Tomás A. Ruiz Argüeso
Laboratorio de Microbiología
ETSI Agrónomos
Universidad Politécnica de Madrid
28040 Madrid. Spain

Moselio Schaechter
Department of Biology
San Diego State University
San Diego, CA 92182. USA

Gary Toranzos
Department of Biology
University of Puerto Rico
P. O. Box 23360
Río Piedras, PR 00931-3360
Puerto Rico

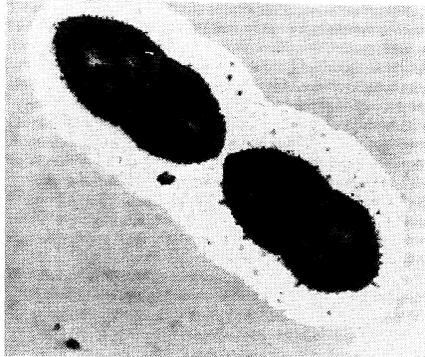
Antonio Torres
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de Sevilla
41012 Sevilla. Spain

Josep M. Torres-Rodríguez
Unidad de Microbiología
Inst. Municipal de Investigación Médica
UDIMAS, Univ. Autónoma de Barcelona
Pg. Marítim, 25-29
08003 Barcelona. Spain

Hans G. Trüper
Institute of Microbiology
University of Bonn
Meckenheimer Allee, 168
D-5300 Bonn 1. Germany

Antonio Ventosa
Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla
41012 Sevilla. Spain

Miquel Viñas
Institut Univ. de Salut Pública
Campus de Bellvitge
Universidad de Barcelona
Carr. de la Feixa Llarga, s/n
08907 L'Hospitalet de L. Spain



DIEZ MAÑANAS DE MICROBIOLOGÍA

Una panorámica de la microbiología a través de diez documentos breves en inglés, con un léxico seleccionado y con preguntas en español para trabajar con el alumno, que comentan temas de gran importancia microbiológica para una mejor comprensión de algunos aspectos de la materia tratada.

Contenido

- Doc. 1. The Germ Theory of Disease. Koch's Postulates
- Doc. 2. Laboratory Culture of Microorganisms
- Doc. 3. Magic Bullets
- Doc. 4. Life with 482 Genes
- Doc. 5. Bacterial Growth and Its Control
- Doc. 6. The Concept of a Virus
- Doc. 7. The Origins of Bacterial Genetics
- Doc. 8. The Ames Test and the Cause of Mutations
- Doc. 9. Innocent Killers
- Doc. 10. Woese's Three Domains and the Bergey's Manual

Los documentos se presentan en 5 disquetes 3.5"HD más copia en papel (aprox. 50 páginas). Están disponibles en formato Macintosh (Microsoft Word 5.0 o Aldus Pagemaker 4.0) y formato PC (Microsoft Word 2.0 para Windows). También puede enviarse una versión abreviada a través del correo electrónico, a un precio más reducido. Los documentos incluyen textos y figuras relacionados con los temas comentados.

Precio: 8.000 PTA

Para solicitar información:

Por correo: Prof. R. Guerrero. Dpto. de Microbiología. Fac. de Biología.
Universidad de Barcelona.
Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona

Por fax o correo electrónico: Fax +34-3-3341079. E-mail: guerrero@bcn.servicom.es

Microbiología y genética molecular

Josep Casadesús (ed.)

Coedición de la Sociedad Española de Microbiología
y la Universidad de Huelva

Algunos temas tratados:

Transducción de señales. Recombinación genética en bacterias y levaduras. Análisis molecular de las envolturas de la célula bacteriana. Patogénesis molecular. Mecanismos de mutagénesis. Replicación de cromosomas y plásmidos. Interacciones microbio/planta. Genética molecular de la transcripción. Clave genética. Fotobiología y desarrollo multicelular. División celular en bacterias y levaduras. Retrotransposones en hongos. Fase estacionaria. Metilación del DNA. Evolución molecular en bacterias y fagos. Microbiología industrial. Métodos moleculares en ecología microbiana. Viroides. Vacunas. Introducción en el ambiente de microorganismos modificados por métodos genéticos (OMG).

Precio: 6.000 PTA

Fecha de aparición: abril de 1996

ISBN: 84-88751-24-9

912 páginas, en dos volúmenes

Envíen el boletín adjunto (o fotocopia) a:

Servicio de Publicaciones
Universidad de Huelva
Miguel de Unamuno, s/n
21071 Huelva



Estoy interesado/a en recibir información sobre el libro “**Microbiología y genética molecular**”.

Nombre y apellidos

Dirección

Código Postal Población

Provincia País

Teléfono Fax E-mail

Groupement des Protistologues de Langue Française

XXXIV REUNIÓN ANUAL BANYULS-SUR-MER

16–19 mayo 1996

La XXXIV Reunión Anual del Groupement des Protistologues de Langue Française está organizada por el Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-mer. Los participantes podrán alojarse en el centro de talasoterapia “Thalacap” de Banyuls-sur-mer, donde se celebrarán las reuniones, la exposición de pósters, etc. El precio de la inscripción es de 300 FF.

Las comunicaciones libres, orales o en forma de póster, tratarán los temas siguientes:

- Evolution: L'Origine des Protistes
- Les Protistes toxiques
- Le point sur le contrôle moléculaire du cycle cellulaire: nouvelles données depuis 1993.

Mesas redondas

17.05.96: “Les Protistes toxiques”. Dr. Marie-Jo Dinet (Laboratoire Arago, Banyuls-sur-mer), Dr. Catherine Rausch (Université de Nantes), Dr. J. Diogene (Université de Québec, Canada).

18.05.96: “Le contrôle moléculaire du cycle cellulaire”. Dr. André Picard (Laboratoire Arago, Banyuls-sur-mer), Dr. Véronique Baldin (Université P. Sabatier, Toulouse), Dr. Guy Lenaers (Laboratoire Arago, Banyuls-sur-mer).

19.05.96: “Evolution: Origine des Protistes”. Dr. André Adoutte (Université d'Orsay), Prof. Patrick Forterre (Université d'Orsay), Dr. Hervé Philippe (Université d'Orsay), Dr. Guy Brugerolles (Université de Clermont-Ferrand).

Para pedir información debe escribirse a:

XXXIVème Réunion du Groupement des Protistologues de Langue Française
Marie-Odile Soyer-Gobillard
Directeur de Recherche au CNRS
Observatoire Océanologique, Laboratoire Arago
Université P. et M. Curie, Paris 6, CNRS URA 117
BP 44 - 66 651 Banyuls-sur-mer Cedex-France

Fax 33-68.88.73.98

Microbiología SEM

PUBLICACIÓN DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

BOLETÍN DE SUSCRIPCIÓN, AÑO 1996

Importe de la suscripción, 1996*

Vol. 12, 4 números. Aprox. 600 pp.

España (I.V.A. incluido) 20.000 PTA

Internacional 180 US \$

Enviar boletín de suscripción a:

Editorial Garsi, S.A.

Príncipe de Asturias, 20

08006 Barcelona

Dirección de envío

Nombre y apellidos

Dirección

Código Postal Población

Provincia País

FORMA DE PAGO: Cheque nominativo que se adjunta

Domiciliación bancaria

* A partir del 1 de abril de 1996.



Código cuenta cliente

Entidad	Oficina	D.C.	Nº de cuenta

Banco/Caja de Ahorros:

Dirección:

Población:

País:

Titular de la cuenta:

Ruego a Vds. tomen nota de que hasta nuevo aviso deberán adeudar en mi
cuenta el recibo presentado anualmente por EDITORIAL GARSI, S.A.