

Volumen 12, nº 4  
Diciembre 1996  
ISSN 02 13-4101

PUBLICACION DE LA SOCIEDAD  
ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGIA

# Microbiología

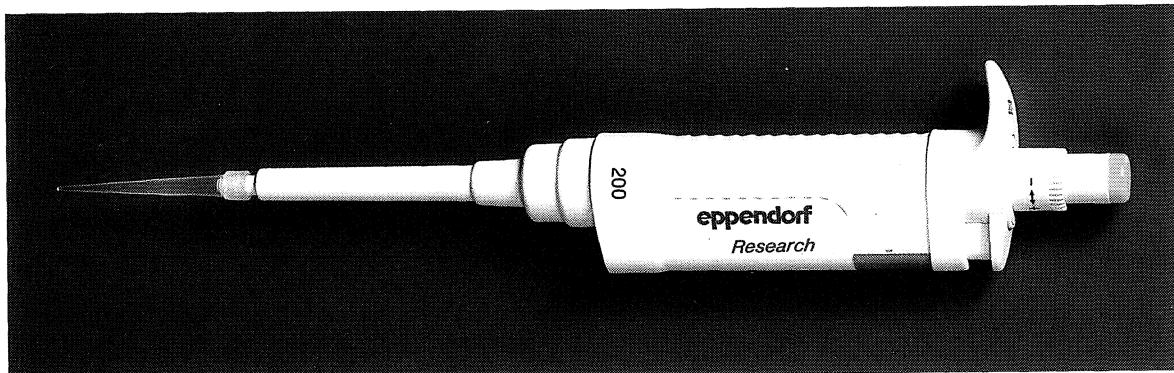


# eppendorf



## 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

# Hemoc ESP

LA NUEVA  
TECNOLOGIA  
CONDUCE A  
UNA MAYOR  
RAPIDEZ

ESP ofrece lectura



# **Microbiología SEM**

## **The Official Journal of the 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

Steven D. Goodwin, University of Massachusetts, Amherst, MA, USA

Harold W. Rossmoore, Wayne State University, Detroit, MI, USA

#### *Environmental Microbiology*

Victoriano Campos, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

Juan 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

Marie-Odile Soyer-Gobillard, Observ. Océanol., CNRS, Banyuls-sur-Mer, France

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 Dartmouth, MA, USA

#### *Microbial Biochemistry and Physiology*

John L. Ingraham, University of California, Davis, CA, USA

Hans G. Schlegel, University of Göttingen, Germany

Miquel Viñas, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain

#### *Microbial Ecology*

Juan J. Borrego, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

Yehuda Cohen, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel

Juan Iribarri, Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain

\* See addresses in pp. 516 and 679–680.

(continued on next page)

[MICROBIOLOGÍA SEM 12(4): 513–692 (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 1997: España, 20.000 ptas. (IVA incluido);

Internacional, 180 US \$.

IMPRIME: Graesal, Madrid.

DEPOSITO LEGAL: M-30455-1985.



EDITORIAL GARSI, S.A.  
GRUPO MASSON



ATENCION AL CLIENTE  
902 - 21 00 74

**APP**  
ASOCIACION  
DE PRENSA  
PROFESIONAL

### Editorial Board\*

---

#### *Microbial Genetics*

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

#### *Microbial Pathogenesis*

Patrick Berche, Fac. de Médecine Necker-Enfants Malades, Paris, France  
José A. Vázquez-Boland, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

#### *Microbial Taxonomy and Phylogeny*

Michael T. Madigan, University of Southern Illinois, Carbondale, IL, USA  
Hans G. Trüper, University of Bonn, Bonn, Germany  
Antonio Ventosa, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

#### *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, CA, USA  
Germán Larriba, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain  
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. 516 and 679–680.

[MICROBIOLOGÍA SEM 12(4): 513–692 (1996)]

---

#### *Internet location:*

The index and the whole contents of the latest issues of this Journal can be found in the Internet at the following addresses:

Index: <http://www.bcn.servicom.es/ImasD.kiosko.html#C-Vida>  
Contents: <http://morgat.udg.es/microbsem>

#### *Instructions to Authors:*

Information about the Journal, including instructions on the preparation and submission of manuscripts, is published on pp. 677–678 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 Perdiguer**

**Sociedad Española de Microbiología**

**Serrano, 117**

**E-28006 Madrid**

**Spain**

**Tel.: +34-1-5613381. Fax: +34-1-5613299.**

---

Preparation and layout of originals by:

Isabel Gallego

David Isamat

Eulàlia Massana

Mireia Mena

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**.

[MICROBIOLOGÍA SEM 12(4): 513–692 (1996)]

---

Editorial Board addresses

---

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

**Patrick Berche**  
INSERM U 411  
Fac. de Médecine Necker-Enfants Malades  
156, rue de Vaugirard  
75730 Paris. France

**Juan J. Borrego**  
Departamento de Microbiología  
Universidad de Málaga  
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**  
Microbiología  
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

**Steven D. Goodwin**  
Department of Microbiology  
University of Massachusetts-Amherst  
Amherst, MA 01003. USA

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

## CONTENTS

	Page
Editorial. COLWELL, R. R.....	519
Year's comments .....	523
Wastewater treatment and elimination of pathogens: new prospects for an old problem. LÓPEZ-PILA, J. M., DIZER, H., DORAU, W.....	525
Fungal siderophores in plant-microbe interactions. RIQUELME, M. ....	537
New molecular methods for the detection of hepatitis A and Norwalk viruses in shellfish. ROMALDE, J. L....	547
Monitoring by PCR amplification of the polyphosphate kinase gene added to natural water samples. LÓPEZ, N. I., PETTINARI, M. J., MÉNDEZ, B. S. ....	557
Cellular content of storage inclusions in purple sulfur bacteria determined by ultrathin sections. ESTEVE, I., MAS, J., GAJU, N., GUERRERO, R. ....	563
Free-living spirochetes from Cape Cod microbial mats detected by electron microscopy. TEAL, T. H., CHAPMAN, M., GUILLEMETTE, T., MARGULIS, L. ....	571
Purification and properties of $\beta$ -galactosidase from <i>Aspergillus nidulans</i> . DÍAZ, M., PEDREGOSA, A. M., DE LUCAS, J. R., TORRALBA, S., MONISTROL, I. F., LABORDA, F. ....	585
Effect of nutrients on alginic synthesis in <i>Azotobacter vinelandii</i> and characterization of the produced alginic. SABRY, S. A., GHANEM, K. M., SABRA, W. A. ....	593
New contributions to the wall polysaccharide structure of vegetative mycelium and fruit body cell walls of <i>Agaricus bisporus</i> . CALONJE, M., GARCÍA MENDOZA, C., NOVAES-LEDIEU, M. ....	599
Epidemiological markers of <i>Serratia marcescens</i> isolates causing nosocomial infections in Spain (1981–1991). BOQUETE, T., VINDEL, A., MARTIN-BOURGON, C., AZAÑEDO, L., SÁEZ-NIETO, J. A....	607
In vitro activity of fluconazole on <i>Candida albicans</i> . ABECIA, L. C., ARÉVALO, J. M., LÓPEZ, M. J. ....	613
Perspectives [In Spanish]	
Short history of the Spanish Society for Microbiology, VI. 1991–1995. GARCÍA MENDOZA, C. ....	621
David Vázquez (1930–1986). Remembrance of a time. VILLANUEVA, J. R. ....	631
The lost paradigms, Thomas S. Kuhn. CHICA, C. ....	641
Latin American journals: a small contribution to universal science. CETTO, A. M. ....	647
Opinion [In Spanish]	
Kenya: the scientific savanna. MAYOR, A. ....	651
The centennial of Ludwik Fleck. MARCÉN, J. J. ....	659
Basic research versus applied research. OLIVARES, J. ....	661
Book reviews .....	663
Books reviewed in volume 12 .....	675
Instructions to authors .....	677
Editorial Board addresses .....	679
Author index, volume 12 .....	681
Key word index, volume 12 .....	685

## ÍNDICE

	Página
Editorial. COLWELL, R. R. ....	519
Comentarios del año .....	523
Wastewater treatment and elimination of pathogens: new prospects for an old problem. LÓPEZ-PILA, J. M., DIZER, H., DORAU, W. ....	525
Fungal siderophores in plant-microbe interactions. RIQUELME, M. ....	537
New molecular methods for the detection of hepatitis A and Norwalk viruses in shellfish. ROMALDE, J. L. ....	547
Monitoring by PCR amplification of the polyphosphate kinase gene added to natural water samples. LÓPEZ, N. I., PETTINARI, M. J., MÉNDEZ, B. S. ....	557
Cellular content of storage inclusions in purple sulfur bacteria determined by ultrathin sections. ESTEVE, I., MAS, J., GAJU, N., GUERRERO, R. ....	563
Free-living spirochetes from Cape Cod microbial mats detected by electron microscopy. TEAL, T. H., CHAPMAN, M., GUILLEMETTE, T., MARGULIS, L. ....	571
Purification and properties of $\beta$ -galactosidase from <i>Aspergillus nidulans</i> . DÍAZ, M., PEDREGOSA, A. M., DE LUCAS, J. R., TORRALBA, S., MONISTROL, I. F., LABORDA, F. ....	585
Effect of nutrients on alginate synthesis in <i>Azotobacter vinelandii</i> and characterization of the produced alginate. SABRY, S. A., GHANEM, K. M., SABRA, W. A. ....	593
New contributions to the wall polysaccharide structure of vegetative mycelium and fruit body cell walls of <i>Agaricus bisporus</i> . CALONJE, M., GARCÍA MENDOZA, C., NOVAES-LEDIEU, M. ....	599
Epidemiological markers of <i>Serratia marcescens</i> isolates causing nosocomial infections in Spain (1981-1991). BOQUETE, T., VINDEL, A., MARTÍN-BOURGON, C., AZAÑEDO, L., SÁEZ-NIETO, J. A. ....	607
In vitro activity of fluconazole on <i>Candida albicans</i> . ABECIA, L. C., ARÉVALO, J. M., LÓPEZ, M. J. ....	613
<b>Perspectivas</b>	
Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, VI. De 1991 a 1995. GARCÍA MENDOZA, C. ....	621
David Vázquez (1930-1986). Recuerdos de una época. VILLANUEVA, J. R. ....	631
Los paradigmas perdidos, Thomas S. Kuhn. CHICA, C. ....	641
Revistas latinoamericanas: un grano de arena a la ciencia universal. CETTO, A. M. ....	647
<b>Opinión</b>	
Kenia: la sabana científica. MAYOR, A. ....	651
En el centenario de Ludwik Fleck. MARCÉN, J. J. ....	659
¿Investigación básica o aplicada? OLIVARES, J. ....	661
<b>Revisión de libros</b> ....	
Libros revisados en el volumen 12 .....	663
Normas para los autores .....	675
.....	677
Direcciones de los miembros del Consejo Editorial .....	679
Índice de autores del volumen 12 .....	681
Índice de palabras clave del volumen 12 .....	685

## Editorial\*

### Reto a la microbiología en América Latina: una epidemia de cólera a finales del siglo XX

En la últimas décadas los microbiólogos de los países latinoamericanos han sido testigos de grandes descubrimientos, que han constituido indudables avances científicos, entre los cuales cabe destacar la detección del agente causante de la enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana. Sin embargo, el mayor desafío que han tenido que afrontar en época reciente ha sido la devastadora progresión del cólera en los países de América Central y América del

---

\* Con esta contribución de Rita R. Colwell, *Microbiología SEM* da por concluida la serie de cuatro editoriales de este año dedicados a comentar algunos aspectos de la situación de la microbiología en América Latina, a cargo de científicos norteamericanos. Agradecemos la colaboración de los sucesivos autores: En el número de marzo, 12(1), Elio Schaechter y Cristián Orrego ofrecieron un panorama general. Francisco J. Ayala nos brindó sus comentarios y los datos recogidos en diversos estudios en el número de junio, 12(2). Harlyn O. Halvorson centró su aportación en describir la situación en Cuba y sus posibilidades de desarrollo, que él conoce de primera mano, en el número de septiembre, 12(3). Finalmente, Rita R. Colwell colabora en el presente número con los datos de un estudio sobre el inicio, desarrollo y expansión de la grave epidemia de cólera que afectó a los países de la región a partir de enero de 1991. En este número, además, en la sección Perspectivas se incluye la contribución de la investigadora mejicana Ana María Cetto, consistente en un análisis de las publicaciones científicas en los países de América Latina y su consideración (o falta de consideración) en el conjunto de la producción científica general. Como decíamos al poner en marcha esta iniciativa, los lazos históricos que nos unen a esos países tendrían que servir para algo más que para producir noticias televisivas y periodísticas de viajes de políticos y artistas. Hay un indudable resurgir científico en aquellos países, del que es una buena prueba el éxito del XIII Congreso Venezolano de Microbiología y VI Congreso Latinoamericano de Microbiología, celebrados conjuntamente en Caracas del 5 al 9 de noviembre de este año. Como investigadores, nos hemos de alegrar de ese resurgir científico, a cuyo desarrollo tenemos que contribuir en la medida de nuestras fuerzas. Por eso es de agradecer la respuesta de los científicos norteamericanos que gustosamente han aceptado la invitación a escribir en nuestra revista sobre este tema. Ellos han dedicado generosamente sus conocimientos y su tiempo a la consecución de ese objetivo.

Sur a partir de 1991. Tras más de un siglo sin ningún caso conocido de cólera, a finales de enero de 1991 se declaró una epidemia súbita en tres ciudades de la costa peruana. El primer brote epidémico se declaró en Chancay, ciudad situada a 60 km al norte de Lima. Al día siguiente se tuvo noticia de otro brote en Chimbote, puerto de mar a 400 km al norte de Chancay. El 31 de enero de 1991 se confirmaba oficialmente que el cólera había llegado a Perú. La semana siguiente se declararon casos de dicha enfermedad a lo largo de los 2000 km de costa peruana, desde la frontera con Ecuador, al norte, hasta la frontera con Chile, al sur. El 12 de febrero del mismo año ya se tenían noticias de casos producidos en el interior del país, en zonas situadas entre 50 km y 150 km de la costa. El 20 de febrero la epidemia había alcanzado los altiplanos andinos.

En los tres meses siguientes se produjeron brotes de cólera también en Ecuador, Colombia, Brasil y Chile. En agosto de 1991 la epidemia alcanzó Bolivia. En junio del mismo año, el cólera estaba presente en el sur de México, y a final de año ya había avanzado por los países de América Central. Después de detectarse su presencia también en Panamá en septiembre de 1991, la enfermedad llegó a Costa Rica y a Belice en enero de 1992. Se sucedieron distintos brotes epidémicos en 1992 y 1993, que alcanzaron prácticamente a todos los países de América Central y América del Sur. Sólo Uruguay quedó a salvo.

Dos aspectos de esta epidemia merecen ser comentados. Por una parte, es preciso reconocer la respuesta casi heroica de microbiólogos y profesionales de la salud pública a una epidemia de tal magnitud. En segundo lugar, hay que considerar su posible relación con el fenómeno climático conocido como “el Niño” y con otros fenómenos atmosféricos.

A finales de 1991 se había declarado el cólera en catorce países de América Central y América del Sur, con un total de 299.332 casos y 3993 muertes. Perú era el país más afectado, con el 77% de los casos y el 72% del total de personas fallecidas por la enfermedad. Los 963.171 casos y 9552 fallecimientos declarados hasta finales de 1994 en veinte de los veintiún países que comprenden América Central y América del Sur representaron una tasa de mortalidad debida al cólera del 0,99% para el período 1991–1994. El brote epidémico se produjo de manera inesperada, afectando masivamente a la población. En tales circunstancias, los microbiólogos y los laboratorios de salud pública no se encontraban preparados para afrontar una epidemia como aquélla. Las personas que trabajaban en hospitales y laboratorios no regatearon esfuerzos y actuaron generosamente, haciendo frente a una situación que superaba las previsiones más pesimistas.

En cuanto a la causa de la epidemia, parece existir una evidente relación entre la bacteria *Vibrio cholerae* y el plancton. Las pruebas acumuladas durante los últimos veinticinco años indican la existencia de un componente ambiental en la presencia del agente causal de la enfermedad. A principios de la década de los ochenta describimos el aislamiento de *Vibrio cholerae* en muestras procedentes de Brasil tomadas en medios naturales. La bacteria del cólera puede entrar en una fase de su ciclo vital en la cual es “viable, pero no cultivable”, lo que le permite resistir cambios ambientales significativos, así como el transporte a distancias muy largas.

La epidemia se ha relacionado con el vertido del agua de las sentinelas de los buques. Las autoridades de la Organización Panamericana de Salud barajaron la hipótesis de que la bacteria del

cólera hubiese llegado, en algún momento de 1990, a las costas del continente americano procedente de un carguero chino que vació el agua de su sentina en el puerto de Lima. El agua, utilizada como lastre, contendría gran cantidad de copépodos, con los cuales hemos detectado la asociación —quizá de comensalismo— de *Vibrio cholerae*. Sin embargo, eso no explicaría la aparición del brote epidémico en Chancay, 60 km al norte de Lima, ni del que al día siguiente se produjera en Chimbote, 400 km más al norte. La causa directa más probable de la epidemia hay que buscarla en el “bloom” de fitoplancton, y en el sucesivo de zooplancton, asociados al fenómeno de “el Niño” antes mencionado. “El Niño” es una alteración climática periódica (cada 4 a 10 años) que está relacionada con el aumento de la temperatura de la superficie del mar, en coincidencia con la aparición de grandes lluvias. Estas lluvias producen un mayor aporte de nutrientes desde la zona costera y, en consecuencia, cambios en la salinidad y en la disponibilidad de nutrientes del agua marina, lo que ocasiona variaciones en la composición del plancton.

De la epidemia de cólera de América Latina, de tan fatales consecuencias, tanto los microbiólogos como los profesionales de la salud pública pueden extraer varias lecciones. La más importante es la necesidad de ser conscientes de que las enfermedades infecciosas, incluso las que parecen haber pasado a la historia, no pueden considerarse dominadas. En el caso de esta enfermedad en la que, debido a la persistencia de *Vibrio cholerae* en el medio y a su dependencia de los ciclos ambientales, el agente causante difícilmente podrá ser erradicado. Lo primero que hay que hacer es controlar el brote aplicando las medidas higiénicas y sanitarias adecuadas, sobre las personas y sobre los productos de consumo susceptibles de contaminación, y controlar al máximo la calidad del agua potable. También se hace patente la necesidad que tienen los países latinoamericanos de formar profesionales con una formación en microbiología clásica fundamental, así como en la moderna microbiología molecular. En los aspectos sanitarios de la vida pública, la cooperación científica con las instituciones responsables es algo no sólo aconsejable sino altamente necesario a la hora de conseguir resultados beneficiosos que repercutan sobre la salud de la comunidad.

En relación con el tema de este editorial, y concretamente con el inicio del brote epidémico en Perú, recordamos aquí una noticia publicada entonces en la prensa. Se informaba que el presidente de Perú, posiblemente queriendo impedir la alarma que podía cundir entre la población por la relación —perfectamente justificada— que algunos medios informativos atribuían a la enfermedad con algunos alimentos habituales, como el pescado, tomó en un restaurante uno de los platos típicos del país, consistente en pescado crudo.

Se trata, posiblemente de uno de los mejores ejemplos para conseguir lo que el mandatario se proponía, y el peor de todos para lograr el control de una enfermedad que, como el cólera, si no se toman las medidas necesarias, puede tener consecuencias catastróficas. Es también un ejemplo del divorcio existente entre política y ciencia, más acusado quizás en países de menor desarrollo, y de la ignorancia imperdonable en quienes tienen en sus manos la “suerte” de los ciudadanos de una comunidad. Un mínimo asesoramiento de las autoridades responsables, y del presidente, por parte de los expertos en microbiología y en salud pública, seguramente hubiera podido evitar una tragedia de tamañas características o, por lo menos, ayudar a detener su expansión. Pero, es la historia

omnipresente..., e interminable, más o menos disfrazada y con cambios en las coordenadas geográficas.

Finalmente, hay que aprender otra lección de esa dolorosa experiencia, y es que el medio ambiente, especialmente el clima y los cambios que puede experimentar, constituyen un componente importante de las epidemias. Esto es particularmente aplicable al caso de enfermedades que, como el cólera, han vuelto a aparecer con fuerza en los últimos años en distintos países. El conocimiento del ciclo de la bacteria responsable y de su estacionalidad, ligado al conocimiento del ciclo de sus hospedadores planctónicos, permiten una detección temprana, gracias al seguimiento, mediante satélites artificiales, de diversos indicadores de las condiciones atmosféricas y oceánicas.

Los microbiólogos, junto con los otros profesionales de la salud de todos los países, se enfrentan a un reto: combatir la aparición y expansión de las enfermedades infecciosas, y para ello, junto con la adecuada profilaxis, no hay mejor arma que informar y educar a la población y dotarse de los recursos técnicos y humanos necesarios para prevenir los brotes epidémicos. Ponerse en el buen camino es menos costoso de lo que muchos creen o quieren hacer creer y, en ocasiones, las cifras económicas que se manejan no son más que una excusa. Es preciso olvidar conceptos restrictivos del pasado, para lo cual hay que exigir la adopción de un enfoque global en la enseñanza y en la práctica de la microbiología del siglo XXI, que está ya a las puertas.

**Rita R. Colwell**

*University of Maryland Biotechnology Institute*

Traducido y adaptado por Mercè Piqueras y Carmen Chica

Redacción de *Microbiología SEM*

---

Rita R. Colwell es la actual presidenta del University of Maryland Biotechnology Institute. Ha sido también presidenta de la American Society for Microbiology (ASM), de la American Association for the Advancement of Science (AAAS) y de la International Union of Microbiological Societies (IUMS). Es persona de reconocido prestigio internacional y con un gran conocimiento de la política científica y del desarrollo de la investigación en los países de América Latina.

*Correspondencia:* Rita R. Colwell. President. University of Maryland Biotechnology Institute. 4321 Hartwick Road, College Park, MD 20740. USA. Tel.: +1-301-4030501. Fax: +1-301-4548123.

## Comentarios del año

Próxima a caer la última hoja del calendario, es el momento de hacer balance del año que termina. Un año prolífico en noticias científicas, tan espectaculares en algunos casos como lo fuera, en 1995, el descubrimiento de las bacterias "jurásicas". De las que, por cierto, no hemos vuelto a tener noticia, por lo que seguimos en la duda de la validez del experimento utilizado para "revivirlas" (véase *Microbiología SEM 11*, 427–428).

Un tema específico, la encefalopatía esporongiforme bovina, y su posible relación con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, que afecta a la especie humana, ha llenado las páginas de revistas científicas y prensa diaria. La posibilidad de una relación entre ambas enfermedades ha tenido consecuencias en ámbitos diversos, desde el económico, con el desastre que ha afectado a la ganadería británica, hasta el gastronómico, cambiando los hábitos de alimentación de muchas personas. La política científica de algunos países europeos se ha visto afectada, al convertirse en tema prioritario de investigación. La población en general, los llamados ciudadanos de a pie, ha recibido una lección de microbiología, y unos agentes infecciosos desconocidos para la mayoría, los priones, han ocupado los titulares de revistas, periódicos y programas de televisión.

Los microorganismos han sido protagonistas de algunas de las noticias que más han dado que hablar este año en el mundo científico. El 16 de agosto, *Science* (vol. 273, pp. 924–930) informaba del descubrimiento de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) y de glóbulos de carbonato en un meteorito de 1,9 kg de peso procedente de Marte, que habría caído hace unos 13.000 años en la Antártida, donde fue hallado en 1984. Los glóbulos de carbonato tenían una textura y tamaño similares a algunos precipitados bacterianos. Su posible formación por procesos biogénicos explicaría otras de las características que se observaron en el meteorito, entre ellas, la presencia de PAHs. Una semana más tarde, la misma revista publicaba la noticia de la secuenciación del genoma de *Methanococcus jannaschii* (*Science*, vol. 273, pp. 1058–1073), que ha sido la primera arqueobacteria (o Arquea) en la que se conocen todas las bases de su DNA. Con ésta son ya cuatro los organismos celulares con el genoma secuenciado, y publicado. Tres procariontes (además de *M. jannaschi*, lo fueron, el año pasado, *Haemophilus influenzae* y *Mycoplasma genitalium*; véase también *Microbiología SEM 11*, 427–428) y un eurocarionte (*Saccharomyces cerevisiae*).

El 7 de octubre, *Nature* (vol. 384, pp. 55–59) publicaba los resultados del estudio, mediante espectrometría de masas de microsonda iónica, del fraccionamiento isotópico del carbono ( $\delta\text{‰}$   $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) en muestras de rocas de la formación de Isua, en Groenlandia, de origen metamórfico y de edad aproximada de 3800 millones de años. Estos datos podrían confirmar la existencia de actividad biológica en aquella época. La noticia, publicada con grandes titulares, corroboraría algo que ya se suponía, dadas las características de los microfósiles más antiguos conocidos (los estromatolitos de Warraona, Australia, de hace 3500 millones de años, en los que se han observado bacterias y cianobacterias bastante evolucionadas): que la vida pudo aparecer en la Tierra desde el momento en que hubo agua líquida, hace algo más de 3800 millones de años.

En cuanto a *Microbiología SEM*, a finales de 1996 se mantiene el optimismo en el equipo de redacción. El número de páginas por número ha seguido aumentado. Pero es posible que la revista haya alcanzado ya la fase estacionaria; no por falta de artículos y entusiasmo por parte de quienes la realizan, sino por la limitación de recursos para cubrir los gastos que ello representa. Los cuatro números del volumen 12 comprenden un total de 692 páginas, con 67 artículos y 28 reseñas de libros. Todos menos tres de los artículos de investigación directa o de revisión (un total de 48) se publicaron en inglés. Se han recibido 108 originales, que han supuesto una tarea laboriosa para los revisores, cuya labor nunca agradeceremos lo suficiente, y para el personal de la redacción. Ha habido un excelente número monográfico dedicado a patogenicidad microbiana (el de junio, coordinado por J. A. Vázquez-Boland y J. Navas, de la Universidad Complutense de Madrid).

Los lectores habrán observado que el formato de página ha pasado a tener dos columnas, como la mayoría de las revistas especializadas. Otros cambios más profundos no son fácilmente detectables. Por una parte, la incorporación al ordenador mediante el escáner de todas las imágenes de los artículos (dibujos y fotografías, que los autores suelen remitir en papel). Las imágenes se pasan por un escáner, lo cual implica a veces hacer modificaciones para aumentar la uniformidad, pero exige mayor cuidado, para no introducir errores. Por otra parte, está el registro directo de texto, fotografías y dibujos, ya listos para imprimir, en un disco óptico, todo lo que antes hacía la imprenta a partir de originales en papel. Esto disminuye la posibilidad de errores y aumenta la calidad y profusión de imágenes, lo que se hace patente en este número, donde al final de la historia de la SEM, que C. García Mendoza nos ha narrado magníficamente a lo largo de año y medio, se incluyen las fotografías de los Presidentes y Secretarios de la Sociedad, desde su fundación hasta 1995.

Otra novedad es la incorporación de la revista a Internet. Primero, se hizo tímidamente, sólo los índices. Posteriormente, gracias a la desinteresada colaboración y pericia informática del grupo de microbiología de la Universidad de Girona, se introdujo el número completo. La revista tiene ahora una hoja web localizable en la dirección <<http://morgat.udg.es/microbsem>>, que es consultada cada vez por más personas. Allí hay también referencias que, mediante hipertexto, conducen a otros puntos de la red de interés microbiológico. La incorporación de *Microbiología SEM* a Internet aumentará su difusión y la cita de sus autores. A través de Internet hemos recibido —y resuelto— consultas sobre localización de libros, direcciones de investigadores, utilización de material, etc. La presencia de *Microbiología SEM* en Internet representa su inclusión en el mayor banco de datos que existe en la actualidad.

Basado en metodologías en continua evolución, el soporte digital es un complemento de toda publicación, que hay que utilizar y desarrollar, aunque ello implique un aumento notable en la tecnología necesaria (este número ocupa una memoria de 110 Mb) y en el coste económico.

Hace un año afrontábamos con ilusión unos retos, algunos de los cuales creemos haber superado. La periodicidad y la puntualidad en la aparición de cada número son un hecho objetivo. La calidad, son los lectores quienes deben apreciarla; a juzgar por los elogios recibidos, nos atrevemos a decir que es satisfactoria. Esperamos que 1997 sea el año en que aprobemos la asignatura aún pendiente del acceso a los índices internacionales donde aún no aparecemos. Las notas que el Institute for Scientific Information nos ha concedido en los "exámenes parciales" así lo hace suponer.

**Ricard Guerrero**  
Director-Coordinador

## Wastewater treatment and elimination of pathogens: new prospects for an old problem

Juan M. López-Pila,\* Halim Dizer, Wolfgang Dorau

*Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Umweltbundesamt, Berlin, Germany*

Received 29 May 1996/Accepted 6 September 1996

---

### Summary

Although the development of wastewater treatment technology is more than one hundred years old, most wastewater treatment plants existing today do not eliminate pathogens satisfactorily. Even in highly developed nations, receiving waters, serving in many cases as drinking water resources, are contaminated with pathogens. Surface waters also contain large concentration of phosphate due to long lasting wastewater discharges. Cyanobacterial and algal overgrowth is the consequence. Present drinking water technology only partially overcomes the pollution; it can not be ruled out that drinking water originating from polluted resources contains pathogens. This situation frequently goes on unnoticed because current indicator organisms are not representative for all pathogens. As studies have shown that small concentrations of pathogens also pose a risk for the consumer health, this state of affairs is a matter of concern. Microfiltration technology is able to significantly eliminate bacteria and protists from wastewater. Viruses, although smaller than the pore size of the filters, are reduced too because, in wastewater, they are frequently bound to larger particles. If the microfiltration of wastewater is preceded by the addition of coagulants for the precipitation of phosphate, the precipitate will be retained by the filter. The effluent obtained contains very low concentrations of phosphate. As viruses also adsorb to the precipitate, the amount of viruses eliminated increases and with increasing amounts of coagulant they become undetectable.

**Key words:** wastewater treatment, water pollution, cyanobacterial–algal overgrowth, microfiltration, public health

---

\* Correspondence to: Juan M. López-Pila. Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene. Corrensplatz, 1. 14195 Berlin. Germany. Tel.: +49-30-89031394. Fax: +49-30-89031830. E-mail: lopez@circe.uba.de

## Resumen

Aunque la tecnología para el tratamiento de aguas residuales se inició hace más de cien años, en los efluentes de la mayoría de las plantas de tratamiento sigue habiendo gran cantidad de patógenos. Esto sucede incluso en países desarrollados, de cuyos ríos y lagunas se extrae agua potable, pero que son, al mismo tiempo, recipientes de aguas residuales, y pueden estar altamente contaminados. En muchas aguas, debido a una carga de aguas residuales de muchos años, hay altas concentraciones de fosfato, lo que origina una elevada eutrofia. La consecuencia es una superpoblación de cianobacterias y de algas. La tecnología actual para la producción de agua potable no siempre elimina completamente la contaminación, por lo que no se puede descartar la presencia de patógenos en esas masas de agua. Esta situación pasa desapercibida porque los indicadores actuales no son suficientemente representativos para todos los gérmenes patógenos. Se ha demostrado que incluso bajas concentraciones de patógenos representan un riesgo para la salud pública, por lo que esta situación es inquietante. La microfiltración elimina de manera significativa bacterias y protistas de las aguas residuales. Los virus, aun con un diámetro inferior al de los poros de la membrana, también reducen su número notablemente, pues tienden a absorberse a otras partículas, que quedan atrapadas en la membrana. Si al agua residual se le añaden coagulantes para la precipitación de fosfato, el precipitado es retenido en la membrana, quedando una concentración de fosfato muy baja. Los virus, que también se absorben al precipitado, son retenidos con éste, y desaparecen del filtrado a partir de una cierta concentración de coagulante.

---

### **Wastewater treatment and removal: a milestone in the prevention of infectious diseases**

In the Europe from the middle ages and until halfway the former century, human and animal wastes were piled up or kept in underground reservoirs and removed only from time to time. The piles of organic wastes would decompose, filling the air with a fetid odor, which, especially during the warmer season, must have been very unpleasant. Lechates of the decomposing wastes mixed with fresh fecal matter used to flow openly through the streets to contaminate adjacent creeks and rivers (18).

As early as 1840, Chadwick started delivering a series of reports with the findings of the investigation committee that had been commissioned by the English Parliament to study the sanitary situation of the major English cities

(3). The committee came to the conclusion that, from fifty cities, only one could boast an almost satisfactory sanitation, whereas in seven the situation was tolerable, and it was detestable (*sic*) in the remaining forty-two. Higher mortality rates were linked to a poor sanitary situation. In accordance with the knowledge of the time, at which the role of microorganisms as pathogens had not yet been recognized, the main effect of the poor sanitary conditions was seen in the production of harmful exhaustion from the wastes.

Virchow recalls in 1876:

“...the water reaching the street channels (was) filthy, and particularly the water coming from households, stables and factories. Many older Berliner citizens remember the intensive stench when, decades ago, the water used to fill the open sewers in the streets; a situation that aggravated during the summer. The clogging of the sewers gave rise to repulsive fouling prod-

ucts which were so noxious, that a rapid solution had to be looked after" (19).

Although this situation was considered intolerable, there were presumably two single circumstances which finally prompted the building of wastewater systems: the need for plenty of wholesome water in the growing cities undergoing rapid industrialization, and the cholera epidemics, responsible for 60,000 deaths in Europe in the nineteenth century.

In the second half of the nineteenth century great efforts were undertaken in the construction of channel systems to remove wastes from the urban areas fast and efficiently, the goal being to rapidly flush the wastes away from the population and into the rivers or the sea. While these measures rapidly improved the living conditions of the people, they brought about a displacement of the contaminants from the cities into the rivers. Clearly, the river pollution created in this manner sharply collided with the increasing requirements for clean water in the rapidly growing cities. It was deemed necessary to somewhat clear and purify the wastewater before it was discharged into the streams.

Initially the clearing of the wastewater was performed mechanically, by means of screens that coarsely retained suspended pollutants down to a given size. Chemical flocculants combined with sedimentation were also included in the purification process. The goal of the mechanical and chemical wastewater clearing processes was to free the water from suspended pollutants, as well as from such substances ready to attach to the flocs, and be removed with them.

But already at the end of the nineteenth century, wastewater technology started taking advantage of biological processes. First the wastewater was collected in ponds (infiltration fields) and infiltrated into the soil. Thanks to the oxidation going on in the infiltration ponds and to the passage through the soil, the wastewater

was purified. It was then collected in drainage trenches and discharged into the streams.

Subsequently, it was observed that the infiltration beds carried out the purification of the wastewater by means of the microorganisms living there. Once this was realized, the aim was to build filters with coarse material that would allow the establishing of the microorganisms on its surface but whose structure were so spongy as to enable the wastewater to percolate without clogging. The trickling filter was borne.

Santo Crimp, Dibdin and Corbett in England were the developers of the trickling filters after having carried out numerous experiments and taking advantage of the work undertaken by Clarke and others in Massachussets (4, 7, 10). In trickling filters, the wastewater rinses through a pile of coarse material, pebbles, coke or similar structures usually not larger than 30 cm in cross section. On the surface of the material, an active biofilm establishes soon, which oxidizes the wastewater and partially purifies it.

Eventually it was discovered that a solid support for the oxidizing microflora was not necessary, provided the microorganisms were constantly supplied with oxygen, by either aeration or agitation. A series of work led to the development of the activated sludge purification plants basically as they are in operation today (for a summary on the historical development of the activated sludge principle see ref. 4 and 14).

In activated sludge basins the wastewater is vigorously aerated, the supply with oxygen giving rise to an active biomass, the sludge floc, which harbors both microorganisms which oxidizes the organic matter in the wastewater, and microorganisms which utilize the metabolites from the oxydation processes. In addition to chemically degrading impurities, the flocs bind solid particles and colloids, sequestering them from the water. The effluent is continuously freed from the sludge by sedimentation.

From the 1970s, modified activated sludge plants have been put in operation. In these, thanks to a sophisticated design of the basins and the aeration devices, the concentration of oxygen in the different regions of the basins can be controlled. This enables the elimination of ammonia by the induction of nitrification and denitrification reactions during the passage of the water through the plant. Similarly, the phosphorous concentration of the wastewater can be reduced by creating conditions favoring the growth of phosphorous accumulating bacteria, which are removed by sedimentation afterwards.

### **The removal of pathogens during wastewater treatment is incomplete**

Wastewater treatment initiated approximately one hundred and fifty years ago on the grounds that human and animal wastes were able to cause disease. However, the performance of wastewater treatment procedures with respect to the elimination of pathogens continues to be unsatisfactory. Developments based on microfiltration technology which have emerged in the last decade could dramatically improve this situation.

Considerations on the removal of pathogens were not made until the role of microbes in causing disease was recognized. Once this role was established, the call for disinfection of the treated water was rapidly made. As early as in the last decade of the nineteenth century, Prussian authorities issued regulations mandating that the concentration of living bacteria in the effluent of wastewater treatment facilities be no higher than 300 in one ml. Fulfillment of this requirement met with considerable difficulties and the requirement was dropped soon.

Even after the introduction of improved procedures of wastewater treatment, the demand

that the discharge of pathogens into the river be minimized was maintained by public health officials in many countries. At the turn of the twentieth century, a number of chemicals was used for treating wastewater. After experimenting with numerous coagulating or disinfecting chemicals, chloride of lime ( $[3 \text{ CaCl(OCl)} \cdot \text{Ca(OH)}_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) was proposed as a low cost and efficient disinfectant (6).

Until today, chlorinating of treated wastewater is carried out extensively. However, chlorination gives rise to undesirable byproducts suspected to damage humans and the environment, for which it is being increasingly given up. Chemical disinfection of wastewater has some inherent disadvantages, which derive from the tendency of microorganisms to attach to suspended solids or even to be embedded in them. This interaction with other particles protects the microorganisms and causes the failure of the disinfectant to inactivate them. Unfortunately, the behavior of indicator organisms is not necessarily representative for pathogens, as it happens in the case of enteric viruses in primary effluent (i.e. mechanically treated wastewater). From the ratio of the indicator bacteria to viruses before and after treatment with chlorine, it seems obvious that viruses are much more resistant to the disinfection than the indicator bacteria (1).

Even in modern activated sludge plants, where the retention time of the water is high, due to the added tasks of reducing ammonia and phosphate, the output of pathogens might be considerable. As an instance, Fig. 1 shows the average performance of the Ruhleben plant in Berlin. This plant has been designed for the biological elimination of ammonia and phosphorous. In spite of a detention time of approximately 24 h, the amount of pathogens leaving the plant is by no means negligible. The columns of Fig. 1 have been calculated from the input and output values of indicator bacteria and enteric viruses. The

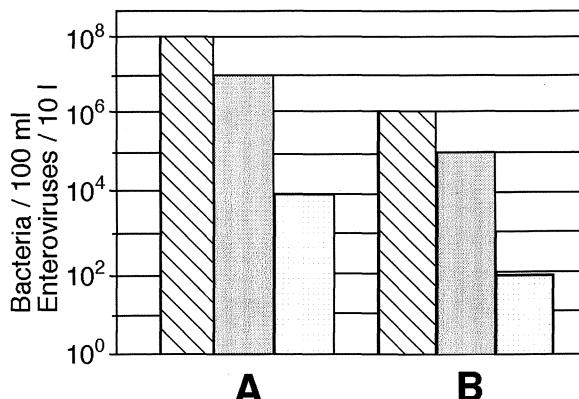


FIG. 1. Average concentration of *Escherichia coli* (left-hand side column), fecal streptococci (center column) and enteric viruses (right-hand side column) at the inlet (A) and outlet (B) of a wastewater treatment plant in Berlin.

average viral concentration of the effluent leaving the plant was approximately 80 infectious units in 10 liters.

#### The capacity of receiving waters to remove pathogens is usually overestimated

All the procedures for the treatment of wastewater used until today, including those comprising chlorination, cause an incomplete elimination of pathogens and leave to the "natural" cleansing properties of the receiving waters the task of further reduction. It seems, however, that the last factor is overestimated. In densely populated areas, the receiving waters maintain a high concentration of pathogens, also because one discharge follows up closely the previous one.

The small river Wuhle, a tributary of the Spree, in Berlin, is an example for this situation: it serves as receiving water for a large wastewater treatment plant which releases an average of  $70 \text{ m}^3$  secondary effluent per minute. Downstream of the discharge, no further discharges other than rainwater occur. As shown in Fig. 2, samples were taken from the creek starting at the point of discharge. Care was taken that the fur-

ther samples downstream were taken at the moment when the originally discharged water passed by. In other words, in average the body of water sampled was always the same. As the figure shows, the reduction of *Escherichia coli* or bacteriophages is moderate, and the proportion of pathogens eliminated in the seven hours which the water takes to run 17 km is presumably not higher.

As a rule, the discharge in the rivers of poorly treated, but also of biologically treated wastewater, leads to fecal contamination that compromises not only recreational activities but also the production of drinking water itself. The Saale river, in the state of Saxonia, Germany, as it passes the cities of Merseburg and Halle, may be regarded as an instance for this situation. Due to discharges of wastewater, this river presents the profile of fecal contamination showed in Fig. 3.

Surface waters are, as it is the case with the Saale river, frequently used for the obtention of drinking water. The fecal contamination present in numerous streams makes elaborated—and expensive—technologies for drinking water treatment necessary. But drinking water technology is not as reliable for the elimination of pathogens

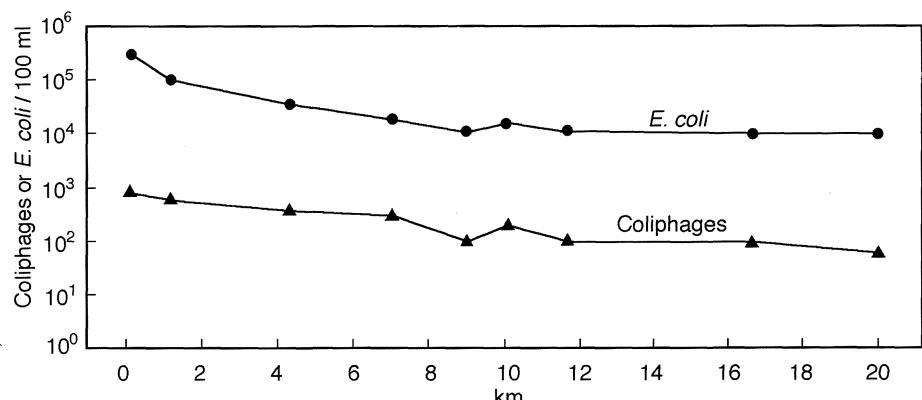


FIG. 2. Concentration of *Escherichia coli* and coliphages along a creek receiving treated wastewater at kilometer 0, but otherwise free of further discharges until it ends at the river Spree (Berlin) at kilometer 20. (From ref. 12.)

as it is generally assumed. In fact, the diversity of pathogens found in contaminated water is high, and it is not warranted that each and every one of the microorganisms is removed with the same efficiency by the technology used (usually flocculation/sand filtration plus disinfection by chlorine, chlorine dioxide, or UV). In fact, the UV dosage needed by different waterborne pathogens to be inactivated by 90% differs considerably (2). Accordingly, the bacterial indicators of pollution currently taken for the monitoring of water are not necessarily representative for all pathogens.

Preparation of drinking water, when it is carried out with polluted waters, might allow the leaking through of pathogens in quantities not negligible. Therefore, the production of drinking water with high standards depends to a large extent on the measures taken for the prevention of pollution in surface waters.

#### Even small concentrations of pathogens might pose a significant health risk

From theoretical considerations, based on observations of infected persons for whom the dose of pathogens received was known, the prob-

ability to become infected or sick from small doses of pathogens (potentially present in drinking water which meets current bacteriological standards) can be estimated. For some pathogens, the doses necessary to cause infection are quite low (17). The chance to become infected with rotavirus or hepatitis A virus, when these pathogens are present at low concentrations in drinking water, is not negligible (8).

Epidemiological studies have already shown that the consumption of drinking water meeting bacteriological standards caused more gastroenterological disorders than water from the same distribution system that had been passed through an additional filter (16).

It seems indeed that current procedures for the processing of drinking water might produce a hygienically unsatisfactory water when the raw water resources are polluted. Of course, additional technical efforts of drinking water treatment may be able to overcome the deficiencies of the raw water, and to inactivate or remove yet a higher percentage of microorganisms. However, common sense indicates that it is better to get rid of pollution right where it arises than to allow contamination to spread out in the environment, from where its removal might occur too late and at costs too high.

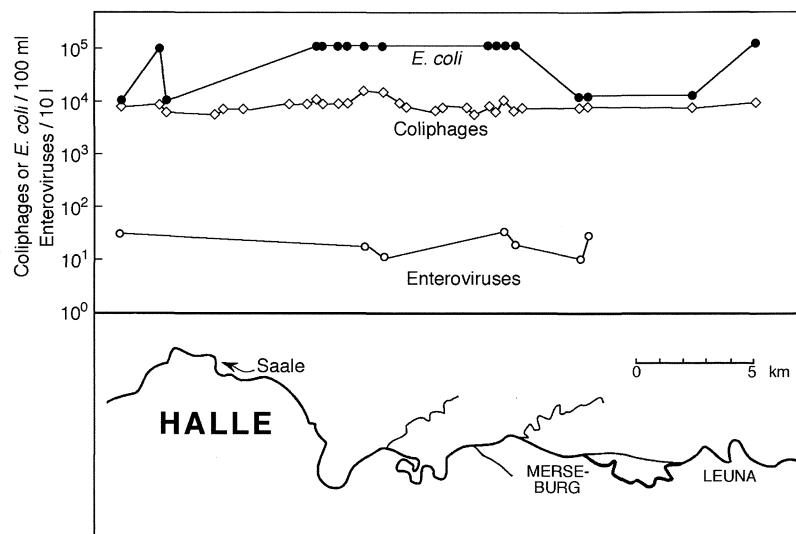


FIG. 3. Concentration of *Escherichia coli*, bacteriophages and enteroviruses in the river Saale in Saxonia, Germany, as it passes the cities of Merseburg and Halle.

Therefore, it seems more reasonable to spend economical resources improving wastewater treatment than implementing increasingly elaborated drinking water technologies. Besides, improving the cleaning up of wastewater has the bonus of clean surface waters, safe for swimming and other recreational purposes.

After many decades of discharging effluents in the streams, the concentration of nutrients, essentially nitrogen and phosphorous compounds, have reached concentrations which seriously compromise natural aquatic ecosystems. Moreover, blooms of cyanobacteria give rise to the production of compounds toxic to animals and humans. Cases of acute poisoning after drinking contaminated water have been observed. Even longtime exposures to drinking water containing small concentrations of cyanobacteria toxins have also been linked to the development of chronic liver damage. Removal of phosphate from wastewater is therefore crucial if, in the long range, hazards for individuals and the environment are to be prevented.

#### Microfiltration technology can be applied for removing pathogens and phosphate from wastewater

Microfiltration is the simplest form of membrane filtration. It is a particle filtration through porous polymers or ceramic materials. The most significant characteristic of microfiltration is its function as an absolute barrier against particles larger than its pore size. Bacteria of an average size of 5  $\mu\text{m}$  and all protists or parasites are significantly larger than the pore size of 0.2  $\mu\text{m}$ —the kind of the units dealt with here—and are therefore retained simply by the difference between the size of the microorganism and the pore size.

The mechanism of retaining viruses is different. It is a common feature of viruses that they have a negative electrical surface charge and readily adsorb to particles. Fecal viruses that leave human or animal bodies are already attached to particles, or become attached to them during their long passage through the sewerage

TABLE 1. Some studies on microfiltration of wastewater

Bacteria		Viruses		Parasites		Ref.
Feed water	Permeate	Feed water	Permeate	Feed water	Permeate	
max. $2.67 \times 10^6$ (in 100 ml)	None detected	$1.3 \times 10^6$ (in 25 l)	$2.8 \times 10^4$	Cysts of <i>Giardia muris</i> , $2.75 \times 10^4$	None detected	5
$5 \times 10^6$ (in 100 ml)	None detected	$10^2$ - $10^6$	None detected	-	-	11
ca. $10^6$ (in 100 ml)	None detected	-	-	-	-	15
$10^{8.3}$ (total)	None detected	$10^{12}$ (total)	None detected	$10^{5.2}$ (total) <i>Amoeba</i> cysts <3 $\mu\text{m}$ 7500 (in 1 l)	None detected 2.30 (in 1 l)	9
$2.6 \times 10^{10}$ (in 100 ml)	None detected	-	-	<i>Amoeba</i> cysts >15 $\mu\text{m}$ : 240,000 (in 1 l) <i>Tenias</i> and <i>Ascaris</i> eggs 3 (in 1 l)	<100 (in 1 l)	13
					0	

and sewage plant. Because of their more or less complete adsorption to particles, viruses are also retained to a high degree.

In the past six years efforts have been undertaken to apply filtration technology to wastewater treatment (Table 1). We were especially eager to test the performance of microfiltration at eliminating viruses and here we report results from a microfiltration plant for processing biologically treated wastewater.

#### Reduction by microfiltration of the numbers of bacteria and viruses, and of the concentration of phosphate

**Bacteria.** Samples from biologically treated wastewater entering the filters and from the filtrate were examined for the presence of *E. coli*, fecal streptococci and *Salmonella* during a period of several months. The results are shown in Table 2. As a rule, the filtrate was free of these bacteria no matter whether the wastewater was flocculated or not.

The main bacterial pathogens in domestic wastewater are *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia*, *Campylobacter* and virulence factor-bearing *E. coli*. All these pathogens are removed as the pore size of the filters are considerably smaller than the diameter of the bacteria. As our results show, the filtrate of the wastewater was indeed essentially free of bacteria in 100 ml. These results are in accordance with the results of other studies on microfiltration.

**Bacteriophages.** Viral pathogens are regularly found in biologically treated wastewater. Coliphages were taken as organisms to test the retention capacity for viruses far smaller than the pore size of 0.2  $\mu\text{m}$  of the filters. Coliphages are non-pathogenic, easily to measure and present in sewage in fairly high concentrations. Though the test viruses are very small in comparison to the pores, few viruses were found in the filtrate in a test volume of 100 ml (Fig. 4). This may be interpreted as the viruses being to a large degree adsorbed to particles. The addition of iron salts improved the already good retention of viruses so that after a certain dosage no viruses were

TABLE 2. Reduction by microfiltration of several bacteria present in a secondary effluent

Week	<i>Escherichia coli</i> (in 100 ml)		Fecal streptococci (in 100 ml)		<i>Salmonella</i> spp. (in 1000 ml)	
	Before filtration	After filtration	Before filtration	After filtration	Before filtration	After filtration
1	$\geq 10^6$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^2$	<1
2	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^2$	<1
3	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^2$	<1
4	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^3$	<1	$\geq 10^2$	<1
5	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^3$	<1	$\geq 10^2$	<1
6	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^3$	<1	$\geq 10$	<1
7	$\geq 10^5$	<10	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
8	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^3$	<1	$\geq 10$	<1
9	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
10	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
11	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
12	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
13	$\geq 10^6$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^2$	<1
14	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
15	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
16	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
17	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
18	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^3$	<1	$\geq 10$	<1
19	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
20	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
21	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
22	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10$	<1
23	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^3$	<1	$\geq 10$	<1
24	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^3$	<1	ND*	ND
25	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^4$	<1	ND	ND
26	$\geq 10^4$	<1	$\geq 10^4$	<1	ND	ND
27	$\geq 10^3$	<1	$\geq 10^4$	<1	ND	ND
28	$\geq 10^5$	<1	$\geq 10^4$	<1	ND	ND

\* ND, not determined.

found in the test volume of 100 ml. Control measurements of pathogenic faecal viruses confirmed the results achieved with coliphages.

**Reduction of the concentration of phosphorous compounds.** The main results are summarized in Table 3. The particulate phosphorous compounds were already substantially reduced

by filtration in the absence of flocculant. When iron salts were added as flocculant, orthophosphate was reduced to 7–3 µg/l, depending on the concentration used. The amount of particulate phosphorous compounds found after filtration of the (flocculated) effluent was probably due to a protracted precipitation occurring between the

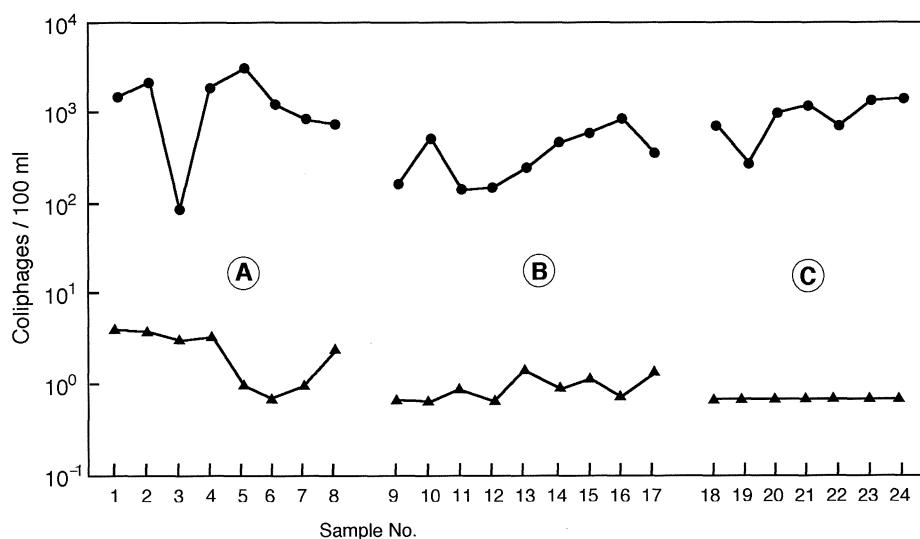


FIG. 4. Concentration of bacteriophages in biologically treated wastewater before (circles) and after (triangles) microfiltration. The numbers represent: (A) No flocculant added; (B) 14 mmol Fe/m<sup>3</sup> added to the treated wastewater; (C) 28 mmol Fe/m<sup>3</sup> added.

time point of microfiltration and the time when the analysis was carried out. Although iron salts were added for the phosphorus elimination, they assumed the double function of reducing the

virus and the phosphorus concentration. The concentration of precipitable phosphorous compounds of about 3–6 µg/l PO<sub>4</sub>-P approached concentrations near the limit of detection.

TABLE 3. Removal of phosphorous compounds by flocculation combined with microfiltration

Time span	mol Fe/m <sup>3</sup>	Treated water, before filtration			Treated water, after filtration		
		TP*	SP*	OP*	TP	SP	OP
		[µg/l]	[µg/l]	[µg/l]	[µg/l]	[µg/l]	[µg/l]
07.12.93–18.05.94 (x = 62)	–	186	93	<30	60	–	<26
19.05.93–28.07.94 (x = 28)	0.014	122	71	34	34	27	7
31.07.93–04.09.94 (x = 16)	0.028	157	71	38	27	22	4
06.09.93–06.11.94 (x = 24)	0.096	224	85	35	21	16	3
08.11.93–13.12.94 (x = 16)	0.062	258	79	30	22	17	3

\* Abbreviations: TP, total amount of phosphorous compounds; SP, soluble phosphorous compounds; OP, orthophosphate.

## Costs

Estimated costs (in German marks) for a plant size of about 50,000 m<sup>3</sup> per day are the following (manufacturers' data):

Energy consumption:	0.17 kWh/m <sup>3</sup>
Costs for:	
Energy (0.26 DM/kWh)	0.045 DM/m <sup>3</sup>
Filtration units	0.085 DM/m <sup>3</sup>
Chemicals	0.035 DM/m <sup>3</sup>
Maintenance	0.030 DM/m <sup>3</sup>
Plant control	0.005 DM/m <sup>3</sup>
Operation costs (about)	0.200 DM/m <sup>3</sup>
Investment costs (filtration only) (about)	0.300 DM/m <sup>3</sup>

As the above mentioned investment costs do not include costs for buildings, connections, et cetera, and as they depend on plant size, the final cost will be higher. The cost data discussed here present only cost for the installation and operation of such a technology.

## Conclusions

Our experience with microfiltration technology is very close to fulfill a goal that has been pursued since the introduction of wastewater treatment: to build a tight barrier for microorganisms between wastewater and receiving waters. This allows to envision a high quality of surface waters even when they receive discharges from treatment plants. Microfiltration technology might seem too costly to be generally introduced. This technique would not only greatly expand recreational water activities, but also reduce the costs for producing drinking water as well, allowing considerable savings. Practically, all bacteria are removed. By simply combining precipitation with micro-filtration, and due to

the double function of precipitation of viruses and phosphorus, all criteria of the searched technique for producing a high quality effluent are fulfilled.

## References

- Berg, G. (1984). Monitoring for viruses disseminated in water. In Melnick, J. L. (ed.), Enteric Viruses in Water, p. 17–29. S. Karger, Basel, München.
- Bitton, G. (1994). Wastewater Microbiology, p. 131. Wiley-Liss, Inc., New York, NY.
- Chadwick, E. (1840). First Report on the Sanitary Conditions. William Clowes and Sons, London.
- Clarke, H. W., Gage, S. (1909). A Review of Twenty-one Years' Experiments upon the Purification of Sewage at the Lawrence Experiment Station. Wright & Potter Printing Co., Boston.
- Coffey, B. M. (1992). Conceptual design report for desert pumping plant domestic water system (Report). The metropolitan water district of southern California water quality division.
- Dunbar, W. P. (1907). Leitfaden für die Abwasserreinigungsfrage, p. 331–355. R. Oldenbourg, München und Berlin.
- Galton, D. (1886). The lessons to be learnt from experimental investigations by the State Board of Health of Massachusetts upon the purification of sewage. Journal of the Sanitary Institute XVII, Part I, April: 1–22.
- Gerba, C. P., Rose, J. B. (1992). Estimating viral disease from drinking water. Fifth International Conference on Environmental Quality and Ecosystem Stability, Jerusalem.
- Jacangelo, J. G., Laine, K. E., Carns, K. E., Cummings, E. W., Mallevialle, J. (1991). Low-pressure membrane filtration for removing *Giardia* and microbial Indicators. JAWWA **83**, 97–106.
- Kinnicutt, L. P., Winslow, C.-E. A., Winthrop, G., Pratt, R. (1910). Sewage Disposal, pp. 314–379. John Wiley & Sons, New York.
- Kolega, M., Grohmann, G. S., Chiew, R. F., Day, A. W. (1991). Disinfection and clarification of treated sewage by advanced microfiltration. Water Sci. Technol. **23**, 1609–1618.
- Körner, S., Dizer, H., López-Pila, J. M. (1995). Reduzierung von Bakterien- und Coliphagenkonzentrationen auf der Fließstrecke eines Klärwerksableiters. Acta Hydrochim. Hydrobiol. **23**, 264–270.

13. Langlais, B., Triballeau, D. S., Faivre, M., Bourbigot, M. M. (1992). Microfiltration used as a means of disinfection downstream a bacterial treatment stage on fixed-bed bacteria. Environmental Quality and Ecosystem V/A, 135–145.
14. Martin, A. J. (1927). The Activated Sludge Process, pp. 1–25. MacDonald and Evans, London.
15. Olivieri, V. P., Willinghan, G. A., Vickers, J. C., McGahey, C. (1992). Continuous microfiltration for the treatment of secondary wastewater effluent. *Adv. Filtr. Sep. Technol.* **5**, 224–232.
16. Payment, L., Richardson, L., Siemiatycki, J., Dewar, R., Edwardes, M., Franco, E. (1991). A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. *Am. J. Public Health* **81**, 703–708.
17. Rose, J. B., Gerba, C. P. (1991). Use of risk assessment for development of microbial standards. *Wat. Sci. Technol.* **24**, 29–34.
18. Strell, M. (1913). Die Abwasserfrage in ihrer geschichtlichen Entwicklung von der ältesten Zeiten bis zur Gegenwart. F. Leineweber, Leipzig.
19. Virchow, R. (1876). Reinigung und Entwässerung Berlins. August Hirschwald, Berlin.

## Fungal siderophores in plant-microbe interactions

Meritxell Riquelme

*Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, California, USA*

Received 15 May 1996/Accepted 29 October 1996

---

### Summary

Siderophores are low-molecular-weight high specificity, ferric iron chelating agents. They are produced under iron starvation by most microorganisms. Systems such as siderophores, involved in the acquisition of iron under iron limited conditions, may play a major role in microbial interactions. Some siderophores are virulence factors in animal and in plant pathogens. Moreover, siderophores have been demonstrated to play a major role in plant disease suppression by some bacterial biocontrol agents which inhibit the growth or the activity of plant pathogens by sequestering iron. This latest type of mechanism has been extensively studied in bacteria. However, the role of these iron chelating compounds in disease suppression by fungal biocontrol agents has not been clearly determined.

**Key words:** siderophore, hydroxamate, iron competition, biological control, microbial interactions

### Resumen

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular y con una alta especificidad para quesar hierro, que son producidos por la mayoría de microorganismos en condiciones de carencia de hierro. Los sistemas que intervienen en la adquisición de hierro en condiciones limitantes del mismo, como es el caso de los sideróforos, desempeñan una función importante en las interacciones microbianas. Algunos sideróforos son factores de virulencia en patógenos de animales y vegetales. En otros casos se ha podido demostrar que tienen un papel destacado en la supresión de enfermedades vegetales llevada a cabo por agentes bacterianos de biocontrol que inhiben el crecimiento o la actividad de patógenos vegetales mediante la retención de hierro. Este tipo de mecanismo se ha estudiado en

*Correspondence to:* Meritxell Riquelme. Department of Plant Pathology. University of California. Riverside, CA 92521-0122. USA. Tel.: +1-909-7874135. Fax: +1-909-7875113. E-mail: txell@ucr.ac1.ucr.edu

profundidad en el mundo bacteriano. Sin embargo, no se ha determinado con suficiente claridad el papel de estos agentes quelantes de hierro en la supresión de enfermedades mediante hongos biocontroladores.

## Introduction

Iron is an essential nutrient for all living cells (36), since it is required in oxidation-reduction and other important cellular reactions which involve the participation of cytochromes, ferredoxins, nitrogenases and ribonucleotide reductases. It is the fourth most abundant element in the Earth's crust. However, under aerobic conditions and neutral pH, ferrous ions are converted to their ferric form, which tend to form highly insoluble ferric hydroxides that are unavailable to living organisms (3). This reaction is most pronounced in alkaline soils, such as occur throughout one third of the world's land surface area. Iron stress is especially common in such soils, and crop plants show iron deficiencies under these conditions (52).

Although essential, iron is also potentially harmful to organisms because it may participate in oxidative damage to cells by activating oxygen. The resultant free-oxygen radicals have been hypothesized to be causative factors in aging, carcinogenesis, and radiation injury, and to be a contributory factor in tumor promotion (26).

As the early Earth's atmosphere evolved from reducing to oxidizing, some mechanisms to regulate iron intake became necessary to life. Microorganisms which did not remain in anaerobic niches evolved high-affinity systems mediated by siderophores to scavenge iron under iron-stress conditions ( $<1\mu M$ ) (60). Siderophores (Greek for "iron-bearers") are low-molecular-weight (0.5 to 1.5 kDa), high specificity  $Fe^{3+}$  chelating agents. They are produced under iron-limiting conditions by almost all aerobic and facultative anaerobic microorganisms examined

(41). These iron ligands facilitate the translocation of oxidized iron ions across the lipid bilayer of the cytoplasmic membrane, and supply iron to the cell. No siderophores have been found in animal tissues. Some plants can either produce compounds analogous to siderophores, named phytosiderophores, or acquire iron from microbial siderophores. Some other substances, such as citrate (58), with intermediate iron affinity, have been obtained from microorganisms. However, their role in iron metabolism is unclear, and they are not classified as siderophores.

## Groups of siderophores: chemical structure and biosynthesis

According to the chemical nature of the groups that chelate ferric iron, siderophores may be classified as either hydroxamates or phenol-catecholates (Fig. 1). Among the siderophore-producing microbes, bacteria produce hydroxamate

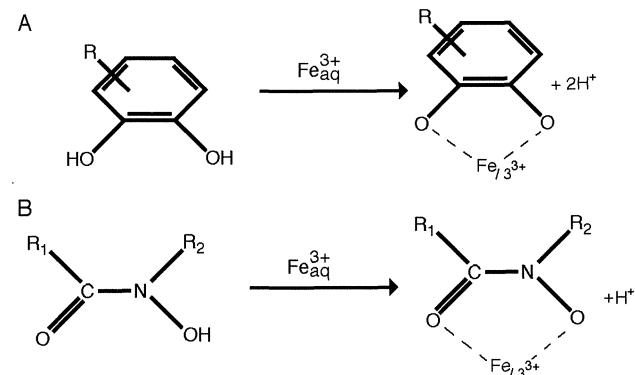


FIG. 1. Iron chelation reactions for: (A) phenol-catecholate siderophores, and (B) hydroxamate siderophores.

as well as catecholate siderophores, whereas fungi produce only hydroxamate-type compounds. Hydroxamic acids result from the combination of a sterically efficient neutral carbonyl donor C=O and an anionic O<sup>-</sup> donor (N—O<sup>-</sup>). The nitrogen atom adjacent to the carbonyl functional group increases the coordinating ability of the carbonyl oxygen atom to the ferric ion. The presence of the negatively charged oxygen atom donor in the chelating group plays a major role in producing thermodynamically stable complexes with ferric ions.

The biosynthetic pathway to fungal hydroxamates comes from hydroxylation and acylation of the δ-amino group of the non-proteinogenic amino acid L-ornithine (Fig. 2) (42), whereas prokaryotic hydroxamate-type siderophores are not derived from ornithine. In the fungal hydroxamate siderophores, the N<sup>δ</sup>-hydroxyamino groups of ornithine and the N<sup>δ</sup>-acyl groups of the vari-

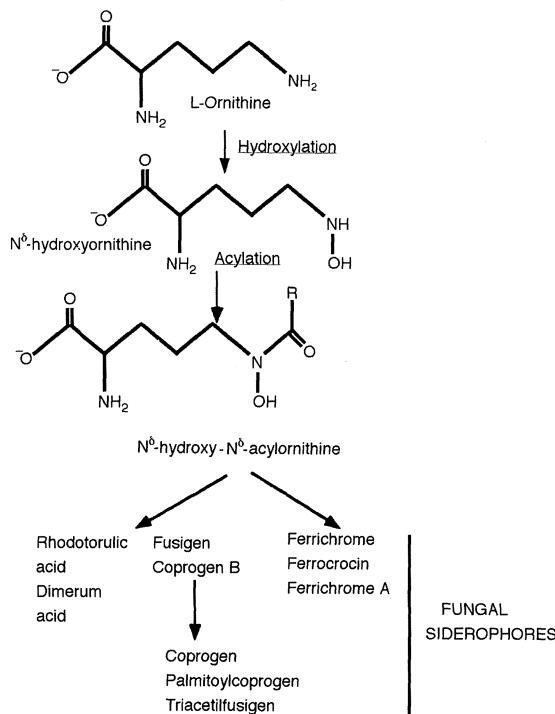


FIG. 2. General biosynthetic pathway of fungal siderophores.

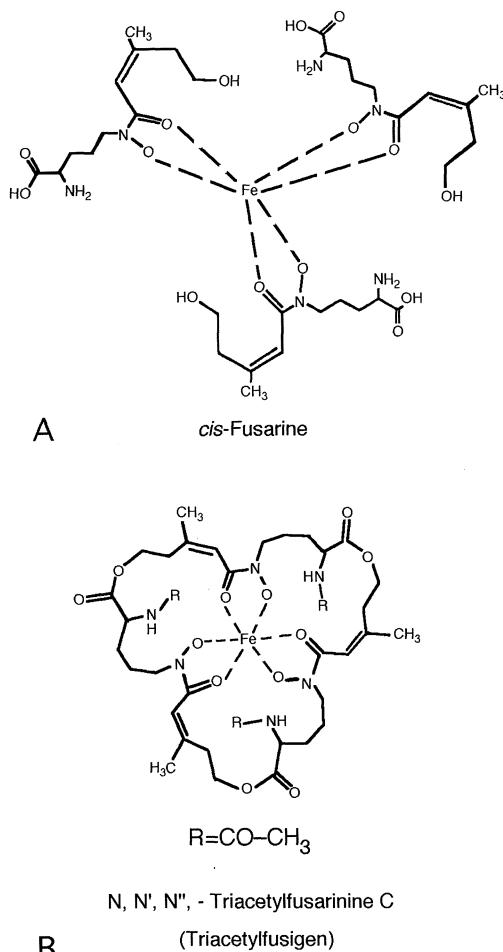


FIG. 3. Structure of some siderophores of the fusarinine family. (A) Three linear monomers chelate an atom of iron. (B) An acetylated cyclic trimer of *cis*-fusarinine containing three hydroxamic groups chelates one atom of ferric iron.

ous carboxylic acids are linked to form the iron-binding hydroxamic acids. These units may then be connected with each other, via peptide or ester bonds, to form mono-, di-, and trihydroxamates. Three bidentate hydroxamate groups from (i) three monomeric molecules, (ii) two or three dimeric molecules or (iii) a single trimeric molecule, bind the ferric ion in a octahedral complex. Hexadentate trihydroxamates have a formation constant higher than the hexadentate monohydroxamate complex.

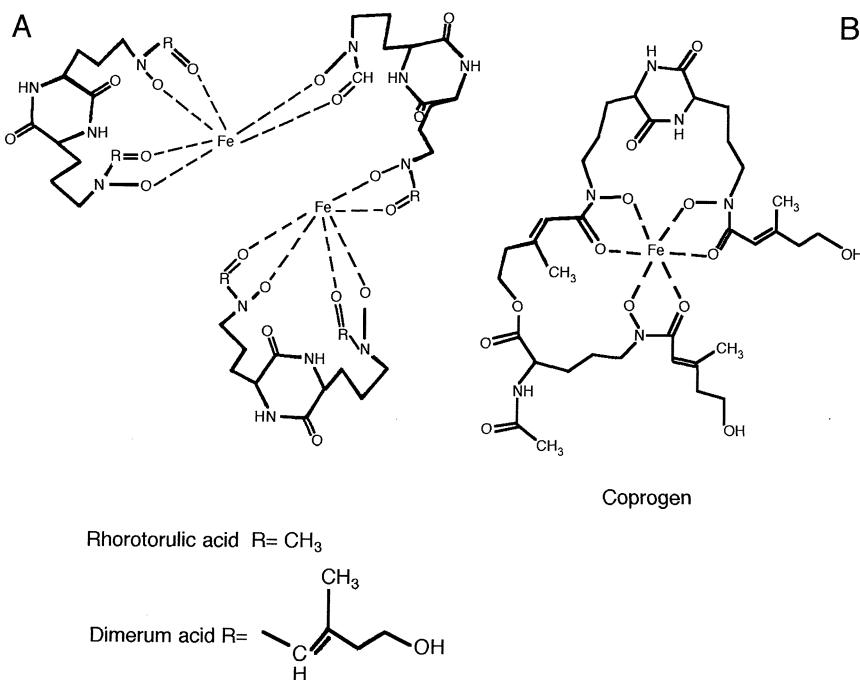


FIG. 4. Siderophore structures of some members of the coprogen family. (A) Dihydroxamates. Three dihydroxamate siderophores coordinate two atoms of iron at pH > 3. (B) Trihydroxamates. One trihydroxamate siderophore chelates one atom of iron.

The families of fungal siderophores differ in the mode of conjugation of the monomeric  $\text{N}^{\delta}$ -hydroxy- $\text{N}^{\delta}$ -acylornithine units and various acids. The fusarinine family possesses a  $\text{N}^{\delta}$ -hydroxy- $\text{N}^{\delta}$ -acylornithine unit linked to *cis*-anhydromevalonic acid. They may occur as linear monomers (Fig. 3A), dimers or trimers and as cyclic trimers (Fig. 3B) as well (14). Fusarinines are the structural units of many fungal siderophores. The coprogen family contains dihydroxamate and trihydroxamate siderophores. Within this family, rhodotorulic acid and dimerum acid are dihydroxamates that contain two  $\text{N}^{\delta}$ -hydroxy- $\text{N}^{\delta}$ -acylornithine residues (Fig. 4A), whereas coprogen and coprogen B are trihydroxamates (Fig. 4B). Finally, the ferri-chrome family (Fig. 5) includes cyclic hexapeptides that contain a tripeptide of  $\text{N}^{\delta}$ -hydroxy- $\text{N}^{\delta}$ -

acylornithine and a variable combination of glycine, serine, or alanine.

### Transport mechanisms

Fungal siderophores are produced under iron-deficient conditions and excreted into the medium. It is not known yet if the excretion of siderophores results from a passive outflow due to high internal concentrations or from an active export mechanism. Once in the extracellular space, the desferri-siderophores chelate the ferric ion by up to six coordination sites, in a high spin, exchangeable, and thermodynamically stable complex. In various fungal systems, the transport of iron into the cell follows Michaelis-Menten kinetics, thus indicating that transport is

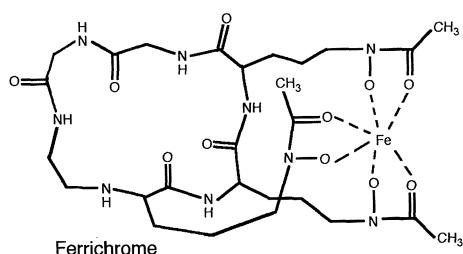


FIG. 5. Structure of ferrichrome, a trihydroxamate siderophore of the ferrichrome family.

mediated by specific membrane receptors and transport systems that recognize the iron-siderophore complex (36). Siderophore transport is energy-dependent. Some studies showed that a membrane potential, maintained by ATPase activity, is required for iron-siderophore transport. The mechanism of recognition and interaction of siderophores with the membrane proteins is still unknown. Nevertheless, experiments with enantiomeric siderophores (57, 59) suggest a highly stereospecific recognition of siderophores. In addition, the metal center and its surrounding residues seem to be very important for siderophore transport.

Although the membrane proteins involved in the translocation of siderophores have not been identified, four mechanisms of siderophore iron transport have been described. (i) *Rhodotorula piliminae* uses a «taxicab» mechanism in which there is no actual uptake of ferri-rhodotorulic acid. Instead, ferri-rhodotorulic acid exchanges the ferric ion with a membrane-bound chelating agent at the cell surface that in turn completes the active transport of iron into the cell (7). It is not linked to a reductive removal of iron. (ii) In *Ustilago sphaerogena*, the mechanism of ferrichrome A iron transport involves a reduction step at the membrane surface («reductive taxi mechanism») (19). When ferri-siderophores are internalized, some mechanism must exist to re-

move the iron and assimilate it into the cell metabolism. Evidence suggests that in *Neurospora crassa*, iron is removed from the ferri-chelate by ferrisiderophore reductase enzymes that employ physiological reductants (24). (iii) Unlike ferrichrome A, *U. sphaerogena* ferrichrome uses a «shuttle» mechanism (20). Ferri-ferrichrome enters the cell where the ferric ion is removed from the complex. Deferri-ferrichrome can be recycled and chelate another atom of iron out of the cell (56).

Ferrichrome and ferrichrome A are transported differently (6), due to differences observed in the iron surrounding N-acyl moieties. (iv) In *Mycelia sterilia* EP-76, after ingress of ferric-N, N', N''-triacetyl fusarinine and intracellular iron removal, the siderophore is hydrolyzed at the ester bonds by esterases (whose synthesis is increased by low iron cultivation) to give N-acetylfusarine (1). These monomeric fusarinines are excreted. They can bind iron and other metals which, if accumulated, would be toxic to the cell. It is not known if once out of the cell they reassemble to chelate another iron ion.

Although siderophores are crucial for growth of many, perhaps most, fungi during iron starvation, not all fungi synthesize siderophores. For instance, *Geotrichum candidum* does not produce siderophores. Instead, it has two different transport mechanisms to uptake iron under low iron conditions. These mechanisms are energy and temperature-dependent and require sulphhydryl groups. One of them shows specificity for either ferric or ferrous iron, and the other enables the fungus to use iron from exogenous hydroxamate siderophores (40). *Mucor*, *Phycomyces*, *Rhizopus*, several ascomycetous, and basidomycetous yeasts are some other fungi that do not produce hydroxamate siderophores. Under iron deficiency, the siderophore non-producers require an alternative system to acquire iron. The mechanism by which these organisms assimilate

iron is based on either the acidification of the medium, which increases iron availability, or on the reduction of ferric iron mediated by plasma membrane ferric reductases (17).

Some fungi accumulate intracellular siderophores which in some instances may function as iron storage compounds (37). Several *Trichoderma* species produce palmitoylcoprogen, a lipophilic siderophore that is not excreted into the culture broth but that is found in methanol extracts of mycelium (2). Its role in the transport of iron into fungal cells needs to be investigated. The localization and structure of this iron ligand suggests a possible role as intracellular iron acceptor and storage compound or as membrane exchange molecule for the taxicab model for iron transport.

Most fungi produce several different siderophores (4). For example, this has been reported for *Boletus edulis* (50), *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, and *Penicillium chrysogenum* (13), *Ustilago sphaerogenes* (20), *Trichoderma* spp. (2), etc. It is probably an adaptation to changing environmental conditions. For instance, when fungi colonize solid surfaces, hydrophilic siderophores may be useful because they can diffuse better and then they can mobilize more iron. On the other hand, when fungi colonize aqueous environments, lipophilic siderophores may be of greater importance since diffusion could be a disadvantage.

### **Ecological significance of siderophores**

Although many studies have examined the chemistry and kinetics of transport of siderophores, little is known about the role of siderophores in competition for iron in plant-microbe and microbe-microbe interactions (53). Studies in this area are scarce, mainly due to the difficulty of establishing the appropriate conditions

for the growth and siderophore production of all the organisms involved in the interactions to be studied.

Much of the knowledge of siderophores is based on observations in vitro. However, the biotic and abiotic conditions in the in vitro studies usually differ from those found in natural environments. Variations in media components (such as C and N sources), pH, and temperature, result in either production of different siderophores or in production of different amounts of siderophore (51).

Siderophores have been established as important determinants of virulence in microbial animal pathogens (54). Siderophores produced by microbial animal pathogens may extract iron from host defense proteins, thus making siderophore a critical virulence factor for those pathogens (45). By extension, it could be possible to assign a similar role to the siderophores detected in phytopathogenic microorganisms (43). For instance, chrysobactin, a siderophore produced by *Erwinia chrysanthemi*, the bacterial causal agent of soft rot in several plants, determines pathogenicity (23).

The same role has been assigned to the fungal plant pathogen *Colletotrichum musae*, which causes banana anthracnose. It has been shown that conidia from *C. musae* harvested from iron-deficient media, that is, with induced siderophore production, form progressive lesions on banana fruits more rapidly than conidia from iron-replete media (5). However, in the bacterial phytopathogens *Agrobacterium tumefaciens* (33), *Pseudomonas syringae* (10) and *Erwinia carotovora* (29), and in the fungal plant pathogen *Ustilago maydis* (38), siderophores show no correlation with virulence.

Biological control (biocontrol) of soilborne plant pathogens by indigenous microbes, or by introduction of antagonistic microorganisms to the soil, is a potential non chemical means for

plant disease control. Competition for iron may play a role in the biocontrol interactions. Systems such as siderophores, involved in the acquisition of iron under iron-limited conditions, may play a role in microbial interactions (30).

There is substantial evidence to believe that siderophores play some role in the biocontrol of phytopathogenic microorganisms by sequestering iron, and thereby inhibiting their growth or metabolic activity (35, 39). Disease suppressions in soils were first attributed to *Pseudomonas* siderophores in 1980 (30). Many rhizosphere-*Pseudomonas* species are plant-pathogenic, but it has been shown that some pseudomonads promote plant growth (31), and inhibit pathogenic bacteria and fungi (30) by producing siderophores. For example, *P. fluorescens* under iron stress produces mainly pyoverdines, which are yellow-green pigments that fluoresce under UV light (366 nm). These pigments are a unique class of siderophores with an affinity for iron higher than that observed for many fungal hydroxamate siderophores.

Competition is believed to be one of the mechanisms by which fungal biocontrol agents affect plant pathogens (49). However, the importance of competition for iron has not been demonstrated or adequately investigated with fungal biocontrol agents. In iron-limiting environments, siderophores may enhance the effectiveness of a biocontrol agent which by scavenging iron can inhibit the growth of the indigenous microorganisms. Other suggested mechanisms of biocontrol are mycoparasitism (15, 21, 22), hyphal lysis (32, 48) and antibiosis (9, 18).

*Trichoderma* has been investigated most intensively as a fungal biocontrol agent (44). *Trichoderma* spp. are present worldwide in many types of soils. The potential of this fungus to serve as a biocontrol agent was suggested more than 50 years ago (55).

*Trichoderma harzianum* has been registered in the United States as a microbial biocontrol agent (46), for use against several plant diseases. *T. harzianum* has been successfully used to load the root zone of seedlings before transplanting them and their surrounding peat to pathogen infested fields (16). Another efficiently used technique is the coating of seeds and bulbs with *T. harzianum* conidia (27). In addition, it has been shown that *T. harzianum* can promote plant growth (12) maybe due to the action of siderophores, as has been suggested for plant growth-promoting pseudomonads.

Although some *Trichoderma* spp. have shown their capability for being used as biocontrol agents under controlled conditions for a number of plant diseases (11, 21, 25, 47), they have not performed consistently in the field. A limiting factor for effective biocontrol may be the ability of the biocontrol agents to compete successfully with the indigenous microorganisms. It is, therefore, of great importance to study the mechanisms that enhance the competitiveness of potential biocontrol agents.

The use of organic mulches on avocado and citrus has been used (8) to deliver *T. harzianum* as biocontrol agent for avocado root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* and citrus root rot caused by *P. parasitica* and *P. citrophthora*. *T. harzianum* will only be effective to control the target pathogens if able to survive in the natural environment where it is released. In previous studies, some *Trichoderma* spp. have failed to control deleterious microorganisms because of the presence of indigenous *Pseudomonas* spp. in the tested soils (28). Siderophores produced by some isolates of *Pseudomonas* spp. seem to be involved in the inhibition of several *Trichoderma* spp. (34).

Siderophores from several strains of *Trichoderma* were isolated and characterized at the structural and chemical levels. Anke et al. (2)

reported coprogen B as the major siderophore found in culture filtrates of *T. harzianum* grown under iron-limiting conditions. By contrast, we found dimerum acid as the main siderophore being excreted by the same fungus grown in different conditions under iron limitation. The role of these hydroxamate siderophores in the competitiveness and survival of this fungal biocontrol agent in soils has not been extensively studied. To test the significance of siderophores in the competitiveness of this fungus we obtained siderophore deficient mutants of *T. harzianum* and we designed a simplified model to simulate the interaction of *T. harzianum* and *P. fluorescens* in natural environments. It was proposed that *T. harzianum* siderophores do not play a major role in competing with *P. fluorescens* siderophores.

## References

1. Adjimani, J. P., Emery, T. (1987). Iron uptake in *Mycelia sterilia* EP-76. *J. Bacteriol.* **169**, 3664–3686.
2. Anke, H., Kimm, J., Bergquist, K. E., Sterner, O. (1991). Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. *Biol. Metals* **4**, 176–180.
3. Barash, I. (1990). Iron, siderophores and plant-pathogen interactions. *Phytoparasitica* **18**, 183–188.
4. Bossier, P., Höfte, M., Verstraete, W. (1988). Ecological significance of siderophores in soil. *Adv. Microbiol. Ecol.* **10**, 385–414.
5. Brown, A. E., Swinburne, T. R. (1981). Influence of iron and iron chelators on formation of progressive lesions by *Colletotrichum musae* on banana fruits. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **77**, 119–124.
6. Budde, A. D., Leong, S. A. (1989). Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia* **108**, 125–133.
7. Carrano, C., Cooper, S. R., Raymond, K. N. (1979). Coordination chemistry of microbial iron transport compounds: 11. Solution equilibria and electrochemistry of ferric rhodotorulate complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 599–604.
8. Casale, W. L., Minassian, V., Menge, J. A., Lovatt, C. J. (1995). Urban and agricultural wastes for use as mulches on avocado and citrus and for delivery of microbial biocontrol agents. *J. Hortic. Sci.* **70**, 315–332.
9. Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R., Avent, A. G. (1987). Antifungal alkyl pyrones on *Trichoderma harzianum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **88**, 503–513.
10. Cody, Y. S., Gross, D. C. (1987). Outer membrane protein mediating iron uptake via pyoverdin, the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **169**, 2207–2214.
11. Cook, R. J., Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. **16**, 539.
12. Chang, Y., Chang, Y., Baker, R., Kleinfeld, O., Chet, I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* **70**, 145–148.
13. Charlang, G., Horowitz, N. H., Horowitz, R. M. (1981). Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 94–100.
14. Charlang, G., Horowitz, R. M., Lowy, P. H., NG, B., Poling, S. M., Horowitz, N. H. (1982). Extracellular siderophores of rapidly growing *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **150**, 785–787.
15. Chet, I., Harman, G. E., Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microb. Ecol.* **7**, 29–38.
16. Chet, I. (1987). *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In Chet, I. (ed.), Innovative Approaches to Plant Disease Control, pp. 137–160. John Wiley, New York, NY.
17. Dancis, A., Klausner, R. D., Hinnebusch, A. G., Barriocanal, J. G. (1990). Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2294–2301.
18. Dunlop, R. W., Simon, A., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L. (1989). An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. *J. Nat. Prod.* **52**, 67–74.
19. Ecker, D. J., Passavant, C. W., Emery, T. F. (1982). Role of two siderophores in *Ustilago sphaerogena* regulation of biosynthesis and uptake mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **720**, 242–249.
20. Ecker, D. J., Emery, T. (1983). Iron uptake from ferrichrome A and iron citrate in *Ustilago sphaerogena*. *J. Bacteriol.* **155**, 616–622.
21. Elad, Y., Hadar, Y., Chet, I. (1983). The potential of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol

- agent under field conditions. *Colloq. INRA.* **18**, 305–310.
22. Elad, Y., Barak, R., Chet, I. (1983). The possible role of lectins in mycoparasitism. *J. Bacteriol.* **154**, 1431–1436.
  23. Enard, C., Diolez, A., Expert, D. (1988). Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J. Bacteriol.* **170**, 2419–2426.
  24. Ernst, J. F., Winkelmann, G. (1977). Enzymatic release of iron from sideramines in fungi. NADH: sideramine oxidoreductase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* **500**, 27–41.
  25. Hadar, Y., Chet, I., Henis, Y. (1979). Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **69**, 64–68.
  26. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1986). Oxygen-free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 501–514.
  27. Harman, G. E., Chet, I., Baker, R. (1980). *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **70**, 1167–1172.
  28. Hubbard, J. P., Harman, G. E., Hadar, Y. (1983). Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. *Phytopathology* **73**, 655–659.
  29. Ishimaru, C. A., Loper, J. E. (1992). High-affinity iron uptake systems present in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* include the hydroxamate siderophore aerobactin. *J. Bacteriol.* **174**, 2993–3003.
  30. Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. (1980). *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.* **4**, 317–320.
  31. Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant-growth promoting rhizobacteria. *Nature* **286**, 885–886.
  32. Labudova, I., Gogorova, L. (1988). Biological control of phytopathogenic fungi through lytic action of *Trichoderma* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**, 193–198.
  33. Leong, S. A., Neilands, J. B. (1981). Relationship of siderophore-mediated iron assimilation to virulence in crown gall disease. *J. Bacteriol.* **147**, 482–491.
  34. Lockwood, J. L., Schippers, B. S. (1984). Evaluation of siderophores as a factor in soil mycostasis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **82-4**, 589–594.
  35. Loper, J. E. (1990). Molecular and biochemical bases for activities of biological control agents: the role of siderophores. In *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*, pp. 735–747. Alan R. Liss, New York, NY.
  36. Loper, J. E., Buyer, J. S. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular plant-microbe interactions*, **14**, 5–13.
  37. Matzanke, B. F., Bill, E., Trautwein, A. X., Winkelmann, G. (1988). Ferricrocin functions as the main intracellular iron-storage compound in mycelia of *Neurospora crassa*. *Biol. Metals* **1**, 18–25.
  38. Mei, B., Budde, A. D., Leong, S. A. (1993). *Sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 903–907.
  39. Misaghi, I. J., Stowell, L. J., Groyan, R. G., Spearman, L. C. (1982). Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* **72**, 33–36.
  40. Mor, H., Barash, I. (1990). Characterization of siderophore mediated iron transport in *Geotrichum candidum*, a non-siderophore producer. *Biol. Metals* **2**, 209–213.
  41. Neilands, J. B. (1981). Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 715–731.
  42. Neilands, J. B. (1983). Siderophores. *Adv. Inorg. Biochem.* **5**, pp. 137.
  43. Neilands, J. B., Leong, S. A. (1986). Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**, 187–208.
  44. Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* **23**, 23–54.
  45. Payne, S. M. (1988). Iron and virulence in the family *Enterobacteriaceae*. CRC. *Crit. Rev. Microbiol.* **16**, 81–111.
  46. Ricard, J. L. (1981). Commercialization of a *Trichoderma* based mycofungicide: some problems and solutions. *Biocontrol News Inf.* **2**, 95–98.
  47. Sivan, A., Ucko, O., Chet, I. (1987). Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease* **71**, 587–592.
  48. Sivan, A., Chet, I. (1989). Degradation of cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 675–682.
  49. Sivan, A., Chet, I. (1989). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* **79**, 198–203.
  50. Szaniszlo, P. J., Powell, P. E., Reid, C. P. P., Cline, G. R. (1981). Production of hydroxamate siderophore iron chelators by ectomycorrhizal fungi. *Mycologia* **73**, 1158–1175.

51. Teintze, M., Leong, J. (1981). Structure of pseudobactin A, a second siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas* B10. Biochemistry **20**, 6457–6462.
52. Vose, P. B. (1982). Iron nutrition in plants: a world overview. J. Plant Nutr. **5**, 233–249.
53. Walter, A., Römhild, V., Marschner, H., Crowley, D. E. (1994). Iron nutrition of cucumber and maize: effect of *Pseudomonas putida* YC3 and its siderophore. Soil Biol. Biochem. **26**, 1023–1031.
54. Weinberg, E. D. (1978). Iron and infection. Microbiol. Rev. **42**, 45–66.
55. Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasitic of other soil fungi. Phytopathology **22**, 837–845.
56. Winkelmann, G., Zähner, H. (1974). Metabolic products of microorganisms. 132. Uptake of iron by *Neurospora crassa*. III. Iron transport studies with ferrichrome-type compounds. Arch. Microbiol. **98**, 39–50.
57. Winkelmann, G. (1979). Evidence for stereospecific uptake of iron chelates in fungi. FEBS Lett. **97**, 43–46.
58. Winkelmann, G. (1979). Surface iron polymers and hydroxy acids. A model of iron supply in sideramine-free fungi. Arch. Microbiol. **121**, 43–51.
59. Winkelmann, G., Braun, V. (1981). Stereoselective recognition of ferrichrome by fungi and bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **11**, 237–241.
60. Winkelmann, G. (1992). Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands. Mycol. Res. **96**, 529–534.

## New molecular methods for the detection of hepatitis A and Norwalk viruses in shellfish

Jesús L. Romalde

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

Received 24 April 1996/Accepted 2 September 1996

---

### Summary

Outbreaks of viral enteric diseases after consumption of shellfish are a major health risk. Methodological problems (such as toxicity for cell cultures and low viral concentrations) and the unculturability of some strains (i.e. hepatitis A virus, Norwalk virus) have made it difficult to study those viruses in the environmental samples. Currently, the analysis of the hygienic quality of marketable shellfish is determined by the use of fecal indicator bacteria, but their reliability in determining viral pollution of shellfish is very low. Recent biotechnology developments are providing available rapid, sensitive, and specific tools for detecting food-borne viruses in shellfish and in shellfish-growing waters. In this paper, a review of these new molecular methods is carried out, discussing their advantages and possible applications.

**Key words:** hepatitis A virus, Norwalk virus, shellfish quality, *in situ* transcription, genetic probes

### Resumen

Los brotes de enfermedades producidas por virus entéricos tras el consumo de moluscos constituyen un peligro para la salud pública muy importante. Las dificultades metodológicas, como son la toxicidad para cultivos celulares y la baja concentración viral, junto con el hecho de que

---

*Correspondence to:* Jesús L. Romalde. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología. 15706 Santiago de Compostela. España. Tel.: +34-81-563100 #3252. Fax: +34-81-596904. E-mail: mpaetjlb@usc.es

algunos de estos virus no son cultivables (i.e. virus de la hepatitis A, virus de Norwalk), hacen difícil su estudio en muestras ambientales. Actualmente, el análisis de la calidad higiénica de los moluscos que se destinan al consumo se determina mediante el uso de indicadores fecales bacterianos, pero su correlación con la contaminación viral es muy baja. Los recientes avances de la biotecnología han permitido el desarrollo de metodologías rápidas, sensibles y específicas para la detección de virus en moluscos y en sus aguas de cultivo. En este artículo, se hace una revisión de estos nuevos métodos moleculares de detección, a la vez que se discuten sus ventajas y posibles aplicaciones.

## Introduction

Bivalve shellfish, including oysters, clams, and mussels, have been involved, as vectors, in the transmission of enteric viral diseases for many decades (31). The periodic appearance of shellfish-transmitted disease outbreaks has contributed to a public confidence problem over shellfish safety and resulted in important economic losses by the seafood industry (31).

At present, the hygienic quality of marketable shellfish is monitored by analyzing the levels of fecal coliforms in shellfish meat and growing-waters (18). However, the reliability of these microorganisms as indicators of viral pollution has been widely questioned (6, 26). In fact, viruses were isolated from approved shellfish growing areas on the basis of fecal coliform counts. Besides, several hepatitis and gastroenteritis outbreaks associated with the consumption of oysters that met the current bacteriological standards were reported (Table 1). Therefore, it has been suggested that shellfish should be tested for these enteric viruses before declaring them safe for human consumption (5).

This had led to efforts to develop surrogates for the presence of viral pathogens in shellfish or to develop alternative methods that allow to detect directly these enteric viruses in shellfish. Recent biotechnology advances have provided the necessary tools to detect food-borne viruses in shellfish and shellfish-growing waters, such

as the use of gene probes and other nucleic acid techniques like the polymerase chain reaction (PCR) and the *in situ* transcription (IST) (2, 12, 28, 33, 39).

## Enteric viruses associated with shellfish and water

Surface water and ground water are continuously subjected to fecal contamination from a variety of sources associated with human activities. In the aquatic environment, a great variety of different infectious viruses for humans can be found, that are usually transmitted by the fecal-oral route. They are known by the generic name of enteric viruses.

Viruses in natural waters frequently appear associated with particulate material and these adsorbed viral particles play a major role in the disease dissemination and transmission (25). This interaction between viruses and solid particles enhance the survival and the transport in aquatic and terrestrial systems.

Bivalve mollusks are filter feeders that can accumulate human viral pathogens at levels higher than those in the surrounding waters (26). Uptake of viruses by shellfish has been shown to occur following their exposure to raw sewage even for a short period of time. In addition, it has been described that mollusks accumulate the associations virus-particulate material more ef-

TABLE 1. Main hepatitis and viral gastroenteritis outbreaks associated with the consumption of shellfish

Year	Country	Shellfish	Agent*	No. cases	Reference
1955	Sweden	Oysters	HAV	629	31
1961	USA	Oysters	HAV	84	31
	USA	Clams	HAV	459	31
	USA	Oysters	HAV	31	31
1963	USA	Clams	HAV	252	31
1964	USA	Clams	HAV	123	31
	USA	Clams	HAV	43	31
1969	USA	Oysters	HAV	13	31
1973	USA	Oysters	HAV	293	31
1976	UK	Cockles	SRVs	797	1
1978	UK	Cockles & mussels	HAV	41	1
	Australia	Oysters	NV	2000+	23
	Australia	Oysters	NV	150	23
1982	USA	Clams	NV	441	31
	USA	Clams	NV	659	31
	USA	Oysters	NV	230	31
	USA	Oysters	NLV	472	31
1983	USA	Clams	SMV	84	31
	UK	Oysters	SRVs	181	1
1984	Italy	Mussels & clams	HAV	75+	24
	USA	Unspecified	SRVs	256	31
1986	UK	Oysters & mussels	SRVs	Not specified	1
1988	USA	Oysters	HAV	61	18
	China	Oysters	HAV	200,000+	38
1991	Canada	Oysters	NLV	200+	31
1993	USA	Oysters	NV	70	18

\*HAV, hepatitis A virus; SRVs, small round structure viruses; NV, Norwalk virus; N LV, Norwalk-like virus; SMV, Snow Mountain virus (now Norwalk virus serotype 3).

fectively than the free virus (26). Besides, although it is known that enteric viruses do not replicate in shellfish, they possess a great stability and survival in their tissues (26).

The majority of non-bacterial shellfish-associated diseases are gastroenteritis and hepatitis, caused by Norwalk virus (NV) and hepatitis A virus (HAV) respectively. Both viruses have a worldwide distribution and HAV is endemic in the Mediterranean area and in many developing countries (5). Norwalk virus is the

prototype of a group of morphologically similar viruses which has been described recently as belonging to the *Caliciviridae* family. These groups of viruses have been responsible for the highest incidence of non-bacterial shellfish-associated gastroenteritis outbreaks in many countries. Infectious hepatitis, caused by HAV, is perhaps the most serious viral illness transmitted by the ingestion of raw or inappropriately cooked contaminated shellfish (31). The real health-hazard of these viruses is probably under-

estimated due to the fact that their infections may not always be recognized because of difficulties in diagnosis or mild presentations, or both (22).

The lack of an efficient cell culture system for primary isolation of wild-type HAV and NV has promoted the development of several direct immunochemical methods for the detection of these noncultivable viruses both in feces and sera (8, 16). However, the majority of these procedures have been unable to detect viral particles in shellfish and estuarine concentrates because of their low numbers in these environmental samples.

### **Classical methods for the detection of enteric viruses in shellfish**

A variety of concentration methods have been described for the detection of enteric viruses from mollusks (6). All these methods imply several steps towards the separation of viruses from shellfish tissues and their concentration in a small volume appropriate for the virus assay. The most used concentrating procedures are the acid precipitation, the polyelectrolyte flocculation, the adsorption-elution protocol followed by ultrafiltration or acid precipitation, and the elution-precipitation methods (27, 32).

In all cases, the main steps of these procedures are the homogenization of shellfish tissues in different buffers, the viruses being adsorbed to shellfish solids and then eluted and subsequently concentrated in a small volume. The processing of the homogenates in this way results in the release of viruses from shellfish tissues. The reduced sample is then decontaminated with antibiotics and finally inoculated onto susceptible cell lines.

The effectiveness of these methods is variable depending on several factors such as shellfish species, average size of the mollusks, viral

group and culture procedures employed (27). Another difficulty of these methodology is the need of having a series of different cell lines due to the lack of a unique cell line susceptible to all the enteric viruses. In addition, these methods are not applicable to the detection of noncultivable human viral pathogens as it is the case of wild-type HAV and Norwalk, and Norwalk-like viruses.

### **Molecular methods for the detection of enteric viruses**

The importance of developing sensitive and specific methods for the detection of noncultivable human viral pathogen in shellfish is obvious if one considers the many illness outbreaks caused by shellfish consumption and the serious economical losses in the seafood business due to these outbreaks (31). Recent biotechnology advances have made it available rapid, sensitive, and specific methods for the detection of enteric viruses from shellfish and other environmental samples. The most promising among these techniques are the use of gene probes, the polymerase chain reaction (PCR), and the *in situ* transcription (IST).

**Genetic probes.** The application of the nucleic acid hybridization technique was the first attempt to use a molecular method for the detection of enteric viruses, especially those difficult to cultivate, from environmental samples including shellfish (13, 20, 39). The most common procedure is the dot-blot hybridization by using either cDNA or ssRNA probes. In general, RNA probes are 6–8 fold more sensitive than DNA probes (14).

Prior to hybridization, it is necessary to perform the concentration of virus usually by adsorption-elution (in the case of water) or polyethylene glycol precipitation (in the case of shell-

fish) followed by a extraction of the viral nucleic acid by using proteases and phenol:chloroform.

Radioactively ( $^{32}\text{P}$ ) and non-radioactively (digoxigenin) labeled probes have been used for this purpose (28). However, non radioactive detection systems are approximately ten times less sensitive than the radioactive ones (14). In fact, all virus detection in environmental samples have been carried out by using radioactively labeled gene probes, since the detection limit of the non radioactive systems is not enough to detect the low number of viruses expected in this type of samples.

Gene probe hybridization to genomic viral RNA has been reported to detect as low as  $10^4$  virions of HAV (13). Although this level of detection is still far from the desired goal of 1–10 infective units, some authors were able to detect naturally-occurring HAV in estuarine (14) and shellfish (5, 20; Romalde, unpublished results) samples by using cDNA or ssRNA probes.

**RT-PCR.** The polymerase chain reaction (PCR) has been proclaimed the most significant development in the field of molecular biology in the last decade (11). PCR employs repeated cycles of oligonucleotide-directed DNA synthesis to perform consecutive rounds of in vitro replication of target nucleic acid sequences, resulting in an extremely sensitive system for the amplification and detection of specific nucleic acid sequences (34). In fact, the pathogen nucleic acid in any sample can be specifically amplified by up to  $10^6$ -fold prior to attempting to detect it (34). The potential of this technique in the detection and epidemiological survey studies is obvious, especially for nonculturable viral pathogens. The method was first applied to the diagnosis of the etiological agent in stool specimens after disease outbreaks. Thus, protocols were designed for the detection of rotavirus, hepatitis A, and Norwalk-like (9, 15) viruses employing this technique. The PCR detection

assay was then adapted for the detection of these viruses from environmental samples, including water and shellfish (2, 19, 38).

Shellfish and shellfish growing waters possess specific characteristics that difficult their analysis. First, the low concentration of virus makes it not sufficient the use of simple extraction methods to recover the viral nucleic acid for PCR. Secondly, the large amount of possible toxicants present in such samples, especially in shellfish tissues, inhibit the amplification of the target nucleic acid (2, 38).

In general, the methods developed involve two main steps: (i) the extraction and concentration of viruses from the sample, and (ii) the viral nucleic acid extraction, the removing of the inhibitors, and the detection by PCR (Fig. 1).

A variety of compounds for the viral extraction have been reported such as freon (19) and chloroform-butanol (2). The concentration step is usually performed by employing polyethylene glycol (PEG 6000). Other protocols utilize charge-modified glass powder for the extraction and concentration steps (4). At this point, the samples can be used for plaque assay (in the case of culturable virus) or for the viral nucleic acid extraction.

The nucleic acid extraction involves several sequential treatments with proteinase K (for the protein elimination), phenol:chloroform (to extract viral RNA), cetyltrimethylammonium bromide (CTBA) (to remove glycogen and other PCR inhibitors) and ethanol precipitation. A simpler method has been also described (38) which uses trichloracetic acid that avoids the proteinase K, the phenol:chloroform, and the CTAB treatments. Although in most cases the initial samples are homogenates of the whole shellfish (19, 38), better results have been obtained by using individual organs such as stomach or digestive diverticula, where the greatest viral accumulation have been observed (2, 27).

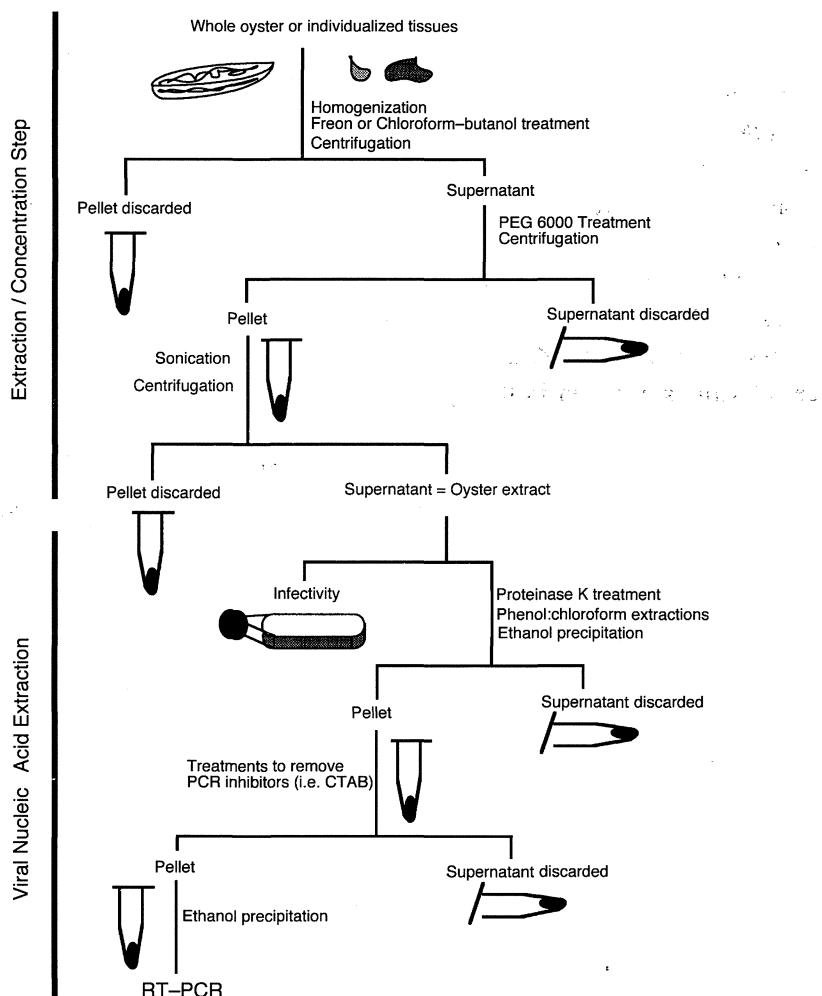


FIG. 1. Outline of the methods for concentration of virus and extraction of viral nucleic acid from oysters.

The extracted viral nucleic acid is then subjected to reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR) under conditions specific for each viral type. By using these RT-PCR methods, sensitivities achieved were in the range of 50-500 viral particles for all the viruses assayed like poliovirus, HAV, and NV (2, 3).

More recently, some modifications of the PCR technique have been employed for the detection of viruses in environmental samples such

as RT-nested PCR (21), antigen capture-PCR (10), immunomagnetic-PCR (29), and RT-PCR followed by slot-blot hybridization of the PCR products with a specific probe (2), which allowed not only to improve the sensibility but also to quantify the viral RNA present in the samples.

**IST.** *In situ* transcription (IST), based on the use of the enzyme reverse transcriptase directly in fixed tissue sections to construct radiolabeled cDNA, is another new approach for the detection

of viral RNA in shellfish samples. This method was initially developed to localize proopiomelanocortin mRNA in the rat pituitary (36), and it has been successfully used to detect coxsackievirus and echovirus in cell cultures (7) and HAV in both cell cultures and shellfish tissues (Fig. 2) (33).

The IST procedure utilizes paraffin-embedded tissues from experimentally or naturally infected mollusks. After deparaffination, tissues

are rehydrated and subjected to several treatments with 0.2 N HCl and proteinase K to improve membrane permeability. Then, a reverse transcription is performed using tritium labeled nucleotides. Finally, slides are dipped in autoradiography emulsion and incubated for 72 h.

The preliminary assays performed in cell cultures showed an excellent sensitivity and specificity for IST, achieving values in the same

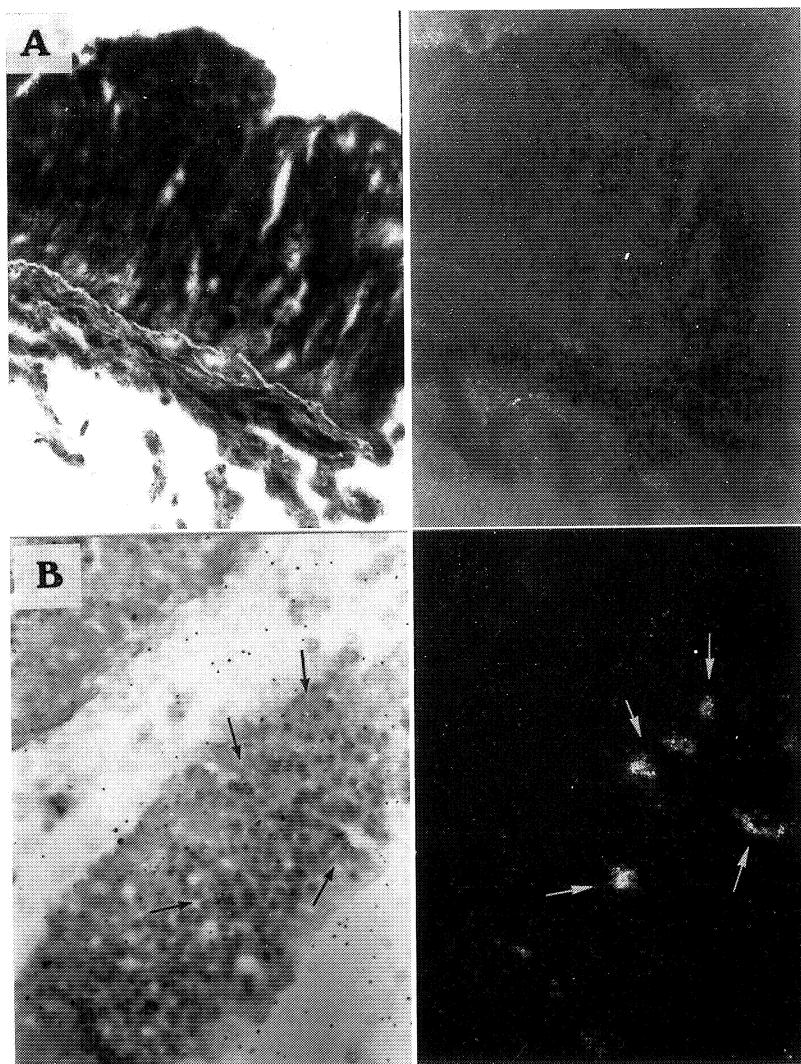


FIG. 2. IST in shellfish tissues. Stomach from a negative control oyster (A) and an experimentally HAV-infected oyster (B). Left panels are transmitted-light pictures and right panels the corresponding dark-field photographs. Arrows indicate positive signals. (From ref. 33.)

range than *in situ* hybridization (7, 33). When the method was applied to oyster and clam tissue sections, it was able to localize HAV specific genomic RNA in the several organs such as stomach (Fig. 2) and hepatopancreas (33).

The main advantages of IST are: (i) simplicity, since no RNA extraction step is required, (ii) versatility, because it can be used for the detection of different shellfish-transmitted, nonculturable human viral pathogens by changing only the specific primer, and (iii) possibility of retrospective analysis, since it can be performed on paraffin-embedded stored material.

In summary, IST is useful not only for the direct detection of viruses in shellfish, but also to localize the viral particles within individual tissues. It has become a very powerful tool to study and better understand the viral bioaccumulation dynamics in filter-feeding bivalve mollusks.

### Final considerations

The above stated facts make it obvious that, recent biotechnology advances have provided the appropriate tools for detecting food-borne viruses in shellfish and shellfish-growing waters.

The new molecular detecting procedures are closer to an ideal method than the classic concentration protocols, since they are rapid, simple, easy to perform, very sensitive and specific, and equally efficient in different shellfish species harvested from different geographical areas. In addition, as recently reported (3) the results obtained with some of these new procedures are reliable and reproducible in different laboratories.

Therefore, we have now the methodology adequate to perform routine viral analysis of the marketable shellfish which can improve the pub-

lic confidence in mollusk safety with the subsequent benefit for the seafood industry. Moreover, the answer to the old question about the necessity of shellfish purification, regardless the bacteriological quality of growing waters, before public consumption can be now achieved.

### Acknowledgements

The critical reading of the manuscript by Dr. Alicia E. Toranzo is gratefully appreciated.

### References

1. Appleton, H. (1987). Small round viruses: classification and role in food-borne infections. In Ciba Foundation (ed.), *Novel Diarrhoea Viruses*, pp. 108–125. Wiley, Chichester, UK.
2. Atmar, R. L., Neill, F. H., Romalde, J. L., Le Guyader, F., Woodley, C. M., Metcalf, T. G., Estes, M. K. (1995). Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3014–3018.
3. Atmar, R. L., Neill, F. H., Woodley, C. M., Manger, R., Fout, G. S., Burkhardt, W., Leja, L., McGovern, E. R., Le Guyader, F., Metcalf, T. G., Estes, M. K. (1996). Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 254–258.
4. Bosch, A., Lucena, F., Diez, J., Gajardo, R., Blasi, M., Jofre, J. (1991). Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *J. Am. Water Works Ass.* **83**, 80–83.
5. Bosch, A., Abad, F. X., Gajardo, R., Pintó, R. M. (1994). Should shellfish be purified before public consumption? *Lancet* **344**, 1024–1025.
6. Bouchrifi, N., Goyal, S. M. (1993). Methods for the concentration and detection of human enteric viruses in shellfish: a review. *Microbiologica* **16**, 105–114.
7. Carstens, J. M., TracY, S., Chapman, N. M., Gauntt, C. J. (1992). Detection of enteroviruses in cell cultures by using *in situ* transcription. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 25–35.
8. Coulepis, A. G., Veale, M. F., MacGregor, A., Kornitschuck, M., Gust, I. D. (1985). Detection of

- hepatitis A virus and antibody by solid-phase radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 119–124.
9. De Leon, R., Matsui, S. M., Baric, R. S., Herrmann, J. E., Blacjlow, N. R., Greenberg, H. B., Sobsey, M. D. (1992). Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and non-radioactive oligoprobess. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 3151–3157.
10. Deng, M. Y., Day, S. P., Cliver, D. O. (1994). Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1927–1933.
11. Erlich, H. A., Gelfand, D., Sninsky, J. J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* **252**, 1643–1651.
12. Gouvea, V., Santos, N., Timenetsky, M. C., Estes, M. K. (1994). Identification of Norwalk virus in artificially seeded shellfish and selected foods. *J. Virol. Methods* **48**, 177–187.
13. Jiang, X., Estes, M. K., Metcalf, T. G., Melnick, J. L. (1986). Detection of hepatitis A virus in seeded estuarine samples by hybridization with cDNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 711–717.
14. Jiang, X., Estes, M. K., Metcalf, T. G. (1987). Detection of hepatitis A virus by hybridization with single-stranded RNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2487–2495.
15. Jiang, X., Wang, J., Graham, D. Y., Estes, M. K. (1992). Detection of Norwalk virus in stools using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2529–2534.
16. Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalika, A. R., Chanock, R. M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* **10**, 1975–1981.
17. Kohn, M. A., Farley, T. A., Ando, T., Curtis, M., Wilson, S. A., Jin, Q., Monroe, S. S., Baron, R. C., McFarland, L. M., Glass, R. I. (1995). An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. Implications for maintaining safe oyster beds. *J. Am. Med. Assoc.* **273**, 466–471.
18. Larkin, E. P., Hunt, D. A. (1982). Bivalve mollusks: control of biological contaminants. *BioScience* **32**, 193–197.
19. Lees, D. N., Henshilwood, K., Butcher, S. (1995). Development of a PCR-based method for the detection of enteroviruses and hepatitis A virus in molluscan shellfish and its application to polluted field samples. *Water Sci. Technol.* **31**, 457–464.
20. Le Guyader, F., Apaire-Marchais, V., Brillet, J., Billaudel, S. (1993). Use of genomic probes to detect hepatitis A virus and enterovirus RNAs in wild shellfish and relationship of viral contamination to bacterial contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3963–3968.
21. Le Guyader, F., Dubois, E., Menard, D., Pommeuy, M. (1994). Naturally contaminated shellfish and sediment: hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus detected by RT semi-nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3665–3671.
22. Letkowitz, A., Fout, G. S., Losonsky, G., Wasserman, S. S., Israel, E., Morris, J. J. (1992). A serosurvey of pathogens associated with shellfish: prevalence of antibodies to *Vibrio* species and Norwalk virus in the Chesapeake Bay region. *Am. J. Epidemiol.* **135**, 369–380.
23. Linco, S. J., Grohmann, G. S. (1980). The Darwin outbreak of oyster-associated viral gastroenteritis. *Med. J. Australia* **1**, 211–213.
24. Mele, A., Rastelli, M. G., Gill, O. N., DiBisceglie, D., Rosmini, F., Pardelli, G., Valtriani, C., Patriarchi, P. (1989). Recurrent epidemic hepatitis A associated with consumption of raw shellfish, probably controlled through public health measures. *Am. J. Epidemiol.* **130**, 540–546.
25. Melnick, J. L., Gerba, C. P. (1980). The ecology of enteroviruses in natural waters. *CRC Crit. Rev. Environ. Control* **10**, 65.
26. Metcalf, T. G. (1982). Viruses in shellfish-growing waters. *Environ. Int.* **7**, 21–27.
27. Metcalf, T. G., Moulton, E., Eckerson, D. (1980). Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 141–152.
28. Metcalf, T. G., Jiang, X., Estes, M. K., Melnick, J. L. (1988). Nucleic acid probes and molecular hybridization for detection of viruses in environmental samples. *Prog. Med. Virol.* **35**, 186–214.
29. Moceyron, C., Grinde, B. (1994). Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. *J. Virol. Methods* **46**, 157–166.
30. Pontefract, R. D., Bishai, F. R., Hockin, J., Bergeron, G., Parent, R. (1993). Norwalk-like viruses associated with a gastroenteritis outbreak following oyster consumption. *J. Food Protect.* **56**, 604–607.
31. Richards, G. P. (1987). Shellfish associated enteric virus illness in the United States, 1934–1984. *Estuaries* **10**, 84–85.
32. Richards, G. P., Goldmintz, D., Babinchak, L. (1982). Rapid method for extraction and concentration of poliovirus from oyster tissues. *J. Virol. Methods* **5**, 285–291.

33. Romalde, J. L., Estes, M. K., Szucs, G., Atmar, R. L., Woodley, C. M., Metcalf, T. G. (1994). In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1921–1926.
34. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffei, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491.
35. Smith, A. W., Reno, P., Poet, S. E., Skilling, D. E., Stafford, C. (1995). Detection of Norwalk-like caliciviruses from shellfish beds on the Atlantic and Pacific coasts of the United States. *IAAAM Proc.* **26**, 104.
36. Tecott, L. H., Barchas, J. D., Eberwine, J. H. (1988). In situ transcription: specific synthesis of complementary DNA in fixed tissue sections. *Science* **240**, 1661–1664.
37. Wang, J. X., Xu, Z. Y., Tang, Y. W. (1988). Seroepidemiological survey of viral hepatitis A during an epidemic in Shanghai. *Acta Acad. Med. Shanghai* **15**, 374–379.
38. Yang, F., Xu, X. (1993). A new method of RNA preparation for detection of hepatitis A virus in environmental samples by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **43**, 77–84.
39. Zhou, Y.-J., Estes, M. K., Jiang, X., Metcalf, T. G. (1991). Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus nucleic acids in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2963–2968.

## Monitoring by PCR amplification of the polyphosphate kinase gene added to natural water samples

Nancy I. López,<sup>1</sup> M. Julia Pettinari,<sup>2</sup> Beatriz S. Méndez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, <sup>2</sup>Departamento de Química Biológica,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina

Received 29 April 1996/Accepted 24 June 1996

---

### Summary

A fast, simple method for the detection of the *Escherichia coli* polyphosphate kinase (*ppk*) gene by means of PCR amplification is described. The method uses filters to recover cells from the samples, which makes it suitable for environmental studies. The detection of the *ppk* gene was achieved from samples containing  $10^2$  *E. coli* cells, either in saline solution or in river water.

**Key words:** PCR, polyphosphate, DNA detection, environmental samples, polyphosphate kinase

### Resumen

Se describe un método simple y rápido para la detección del gen de la polifosfato kinasa (*ppk*) de *Escherichia coli* mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método utiliza filtros para recuperar las células a partir de las muestras, lo que lo hace útil para estudios ambientales. La detección del gen *ppk* se logró en muestras que contenían  $10^2$  células de *E. coli*, tanto en solución salina como en agua de río.

\* Correspondence to: Beatriz S. Méndez. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Ciudad Universitaria. Pabellón 2. 1428 Buenos Aires. Argentina. Tel.: +54-1-7820281. Fax: +54-1-7820458. E-mail:bea@quibiol.qb.fcen.uba.ar

## Introduction

Polyphosphate (polyP) is an inorganic polymer widely distributed among prokaryotic and eukaryotic organisms. Its biosynthesis has been elucidated for *Escherichia coli* (12, 13). In this pathway, the terminal phosphate of ATP is transferred to the polyP growing chain by the polyphosphate kinase (PPK), and the same enzyme catalyzes the reverse reaction. The *E. coli* *ppk* gene has been cloned and molecularly characterized (2).

Several functions are performed by polyP in bacteria. PolyP is a reservoir for phosphate; it is also a chelator of metal ions; and it contributes to the formation of a channel for DNA entry (14). In biotechnological terms, polyP accumulation is an important process in the removal of inorganic P in waste waters (11). Different bacterial species isolated from sludge present the capability of accumulating polyP. However, the contribution of each of them to total polyP accumulation is unclear (8, 10).

Genetic methods for the detection of microorganisms based on the recovery of DNA, the amplification of target nucleotide sequences by using the polymerase chain reaction (PCR), and the detection of the amplified DNA with gene probes have been successfully used in various applications, avoiding the need for culturing (4). The approach chosen to study and isolate the microorganisms that are relevant for polyP accumulation in sludge or other environments is the detection of the genes for polyP synthesis.

We evaluate this approach in a model system, using the *ppk* gene sequence from *E. coli*, which at present is the only one that has been published (2). This sequence was compared with *ppk* sequences from *Campylobacter coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Neisseria meningitidis*, and the most conserved region was used for the design of the primers.

In this work, a method for the isolation of genomic DNA and amplification of polyP genes using *ppk* primers is described.

## Materials and methods

**Bacterial strains, plasmid and culture conditions.** *E. coli* JM109 was grown in LB broth with shaking until late exponential phase. Serial dilutions were plated in LB agar plates for cell number determinations.

For chromosomal DNA preparation, overnight bacterial cultures in LB were used. Plasmid pBC10 is a derivative of pUC18 carrying the *E. coli* *ppk* gene (2).

**Water sample collection.** Superficial water samples from the Río de la Plata were collected using one-liter plastic containers with a lid, previously rinsed three times with the same water. The water was processed in the laboratory within a few hours from collection.

The viable number of bacteria in the samples was determined by plating on LB agar. Direct microscopic counts of cells, stained with acridine orange (9), were also performed to determine the total number of bacteria present.

**DNA recovery.** The method developed in this work was an adaptation of the boiling method (16), using filters for the harvesting of cells. For this procedure, 1 or 10 ml serial dilutions of an *E. coli* culture were prepared in saline solution or water obtained from the Río de la Plata, either untreated or previously sterilized by filtration through a 0.22 µm cellulose filter (Millipore GSWP). The dilutions were filtered through two types of filters: Durapore (Millipore GVWP) or Fluoropore (Millipore FGLP, hydrophobic) 25 mm diameter, 0.22 µm pore size, to collect the cells. The filters were placed in 1.5 ml Eppendorf tubes, against the inner surface of the tube, the cells towards the center of the tube, to which

500 µl TE (Tris-HCl, 10 mM, pH 8, EDTA 0.1 mM) were added. The tubes were vortexed vigorously to resuspend the cells, the filters were submerged in the liquid, and then placed in a boiling water bath for 10 min. The resulting suspension was vortexed briefly, and spun down to bring down condensation.

DNA was also prepared from the cells by three other previously described methods. The hot SDS method of Fuhrman et al. (6) was modified as follows: 100 ml of serial dilutions in NaCl 0.9% of *E. coli* were filtered through 47 mm diameter, 0.22 µm pore size, Durapore filters. The filters were cut in strips 1 cm wide and vortexed briefly in 4 ml STE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl). One tenth volume of 10% SDS solution was added dropwise with swirling. The tubes were placed in a boiling water bath for 2 min and were allowed to cool at room temperature. The liquid was transferred to a new tube, and the DNA was directly precipitated by adding 1.5 ml ammonium acetate 10.5 M and 14 ml absolute ethanol. The tubes were placed at -20°C overnight and centrifuged at 12000 × g, 15 min. The resulting pellet was resuspended in 0.1 to 1 ml TE (Tris-HCl, 10 mM pH 8, EDTA 0.1 mM) according to its magnitude. The methods of Bej et al. (3) and Li et al. (15) were applied to 1 ml of *E. coli* cell culture serial dilutions in saline solution filtered through Fluoropore (for the method of Bej) or Durapore (for the method of Li) 25 mm diameter, 0.22 µm pore size filters.

**Control DNA preparation.** Purified genomic DNA was prepared according to published protocols (1). Lyophilized plasmid DNA from pBC10 was kindly supplied by A. Kornberg.

**PCR amplification.** Using available sequence information from the *ppk* gene from *E. coli* (2), *Campylobacter coli*, *Klebsiella aerogenes* and *Neisseria meningitidis* (Kornberg, A., and Ault-Riche, D., personal commun-

cation), the following primers were designed:

5'-TTACAGGCGCGTTCGACGAA

5'-CATCCAGTCGGCGGAAGA

One to 25 µl of template DNA were added to tubes containing 5 ml 10× PCR amplification buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9, 1% Triton X-100), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each dNTP, 0.3 µM each primer, 0.5 units *Taq* DNA polymerase (Promega) and sterile distilled water to a final volume of 50 µl.

The reaction mix of the samples treated with the extraction method was described in the original paper (15), with the addition of the *ppk* primers and 0.5 units of *Taq* polymerase. The final volume used in this case was also 50 µl.

A layer of mineral oil (30 to 50 µl) was placed on top of each sample. The amplification was performed in a Sontec ctp1 thermal cycler (SONTEC, Buenos Aires, Argentina).

Template DNA was initially denatured at 95°C for 5 min. Then a total number of 35 PCR cycles were run following a three-step program with denaturation for 45 s at 95°C, annealing at 54°C for 30 s and extension at 72°C for 90 s. A final incubation at 72°C for 10 min ensured complete extension of all DNA strands. A negative control using water instead of template DNA was run in every reaction. The PCR-amplified DNAs were visualized by electrophoresis in horizontal 1% agarose gels, stained with ethidium bromide.

## Results and discussion

When large volumes are used, as in samples obtained from natural environments, the usual method of choice for the harvesting of bacterial cells is filtering.

We adapted the method described by Möller (16) to release DNA from filtered samples, in order to use it for the detection of cells from

environmental samples. Similar results were obtained using Fluropore or Durapore filters. Durapore filters have the advantage of being less expensive and easier to use than Fluropore filters, which must be pre-wet in ethanol and are not suitable for some commonly used manifold filtering units.

This method allowed the detection by amplification of the *ppk* gene in a sample containing  $10^2$  *E. coli* cells. The predicted product size for amplification in *E. coli* was 638 bp. Plasmid pBC10, which carries *E. coli ppk* gene (2) was used as control (Fig. 1).

Different procedures for DNA release suitable for PCR amplification were applied to the same samples, which were amplified in the conditions previously described. The results are shown in Table 1. The method developed in this study was the most sensitive in our conditions

for the amplification of the *ppk* gene fragment. It is also simple, fast and adequate for the processing of many samples.

To evaluate the use of this technique in environmental studies, we analyzed the effect of natural samples on the detection of the *ppk* gene by the method described in this paper. Dilutions of an *E. coli* culture in either untreated or filter sterilized river water gave the same detection limit as the dilutions made in saline solution (Fig. 1). This indicates that neither inorganic or organic material, nor the indigenous microbiota present in the river water inhibited the procedure. According to plate counts and direct microscopic observation, river water contained approximately  $10^4$  CFU/ml or  $10^5$  total bacterial cells/ml, respectively.

Ethidium bromide-stained agarose gel electrophoretic analysis of PCR products al-

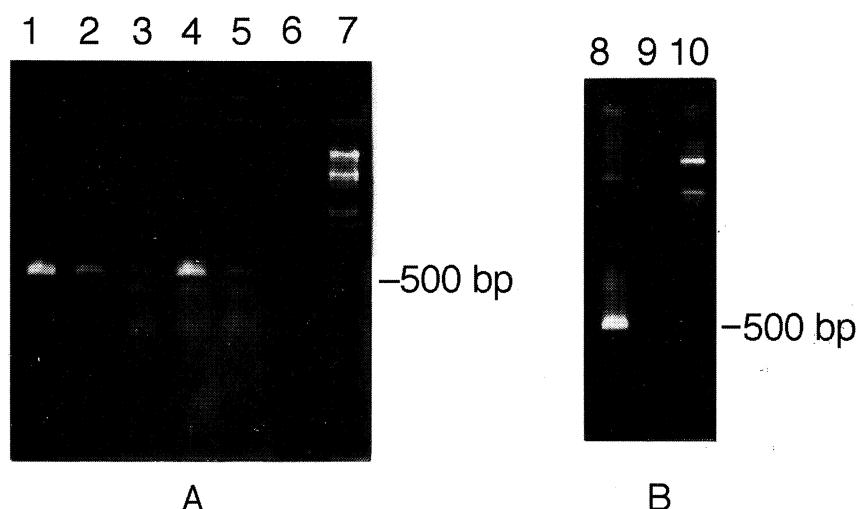


FIG. 1. A: PCR amplification of the *ppk* gene in samples containing dilutions of *Escherichia coli* JM109, either in saline solution or in filtered river water, using the method described in this paper for the recovery of DNA. B: PCR amplification of the *ppk* gene from plasmid pBC10. Lanes: 1,  $10^4$  cells in saline solution; 2,  $10^3$  cells in saline solution; 3,  $10^3$  cells in river water; 4,  $10^2$  cells in saline solution; 5,  $10^2$  cells in river water; 6, dilution blank; 8, plasmid pBC10; 9, water. Lanes 7 and 10, *EcoRI* and *HindIII*-digested DNA, used as a size marker. After PCR amplification, 10 ml of reaction mixture were run in a 1% agarose gel, and stained with ethidium bromide for visualization.

TABLE 1. Comparison of the detection limits using different DNA release methods

Method	Type of filter	Limit of detection (in cell number)	Reference
Hot SDS	Durapore	10 <sup>6</sup>	6
Frezee and thaw	Fluoropore	10 <sup>3</sup>	3
Direct lysis	Durapore	10 <sup>5</sup>	15
Boiling	Durapore	10 <sup>2</sup>	This work
Boiling	Fluoropore	10 <sup>2</sup>	This work

lowed the detection of *ppk* gene in 30 pg of *E. coli* purified genomic DNA, used as a control, or in DNA obtained by the method here described from 10<sup>2</sup> cells. This detection limit is within the values described for different genes and species, that range from 10<sup>0</sup> to 10<sup>4</sup> (3, 16). These limits vary according to the species, the genes used, and whether these genes are on a plasmid or on the chromosome (5, 7).

The primers that we describe in this paper have allowed the amplification of *ppk* genes from purified genomic DNA from *Alcaligenes eutrophus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus megaterium*, and some river isolates obtained in this laboratory (data not shown), both Gram-positive and Gram-negative. It indicates that the region chosen for the construction of the primers is conserved enough to allow the detection of polyP-producing strains in natural environments. This, together with the fact that indigenous microbiota or solutes present in the river do not appear to inhibit the reaction, make the system adequate for the detection of polyP-producing bacterial strains in natural environments.

### Acknowledgements

We thank Arthur Kornberg and Dana Ault-Riche for the gift of pBC10 and sharing unpublished information. This work was supported by

grants from the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET) and the Universidad de Buenos Aires. BSM is a career investigator from CONICET.

### References

1. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J., Smith, J. A., Struhl, K. (1988). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc. New York.
2. Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A. (1992). The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 22556–22561.
3. Bej, A. K., Mahbubani, M. H., DiCesare, J. L., Atlas, R. M. (1991). Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3529–3534.
4. Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J., Haff, L., Atlas, R. M. (1990). Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3529–3534.
5. Cebolla, A., Ruiz-Berraquero, F., Palomares, A. J. (1993). Stable tagging of *Rhizobium meliloti* with the firefly luciferase gene for environmental monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2511–2519.
6. Fuhrman, J. A., Comeau, D. E., Hagström, Å., Chan, A. M. (1988). Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1426–1429.
7. Goldenberger, D., Perschil, I., Ritzler, M., Altweg, M. (1995). A simple “universal” DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods and Applications* **4**, 368–370.

8. Hiraishi, A., Morishima, Y. (1990). Capacity for polyphosphate accumulation of predominant bacteria in activated sludge showing enhanced phosphate removal. *J. Ferment. Bioeng.* **69**, 368–371.
9. Hobbie, J. E., Daley, R. J., Jasper, S. (1977). Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1225–1228.
10. Jorgensen, K. S., Pauli, A. S-L. (1995). Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge. *Anaerobe* **1**, 161–168.
11. Kawaharasaki, M., Nakamura, K. (1995). Some factors which affect the phosphorus uptake of a phosphorus-accumulating bacterium, strain NM-1. *J. Ferment. Bioeng.* **79**, 190–192.
12. Kornberg, A., Kornberg, S. R., Simms, E. S. (1956). Metaphosphate synthesis by an enzyme of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 215–227.
13. Kornberg, S. R. (1957). Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 294–300.
14. Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* **177**, 491–496.
15. Li, H., Gyllensten, U. B., Cui, X., Saiki, R. K., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1988). Amplification and analysis of sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature (London)* **335**, 414–417.
16. Möller, A., Gustafsson, K., Jansson, J. K. (1994). Specific monitoring by PCR amplification and bioluminescence of firefly luciferase gene tagged bacteria added to environmental samples. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **15**, 193–206.

## Cellular content of storage inclusions in purple sulfur bacteria determined by ultrathin sections

Isabel Esteve,<sup>1\*</sup> Jordi Mas,<sup>1</sup> Núria Gaju,<sup>1</sup> Ricardo Guerrero<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Genetics and Microbiology, and Institute for Fundamental Biology,  
Autonomous University of Barcelona, Bellaterra*

<sup>2</sup>*Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 6 May 1996/Accepted 29 October 1996

---

### Summary

Phototrophic sulfur bacteria accumulate storage inclusions as a mechanism to adapt to several types of environmental stress. We compare the content of elemental sulfur and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) found in cultures growing under laboratory conditions with the content found in microorganisms in natural environments. Since natural communities are extremely heterogeneous in composition (they do not contain only phototrophic sulfur bacteria) and physiological state, it was not possible to apply conventional chemical analyses for the determination of the contents of sulfur and PHB. The study was performed by means of transmission electron microscopy, which turned out to be an excellent tool for this purpose. The results indicate that, in natural environments, cells have an extremely high content of storage inclusions, much higher than their laboratory grown counterparts, probably as a consequence of less favorable environmental conditions.

**Key words:** storage inclusions, purple sulfur bacteria, electron microscopy, anoxic ecosystems, cell ultrastructure

### Resumen

Las bacterias fototróficas del azufre acumulan inclusiones de reserva como mecanismo adaptativo a diferentes tipos de condiciones ambientales adversas. Este trabajo compara el contenido de azufre elemental y de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) producido en cultivos bajo condiciones controladas de

---

\*Correspondence to: Isabel Esteve. Department of Genetics and Microbiology, and Institute for Fundamental Biology. Autonomous University of Barcelona. Bellaterra. 08193 Barcelona. Spain. Tel.: +34-3-5811278. Fax: +34-3-5812011.

laboratorio, con el encontrado en microorganismos en ambientes naturales. Dado que las comunidades naturales estudiadas son extraordinariamente heterogéneas en su composición (no están constituidas sólo por bacterias fototróficas del azufre) y en el estado fisiológico de sus células, no es posible aplicar técnicas convencionales de análisis químicos para determinar el contenido en azufre o PHB. El microscopio electrónico de transmisión ha demostrado ser una excelente herramienta para este propósito. Los resultados del presente trabajo indican que las células en su ambiente natural presentan un elevado contenido de inclusiones de reserva, mucho mayor que el de las células de los mismos grupos desarrolladas en cultivos de laboratorio. Ello es probablemente debido a su respuesta a condiciones ambientales menos favorables.

## Introduction

In natural environments, phototrophic sulfur bacteria form mass developments when conditions are favorable. The structure and function of these blooms has been a matter of study for several years, and other papers have been published on the subject (3, 11, 16). Evidences indicate that bacteria accumulate significant amounts of storage inclusions in these blooms (2, 8, 9, 10).

The major role played by these inclusions in the bacterial metabolism has been well documented for laboratory cultures of purple sulfur bacteria (1, 15). However, scarce information is available which explains their role in natural environments.

The role of storage inclusions in the in situ metabolism of the community was well demonstrated by van Gemerden et al. (16), in their study of the day/night kinetics of the concentrations of sulfur, glycogen and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) in the microbial community of lake Cisó. Their observations, though, correspond to global sulfur, glycogen and PHB measurements, which refer to the whole community, not to individual cells. As a consequence, it is difficult to assess the physiological heterogeneity of the organisms and to estimate the average content per cell of these inclusions, which is one of the most useful variables when

trying to interpret the physiological state of the cells.

Application of electron microscopy techniques to the analysis of similar situations has yielded valuable information on the content of sulfur and PHB per individual cell (2). In this case, however, the contents were calculated from ultrathin sections and could not be compared with data available from the literature (usually expressed as the weight of inclusion per cell dry weight or per mg protein). Recently, flow cytometry has allowed to quantify the PHB content of individual cells of *Rhizobium melliloti* (4). The method, although promising in many aspects, still has to be tested in the analysis of microbial communities in natural environments, and will probably be of little help in the analyses of benthic communities such as microbial mats. Also, FT-IR spectroscopy has been used for identification of cell components in bacterial cultures, but no data are available from natural habitats (6).

In this study we try to correlate ultrastructural observations to biochemical measurements. This correlation should allow the interpretation of ultrathin sections of phototrophic sulfur bacteria in natural environments from the biochemical data described in the literature. This approach might allow to diagnose to some extent the physiological state of the organisms in their environment, especially when

no other procedures seem feasible, as it is the case of microbial mats. We first performed a laboratory experiment with a phototrophic purple sulfur bacterium (*Chromatium warmingii*), in which the accumulation of inclusions was studied both by chemical analyses and by observing ultrathin sections. At a second stage, we carried out an extensive morphometric analysis of ultrathin sections of several samples from environments in which phototrophic sulfur bacteria were predominant. The interpretation of ultrastructural observations of field samples taking as a reference culture experiments had not been reported before.

## Materials and methods

**Study area and sampling.** Field samples were taken from the microbial community of Lake Cisó, located in the Banyoles karstic area ( $42^{\circ} 08' N$ ,  $2^{\circ} 45' E$ ) near the city of Girona, NE Spain, as well as from microbial mats located at the delta of the Ebro river ( $40^{\circ} 35' N$ ,  $0^{\circ} 40' E$ ), 50 km south of the city of Tarragona, NE Spain.

### Bacterial strain and analytical procedures.

Cultures of *Chromatium warmingii* were provided by H. G. Trüper (University of Bonn, Germany). The cultures were grown in Pfennig's medium. The initial sulfide concentration was 0.89 mM and cell concentration was  $2.71 \times 10^6$  cells/ml. Cultures were incubated at  $27^{\circ}C$  and  $60 \mu\text{Einstein}/\text{m}^2/\text{s}$ . A Coulter counter model ZBI with a 30  $\mu\text{m}$  aperture tube, connected to an impulse Channelyzer 1000, was used for counting and sizing bacterial cells (5).

The intracellular sulfur content was measured photometrically in 96% ethanol extracts of whole cells according to van Gemerden (14).

PHB was monitored at a few points during the experiments because its concentration was expected to be low under the experimental con-

ditions used. PHB was followed by examination of Sudan black stained preparations (7).

**Ultrathin sections, measurements and data processing.** Samples from axenic cultures and from Lake Cisó were suspended in 2.5% glutaraldehyde sodium cacodylate buffer (50 mM, pH 7.1) and embedded in Epoxy resins. Samples from microbial mats were prepared according to the method described by Stolz et al. (13). A series of thin sections were picked at random and mounted on Formvar-coated grids, stained with saturated uranyl acetate and Reynolds lead citrate (12), and viewed in a Hitachi 12A transmission electron microscope.

For measurements and data processing, 30 to 50 ultrathin sections were processed from every sample of each experiment. Pictures from transmission electron microscopy were enlarged  $40,000\times$  to obtain accurate measurements. From these measurements, the average number of inclusions per cell section and the surface density of inclusions (determined as the ratio between the area of the inclusions and the area of the structural cell material [SCM]) were determined.

## Results and discussion

**Variations in the cellular content of sulfur and PHB during the growth of *Chromatium warmingii*.** The aim of this study was to interpret the ultrathin sections from natural samples from the results of comparing the analytical and ultrastructural information on the cellular content of storage inclusions. To do this, it was necessary to perform an experiment under well controlled conditions, in which the organisms were forced to change their inclusion content. The experiment, carried out with the bacterium *Chromatium warmingii*, was set up in such a way that a dense culture ( $2 \times 10^6$  cells/ml) was fed hydrogen sulfide (1mM final concentration),

incubated in the dark for 10 h, and placed then in the light. From the onset of the illumination, *Chromatium warmingii* started the oxidation of hydrogen sulfide (Fig. 1A). Simultaneously, sulfur, which was being formed as an intermediate in sulfide oxidation, accumulated in the culture, reaching a maximum value of 0.25 mM at the time of sulfide depletion. From then on the culture grew at the expense of intracellular sulfur,

which was then used as the only electron donor. Incubation was extended overnight. The following morning the sulfur had been completely oxidized and the culture had reached stationary phase at  $6 \times 10^6$  cells/ml.

At different times during the experiment, samples were taken from the culture for ultrastructural analyses. After processing the samples as described in Materials and methods,

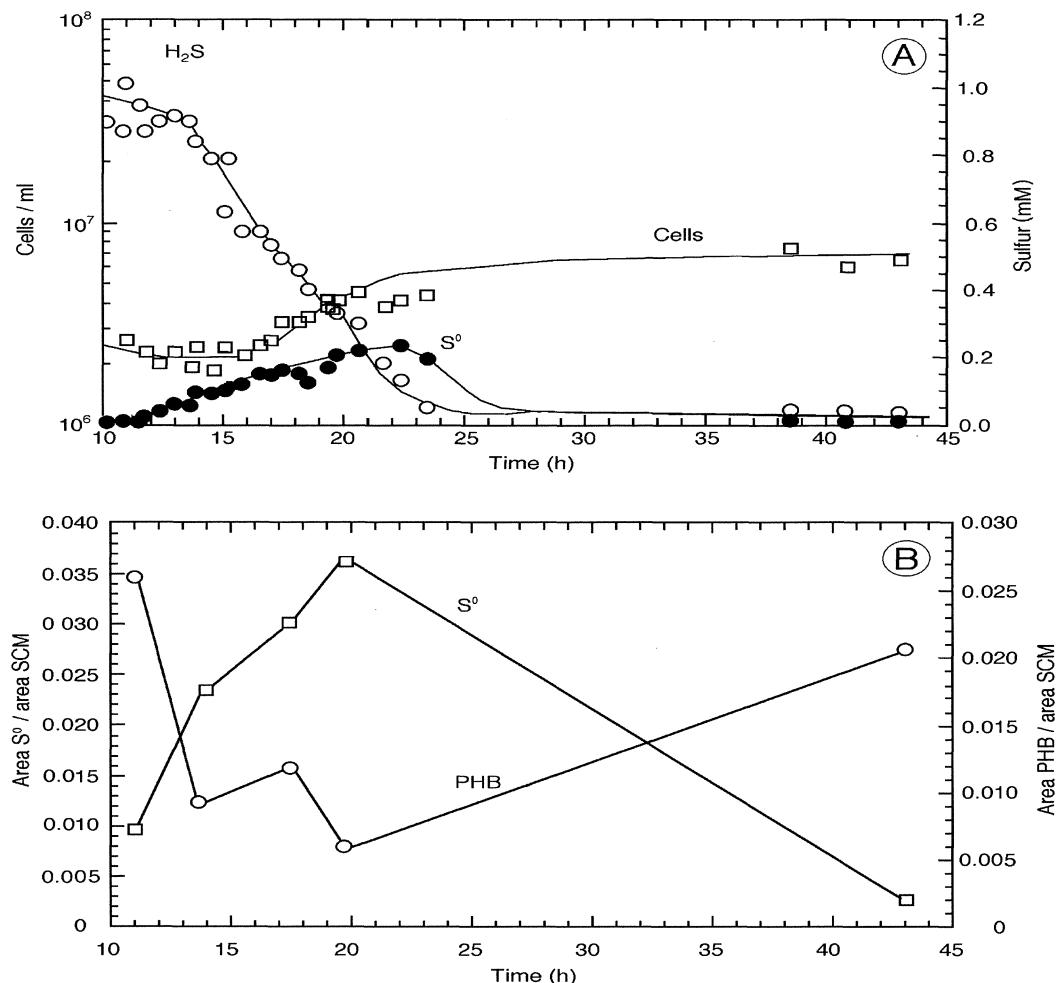


FIG. 1. (A) Time course of culture variables during the growth of *Chromatium warmingii*: cell numbers (□), total sulfide (○) and intracellular sulfur (●). (B) Surface density of inclusions ( $\mu\text{m}^2$ ) referred to cell profile area ( $\mu\text{m}^2$ ). Data obtained from ultrathin sections. Symbols: (□) sulfur; (○) poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB); SCM, structural cell material. (Complementary data in Table 1.)

a detailed morphometric study of sulfur and PHB inclusions was performed. Glycogen, which accumulates along with sulfur during this kind of experiment (3) could not be accurately determined due to the small size of the glycogen inclusions and to the difficulty to discriminate them from the intracellular membrane system. The results of the study have been summarized in Table 1. The number of sulfur globules per cell ranges from an average of 0.5–0.2, at the beginning and at the end of the experiment, to an average of 1.4–1.9 during the period of sulfur accumulation.

When the sulfur content was expressed as the ratio between the area of the inclusion and the structural cell area (area of the cell section not occupied by inclusions) the values increased from 0.010 up to 0.036  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ . These results are in good agreement with the specific contents of sulfur (Table 1) estimated from direct chemical measurements of sulfur concentration, and the cellular biovolumes determined with the Coulter counter (data not shown). The variation of sulfur content, determined from transmission electron microscopy observations, has been represented in Fig. 1B as a function of time. The kinetics of change resembles very closely the

variations in sulfur concentration shown in Fig. 1A.

In the case of PHB, a completely different pattern was observed. First, there were more PHB inclusions than sulfur inclusions per cell section (between 2 and 5 inclusions per cell). Second, the variation with time of the PHB content, expressed also as the ratio between the area of the inclusion and the structural cell area, followed a different trend. At the beginning of the light period, cells contained a fair amount of PHB ( $0.026 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ), comparable to the sulfur content at the moment of maximum accumulation. This PHB, which was probably accumulated as a product of dark metabolism during the previous 10 h in the dark, was utilized during the light period, reaching a minimum of  $0.006 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$  10 h later. At the end of the experiment, the PHB content had increased again up to  $0.021 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ . The time course of PHB variation during the experiment has been represented in Fig. 1B.

**Cellular content of sulfur and PHB in samples from natural environments.** The information provided by the experiments described above was expected to allow the interpretation of ultrastructural observations of field samples,

TABLE 1. Specific contents of intracellular inclusions in a culture of *Chromatium warmingii* during growth on minimal medium containing hydrogen sulfide

Time (h)	Sulfur (pg/ $\mu\text{m}^3$ )	% <sup>a</sup>	No. of globules/cell section (average)		Surface density <sup>b</sup> ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ )	
			S <sup>0</sup>	PHB	S <sup>0</sup>	PHB
11.0	0.004	0.4	0.5	5.0	0.010	0.026
13.7	0.017	1.5	1.9	2.3	0.020	0.009
17.5	0.118	10.4	1.4	2.2	0.030	0.012
19.8	0.142	12.5	1.9	1.9	0.036	0.006
43.1	0.004	0.4	0.2	4.2	0.003	0.021

<sup>a</sup> Percentage of volume occupied by the inclusion calculated assuming a sulfur specific density of  $1.142 \text{ pg}/\mu\text{m}^3$ .

<sup>b</sup> Ratio between the area of the inclusions and the area of structural cell material.

especially when no other procedure could be used, as in the case of microbial mats. To test the suitability of this approach, we decided to study samples from two different environments.

One of the chosen environments was Lake Cisó, in which a rich planktonic community of purple sulfur bacteria has been thoroughly described (16). The second was one of the microbial mats which develop in the Ebro Delta, in which purple sulfur bacteria seem to play a major role.

Samples from Lake Cisó were taken at sunrise (6 a.m.) and at noon, anticipating maximum differences in the content of inclusions between these two times. The samples were processed simultaneously for ultrastructural and chemical analyses of the sulfur and PHB contents. The obtained results (Table 2) show similarities with the results of the experiment above described. At 6 a.m., after a period of several hours in the dark, ultrastructural observations indicate that the cells contain  $0.024 \mu\text{m}^2$  of sulfur inclusion per  $\mu\text{m}^2$  of SCM. This sulfur content is relatively low when referred to the content measured at noon ( $0.288 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ). However, it is comparable to the amounts of sulfur stored by *Chromatium warmingii* during the laboratory experiment above described. The content of PHB, on the

contrary, was maximum at 6 a.m. ( $0.346 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ) and decreased at noon ( $0.185 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ).

When compared with the data found in the previous experiment, all these values are extremely high. Moreover, the number of PHB inclusions per cell, which was 2 to 5 in the culture, was much higher in samples from Lake Cisó, reaching as many as 10 granules per cell. Those ultrastructural contents, in general, were much higher than any of the values previously described in the laboratory. This trend was also observed in samples from the Ebro Delta microbial mats. Microbial mats are multilayered microbial communities in which phototrophic purple sulfur bacteria occupy a well defined position. Samples for ultrastructural analyses were taken from the purple layer of a well developed microbial mat, following the procedure above described.

The results, also shown in Table 2, indicate an extremely high sulfur content ( $0.221 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ), and a relatively high PHB content ( $0.089 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ), both of them much higher than the contents found in cultures of *Chromatium warmingii*.

A common trend seems to emerge with cellular contents of the two inclusions analyzed in field samples, which can be as much as one order

TABLE 2. Specific contents, determined from ultrathin sections, of intracellular inclusions in natural samples from different environments

Sample	Sulfur (pg/ $\mu\text{m}^3$ )	PHB (pg/ $\mu\text{m}^3$ )	No. of globules/cell section (average)		Surface density <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ )	
			S <sup>0</sup>	PHB	S <sup>0</sup>	PHB
Lake Cisó 6 a.m.	0.32	0.17	1.4	10.6	0.024	0.346
Lake Cisó 12 a.m.	0.56	0.03	3.4	8.3	0.288	0.185
Ebro Delta	-	-	2.2	21.5	0.221	0.089

<sup>a</sup> Ratio between the area of the inclusions and the area of structural cell material.

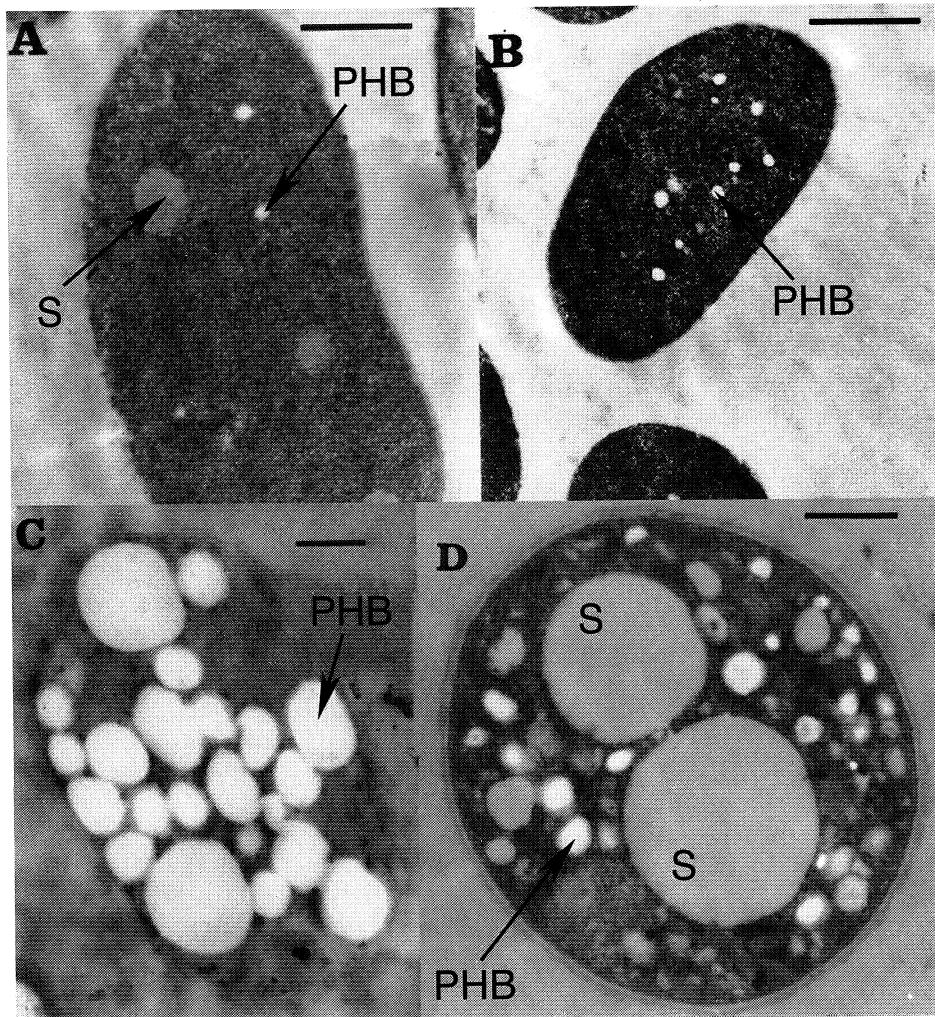


FIG. 2. Cytoplasmic inclusions in purple sulfur bacteria: sulfur globules (S) and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) granules. (A) Ultrathin section of *Chromatium warmingii*, 15 h, and (B) 26 h. Bar represents 1  $\mu\text{m}$  and 2  $\mu\text{m}$ , respectively. (C) Ultrathin section of *Chromatium* sp., taken at early morning (6 a.m.) from Lake Cisó. Bar represents 0.25  $\mu\text{m}$ . (D) Unidentified purple phototrophic bacterium from the Ebro Delta microbial mats. (Courtesy, D. Ceballos.) Bar represents 1  $\mu\text{m}$ . Arrows indicate sulfur globules and PHB granules.

of magnitude higher than the contents found in laboratory cultures. The electron micrographs presented in Fig. 2 further illustrate this tendency. Two of the images correspond to ultrathin sections from *Chromatium warmingii* at the point of minimal and maximal accumulation (Fig. 2A and 1B). The other two images belong to a *Chromatiaceae* in Lake Cisó (Fig. 2C) and to a *Chromatiaceae* in the Ebro Delta microbial mat

(Fig. 2D). From plain observation it becomes obvious that the content of inclusions in laboratory cultures and field samples are very different from each other.

Ultrastructural studies, therefore, seem to be a major complement to ecological studies intending to shed light on the physiological state and behavior of natural microbial communities. The application of transmission electron

microscopy to more field samples, in conjunction with other ecological studies, would prove an extremely valuable tool to understand the mechanisms of adaptation of these bacteria to their environment.

### Acknowledgments

This work was supported by Spanish grant DGICYT 94-0730 to IE. We thank C. Pedrós-Alió for helpful discussion and M. Piqueras for her advice and collaboration.

### References

1. Liebergesell, M., Hustedt, E., Timm, A., Steinbüchel, A., Fuller, R. C., Lenz, R. W., Schlegel, H. G. (1991). Formation of poly-3-hydroxyalcanoates by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**, 415–421.
2. Esteve, I., Montesinos, E., Mitchell, J. G., Guerrero, R. (1990). A quantitative ultrastructural study of *Chromatium minus* in the bacterial layer of lake Cisó (Spain). *Arch. Microbiol.* **153**, 316–323.
3. Esteve, I., Ceballos, D., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., Guerrero, R. (1994). Development of versicolored microbial mats: successional of microbial communities. In Stal, L. J., Caumette, P. (ed.), *Microbial Mats. Structure, Development and Environmental Significance*. pp. 415–420. NATO ASI Series, vol. G 35, Springer-Verlag, Berlin.
4. Fouchet, P., Jan, S., Courtois, J., Courtois, B., Frelat, G., Barbotin, J. N. (1995). Quantitative single-cell detection of poly-β-hydroxybutyrate accumulation in *Rhizobium meliloti* by flow cytometry. *FEMS Microbiol. Letters* **126**, 31–36.
5. Guerrero, R., Mas, J., Pedrós-Alió, C. (1984). Buoyant density changes due to intracellular content of sulfur in *Chromatium warmingii* and *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **177**, 350–356.
6. Helm, D., Nauman, D. (1995). Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiol. Letters* **126**, 75–80.
7. Herbert, D., Phipps, P. J., Strange, R. E. (1971). Chemical analysis of microbial cells. In Norris, J. R., Ribbons, D. W. (ed.), *Methods in Microbiology*, vol 5B. pp. 209–344. Academic Press, London.
8. Herron, J. S., King, J. D., White, D. C. (1978). Recovery of poly-β-hydroxybutyrate from estuarine microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 251–257.
9. Mas-Castellà, J., Guerrero, R. (1995). Poly-β-hydroxyalkanoate accumulation in bacterioplankton from Lake Cisó. *Can. J. Microbiol.* **41**, 80–83.
10. Mas, J., van Gemerden, H. (1995). Storage products in purple and green sulfur bacteria. In Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E. (ed.), *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. pp. 973–990. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
11. Mir, J., Martínez-Alonso, M., Esteve, I., Guerrero, R. (1991). Vertical stratification and microbial assemblage of a microbial mat in the Ebro Delta (Spain). *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**, 59–68.
12. Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17**, 208–212.
13. Stolz, J. F. (1983). Fine structure of the stratified microbial community at Laguna Figueroa, Baja California, México. I Methods of *in situ* study of the laminated sediments. *Precamb. Res.* **20**, 479–492.
14. van Gemerden, H. (1968). Utilization of reducing power in growing cultures of *Chromatium*. *Arch. Mikrobiol.* **64**, 111–117.
15. van Gemerden, H. (1980). Survival of *Chromatium vinosum* at low light intensities. *Arch. Microbiol.* **125**, 115–121.
16. van Gemerden, H., Montesinos, E., Mas, J., Guerrero, R. (1985). Diel cycle of metabolism of phototrophic purple sulfur bacteria in Lake Cisó (Spain). *Limnol. Oceanogr.* **30**, 932–943.

## Free-living spirochetes from Cape Cod microbial mats detected by electron microscopy

Thomas H. Teal, Michael Chapman, Tracy Guillemette, Lynn Margulis\*

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

Received 20 June 1996/Accepted 15 October 1996

---

### Summary

Spirochetes from microbial mats and anaerobic mud samples collected in salt marshes were studied by light microscopy, whole mount and thin section transmission electron microscopy. Enriched in cellobiose-rifampin medium, selective for *Spirochaeta bajacaliforniensis*, seven distinguishable spirochete morphotypes were observed. Their diameters ranged from 0.17 µm to >0.45 µm. Six of these morphotypes came from southwest Cape Cod, Massachusetts: five from *Microcoleus*-dominated mat samples collected at Sippewissett salt marsh and one from anoxic mud collected at School Street salt marsh (on the east side of Eel Pond). The seventh morphotype was enriched from anoxic mud sampled from the north central Cape Cod, at the Sandy Neck salt marsh. Five of these morphotypes are similar or identical to previously described spirochetes (*Leptospira*, *Spirochaeta halophila*, *Spirochaeta bajacaliforniensis*, *Spirosymplokos deltaeiberi* and *Treponema*), whereas the other two have unique features that suggest they have not been previously described. One of the morphotypes resembles *Spirosymplokos deltaeiberi* (the largest free-living spirochete described), in its large variable diameter (0.4–3.0 µm), cytoplasmic granules, and spherical (round) bodies with composite structure. This resemblance permits its tentative identification as a Sippewissett strain of *Spirosymplokos deltaeiberi*. Microbial mats samples collected in sterile Petri dishes and stored dry for more than four years yielded many organisms upon rewetting, including small unidentified spirochetes in at least 4 out of 100 enrichments.

**Key words:** *Spirosymplokos deltaeiberi*, *Spirochaeta bajacaliforniensis*, *Spirochaeta halophila*, *Leptospira*, *Treponema*, spirochete desiccation resistance

### Resumen

Se han estudiado por microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión, en preparaciones enteras y secciones finas, diversas muestras de espiroquetas de tapetes microbianos y de lodo

---

\* Correspondence to: Lynn Margulis. Department of Biology. University of Massachusetts. Amherst, MA 01003-5018. USA. Tel.: +1-413-5453244. Fax: +1-413-5453243.

anaeróbico de lagunas salinas. En medio enriquecido con celobiosa–rifampina, selectivo para *Spirochaeta bajacaliforniensis*, se diferenciaron siete morfotipos de espiroquetas, con diámetros comprendidos entre 0,17 y >0,45 µm. Seis de estos morfotipos procedían de muestras del sureste de Cape Cod, Massachusetts (cinco correspondían a los tapetes de las lagunas salinas de Sippewissett en las cuales domina *Microcoleus*; una al fango anóxico recogido en School Street, en la orilla este de Eel Pond). El séptimo morfotipo fue enriquecido a partir de fango anóxico del norte del Cape Cod central, cerca de Sandwich, Massachusetts, en la laguna salina de Sandy Neck. Cinco de estos morfotipos son similares o idénticos a espiroquetas descritas previamente (*Leptospira*, *Spirochaeta halophila*, *Spirochaeta bajacaliforniensis*, *Spirosymplokos deltaeiberi* y *Treponema*), mientras que los otros dos presentan rasgos únicos que parecen indicar que no han sido descritos anteriormente. Uno de los morfotipos se parece a *Spirosymplokos deltaeiberi* (la mayor espiroqueta de vida libre descrita) debido a su diámetro grande y variable (0,4–3,0 µm), a la presencia de gránulos citoplásmicos, y por presentar cuerpos redondos (esféricos) de estructura compuesta. Tal similitud permite identificarlo provisionalmente como una cepa de Sippewissett de *Spirosymplokos deltaeiberi*. Al humedecer, al cabo de más de cuatro años, las muestras de tapetes conservadas en ambiente seco en placas de Petri estériles, en al menos 4 de cada 100 enriquecimientos se observaron numerosos organismos, entre ellos pequeñas espiroquetas no identificadas.

## Introduction

Unique among prokaryotes, spirochetes have slender, helical cell morphologies and internal flagella which allow them to move rapidly especially through viscous media by forward and reverse translation, bending, flexing, creeping and/or crawling (4). Host-associated spirochetes were first identified by van Leeuwenhoek in 1683 (13). They are well-studied because some are pathogens. However, the diversity of free-living spirochetes is insufficiently documented as none are known pathogens. The antibiotic rifampin, a prokaryotic RNA-polymerase inhibitor to which spirochetes are resistant, has enabled the isolation of some new spirochetes from mixed culture (18). Supportive media for maintaining most of them are still unavailable. The free-living spirochete, *Spirochaeta plicatilis* (spira: coil, chaeta: hair), for example, has been observed many times since it was described over 160 years ago by Ehrenberg (6), but has never been cultivated. Morphological studies of *S. plicatilis* are limited to whole mount negative

stain preparations from sealed wet mount enrichments (3).

Spirochetes have been documented from microbial mat environments in current studies. These investigations form part of the search for the modern bacterial co-descendant(s) of the spirochete(s) which gave rise to the kinetosomes and axonemes (undulipodia) of eukaryotic cells, as hypothesized by the Serial Endosymbiosis Theory (19, 20). Microbial mats are ideal environments for bacterial symbioses to form. They may be modern analogues of environments where the first amitochondriate eukaryotes evolved (21, 30). Highly concentrated bacterial populations in these environments can lead to stratification, initiation of nutrient recycling and syntropy. Spirochetes described from microbial mats in these studies include: *Spirochaeta bajacaliforniensis* (8), *Mobilifilum chasei* (22) and *Spirosymplokos deltaeiberi* (11).

This study focuses on the morphological diversity of anaerobic marine spirochetes from microbial mats and anoxic mud collected in marsh habitats at Cape Cod, Massachusetts. Sam-

ples from three sites were studied over a two-year period (June 1993 to July 1995): Sippewissett salt marsh, the School Street salt marsh near Eel Pond, and Sandy Neck salt marsh near Sandwich.

## Materials and methods

**Field Sites.** Samples were collected from three sites: (i) Sippewissett salt marsh (SI), at lat.  $41^{\circ} 35' 30''$  N, long.  $70^{\circ} 38' 50''$  W; (ii) School Street salt marsh near Eel Pond (EP), at lat.  $41^{\circ} 31' 32''$  N, long.  $70^{\circ} 40' 15''$  W; and (iii) Sandy Neck salt marsh (SN), at lat.  $41^{\circ} 44' 03''$  N, long.

$70^{\circ} 23' 16''$  W (Fig. 1). In situ salinity and pH measurements were made at all sites during field collection. The general appearance of field sites was documented with a Minolta Maxxum 3000i camera using Kodak Ektachrome color slide film. Some slides were transferred to video and printed on a Sony color thermal printer.

(i) *Sippewissett salt marsh.* The studied site of other investigators (9, 26, 28) is fronted by barrier dunes, diurnally flooded and dried by tides. Located on the southeast shore of Buzzards Bay, it receives water from a warm southern current. Vertically stratified mats develop in the low lying sandy area of the marsh to a depth approximately 1–2 cm thick. The mat consists of

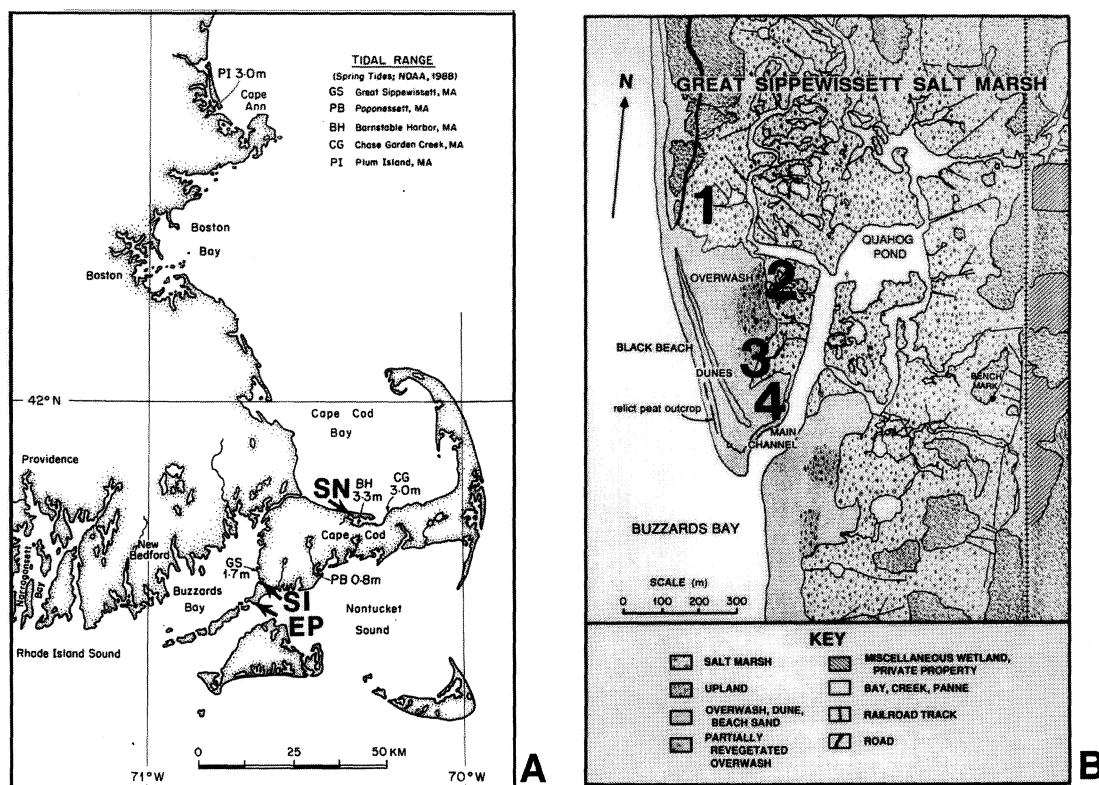


FIG. 1. Maps of field sites. (A) USGS map of Cape Cod, Massachusetts. Field sites: Sippewissett salt marsh (SI), School Street marsh at Eel Pond (EP), and Sandy Neck salt marsh (SN). (B) Detailed map of the Sippewissett salt marsh. Sampling sites (numbered 1–4) are all located west of Quahog Pond. Barrier dunes front the marsh and an extensive channel system is diurnally flooded by tides, see ref. 28.

several colored layers including a top brown diatom layer, a *Microcoleus chthonoplastes*-dominated cyanobacteria layer, an intermediate *Oscillatoria*-dominated bluish-green layer, a central pink layer of *Thiocapsa roseopersicina* and *Chromatium* sp., a peach layer of *Thiocapsa pfennigii*, a lower green sulfur bacterial layer, and an underlying black iron-sulfide rich layer (26). Microbial mats were collected at SI from four sites all located west of Quahog Pond (Fig. 1B) from September 1993 until July 1995.

Mats were collected using the bottom half of a Petri dish to core out a 2–3 cm deep circle of mat including all stratified layers. Samples were sealed with parafilm, labeled and cooled on ice for transport to the lab within 24 h. Sealed samples were stored up to four months at 4°C for enrichments. Strips approximately 8 × 15 cm were also cut on site from the mat, transported to the lab, and maintained at 25°C under 24 h fluorescent light. These mat samples thrived indefinitely, as each day they were lifted out and reimmersed in 80% sea water solution to help simulate the marsh environment. Some mat core samples were placed in 500–1000 ml sealed glass containers and covered with marsh water.

(ii) *School Street salt marsh* (near Eel Pond). Anoxic mud samples were collected in Petri dishes as described for mat samples. The School Street salt marsh (EP) is regularly subjected to flooding from the nearby sea-water Eel Pond. Anoxic black mud smelling strongly of sulfide was collected along the sides of a fresh-water stream running through the marsh into Eel Pond. Brownish mud from pools in the marsh, within a meter of the stream, was also collected. Samples were collected from September 1994 until July 1995. Some mud was placed in a sealed glass cylinder of ca. 115 liter (diameter 0.5 m), covered by 3–4 cm of marsh water and illuminated under 24 h incandescent light. This “giant Winogradsky column,” the growing strips of

microbial mat and mat core samples provided mud water enrichment sources of additional sampling.

(iii) *Sandy Neck* (near Sandwich, MA). Salt marsh anoxic mud was collected on an abandoned transport road approximately 100 m south of the main ranger station at Barnstable Beach Recreation Facility. The road is regularly flooded by tidal fluxes from the adjacent marsh. Samples were collected at SN from April 1994 until July 1995.

**Enrichments.** Spirochete enrichments were made by sterile inoculation of approximately 1.0 cm<sup>3</sup> of mat (including all layers and underlying sand) or mud samples into a 20 ml culture tube containing BA2rif medium. BA2 medium contains: 0.2% cellobiose, 0.2% trypticase peptone, 0.1% yeast extract, 0.1% sodium thioglycolate, 80% filtered sea water and 20% distilled H<sub>2</sub>O (8). BA2 medium was adjusted to pH 7.0 with KOH before autoclaving. After cooling, 0.4 ml stock filter sterilized rifampin solution (2 mg/ml) was pipetted into each culture tube to achieve a final rifampin concentration of 40 µg/ml. Inoculated tubes were tightly sealed and incubated at 25°C under 24 h fluorescent light in a semi-sealed Plexiglas box.

**Light microscopy.** Bacterial growth was monitored using a Nikon Microphot-FX microscope equipped with phase contrast and differential interference contrast (Nomarski) optics. Video light microscopy, using a Sony U-Matic video camera, was used to record activities of live spirochetes. Light micrographs were produced from video footage using a Sony color thermal printer.

#### Transmission electron microscopy (TEM).

(i) *Whole mounts.* Formvar-coated, carbon-reinforced 250-mesh copper grids were used in the multiple-drop technique (14) to prepare samples for whole mount TEM. Drops of poly-L-lysine (150–300,000 MW) and stain (1% uranyl acetate) were placed on a flat strip of parafilm.

The grid was floated on the poly-L-lysine drop for 30 s and wick-dried with the edge of a filter paper. A drop of sample containing live spirochetes was placed on the coated surface for 5 min, allowing spirochetes to settle on the grid surface. Excess medium was wicked away and the grid was floated on 1% uranyl acetate for 5–30 s. The grid was then rinsed in a jet of distilled H<sub>2</sub>O from a wash bottle for 20 s and allowed to air dry. Grids were observed on a Jeol JEM 100 electron microscope operated at 80 kV.

(ii) *Thin sections.* A 10 ml sample of media containing mixed-culture spirochete blooms was removed from mid-level in the culture tubes and centrifuged at 4000 rpm for 5 min to remove sediment. The supernatant was centrifuged at 7000 rpm for 20 min and the resulting pellet was resuspended in 1 ml 1.0 M phosphate buffered saline (PBS) and fixed for 1 h by adding 1 ml 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium citrate buffered seawater (pH 7.0) dropwise. All fixation and embedding steps took place at 25°C. The cells were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min to obtain a pellet, rinsed 3 times with 0.04 M sodium citrate wash buffer (pH 7.0) and embedded in 2% aqueous ultra-low melting agarose. The agarose was cut into slabs 1 mm thin and placed in glass scintillation vials for secondary fixation with 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h. The slabs were rinsed 3 times with 0.1 M cacodylate buffer and covered in 1% uranyl acetate for 2 h while slowly rotating. Slabs were again rinsed 3 times with 0.1 M cacodylate buffer and dehydrated in a graded ethanol series. Following dehydration, slabs were cleared in acetone for 10 min 3 times, infiltrated in a graded acetone/Spurr's series: 2:1, 1:1, 1:2 for 1 h each (29) and left overnight in pure resin. Agarose slabs were transferred again to new resin for 3 h before transfer to Spurr's filled Eppendorf tubes and polymerization, 60°C, 36 h.

Samples were cut into blocks from the polymerized resin and mounted on blank resin stubs. Blocks were then hand trimmed with a razor blade using a dissecting scope. Silver to gold thin sections were cut with a glass knife using a MT-1 Sorvall Porter-Blum ultramicrotome. Sections were collected on uncoated 250-mesh copper grids and stained with either Fahmy lead citrate for 10 min or double stained with 1% uranyl acetate for 10 min followed by lead citrate for 5 min. The grid was rinsed after each stain with a jet of distilled H<sub>2</sub>O from a wash bottle for 20 s and allowed to air dry. Thin sections were observed on a Jeol JEM 100 electron microscope operated at 80 or 100 kV.

## Results

**Field Sites.** Sippewissett mats found west of the main channel entry to Quahog Pond at sites 1–4 contained a vertically stratified community including a minimum of five layers: a top brownish diatom layer, a green cyanobacterial layer, a pink sulfur bacterial layer, a peach sulfur bacterial layer and a lower black sediment layer (Fig. 2 A–D). Site 3 was covered by a thin layer of white flocculent material on 28 Dec. 1994, possibly a *Beggiatoa*-like bacterial bloom (Fig. 2A), not present during the summer months. Mud collected from alongside a fresh-water stream at EP was black or brownish, while mud from an abandoned road (SN) was black with a rust colored covering layer. The pH of SI mats ranged between 5.0–7.0 (decreasing in lower layers) and salinity was typical of seawater, 3.3%. The pH at EP ranged between 5.5–7.2 and salinity, lower than that of seawater, was 2.0%, while the pH at SN was 5.5 and the salinity was measured at 3.3%.

**Spirochete morphotypes.** Enrichments in BA2rif medium from all sites sampled consistently yielded many spirochetes, spirilla,

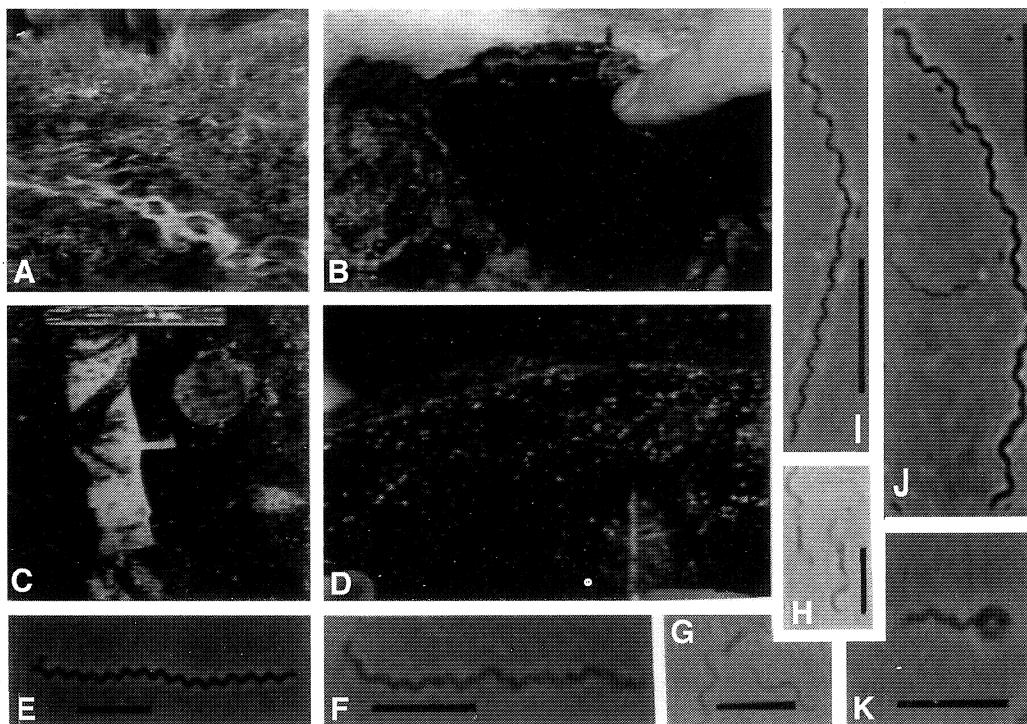


FIG. 2. Field sites at Sippewissett salt marsh (microbial mats) and light micrographs of spirochetes from SI and EP. (A) Microbial mats at SI site 3. A white flocculence covers the site. (B) Vertical stratification of mat at SI site 3 with *Beggiatoa*-like white sulfur bacterial bloom covering site. (C) Microbial mats at SI site 4. Note circular and rectangular holes in mat from collecting with bottom half of a Petri dish and cutting stripes with a spatula. Length of ruler at top is 15 cm. (D) Vertical stratification of mat at SI site 4. (E) SI-1, *Spirochaeta halophila*-like spirochete. (F) SI-2, *Spirochaeta bajacaliforniensis*. (G) SI-3, *Treponema*-like spirochete. (H) EP-1, *Spirochaeta*-like spirochete. (I) Large unidentified SI spirochete. (J) Large unidentified EP spirochete. (K) SI-2, *Spirochaeta bajacaliforniensis*, forming spherical body. Bars equal 10  $\mu$ m in E–K.

vibrios and rod-shaped bacteria. Small spirochetes in profusion were observed after 2–3 days in tubes inoculated from all sites. A total of seven distinct morphotypes were documented: five from SI and one each from EP and SN (Fig. 3A–F). Comparative morphometrics are summarized in Table 1. Morphologically, SI-1, SI-2, SI-4 and EP-1 are *Spirochaeta* sp.-like spirochetes, while SI-3 resembles the symbiotic *Treponema* and SI-5 resembles *Spilosymplokos deltaeiberi*. The Sandy Neck salt marsh spirochete, SN-1, has hooked ends resembling those of *Leptospira* and *Leptonema* spirochetes (15,16). Two of the *Spirochaeta* sp. (SI-2 and

SI-4) contain cytoplasmic fibers, and two (SI-2 and SI-5) also contain cytoplasmic granules.

The first of the Sippewissett spirochetes, SI-1 (Fig. 2E, 3A), with its tight coils resembles *Spirochaeta halophila* (10). Flagella are not resolved in whole mount preparations and no thin section data are available. SI-1 measures 0.27  $\mu$ m in diameter and 37  $\mu$ m in length, whereas *S. halophila* is somewhat larger in diameter (0.4  $\mu$ m) and shorter in length (15–30  $\mu$ m). However, *S. halophila* cell length ranges between 5–60  $\mu$ m. The wavelength and amplitude of SI-1 are 1.48  $\mu$ m and 0.82  $\mu$ m, similar to measurements reported for *S. halophila* (1.8  $\mu$ m and

TABLE 1. Morphometric analysis of Cape Cod spirochetes

Criterion (method) <sup>a</sup>	SI-1	SI-2	SI-3	SI-4	SI-5	SN-1	EP-1
1. Whole cell diameter (NS)	0.27	0.20	0.17	0.45	0.3-3	0.32	0.33
2. Protoplasmic cylinder diameter (TEM)	ND <sup>c</sup>	0.17	ND	ND	0.3-3	ND	0.25
3. Number of flagella (TEM)	ND	2	ND	2	4-5	2	2
4. Ratio: Diameter of protoplasmic cylinder/cell diameter (TEM)	ND	0.85	ND	ND	0.9	ND	0.76
5. Angle of protoplasmic cylinder subtended by flagella (TEM)	ND	21≥	ND	ND	100≥	ND	22≥
6. Length (NS)	36.7	14.3	10.2	8.3	15-20	12.8	15.2
7. Amplitude (NS)	0.82	0.60	1.58	0.67	0.5	0.45	0.87
8. Wavelength (NS)	1.48	1.42	4.11	1.60	5	0.46	4.46
9. Cytoplasmic fibers (TEM) <sup>b</sup>	ND	+ <sup>c</sup>	ND	+	- <sup>c</sup>	-	-
10. Granulated cytoplasm (TEM)	-	+	-	-	+	-	-

<sup>a</sup> Units in μm. Determined in electron micrographs in thin sections (TEM), or in negative stain whole mounts (NS). For discussion of spirochete morphometrics, see refs. 23, 24.

<sup>b</sup> For composition of spirochete fibers, see refs. 5, 25, 31.

<sup>c</sup> ND, not determined; +, present; -, absent.

0.5 μm). Red carotenoid pigments were not observed in blooms of SI-1 spirochetes enriched in anoxic BA2rif medium.

The loosely-coiled SI-2 spirochete is morphologically identical to *Spirochaeta bajacaliforniensis* (8) (Fig. 2F, 3B). Like *S. bajacaliforniensis*, it has a single subapically inserted flagellum at each pole. These overlap in the middle of the cell, making it a 1:2:1 spirochete. In transverse section, two flagella are seen between the peptidoglycan cell wall and outer membrane in the periplasmic space (Fig. 3K). SI-2 measures 0.2 μm in diameter and 14 μm in length, whereas *S. bajacaliforniensis* measures 0.3 μm in diameter and 30 μm in length (8).

Like the similar spirochete from Mexican microbial mats, SI-2 contains two cytoplasmic fibers, 10 nm wide, running beneath the flagella in the cytoplasm (Fig. 3I). Cytoplasmic granules, 25–35 nm in diameter, were less evident when stained with Fahmy lead citrate (Fig. 3I), but became pronounced when double-stained with 1% uranyl acetate and lead citrate (Fig. 3H). Granules were not seen by Fracek and Stolz (8)

in *S. bajacaliforniensis*, though they used a similar double-staining method. The cell size and presence of cytoplasmic fibers in SI-2 is consistent with the interpretation that SI-2 is *S. bajacaliforniensis*, however granules in this spirochete are reported here for the first time.

The short, thin spirochete (SI-3) with large wavelength and amplitude and blunt poles resembles symbiotic *Treponema* spirochetes (Fig. 2G, 3C). This small spirochete bloomed in culture many times, but only whole mount and live images of it are available.

A short, thick spirochete with distinctive umbonate poles (SI-4) is distinguishable only in whole mount preparations (Fig. 3D). This 1:2:1 spirochete has a single subapically inserted flagellum at each pole, overlapping in the middle of the cell. This fourth Sippewissett spirochete contains two 5 nm wide cytoplasmic fibers. These fibers, found in the middle of the cell, are not directly beneath the flagella. The intracellular origin of these fibers was not determined. SI-4 is thicker and shorter than the other spirochete containing cytoplasmic fibers (SI-2), and was

also documented in the samples collected from Sandy Neck salt marsh.

SI-5 was sporadically seen in mixed cultures, predominantly in blooms of *Spirochaeta* spp. from 1991 on, and were videographed by one of the authors (L. M.). The micrographs shown here are derived from the only massive bloom where SI-5 was fixed in quantity. Present in nearly every thin section was evidence of the main features of *Spriosymplokos* species: composite structure with

granulated cytoplasm in up to five mixed-size protoplasmic cylinders in a common periplasm (Fig. 4). The granules measured  $24 \pm 4$  nm in diameter and, in favorable sections, 4–5 flagella associated with protoplasmic cylinders could be seen (Fig. 4). Consistent with observations of live cells were electron micrographs of spirochetes with terminal and subterminal swellings, and occasional refractile bodies in these swellings. Although not ever as conspicuous as

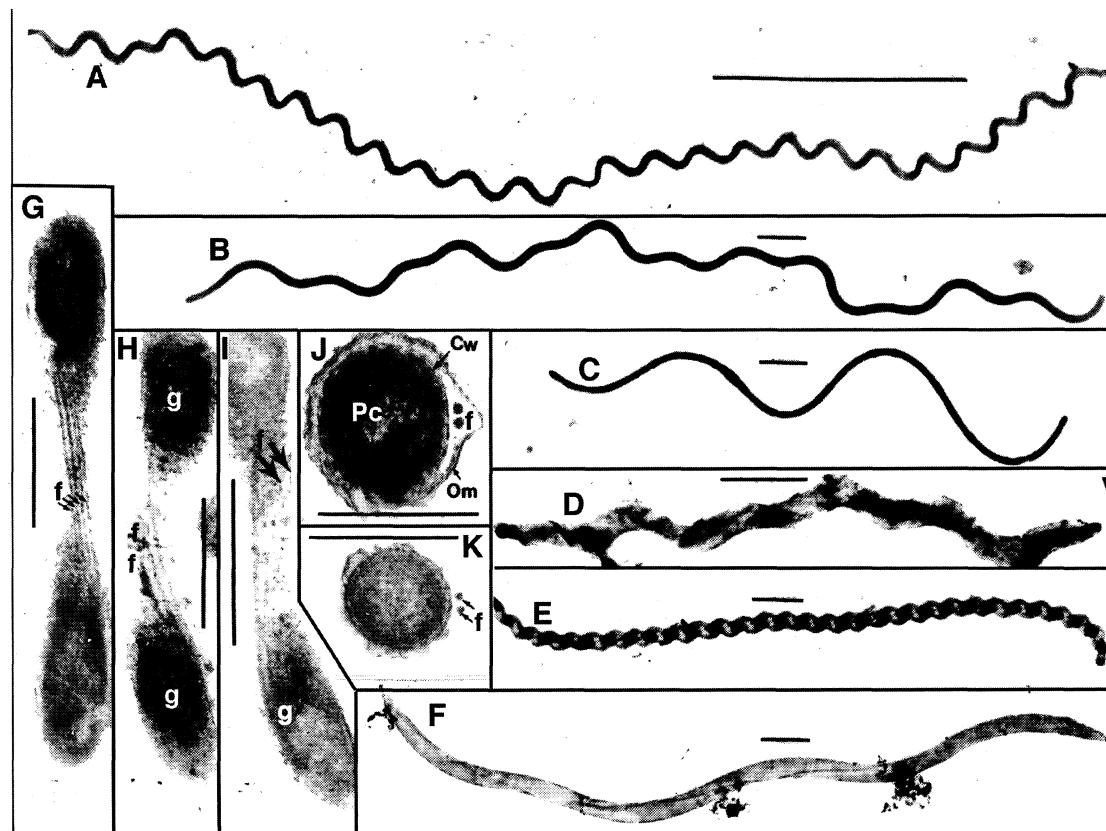


FIG. 3. Spirochete whole mounts and thin sections. (A) SI-1, *Spirochaeta halophila*-like spirochete. (B) SI-2, *Spirochaeta bajacaliforniensis*. (C) SI-3, *Treponema*-like spirochete. (D) SI-4, *Spirochaeta*-like spirochete. (E) SN-1, *Leptospira*-like spirochete. (F) EP-1, *Spirochaeta*-like spirochete. (G) Longitudinal thin section of dividing EP-1 spirochete, stained with Fahmy lead citrate; f, flagella. (H) Longitudinal thin section of SI-2, double stained with uranyl acetate and lead citrate; g, granules. (I) Longitudinal thin section of SI-2, stained with Fahmy lead citrate; arrows, cytoplasmic fibers. (J) Transverse thin section of EP-1, stained with Fahmy lead citrate. Cw, cell wall; Om, outer membrane; Pc, protoplasmic cylinder. (K) Transverse thin section of SI-2, stained with Fahmy lead citrate. Bars equal: 10  $\mu\text{m}$  in (A); 1  $\mu\text{m}$  in (B, C, D, E, F, G, K); 0.5  $\mu\text{m}$  in (H, I); and 0.25  $\mu\text{m}$  in (J).

the membranous bodies of *S. deltaeiberi*, structures expected to have refractile appearance at the light microscopic level were observed in several cases (Fig. 4). Conspicuous and typical of *S. deltaeiberi* (and to our knowledge no other large spirochetes) was the variable diameter (0.4–3 µm) of SI-5. Frequent observations were made of distorted, swollen, large, rapidly swimming and twitching spirochetes, reminiscent of *S. deltaeiberi*. These occurred infrequently in spirochete enrichment cultures usually 5–8 days old. Blooms or at least populations of SI-5 reaching densities adequate for electron microscopy were seen on at least two occasions (summers of 1991 and 1993). The

SI-5 spirochete in swimming form tends to form refractile densities similar to, but less evident than, the well-studied membranous bodies of its Spanish relative, *Spilosymplokos deltaeiberi* (11, 24). SI-5 blooms greater than about 10-day old tended to become replete with spherical bodies. The spherical bodies with dark or refractile densities within them may be, as we suggest for those from the Ebro river delta (11), a resistant "encysted" form of these bacteria. However, since we lack any proper growth medium and they have not "excysted" when transferred to fresh media, we do not yet know the meaning of the spherical bodies containing membranous structures.

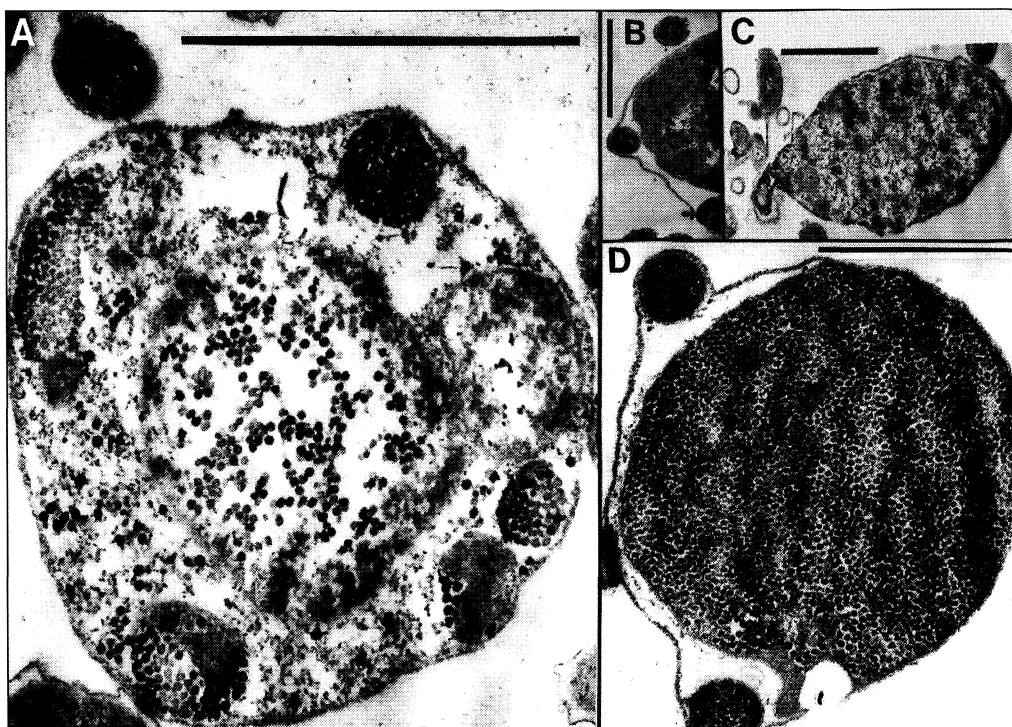


FIG. 4. *SI-5, Spilosymplokos deltaeiberi*-like spirochete thin sections, from Sippewissett microbial mat site dominated by *Microcoleus*, the filamentous cyanobacterium with many trichomes in a common sheath. From a BA2rif medium enrichment. Major distinguishing features of *Spilosymplokos* from the Ebro delta, Spain, were also seen in these organisms from Massachusetts: (A) Granulated cytoplasm. (B) Similar small spirochetes within and immediately outside the protoplasmic cylinder. (C) Variable diameter correlated with the tendency to disintegrate into smaller diameter healthy spirochetes. (D) 4–5 subterminal flagella and composite organization. Bars equal 1 µm.

Collected from brackish water, EP-1 is a loosely-coiled *Spirochaeta* (Fig. 2H, 3F). This spirochete has single subapically inserted flagella at each pole which overlap in the middle, making it a 1:2:1 spirochete. Two flagella lie beneath the protrusion of the outer membrane (the flagellar lamella) in the middle of the cell (Fig. 3J). The blunt cell pole bears a distinctive electron-dense knobby structure. The motility apparatus of this spirochete resembles that of other spirochetes, e.g. a basal disc, hook and flagellum. Four flagella are present in the middle of the cell during binary fission (Fig. 3G).

A tightly-coiled spirochete, SN-1, with hooked ends similar to *Leptospira* and *Leptonema* spirochetes, was distinguishable only in whole mount preparations (Fig. 3E). Each pole bears a single subapically inserted flagellum. Tapered spiral, bent ends and lack of cytoplasmic fibers place SN-1 within the genus *Leptospira* (15).

Large (>0.5 µm diameter) tightly coiled spirochetes with some secondary coiling were occasionally observed with light microscopy from BA2rif enrichments of SI mat (Fig. 2I) and from EP mudwater enrichments in the Winogradsky column (Fig. 2J). *Spirochaeta* spirochetes may survive in the swimming form for 7–10 days or more in BA2rif medium, but towards the end of that period they tend to form spherical bodies (Fig. 2K) whose viability has never been ascertained, since they have not been studied after transfer to new BA2rif. They may be an encystment stage of the spirochete life history. In these as in previous studies in material from mats of different geographical locations, samples that had been out of the field for at least four years when used as inoculum for enrichments occasionally yielded small motile unidentified spirochetes. Although we video-documented some of these, their sporadic appearance, low population density and tiny size rendered impossible the collection of systematic data about them.

## Discussion and conclusions

More than seven morphotypes of free-living spirochetes were observed from spirochete enrichments of microbial mat and anoxic muds collected at three coastal salt marshes on Cape Cod, Massachusetts. Although morphologically distinguishable as confirmed by ultrastructural study, analysis of fermentation end products and molecular studies are required for their definitive identification. The morphology of SI-4, with umbonate termini and cytoplasmic fibers, and EP-1, with electron-dense knobby structures at its poles and loose coiling, suggests these two are new to science. The fibers may be related to similar structures, referred to as filaments by some investigators, detected in *E. coli* (27) and treponemes (25, 31). The morphological similarity of SI-3 to *Treponema*, rather than to other *Spirochaeta*, indicates it is possibly a free-living relative of symbiotic *Treponema*, which (by definition of the genus) must be symbiophils. SI-2, which is a strain of *Spirochaeta bajacaliforniensis*, previously known only from Mexican microbial mats, has been studied in detail (8). Cytoplasmic granules in *S. bajacaliforniensis* are reported here for the first time. The detection of cytoplasmic fibers in the Massachusetts *S. bajacaliforniensis* corroborates findings of previous investigators (1, 8). SI-5, with its granulated cytoplasm, composite structure, variable diameter and spherical bodies containing dark or refractile densities—all reminiscent of *S. deltaeiberi*—may be the first described North American representative of the genus *Spirosymplokos*. The comparative morphology of the seven spirochete morphotypes identified by ultrastructure in this study and their most probable classification are given in Table 2.

Although none of the seven spirochetes identified here are *Spirochaeta plicatilis*, some mud water enrichments probably did contain this type

species of the genus. *S. plicatilis* is thick in diameter ( $>0.5 \mu\text{m}$ ) and contains 18–20 flagella inserted subapically in a row along each pole (3). Nor are any *S. litoralis*, as this spirochete requires a salt mixture not found in BA2rif medium (8, 12). Analyses of fermentation end products are needed to determine whether any of these spirochetes are *S. isovalerica*. The tightly-coiled long cell of SI-1 greatly resembles *S. halophila*. Aerobic growth to test for production of a red carotenoid pigment (10) is required for definitive identification of SI-1 as *S. halophila*.

Since SI-2 was enriched at least 100 times and grew well in BA2rif medium, the defined media for *S. bajacaliforniensis*, we feel confident that it is a strain of *S. bajacaliforniensis*. This represents a second isolation of this spirochete three thousand miles east of the first one from Laguna Figueroa, Baja California, Mexico. The morphology, ecology, nutritional requirements and the presence of cytoplasmic fibers all confirm the organism as *S. bajacaliforniensis* (1, 8). The whole cell diameter measurement of  $<0.20 \mu\text{m}$  (see Table 1) indicates this may be a new strain.

The presence of cytoplasmic granules (25–35 nm in diameter) in *S. bajacaliforniensis* is reported here for the first time. These granules, present in both single and double-stained thin sections, were more obvious in double-stained preparations. Indistinguishable granules (20–32 nm) to those of *Spirosymplokos deltaeiberi* (1, 24), are present in SI-5 ( $24 \pm 3 \text{ nm}$ ,  $n = 50$ ).

We identify the Sandy Neck spirochete (SN-1) as a member of the *Leptospiraceae* family. Two genera are placed in the family. Both have hooked ends and non-overlapping flagella, however *Leptospira* lacks cytoplasmic fibers while *Leptonema* has two bundles of cytoplasmic fibers lying close to the inner layer of the cytoplasmic membrane (15). The absence of cytoplasmic fibers in SN-1 places it in the genus *Leptospira*. Because of its larger diameter, SN-1 is probably not *L. parva*. More work is required to determine if this free-living mud *Leptospira* is *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii* or a new *Leptospira*.

Mud water enrichments taken from the Winogradsky column containing EP mud yielded large spirochetes resembling *S. plicatilis* after about

TABLE 2. Tentative identification and comparison of Cape Cod spirochetes (units in  $\mu\text{m}$ )\*

Field site	Isolate name	Length	Whole cell diameter	Most probable identification	Comments
Sippewissett salt marsh (microbial mats)	SI-1	36.7	0.27	<i>Spirochaeta halophila</i>	No obvious carotenoids
	SI-2	14.3	0.20	<i>Spirochaeta bajacaliforniensis</i>	Fibers; granulated
	SI-3	10.2	0.17	<i>Treponema</i> sp.	Free-living
	SI-4	8.3	0.45	<i>Spirochaeta</i> sp. nov.	Fibers; new morphotype
	SI-5	10–15	variable	<i>Spirosymplokos deltaeiberi</i>	Granulated, composite
School St. salt marsh at Eel Pond (mud)	EP-1	15.2	0.33	<i>Spirochaeta</i> sp. nov.	New morphotype
Sandy Neck salt marsh (mud)	SN-1	12.8	0.32	<i>Leptospira</i> sp.	Bent ends, no cytoplasmic fibers

\* References used in constructing this table: (5, 17, 23).

one month of enrichment. Sealed wet mount preparations containing mud from this site have revealed both *S. plicatilis* and another large spirochete designated "type B" (3). Neither of those, were not enriched in BA2rif medium. Another large unidentified spirochete with secondary coiling was seen once in Sippewissett mat samples enriched in BA2rif medium. This spirochete is similar to the "type B" spirochete identified in (3).

Large spirochetes indistinguishable from the granulated variable-diameter composite-membranous-body producing *Spirosymplokos deltaeiberi* were detected by electron microscopy in enrichments made from Sippewissett microbial mat samples (Fig. 4). Jerky in movement, these loosely coiled spherical-body formers have been videographed from mud water samples and BA2rif enrichments on at least three separate occasions. Massive blooms like those of the Spanish samples were never achieved (11). Although the observation of sporadic and unpredictable appearance has precluded detailed study of this granulated mat spirochete, we are confident that *S. deltaeiberi* or a strain of this spirochete is an inhabitant of the *Microcoleus*-dominated vertically stratified microbial mats of Sippewissett salt marsh.

Microbial mat samples collected from the *Microcoleus*-dominated mats are routinely placed in sterile plastic Petri dishes or on a microbial mat table in the University of Massachusetts greenhouse. Both Petri dish and greenhouse mat samples have been desiccated by negligence, some for more than four years. In a series of experiments designed to reisolate protists such as the encysting ciliate *Pseudocohnilembus pusillus* (Olendzenski, M. S. thesis, University of Massachusetts, 1993) and amoebomastigote *Paratetramitus jugosus* (7) as well as other desiccation-resistant microbes (2), viable spirochetes have appeared in BA2rif medium after 4–6 days

incubation with dry mat material. Although complete records are not available, we can say with confidence that some few very active small spirochetes have appeared, always in mixed culture, in at least 4 out of 100 rewetting experiments (Fig. 5). This leads us to believe that the spherical bodies formed by *S. bajacaliforniensis* (Fig. 2K) and *Spirosymplokos* are an encystment phase of the spirochete life history, not an indication of death.

Taken together, our experience suggests that the spirochete diversity in intertidal mud environments is greater than previously recognized, and that many spirochetes may be capable of evading immediate detection by formation of stages resistant to environmental insult. The membranous structures in *Spirosymplokos* (24) are thought to be responsible for the survival and recovery of swimming spirochetes long after their removal from the field, as are the spherical bodies formed by *Spirochaeta* and other spirochetes shown in Fig. 5 (arrows). The basis for survival of large motile non-sporeformers, including some spirochetes and other long, less coiled, enrichable bacteria, is still unknown.

## Acknowledgements

This work was supported by NASA (Solar System Program, Exobiology) NGR 004 025 (Microbial Contributions to the Precambrian Earth) to Lynn Margulis and by the University of Massachusetts, Amherst, College of Natural Science and Mathematics and Graduate School. A major portion of the work performed by T. H. Teal represents requirements presented in partial fulfillment of his M. S. degree from the Organismic and Evolutionary Biology graduate program at the University of Massachusetts, Amherst. Additional electron micrographs (Fig. 4) were made by Floyd Craft, to whom we

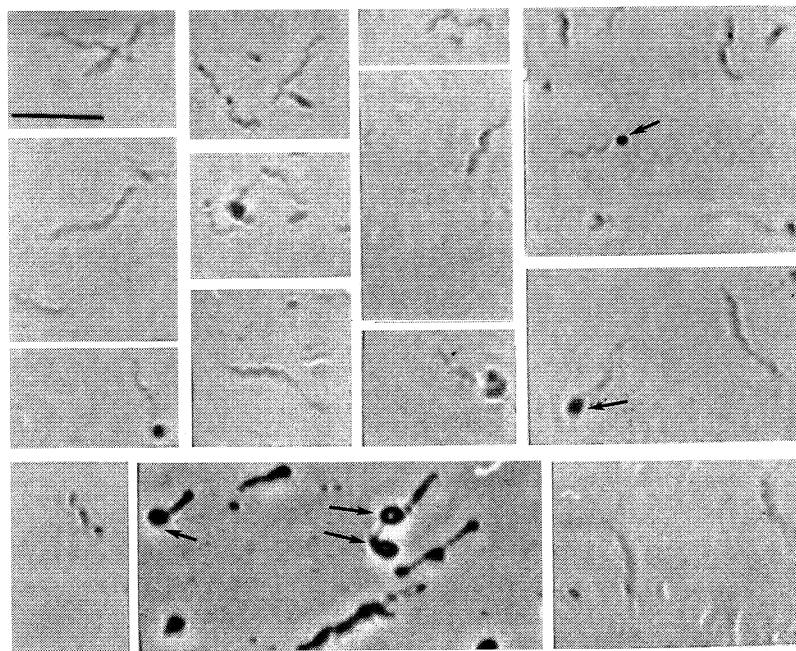


FIG. 5. Small unidentified spirochetes and their spherical bodies (arrows) from field mat samples dry for at least four years and enriched in BA2rif medium. Bar equals 10  $\mu$ m.

are extremely grateful. We acknowledge aid from W. Cochran, M. Solé, W. Bemis, P. Jacques, D. Reppard, B. Duval, M. Dolan, S. Dolan, L. Olendzenski, R. Charon, O. West, and members of the Symbiosis course of the Boston University Marine Program at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA (Autumn, 1994), that led to completion of this project.

## References

- Bermudes, D., Hinkle, G., Margulis, L. (1994). Do prokaryotes contain microtubules? *Microbiol. Rev.* **58**, 387–400.
- Brown, S., Margulis, L., Ibarra, S., Siqueiros, D. (1985). Desiccation resistance and contamination as mechanisms of Gaia. *BioSystems*. **17**, 337–360.
- Blakemore, R. P., Canale-Parola, E. (1973). Morphological and ecological characteristics of *Spirochaeta plicatilis*. *Arch. Mikrobiol.* **89**, 273–289.
- Canale-Parola, E. (1994). The Spirochetes. In Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., Williams, S. T. (ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., pp. 27–37. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Eipert, S. R., Black, S. H. (1979). Characterization of the cytoplasmic fibrils of *Treponema refringens* (Nichols). *Arch. Microbiol.* **120**, 205–214.
- Ehrenberg, C. G. (1833). Dritter Beitrag zur Erkenntnis grofier Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Abhandl. der Akademie der Wissenschaften zu Berlin*. p. 313.
- Enzien, M., McKhann, H. I., Margulis, L. (1989). Ecology and life history of an amoebomastigote, *Paratetramitus jugosus*, from a microbial mat: New evidence for multiple fission. *Biol. Bull.* **177**, 110–129.
- Fracek, S. P., Stoltz, J. F. (1985). *Spirochaeta bajacaliforniensis* sp. n. from a microbial mat community at Laguna Figueroa, Baja California Norte, Mexico. *Arch. Microbiol.* **142**, 317–325.
- Gibson, J., Leadbetter, E. R., Jannasch, H. W. (1984). Great Sippewissett Marsh: A summary of projects carried out by students in the Microbial

- Ecology course of the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, during summers 1972–1981. In Cohen, Y., Castenholz, R. W., Halvorson, H. O. (ed.), Microbial Mats: Stromatolites, pp. 95–100. Alan R. Liss, New York.
10. Greenberg, E. P., Canale-Parola, E. (1976). *Spirochaeta halophila* sp. n., a facultative anaerobe from a high-salinity pond. Arch. Microbiol. **110**, 185–194.
  11. Guerrero, R., Ashen, J., Solé, M., Margulis, L. (1993). *Spirosymplokos deltaeiberi* nov. gen., nov. sp.: Variable-diameter composite spirochete from microbial mats. Arch. Microbiol. **160**, 461–470.
  12. Hespell, R. B., Canale-Parola, E. (1970). *Spirochaeta litoralis* sp. n., a strictly anaerobic marine spirochete. Arch. Mikrobiol. **74**, 1–18.
  13. Holt, S. C. (1978). Anatomy and chemistry of spirochetes. Microbiol. Rev. **42**, 114–160.
  14. Hovind-Hougen, K., Birch-Andersen, A. (1971). Electron microscopy of endoflagella and microtubules in *Treponema Reiter*. Acta Path. Microbiol. Scand. **79**, 37–50.
  15. Hovind-Hougen, K. (1979). Leptospiraceae, a new family to include *Leptospira* Noguchi 1917 and *Leptonema* gen. nov. Int. J. Syst. Bact. **29**, 245–251.
  16. Hovind-Hougen, K., Ellis, W. A., Birch-Andersen, A. (1981). *Leptospira parva* sp. nov.: Some morphological and biological characters. Zbl. Bakt. Hyg. **250**, 343–354.
  17. Jackson, S., Black, S. H. (1971). Ultrastructure of *Treponema pallidum* Nichols following lysis by physical and chemical methods, I. Envelope, wall, membrane and fibrils. Arch. Mikrobiol. **76**, 308–324.
  18. Leschine, S. B., Canale-Parola, E. (1986). Rifampin-resistant RNA polymerase in spirochetes. FEMS Microbiol. Letters **35**, 199–204.
  19. Margulis, L. (1993). Symbiosis in Cell Evolution. 2nd edition. W. H. Freeman, New York.
  20. Margulis, L. (1996). Archeal-eubacterial mergers in the origin of the Eukarya: Phylogenetic classification of life. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**, 1071–1076.
  21. Margulis, L., Barghoorn, E. S., Ashendorf, D., Banerjee, S., Chase, D., Francis, S., Giovannoni, S., Stoltz, J. (1980). The microbial community in the layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico: does it have Precambrian analogues? Precambrian Res. **11**, 93–123.
  22. Margulis, L., Hinkle, G., Stoltz, J., Craft, F., Esteve, I., Guerrero, R. (1990). *Mobilifilum chasei*: morphology and ecology of a spirochete from an intertidal stratified microbial mat community. Arch. Microbiol. **153**, 422–427.
  23. Margulis, L., Hinkle, G. (1992). Large symbiotic spirochetes: *Clevelandina*, *Cristispira*, *Diplocalyx*, *Hollandina* and *Pillotina*. In Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (ed.), The Prokaryotes, 2nd ed., vol. 4. pp. 3965–3978. Springer-Verlag, New York.
  24. Margulis, L., Ashen, J., Solé, M., Guerrero, R. (1993). Composite, large spirochetes from microbial mats: Spirochete structure review. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 6966–6970.
  25. Masuda, K., Kawata, T. (1989). Isolation and characterization of cytoplasmic fibrils from treponemes. Microbiol. Immunol. **33**, 619–630.
  26. Nicholson, J. M., Stoltz, J. F., Pierson, B. K. (1987). Structure of a microbial mat at Great Sippewissett marsh, Cape Cod, Massachusetts. FEMS Microbiol. Ecol. **45**, 343–364.
  27. Okada, Y., Wachi, M., Hirata, A., Suzuki, K., Nagai, K., Matsuhashi, M. (1994). Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. J. Bacteriol. **176**, 917–922.
  28. Scott, D., Leckie, M. (1990). Foraminiferal zonation of Sippewissett salt marsh. J. Foram. Res. **20**, 248–266.
  29. Spurr, A. R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. **26**, 31–43.
  30. Ward, D. M., Weller, R., Shiea, J., Castenholz, R. W., Cohen, Y. (1989). Hot spring microbial mats: Anoxygenic and oxygenic mats of possible evolutionary significance. In Cohen, Y., Rosenberg, E. (ed.), Microbial Mats: Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities, pp. 3–15. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
  31. You, Y., Elmore, S., Colton, L. L., Mackenzie, C., Stoops, J. K., Weinstock, G. M., Norris, S. J. (1988). Characterization of the cytoplasmic filament protein gene (*cfpA*) of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. J. Bacteriol. **170**, 3177–3187.

## Purification and properties of $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus nidulans*

Marisol Díaz, Ana M. Pedregosa, José R. de Lucas, Sara Torralba,  
Inmaculada F. Monistrol, Fernando Laborda\*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia,  
Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, Madrid, España

Received 5 May 1996/Accepted 4 September 1996

---

### Summary

$\beta$ -Galactosidase from mycelial extract of *Aspergillus nidulans* has been purified by substrate affinity chromatography and used to obtain anti- $\beta$ -galactosidase polyclonal antibodies. *A. nidulans* growing in lactose as carbon source synthesizes one active form of  $\beta$ -galactosidase which seems to be a multimeric enzyme of 450 kDa composed of monomers with 120 and 97 kDa. Although the enzyme was not released to the culture medium, some enzymatic activity was detected in a cell-wall extract, thus suggesting that it can be an extracellular enzyme.  $\beta$ -Galactosidase of *A. nidulans* is a very unstable enzyme with an optimum pH value of 7.5 and an optimum temperature of 30°C. It was only active against  $\beta$ -galactoside substrates like lactose and *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (PNPG).

**Key words:** *Aspergillus nidulans*,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -galactoside substrates, enzyme purification, substrate affinity chromatography

---

### Resumen

De un extracto de micelio de *Aspergillus nidulans* ha sido purificada la enzima  $\beta$ -galactosidasa mediante cromatografía de afinidad por el substrato. Posteriormente se ha utilizado la enzima para obtener anticuerpos policlonales anti- $\beta$ -galactosidasa. *A. nidulans*, cuando crece en un medio que contiene lactosa como fuente de carbono, sintetiza una forma enzimáticamente activa de  $\beta$ -galac-

---

\* Correspondence to: Fernando Laborda. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá de Henares. Campus Universitario. 28871 Alcalá de Henares. Madrid. España. Tel.: +34-1-8854621. Fax: +34-1-8854621. E-mail: mplaborda@alcala.es

tosidasa que parece ser una proteína multimérica de 450 kDa, formada por monómeros de 120 y 97 kDa. Esta enzima no es liberada al medio de cultivo, aunque se detectó actividad en la pared celular, por lo que podría tratarse de una enzima extracelular. La  $\beta$ -galactosidasa de *A. nidulans* es una enzima muy inestable, con un pH óptimo de 7,5 y una temperatura óptima de 30°C. Es activa únicamente frente a substratos  $\beta$ -galactósidos, como lactosa y *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (PNPG).

## Introduction

$\beta$ -Galactosidase (EC 3.2.1.23) is a well-known enzyme which hydrolyzes lactose. It is widely distributed in nature and many studies on this enzyme from bacteria, yeasts, moulds, plants and animals have been reported. Some years ago, Fantes and Roberts (6) studied the enzyme from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. They described two proteins with 120 and 450 kDa molecular mass that displayed  $\beta$ -galactosidase activity. These authors suggested that those proteins were different aggregates of the same polypeptide, but irreversible loss of enzyme activity during the purification process prevented the research work from going on. Since then, no detailed investigation of this enzyme in *A. nidulans* has been carried out. In previous studies undertaken in our laboratory,  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase were chosen as pattern extracellular enzymes to study protein secretion in *A. nidulans*.  $\alpha$ -Galactosidase has been purified (17), and the role of N-carbohydrates on its secretion process has been analysed (18). Here we describe a procedure for a rapid purification of  $\beta$ -galactosidase, and some molecular properties of the enzyme from that fungus which we have studied.

## Materials and methods

**Organism and growth conditions.** The strain used was *Aspergillus nidulans* 2.3, kindly donated by Prof. J. F. Peberdy (Department of Life

Sciences, University of Nottingham, UK). *Aspergillus* complete medium (ACM) was prepared according to the method proposed by Andres and Peberdy (1), supplemented with either glucose, galactose or lactose, at 10 g/l. A conidial suspension was inoculated into 100-ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of ACM, to have a final concentration of  $2 \times 10^6$  conidia/ml. Cultures were incubated on a rotary shaker (200 rpm) at 28°C. To test the enzyme production during *A. nidulans* growth, samples (the content of a flask) were taken at different times. Mycelial wet weight was determined as a measure of fungal growth.  $\beta$ -Galactosidase activity was measured in the culture filtrate and in two mycelial fractions (soluble and insoluble mycelial extracts). For enzyme purification, *A. nidulans* was grown for 30 h in 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of ACM to which 10 g/l lactose had been added.

**Preparation of enzyme fractions.** Three enzyme fractions were derived from the cultures, namely soluble and insoluble mycelial extract and a culture filtrate solution. The mycelium was separated from the liquid culture by filtration through Nylon membranes, and was washed with distilled water. The mycelium was then homogenized in a mortar and resuspended, at a concentration of 5 mg/ml, in lysis buffer (7.5 pH 50 mM phosphate buffer plus 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1 M NaCl and 2 mM MgCl<sub>2</sub>). After centrifugation (10,000  $\times g$ , 30 min, 4°C), the collected supernatant was considered as the soluble mycelial extract. The remaining material was washed with the same buffer until no malate

dehydrogenase activity (taken as control for cytoplasmic contamination) was detected in the washing fluid. It was then resuspended in the lysis buffer (5 mg of pellet/ml) and used as insoluble mycelial extract (cell-wall) (22).  $\beta$ -Galactosidase activity was measured in all three fractions.

**Purification procedure.**  $\beta$ -Galactosidase was purified from the soluble mycelial extract obtained from 30 h old cultures of *A. nidulans*, growing on lactose as carbon source. Proteins were precipitated with ammonium sulfate (40% w/v). After centrifugation, the precipitate was resuspended in the lysis buffer (100 mg/ml). It was then applied to an affinity-substrate column of agarose gel substituted with *p*-amino-phenyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside, which was prepared by the method of Steers et al. (20). The column was adjusted with the lysis buffer. After sample application, it was extensively washed until the absorbance returned nearly to the base line. The elution of  $\beta$ -galactosidase (which had been retained on the column) was accomplished by raising the pH. Thus, the elution buffer was changed to 0.1 M sodium borate pH 9. Elution was allowed to proceed until a sharp boundary of  $\beta$ -galactosidase activity emerged. Fractions with  $\beta$ -galactosidase activity were pooled, concentrated and adjusted with lysis buffer by ultrafiltration (Amicon). Concentrated fractions were loaded on a column of Sephadryl S-300 (2.6 × 50 cm) previously adjusted with lysis buffer. The Sephadryl S-300 column was calibrated with bovine serum albumin (67 kDa), apoferritin (443 kDa) and bovine thyroglobulin (669 kDa), as molecular mass marker proteins, to determine the molecular mass of the native enzyme.

**Electrophoretic techniques.** Proteins eluted from the Sephadryl S-300 column with maximal  $\beta$ -galactosidase activity were subjected to several electrophoretic techniques: polyacrylamide gel electrophoresis in denaturing condi-

tions (SDS-PAGE), native PAGE and isoelectric focusing. Slab gel electrophoresis was carried out according to Laemmli (12). In SDS-PAGE (10% w/v polyacrylamide), proteins with a known molecular mass were used as references to determine the molecular mass of  $\beta$ -galactosidase monomers. Gels were stained with 0.2 g/l Coomassie brilliant blue R-350. The gels subjected to native PAGE (7.5% w/v polyacrylamide) were processed in several ways. Gels were stained with Coomassie brilliant blue. Identical unstained gels were used to localize  $\beta$ -galactosidase activity by incubating pieces of the gel in buffer containing the chromogenic substrate *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (PNPG). Besides, proteins were developed in other gels with anti- $\beta$ -galactosidase sera and alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit immunoglobulin (anti-rabbit IgG), by using an immunoblot assay kit (BioRad Laboratories), and following the manufacturer's instructions. Isoelectric focusing was performed in polyacrylamide gels containing ampholites (pH range 3–9) by using a Phast System (Pharmacia). Proteins were detected in the gel by immunoblotting, as described above.

**Preparation of polyclonal antibodies against  $\beta$ -galactosidase.** The protein with  $\beta$ -galactosidase activity eluted from the native polyacrylamide gel was used to produce antibodies. New Zealand white rabbits were injected intradermally at 4 week intervals with 200  $\mu$ g of the antigen in Freund complete adjuvant (9). Sampling and serum preparation were performed as suggested by Harlow and Lane (10). Antibody titers were monitored by indirect-ELISA.

**Analytical procedures.**  $\beta$ -Galactosidase (EC 3.2.1.23) activity was assayed at 37°C using 2 mM PNPG in phosphate buffer (pH 7.5) plus 2 mM MgCl<sub>2</sub> as substrate solution (4). This method was also used to study enzyme specificity over several *p*-nitrophenyl- $\beta$  or  $\alpha$ -glycosides. Moreover, the  $\beta$ -galactosidase activity was de-

termined by enzymatic analysis of the glucose released (7) from the following substrates: maltose, sucrose, cellobiose, lactose, laminarine, melibiose, all at 2 mM. When 2 mM raffinose was used as a substrate, the reducing sugars released were determined (14, 19). One unit of  $\beta$ -galactosidase activity (U) was defined as the amount of enzyme liberating 1  $\mu$ mol of product (*p*-nitrophenol, glucose or reducing sugars) per minute under the assay conditions. Specific activity was expressed as units per mg protein. Malate dehydrogenase (E.C. 11.1.37) activity was measured spectrophotometrically (2); one unit was 1  $\mu$ mol of malate reduced per minute under the assay conditions.

**Kinetic studies.** These were carried out using 2 mM PNPG in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), plus 2 mM MgCl<sub>2</sub> as substrate solution. The effect of the pH on the enzyme activity was studied over a pH range from 2.0 to 10.0 using, in this case, 50 mM citrate-phosphate-borate buffer. The pH stability was studied by pre-incubating the enzyme on the same pH range for 2 h. The optimum temperature was determined over the range 10–80°C, and the thermal stability was investigated at the same range over a period of 15 min. The effect of substrate concentration on the  $\beta$ -galactosidase activity ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) was determined as in Lineweaver-Burk (13). The inhibition of several compounds was analysed using PNPG as substrate. All the experiments were carried out in triplicate.

## Results and discussion

**Production of  $\beta$ -galactosidase in different media.** *A. nidulans* growing in ACM with glucose did not produce  $\beta$ -galactosidase. However, galactose and lactose induced high levels of a cell-bound enzyme during the exponential growth.  $\beta$ -Galactosidase production, like that of

other fungal carbohydrolases, seems to be regulated by the carbon source used for the growth. Catabolic repression by glucose (8) and induction by the enzyme substrate or related compounds has been described in many fungal species (16). When  $\beta$ -galactosidase was produced, the main enzyme activity was detected in the soluble mycelial extract and some of it was present in the cell-wall (Fig. 1). No  $\beta$ -galactosidase activity was detected in the culture filtrate. Thus, although  $\beta$ -galactosidase seems to be an extracellular enzyme present in the cell-wall, it was not released to the culture medium. The highest values of  $\beta$ -galactosidase activity were detected in the mycelial extract of *A. nidulans* grown for 30 h in the presence of lactose and used to purify the enzyme.

**Purification of  $\beta$ -galactosidase of *A. nidulans*.**  $\beta$ -Galactosidase of *A. nidulans* is a very unstable enzyme, which has its enzymatic activity significantly reduced throughout dialysis, filtration chromatography and freezing process. This instability had been previously described for the same enzyme of *Escherichia coli* (21). We were able to preserve the frozen enzyme in an active form once precipitated by ammonium sulfate. Moreover, to prevent loss in enzyme activity, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol was added to all buffered solutions. However, the purified enzyme completely lost its activity once frozen or freeze-dried. These special features drove us to choose a rapid, selective purification method such as the substrate affinity chromatography. This approach had been successful for the purification of  $\beta$ -galactosidase of *E. coli* (20) and *Bacillus megaterium* (15). Table 1 shows the different steps in the purification of  $\beta$ -galactosidase of *A. nidulans*. Fractions with  $\beta$ -galactosidase activity recovered from the affinity column and Sephadryl S-300 were analysed by native PAGE. In both purification steps almost two Coomassie brilliant blue stained bands

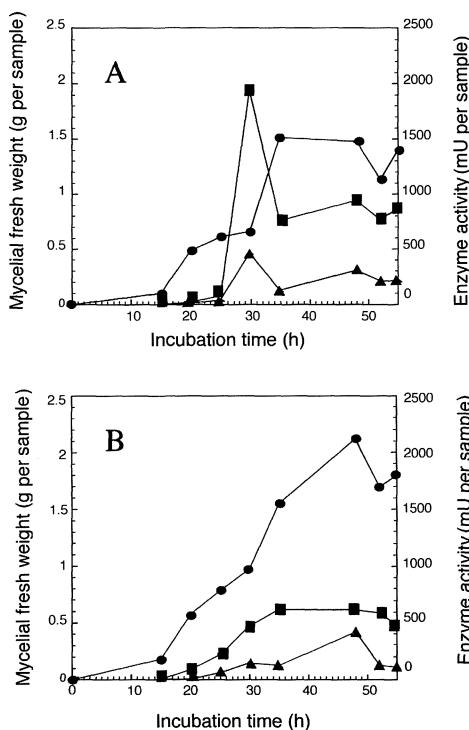


FIG. 1.  $\beta$ -Galactosidase production by *Aspergillus nidulans* grown in AM supplemented with: (A) lactose, or (B) galactose. (●) Fungal growth; (■) enzymatic activity of the soluble mycelial extract; and (▲) unsoluble mycelial extract (cell-wall). Data represent the mean values for three independent experiments.

were observed (Fig. 2, lane 1).  $\beta$ -Galactosidase activity in an identical unstained gel was localized by incubating 2 mm pieces of gel in buffer containing the substrate PNPG. In the reconstructed gel (data not shown), the  $\beta$ -galacto-

sidase activity band coincided with the enzyme activity band present in the mycelial extract (Fig. 2, lane 2) and with the protein band I eluted from Sephadryl S-300 (Fig. 2, lane 1). The other protein bands can represent inactive forms of

TABLE 1. Summary of the purification procedure of  $\beta$ -galactosidase from the soluble mycelial extract of *Aspergillus nidulans*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Soluble mycelial extract	2847.0	167	0.058	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation 40%	1120.0	103	0.091	1.5	61
Substrate affinity	8.5	17	2	34.5	10
Sephadryl S-300	8.0	16	2	34.5	9.6

Data are the mean values of three determinations.

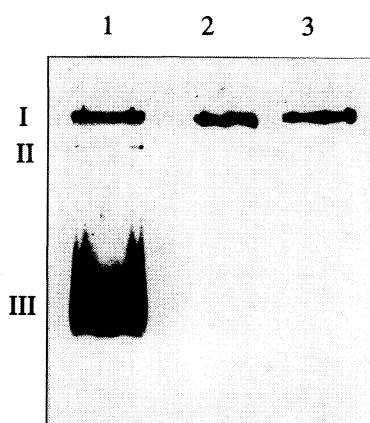


FIG. 2. Native PAGE of: proteins eluted from Sephadryl S-300 and stained by Coomassie brilliant blue (lane 1); soluble mycelial extract stained for  $\beta$ -galactosidase activity (lane 2); and immunoblotting of proteins eluted from Sephadryl S-300, revealed with anti- $\beta$ -galactosidase antibodies (lane 3).

the same enzyme. Some inactive  $\beta$ -galactosidase proteins from *E. coli* which were also able to bind to the affinity column have been reported (20). The  $\beta$ -galactosidase eluted from a native PAGE was used to produce polyclonal antibodies.

**Immunological reactions.** Polyclonal antibodies raised against  $\beta$ -galactosidase only reacted with the protein band with  $\beta$ -galactosidase activity (Fig. 2, lane 3). This native enzyme had a molecular mass of 450 kDa (determined by filtration chromatography) (Table 2).

After SDS-PAGE, one main protein band of 120 kDa and several other bands around 97 kDa were resolved. Polyclonal antibodies reacted only with the protein bands of 97 kDa, but not with the 120 kDa band (Fig. 3). A possible explanation might be that polyclonal antibodies recognize epitopes in the native protein that are only present in the 97 kDa bands of the same denatured protein. These results suggest that  $\beta$ -galactosidase of *A. nidulans* might be a multimeric enzyme with a molecular mass of 450 kDa composed by monomers of 120 and 97 kDa, which agrees with the observation of Fantes and Roberts (6). Multimeric nature is frequent among microbial  $\beta$ -galactosidases. The enzyme of *E. coli* is a tetramer with an apparent molecular weight of 540 kDa (5).

**Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *A. nidulans*.**  $\beta$ -Galactosidase of *A. nidulans* remained stable over a range of pH from 5 to 8, showing an optimum value of activity at about pH 7.5 (Table 2), similar to other  $\beta$ -galactosidases which are not released to the culture medium (11, 23). Its optimum temperature of activity is about 30°C, although it was unstable above 10°C. The fact that  $\beta$ -galactosidase was active at temperatures for which the enzyme was unstable could be a consequence of the stabilizing effect of the substrate, as it has been suggested for glucanases from *Phytophtora infestans* (3) and  $\alpha$ -galactosidase from *A. nidulans* (17).  $\beta$ -Galactosidase of *A. nidulans* was completely inactive

TABLE 2. Properties of  $\beta$ -galactosidase purified from the soluble mycelial extract of *Aspergillus nidulans*

Molecular mass:	
Native	450 kDa
Monomers	120 and 97 kDa
Optimum pH	7.5
pH stability	Stable between 5–8
Optimum temperature	30°C
Temperature stability	Unstable above 10°C (see text)

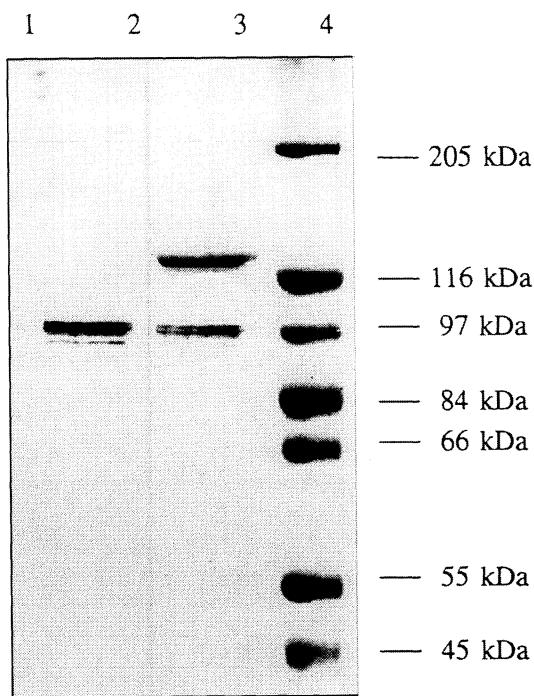


FIG. 3. SDS-PAGE of proteins eluted from Sephadryl S-300. Immunostained with anti- $\beta$ -galactosidase antibodies (lane 1); Coomassie brilliant blue protein staining (lane 2); and molecular mass markers (lanes 3 and 4).

after incubation at 50°C, like the cell-bound enzyme of *E. coli* (23). The pI value determined for  $\beta$ -galactosidase was 7.

$\beta$ -Galactosidase from *A. nidulans* is a very specific enzyme. It was unable to hydrolyze a great variety of carbohydrates tested, it being active exclusively on  $\beta$ -galactosides as lactose

TABLE 3. Affinity for the substrate of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus nidulans* ( $V_{max}$  and  $K_m$  values)

Substrate	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg protein)
PNPG	1.4	28.00
Lactose	71.0	0.4

and the synthetic substrate PNPG (data not shown). Although lactose is the natural substrate of  $\beta$ -galactosidase, the enzyme displayed its greatest affinity ( $K_m$ ) and its highest  $V_{max}$  for PNPG (Table 3). Neither glucose, galactose nor lactose inhibited the  $\beta$ -galactosidase activity.

## References

- Andres, I., Peberdy, J. F. (1974). The production of invertase in *Aspergillus nidulans* with reference to the effects of glucose and sucrose. *Microbiol* **10**, 15–23.
- Bergmeyer, H. U., Graßl, M. (1983). Malate dehydrogenase. In Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., Graßl, M. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 2, pp. 246–247. Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- Bodenmann, J., Heiniger, U., Hohl, H. R. (1984). Extracellular enzymes of *Phytophthora infestans*: endo-cellulase,  $\beta$ -glucosidases and 1,3  $\beta$ -glucanases. *Can. J. Microbiol.* **31**, 75–82.
- Brightwell, R., Tappel, A. (1968). Lysosomal acid pyrophosphatase and acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 333–334.
- Craven, G. R., Steers, E., Anfinsen, C. B. (1965). Purification, composition and molecular weight of the  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **240**, 2468–2477.
- Fantes, P. A., Roberts, C. F. (1973).  $\beta$ -Galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **77**, 471–486.
- Gascón, S., Lampen, J. O. (1968). Purification of the internal invertase of yeast. *J. Biol. Chem.* **243**, 1567–1572.
- Ghosh, A., Chatterjee, B., Das, A. (1990). Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1307–1311.
- Harboe, N., Ingild, A. (1973). Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titer. *Scand. J. Immunol.* **2** (suppl. 1), 161–164.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Johnson, H. N., DeBusk, A. G. (1970). The  $\beta$ -galactosidase system of *Neurospora crassa*, II. Extracellular nature of the pH 4.2 enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **138**, 412–417.

12. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
13. Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Biochem. J.* **55**, 170–171.
14. Moppar, R., Gindler, J. M. (1973). A new noncorrosive dye reagent to automatic sugar chromatography. *Anal. Biochem.* **56**, 440–442.
15. Pollard, H. B., Steers, E. Jr. (1973). *Bacillus megaterium* KM  $\beta$ -galactosidase: purification by affinity chromatography and characterization of the active species. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, 650–661.
16. Réczey, K., Stalbrand, H., Hahn-Hägerdal, B., Tjerneld, F. (1992). Mycelia-associated  $\beta$ -galactosidase activity in microbial pellets of *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 393–397.
17. Ríos, S., Pedregosa, A. M., Monistrol, I. F., Laborda, F. (1993). Purification and molecular properties of an  $\beta$ -galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Letters* **112**, 35–42.
18. Ríos, S., Monistrol, I. F., Laborda, F. (1994). Effect of tunicamycin in  $\beta$ -galactosidase secretion by *Aspergillus nidulans* and the importance of N-glycosylation. *FEMS Microbiol. Letters* **120**, 169–176.
19. Sinner, H., Puls, J. (1978). Non corrosive dye reagent for detection of reducing sugar in borate complex ion-exchange chromatography. *J. Chromat.* **156**, 197–204.
20. Steers, E. J., Cuatrecasas, P., Pollard, H. B. (1971). Purification of  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **246**, 196–200.
21. Steers, E. Jr., Cuatrecasas, P. (1974).  $\beta$ -Galactosidase. Methods in Enzymology. Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B. vol. 34, pp. 351–358.
22. Vainstein, M. H., Peberdy, J. F. (1991). Location of invertase in *Aspergillus nidulans*: release during hyphal wall digestion and secretion by protoplasts. *Mycol. Res.* **95**, 1270–1274.
23. Wallenfels, K., Weil, R. (1972).  $\beta$ -Galactosidase. In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes*, vol. 7, pp. 618–665. Academic Press, New York.

## Effect of nutrients on alginate synthesis in *Azotobacter vinelandii* and characterization of the produced alginate

Soraya A. Sabry,\* Khaled M. Ghanem, Wael A. Sabra

*Department of Botany and Microbiology, Faculty of Science, Alexandria University, Egypt*

Received 23 June 1995/Accepted 16 September 1996

---

### Summary

The role of nutrients on alginate production by *Azotobacter vinelandii* was studied in batch cultures. The largest amount of bacterial alginate was obtained in presence of: 0.3 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 g/l NaCl, 42 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mg/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.9 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 mg/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Alginate production was not enhanced by natural additives or inducing agents, except for acetate, which increased alginate yield. The pure alginate contained 0.36% ash and 0.4% protein. It is similar to algal alginate, but it has an extra acetyl group. It contains 69.5% M-M block, 27.5% M-G block and 3% G-G block.

**Key words:** *Azotobacter vinelandii*, alginate production, exopolysaccharides, biosynthesis, bacterial growth

### Resumen

Se estudió el papel de los nutrientes en la producción de alginato por *Azotobacter vinelandii* en cultivo discontinuo. La mayor producción de alginato bacteriano se obtuvo en la presencia de: 0,3 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g/l NaCl, 42 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mg/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,5 mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,9 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 mg/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . La producción de alginato no mejoró con aditivos naturales o con agentes inductores, excepto con acetato, que la aumentó. El alginato puro obtenido contenía 0,36% de cenizas y 0,4% de proteína. Es similar al alginato de algas, pero tiene un grupo acetilo extra. Contiene 69,5% de bloque M-M, 27,5% de bloque M-G y 3% de bloque G-G.

\* Correspondence to: Soraya A. Sabry. Department of Botany and Microbiology. Faculty of Science. Alexandria University. Alexandria. Egypt. Tel.: +20-3-5969151. Fax: +20-3-5969151.

## Introduction

The production of copious quantities of exopolysaccharide is common amongst plant pathogens such as *Xanthomonas*, *Erwinia* and the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium*, *Azotobacter* and *Beijerinckia*. Alginic acid produced by *Azotobacter vinelandii* is a partially acetylated (1–4) linked linear copolymer of D-mannuronic acid unit, with a small proportion of L-guluronic acid unit (9). Alginate produced was studied under a variety of environmental conditions (5, 20).

The work reported here is part of an investigation undertaken to assess the effect of some nutrients on the formation of alginate by *A. vinelandii* when grown in batch culture. Characterization of the produced alginate was also carried out.

## Materials and methods

### Maintenance and growth of the organism.

The organism used is a strain of *A. vinelandii* supplied by the Microbiological Resource Center Ain-Shams University (MIRCEN). It was maintained on Jarman nitrogen-free mineral medium (see below), solidified with 2% w/v agar. Stock cultures were subcultured monthly, grown at 30°C for 3 days and stored at 4°C.

The organism was routinely cultured in nitrogen-free mineral medium (15) containing (per liter):

Sucrose, 40 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; NaCl, 0.2 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 42 mg; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 42 mg; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 32 mg; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2.9 mg; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.2 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1 mg; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.09 mg. pH of the medium was adjusted to 8. Aliquots (100 ml) of the medium were dispensed in 250 ml

Erlenmeyer flasks, inoculated with 5% of a 36 h seed culture and incubated at 30°C on a rotary shaker (200 shakes/min) for 4 days.

**Bacterial dry weight determination.** Cell dry weight was determined in non-viscous cultures by centrifugation (34,000 × g, 15 min) at 20°C. The cell precipitate was washed with distilled water and finally dried to a constant weight at 105°C. For highly viscous cultures, the capsular material was separated from the bacterial cells by homogenization using a commercial blender followed by centrifugation (8).

**Viscosity measurement.** The viscosity of the culture broth after cell removal was measured using a conventional Ostwald viscometer at 30°C (21).

Apparent relative viscosity,  $\eta_{(app)}$ , was determined as follows:

$$\eta_{(app)} = t_s / t_0$$

where  $t_s$  is the falling time of the sample at 30°C and  $t_0$  is that of distilled water under the same conditions.

**Alginate content.** Alginate was recovered from culture supernatants by precipitation with 3 volumes of cold acetone (-20°C) and kept overnight at -20°C. The precipitated alginate was sedimented by centrifugation (16,300 × g for 1 h at 4°C), washed twice with acetone and dried to constant weight at 105°C.

**Residual sucrose.** The residual sucrose in the culture broth was hydrolyzed with acid, and the resulting reducing sugars were measured according to Dubois et al. (7).

**Purification of the recovered alginate.** The recovered alginate was purified as described by Fett et al. (8).

**Characterization of alginate.** The ash content of alginate was estimated by the sulfated ash method according to Browne and Zerben (2). The total nitrogen content of the alginate was determined by the micro-kjeldahl technique. The

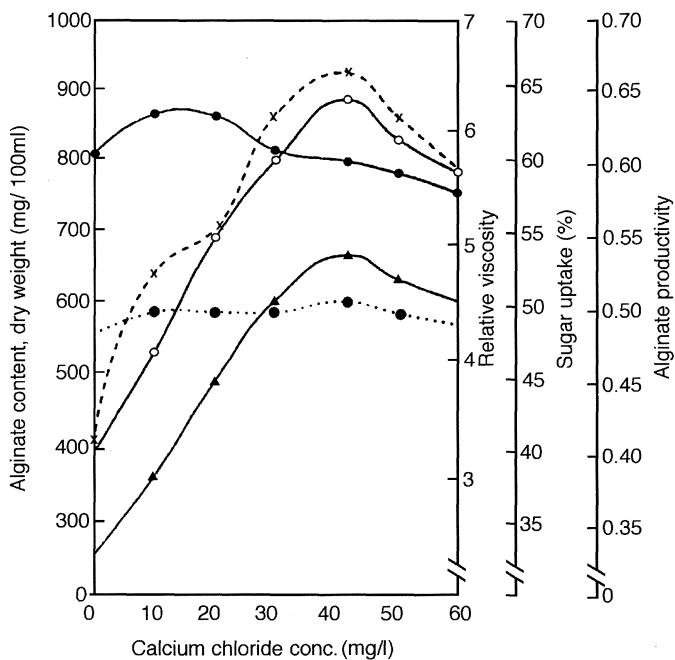


FIG. 1. Dry weight (—●—), sugar uptake (···○···), alginic content (—○—) and filtrate relative viscosity (---x---) of *Azotobacter vinelandii* as well as its alginic productivity (—▲—) as influenced with different concentrations of CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O.

infrared spectra of the alginic sample was carried out using commercial algal alginic acid as a standard.

The determination of guluronic acid was carried out as described by Hitchen and Sadoff (12). Deacetylation of alginic acid was carried out by the method described by Linker and Evans (19). Block composition was estimated as described by Haug et al. (11).

## Results and discussion

**Effect of salts on alginic acid production.** Poor growth and low alginic acid yield were obtained using MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O depleted medium. The optimal concentration for alginic acid formation appeared to be 0.3 g/l with which an increase of about 130% was recorded. Magnesium was reported to increase polymer yield (3).

The alginic content of the culture was increased by 76% in the presence of 0.4 g/l NaCl compared to the NaCl depleted medium. This was accompanied with a remarkable increase in culture viscosity.

The presence of 42 mg/l of CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O increased the alginic yield as well as the relative viscosity of the culture filtrate (Fig. 1). The result of optical density indicated that the presence of calcium chloride not only enhanced the quantity of alginic acid produced, but also showed an increase in the amount of guluronic acid unit in the polymer. A similar observation had been reported previously (1, 21).

The phosphate content of the medium exerted a marked effect on bacterial growth and alginic acid production. The highest alginic content (894 mg/100 ml) and relative viscosity (6.8) were recorded in the presence of 20 mg/l of a mixture of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in the ratio of

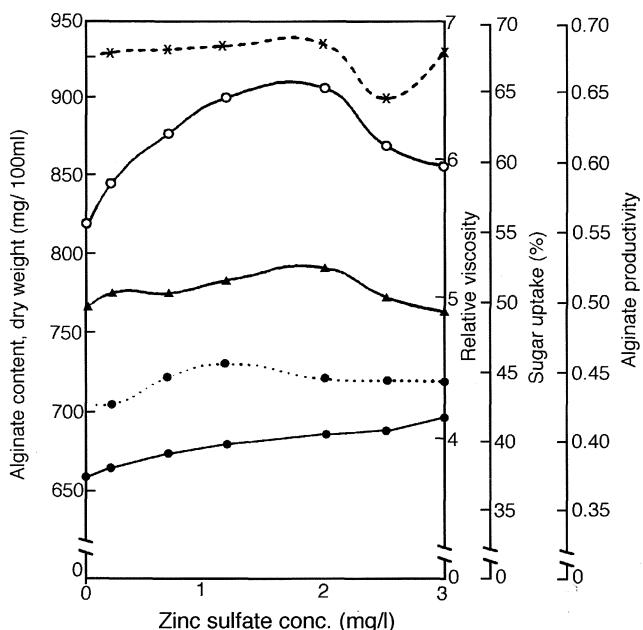


FIG. 2. Dry weight (—●—), sugar uptake (···●···), alginate content (—○—) and filtrate relative viscosity (---x---) of *Azotobacter vinelandii* as well as its alginate productivity (—▲—) as influenced with different concentrations of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

4:1. Higher phosphate concentrations increased bacterial growth, but were accompanied by lower alginate biosynthesis. Similar observations were reported for *A. vinelandii*, whose alginate yield decreased with excess of phosphate (6, 13).

**The role of micronutrients.** The role of micronutrients on bacterial growth and alginate formation was elucidated by the separate addition of different concentrations of salts to Jarman medium.

The optimal concentration of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  seems to be 2.5 mg/l, at which the highest alginate yield (900 mg/100 ml) and productivity (0.51) were achieved. Higher concentrations of the same salts increased growth yield but decreased polymer formation.

The alginate content showed its highest value (900 mg/100 ml) in the presence of 2.9 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$  in the medium. At the same concentration, the highest productivity and relative vis-

cosity were recorded. Growth continued to increase as the concentration of  $\text{H}_3\text{BO}_3$  increased in the medium.

The optimal concentration of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  was found to be 2 mg/l, at which maximal productivity and highest alginate yield were recorded (Fig. 2). The presence of molybdenum in the medium was essential for bacterial growth, as cell yield increased with the increase of  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in the medium. Alginate content was not markedly affected by molybdate concentration, indicating that alginate biosynthesis is mostly independent of molybdenum concentration in the medium. Deavin et al. (6) and Jarman et al. (15) reported that the highest rate of alginate production was recorded with molybdate or phosphate as a growth limiting substrate.

The growth and alginate formation of *A. vinelandii* did not seem to be greatly affected by the presence of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in the medium.

An optimal concentration of 0.3 mg/l was recorded for both cell yield and alginic production.

The response of *A. vinelandii* to different concentrations of  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  showed no remarkable increase in growth or alginic yield. The highest yield was recorded in the presence of 0.2 mg/l  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ .

**Effect of natural additives and inducing agents.** In an attempt to increase the alginic yield of *A. vinelandii*, natural additives were separately added to the medium. A marked increase in growth yield was obtained by adding 2 g/l of each of beef extract (100% increase), yeast extract (74%), peptone (56%) and malt extract (54%), which suggests that these substances would contain growth factors required for bacterial growth. On the other hand, each of these substances exerted a deleterious effect on the viscosity and alginic content of the culture filtrate. The adverse effect of these substances on alginic biosynthesis might be due to the decrease in the C/N ratio in the medium, which is not favorable for polymer formation (18, 22, 23). The inhibitory effect of yeast extract has been previously reported (17). Alternatively, the medium was individually supplemented with

selected inducing agents (0.2 g/l), in an attempt to explore their effect on the metabolic activities of the tested bacterium. Only sodium acetate exhibited stimulatory effect on alginic formation, the other inducers were inconducive to growth and alginic production. The highest polymer yield and productivity were achieved in the presence of acetate at 0.25 g/l. The role of acetate in increasing the production of polysaccharide had been previously reported (16).

Under our experimental conditions, a final yield of 9.85 g alginic per liter of culture was obtained, which is comparable to that obtained elsewhere, or even higher (4, 10, 14, 20).

**Characterization of alginic produced by *Azotobacter vinelandii*.** The alginic obtained was purified from proteins and inorganic salts. The analysis of the pure alginic revealed the presence of 0.36% ash and 0.4% protein. The infrared spectra revealed that the alginic produced is very similar to algal alginic but contains an O-acetyl group (Fig. 3). The determination of block composition of alginic which necessitated the previous deacetylation, revealed that it contained 69.5% M-M block, 27.5% M-G block and 3% G-G block. The high percen-

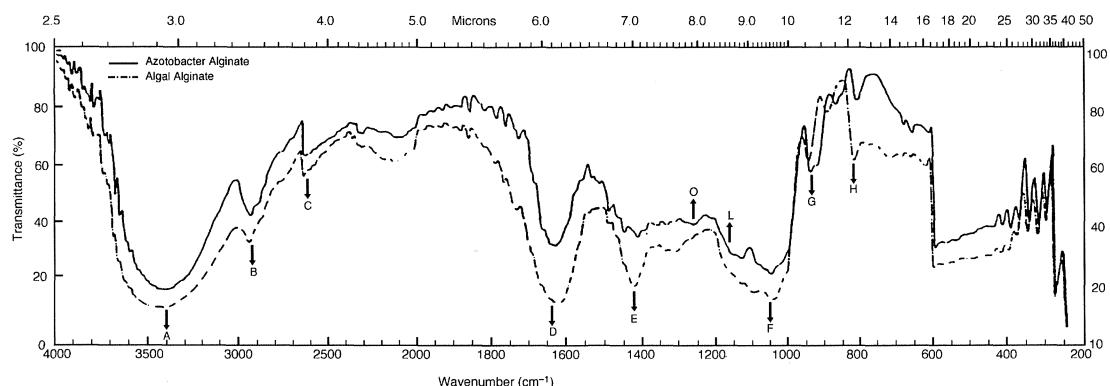


FIG. 3. Comparative infrared spectra of *Azotobacter* and algal alginates. (A) Broad, intermolecular H-bond, O-H stretching,  $3400\text{ cm}^{-1}$ . (B) O-H stretching, for carboxylic acid dimer,  $2910\text{ cm}^{-1}$ . (C) C-H stretch,  $2620\text{ cm}^{-1}$ . (D) C=O stretching for carboxylic acid,  $1620\text{ cm}^{-1}$ . (E) C-O-H in plane bend,  $1410\text{ cm}^{-1}$  [O: O-acetyl group,  $1250\text{ cm}^{-1}$ . L: definite peak for bacterial alginic only,  $1150\text{ cm}^{-1}$ ]. (F) C-O-C stretching, for six membered ring,  $1035\text{ cm}^{-1}$ . (G) O-H out-of plane,  $930\text{ cm}^{-1}$ . (H) Peak for  $\delta$ -linkage,  $810\text{ cm}^{-1}$ .

tage of polymannuronic acid in the polymer suggests that this polymer was the form of alginic initially secreted by the *Azotobacter* cells.

## References

- Annison, G., Couperwhite, I. (1986). Influence of calcium on alginic production and composition in continuous culture of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 55–61.
- Browne, C. A. (1948). Physical and chemical methods of sugar analysis. 3rd edition, p. 1020. John Wiley and Sons, New York.
- Cadmus, M. C., Gasdorf, H. J., Lagoda, A. A., Anderson, R. F., Jackson, R. W. (1963). New bacterial polysaccharides from *Arthrobacter*. *Appl. Microbiol.* **11**, 448–492.
- Chen, W. P., Chen, J. Y., Chang, S. C., Su, C. L. (1985). Bacterial alginic produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 543–546.
- Deavin, L., Jarman, T. R., Lawson, C. J., Righelato, R. C., Slocombe, S. (1976). Abstract, 172nd Nat. Meet., Amer. Chem. Soc. CARB 19.
- Deavin, L., Jarman, T. R., Lawson, C. J., Righelato, R. C., Slocombe, S. (1977). The production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in batch and continuous cultures. In Sandford, P. A., Laskin, A. (ed.), Extracellular Microbial Polysaccharides, pp. 14–26. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356.
- Fett, W. F., Osman, S. F., Dunn, M. F. (1989). Characterization of exopolysaccharides produced by plant associated fluorescent *Pseudomonads*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 579–583.
- Gorin, P. A. J., Spencer, J. F. T. (1966). Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canad. J. Chem.* **44**, 993–998.
- Haug, A., Larsen, B. (1971). Biosynthesis of alginic. Part II. Polmannuronic acid C-5 epimerase from *Azotobacter vinelandii*. *Carb. Res.* **17**, 297–308.
- Haug, A., Larsen, B., Smidsrod, O. (1974). Uronic acid sequence in alginic from different sources. *Carb. Res.* **32**, 217–225.
- Hitchens, V. M., Sadoff, H. L. (1970). Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **104**, 492–498.
- Horan, N. J., Jarman, T. R., Dawes, E. A. (1981). Effect of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 185–191.
- Jarman, T. R. (1978). Bacterial alginic synthesis. In Berkeley, R. C. W., Gooday, G. W., Ellwood, D. C. (ed.), *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*. Academic Press, London.
- Jarman, T. R., Deavin, L., Slocombe, S., Righelato, R. C. (1978). Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 59–64.
- Larsen, B., Haug, A. (1971). Biosynthesis of alginic. Part I. Composition and structure of alginic produced by *Azotobacter vinelandii*. *Carb. Res.* **17**, 287–296.
- Leberkuhne, M. S., Wagner, F. (1986). Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnol. Lett.* **8**, 695–700.
- Lee, P. K., Chang, H. N., Kim, B. H. (1989). Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in continuous fermentation. *Biotechnol. Lett.* **11**, 573–578.
- Linker, A., Evans, L. R. (1976). Unusual properties of glycuronan [Poly(glcosyluronic)compounds]. *Carb. Res.* **47**, 179–187.
- Okabe, E., Nokojima, M., Morooka, H., Nisizawa, K. (1981). Investigation of carbon and phosphorous sources in cultural media of a selected strain of alginic producing *Azotobacter vinelandii*. *J. Ferment. Technol.* **59**, 1–7.
- Page, W. J., Sadoff, H. L. (1975). Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **122**, 145–151.
- Williams, A. G., Wimpenny, J. W. T. (1977). Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in batch culture. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 13–21.
- Williams, A. G., Wimpenny, J. W. T. (1978). Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **104**, 47–57.

# New contributions to the wall polysaccharide structure of vegetative mycelium and fruit body cell walls of *Agaricus bisporus*

Myriam Calonje, Concepción García Mendoza,\* Monique Novaes-Ledieu

*Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain*

Received 8 July 1996/Accepted 14 September 1996

---

## Summary

Significant differences in chemical composition and structure of wall polysaccharides were found in *Agaricus bisporus* vegetative mycelium in comparison with the fruit body mycelium. Chemical fractionation of the walls demonstrated distinct percentages of the successively solubilized polysaccharides in both walls, and different proportions of their respective sugar monomers. Permethylolation of isolated fractions also showed striking differences relative to the sugar linkages between the two types of walls studied. Furthermore, infrared spectrophotometry exhibited a distinct polysaccharidic configuration in several fractions. All the described differences were correlated with the transition of vegetative mycelial walls to the fruiting stage of differentiation.

**Key words:** *Agaricus bisporus*, vegetative mycelium, aggregated mycelium, wall polysaccharides, chemical structure

## Resumen

Se han encontrado diferencias significativas en la composición y estructura química de los polisacáridos de las paredes celulares de los micelios vegetativo y fructífero de *Agaricus bisporus*. El fraccionamiento químico de las paredes mostró distintos porcentajes en los polisacáridos solubilizados sucesivamente en ambas paredes, y diferentes proporciones en sus respectivos monosacáridos. La permetilación de las fracciones aisladas también mostró diferencias importantes en los enlaces de dichos monosacáridos de las dos clases de paredes. Por otra parte, la espec-

\* Correspondence to: Concepción García Mendoza. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Velázquez, 144. 28006 Madrid. Tel.: +34-1-5611800. Fax: +34-1- 5627518.

trofotometría de infrarrojo permitió apreciar diferente configuración en varias fracciones. Todas las diferencias descritas pudieron ser relacionadas con la diferenciación de las paredes en la transición de micelio vegetativo a micelio fructífero.

## Introduction

Fungal cell walls are mainly composed of polysaccharides. As a general rule microfibrils either of chitin or cellulose, according to the genus, are cemented by amorphous components such as glucans, mannans, galactans, xylans, heteropolysaccharides and proteins. Basidiomycete walls can be included in the chitin pattern and several reports have been published on the wall composition of species of this fungal class (10, 11, 14, 15, 17, 19, 20).

Comparison of the vegetative mycelium and fruit body cell walls of *Agaricus bisporus* (8) has previously shown significant differences in their chemical composition and structure, later confirmed (16) on walls of substrate and stipe hyphae of another strain of the same organism.

The present report describes a more detailed study on the chemical and structural differences of vegetative mycelium and fruit body walls of an *A. bisporus* commercial strain.

## Materials and methods

**Organism.** Commercial fruit bodies at the button stage of *A. bisporus* (strain H 25) were supplied by CIES (see acknowledgments). Fragments of these basidiocarps were cultivated to obtain vegetative mycelium. Lamellae and soil debris were carefully removed and caps and stipes constituted the aggregated mycelium. The vegetative mycelium was grown in Roux flasks with 60 ml of Raper medium (18) for 2 weeks at 25°C in static cultures and the hyphae harvested by filtration and washed with distilled water.

## Preparation and fractionation of hyphal walls.

Fruit body and vegetative mycelia were suspended in distilled water, disrupted by the action of a Polytron homogenizer and the walls purified as described previously (2). The wall fractionation was performed according to the method shown in Fig. 1. The seven fractions obtained were freeze-dried and reserved for further analyses.

**Analytical techniques.** Neutral carbohydrates were determined by the anthrone procedure (6), with glucose as standard. For identification of the monosaccharides, the fractions were hydrolyzed with  $H_2SO_4$  at different concentrations and times, and with trifluoracetic acid 5M, 1 h at 105°C, in sealed evacuated ampoules. Sugars were converted in their corresponding alditol acetates (12) and identified by gas liquid chromatography (GLC). For methylation analysis, the Ciucanu and Kerek method (7) was used. The polysaccharide material (5 mg) was dissolved in anhydrous dimethyl sulphoxide (1 ml) with ultrasonic treatment and then 20 mg of NaOH were added. The samples were sonicated and methylated using methyl iodide (0.5 ml). Methylated polysaccharides were hydrolyzed with trifluoroacetic acid in the same conditions as above, and products were reduced with  $NaBD_4$  and converted to partially methylated alditol acetates (PMAAs). The PMAAs were separated by GLC on a column of 3% OV-225 at 170°C (for retention times) and with a temperature program (for the peak areas). GLC-MS was performed on an ITD Perkin Elmer coupled with a capillary column from 160°C to 200°C at 2°C/min. IR spectra were obtained by the KBr technique on a Perkin Elmer 457 infrared spectrophotometer.

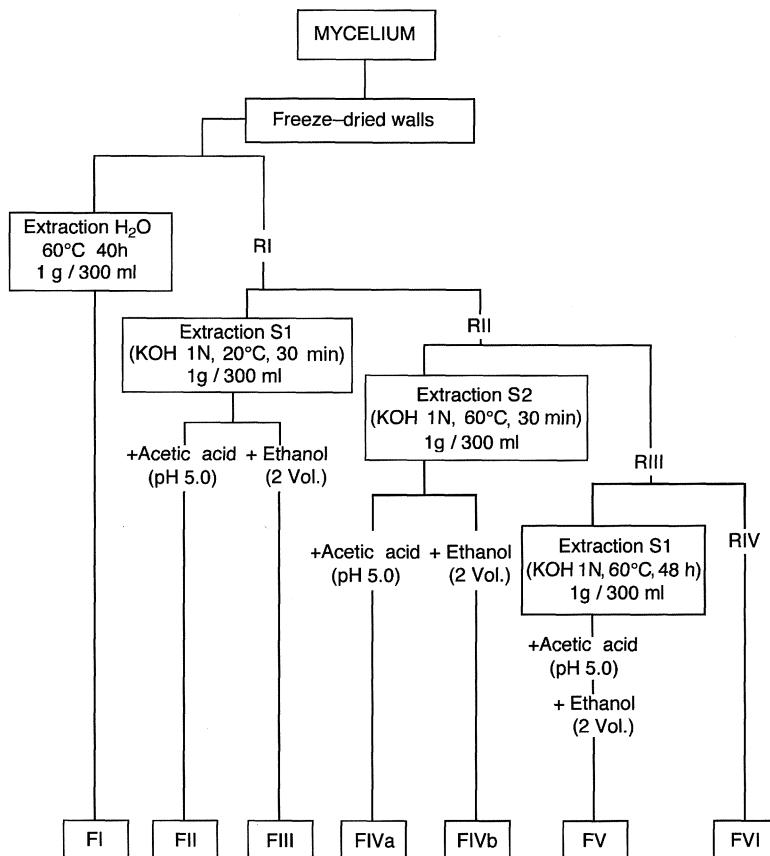


FIG. 1. Fractionation of the vegetative and fruit body walls of *Agaricus bisporus*.

## Results

Significant differences between the vegetative mycelium and fruit body walls of the same commercial strain of *A. bisporus* were found in this study. The fractionation procedure revealed different percentages of the isolated polysaccharidic fractions in the two mycelia. Fractions FI, FII and FVI showed the highest percentages in vegetative mycelial walls, whereas fractions FIVb, FV and FVI were the most important fractions in aggregated mycelial walls (Table 1).

Global composition of the vegetative mycelium and fruit body walls showed that neutral carbohydrates were their main component, followed by amino sugars and proteins, but the

percentage of each component was different in the two types of walls. Aggregated walls presented higher values of amino sugars and proteins (43.6% and 7.3% respectively) than vegetative walls (20.8% and 4.8% respectively), whereas the neutral sugar content was higher in vegetative walls (Table 1). With regard to the fractions, all of them contained neutral carbohydrates, amino sugars and proteins. The percentages of neutral carbohydrates in fractions FII, FIII, FIVb and FV were similar (70–80%) in both types of walls. However, fractions FI and FVI showed higher carbohydrate amounts in vegetative than in fruit body walls. Fraction FIVa showed low percentage of neutral sugars in both mycelia. The protein content was higher in

TABLE 1. Percentages of dry weight and neutral carbohydrates in the fractions of vegetative cell walls and fruit body cell walls in *Agaricus bisporus*

Fractions	Dry weight (%)		Neutral carbohydrates (%)	
	VCW*	FBCW*	VCW	FBCW
FI	27.4 ± 0.3	7.5 ± 0.2	61.9 ± 0.7	35.3 ± 0.5
FII	11.2 ± 0.2	5.8 ± 0.2	69.7 ± 0.6	69.6 ± 0.7
FIII	3.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1	69.5 ± 0.7	70.6 ± 0.6
FIVa	5.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	40.2 ± 0.5	39.6 ± 0.5
FIVb	2.5 ± 0.2	10.3 ± 0.3	70.7 ± 0.8	78.4 ± 0.7
FV	6.8 ± 0.1	16.1 ± 0.3	86.8 ± 0.7	72.3 ± 0.7
FVI	24.3 ± 0.3	37.7 ± 0.3	51.7 ± 0.4	19.9 ± 0.4
Total cell wall	—	—	58.4 ± 0.5	43.9 ± 0.6

\* VCW: Vegetative cell walls. FBCW: Fruit body cell walls. The mean deviation is calculated from the results of, at least, five experiments.

fraction FI, specially in vegetative walls, and decreased gradually in the subsequent fractions except in fraction FIVa, in which the percentage was elevated in the two wall types. Amino sugar content was clearly higher in fraction FVI (chitin-glucan complex) particularly in fruit body walls (around 80%), and decreased in the other fractions, specially in the external fractions in which the percentage was around 1–2% (data not shown).

Chromatographic analysis of the hydrolyzed total walls and fractions demonstrated that glucose was the main component of the neutral sugars in both mycelia. Mannose, xylose and galactose were present in minor and variable quantities in the two wall preparations, whereas trace amounts of arabinose and rhamnose were detected. Total walls showed higher percentages of mannose, galactose and xylose in vegetative than fruit body walls that was reflected in the fractions, galactose presenting a remarkable value in fraction FIVa, mannose in fraction FII and xylose in fractions FII, FIII and FIVa (Table 2).

All the fractions isolated from the vegetative and aggregated mycelial walls were subjected to methylation analysis and the results revealed significant differences with regard to the principal types of glycosidic linkages between the two mycelia. Fraction FI or mucilage was very simi-

lar in both mycelia and it was essentially composed of (1→4) linked glucosyl residues and rather low values of glucose as branch points.

Fraction II was constituted principally by (1→3) linked glucosyl and (1→3) linked mannosyl residues, xylose as the main terminal residue and glucose and mannose as branch points, but the amount of terminal xylose was significantly higher in vegetative walls as well as branched mannose in aggregated walls. Fraction FIII was different in the two mycelia, vegetative mycelial wall showing (1→4) linked glucosyl residues as the main type of linkage followed by (1→4) linked xylosyl residues whereas aggregated mycelial wall presented (1→6) linked glucosyl residues followed by (1→3) and (1→3,6) linked glucosyl residues.

Fraction IVa was similar in vegetative and fruit body walls and contained high amount of (1→3) linked glucosyl residues together with (1→6) linked galactosyl and (1→4) linked xylosyl residues. Fraction IVb of the vegetative mycelial wall presented high values of (1→4) linked glucosyl residues, an appreciable amount of (1→4) linked xylosyl residues as long as the fruit body mycelial wall exhibited a very high percentage of (1→6) linked glucosyl residues. Finally, fractions FV and FVI were principally

TABLE 2. Molar ratio of sugars detected as alditol acetates by gas liquid chromatography in vegetative cell walls and in fruit body cell walls in *Agaricus bisporus*

Fractions	Glucitol		Galactitol		Mannitol		Xylitol		Arabinitol		Rhamnitol	
	VCW*	FBCW*	VCW	FBCW	VCW	FBCW	VCW	FBCW	VCW	FBCW	VCW	FBCW
FI	93.4	95.0	4.9	4.4	2.3	3.0	—	0.3	—	—	—	0.3
FII	69.9	84.2	2.2	0.9	13.0	8.3	14.4	6.1	—	0.3	0.5	0.2
FIII	76.5	86.9	5.7	7.0	1.9	3.9	14.7	2.2	1.0	—	—	Traces
FIVa	42.6	66.3	27.6	5.5	12.5	9.3	14.2	17.4	—	Traces	—	0.5
FIVb	82.8	96.2	2.7	2.0	4.8	1.0	8.4	0.8	0.7	Traces	0.4	Traces
FV	94.7	94.0	2.3	4.8	0.9	0.4	1.4	0.6	0.4	0.3	0.3	0.1
FVI	96.8	99.0	—	1.0	3.2	Traces	Traces	—	—	—	—	—
Total cell wall	81.1	92.4	4.8	2.2	5.8	4.0	4.2	1.0	0.1	0.4	Traces	Traces

\* VCW: Vegetative cell walls. FBCW: Fruit body cell walls. Data are from the average of, at least, three determinations.

constituted by (1→4) linked glucosyl residues in the vegetative mycelial wall, and by (1→6) linked glucosyl residues in the fruit body wall.

Comparison of the infrared spectra of the polysaccharidic fractions also showed important differences between the two mycelia (Figs. 2 and 3), specially in Fractions III, IVa and IVb. Fraction FI is an  $\alpha$ - $\beta$  configurational polysaccharide in both mycelia. Fraction FII presented mainly  $\alpha$  configuration with some  $\beta$  linkages in the vegetative and fruit body walls. Fraction FIII showed the spectrum of an  $\alpha$ (1→4) polymer (930, 850, 760 and 710  $\text{cm}^{-1}$ ) in vegetative walls, whereas the fruit body preparation showed the spectrum of a  $\beta$  glucan with a significant absorption band at 890  $\text{cm}^{-1}$ . Fraction FIVa exhibited in the two preparations a spectrum of an  $\alpha$ (1→3) glucan (930 and 850  $\text{cm}^{-1}$ , although with a peak at 790  $\text{cm}^{-1}$  instead of 820  $\text{cm}^{-1}$ ) and some  $\beta$  absorption band at 890  $\text{cm}^{-1}$ , whereas in the vegetative walls the absorption band of  $\beta$  configuration was remarkable. Fraction FIVb presented an  $\alpha$ (1→4) glucan spectrum in vegetative mycelial walls and the characteristic peak of a  $\beta$  configuration in fruit body walls. Fraction FV showed the spectrum of a  $\beta$  glucan, and fraction FVI presented the absorption bands characteristic of the chitin together with that of the  $\beta$  configuration in both mycelia.

## Discussion

The results showed here confirm the remarkable structural differences between vegetative and fruit body cell walls within the same strain of *A. bisporus*, previously reported by García Mendoza et al. (8) and Mol and Wessels (16). These findings are also in good agreement with those described before by Michalenko et al. (15) in vegetative mycelial walls and by Novaes-Ledieu and García Mendoza (17) in fruit body cell walls. All these studies were carried out in different commercial strains of *A. bisporus*.

The overall chemical composition of both types of walls was nearly similar, not reflecting the different complexity found along the present studies. Comparison of the successive fraction weights released by the above described chemical fractionation procedure on both wall types showed that the non-aggregated walls were more enriched in the most external fractions FI and FII, whereas in the fruit body walls the same fractions decreased with an increase in the most internal fractions FIVb, FV and FVI. This is associated with the higher amount of chitin in these fruit body walls (8), chitin being also located mainly in the inner wall (9). The total neutral sugar content was somewhat higher in total vegetative mycelial walls and varied not

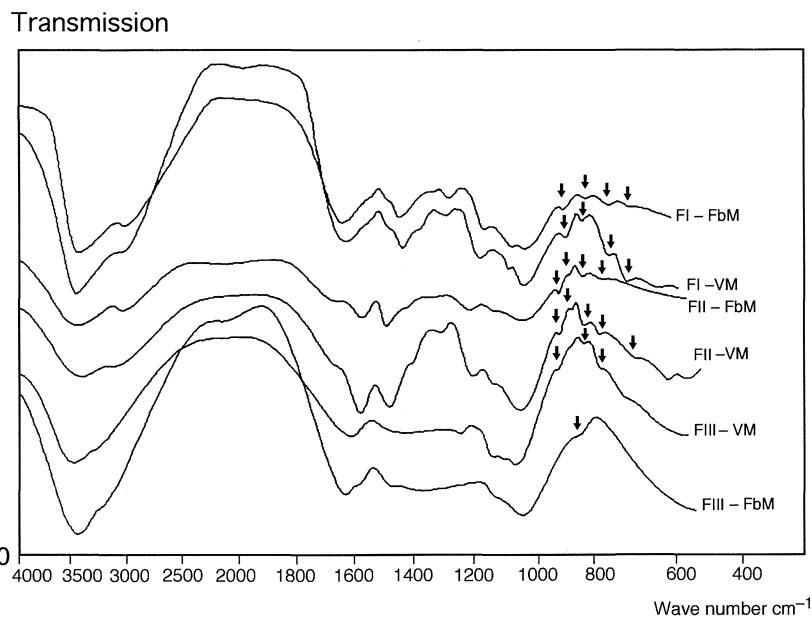


FIG. 2. Infrared spectra of the fractions FI, FII and FIII of *Agaricus bisporus* vegetative and fruit body walls. Fruit body mycelium (FbM) FI: 930, 850, 760 and 710  $\text{cm}^{-1}$ ; vegetative mycelium (VM) FI: 930, 850, 760 and 710  $\text{cm}^{-1}$ ; fruit body mycelium FII: 930, 890, 850 and 820  $\text{cm}^{-1}$ ; vegetative mycelium FII: 930, 890, 850, 820, 710, 650 and 610  $\text{cm}^{-1}$ ; fruit body mycelium FIII: 890  $\text{cm}^{-1}$ ; vegetative mycelium FIII: 930, 850, 760 and 710  $\text{cm}^{-1}$ .

only in the water-soluble polysaccharides of both walls (FI) but also in the alkali soluble fractions FIVa, FIVb and FV as well as in the insoluble residue (FVI). The presence of higher proportions of xylose, mannose and galactose in vegetative mycelial walls suggests a more heteropolysaccharidic nature for these walls. The significant differences in the type and percentages of the neutral sugars could be a consequence of the necessary mobilization and further reorganization of polysaccharide material to achieve wall differentiation.

Glucose as the main sugar in both types of walls is related with the presence of water- and alkali-soluble  $\alpha$  and  $\beta$  glucans and the residual alkali-insoluble  $\beta$  glucan. Other neutral sugars as xylose and mannose may be structured as one some possible xylomannan, as described in *Armillaria mellea* (4), *Polyporus tumulosus* (1) and *Coprinus cinereus* (3). Nevertheless, xylose is well represented in more fractions of vegeta-

tive mycelial walls (FII, FIII, FIVa and FIVb) than of fruit body walls (FII and FIVa). The other inner fractions in these latest walls are more enriched in glucan components. Galactose has been described as part of galactofuranose-containing homo- and heteropolysaccharides in cell walls of different species of *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Talaromyces* and *Paecilomyces* (13), but our studies have not shown similar kinds of polysaccharides.

From the methylation analysis it has been possible to detect clear differences in the types of linkages and their proportions in the wall fractions of both stages of differentiation of *A. bisporus* mycelial walls. The vegetative walls showed high percentages of (1 $\rightarrow$ 3) glucosyl linkages in fractions FII and FIVa as well as in (1 $\rightarrow$ 4) linked glucose of fractions FI, FIII, FIVb, FV and FVI. On the contrary, fruit body walls exhibited high amounts of (1 $\rightarrow$ 3) glucosyl linkages in fractions FII and FIVa, and (1 $\rightarrow$ 4)

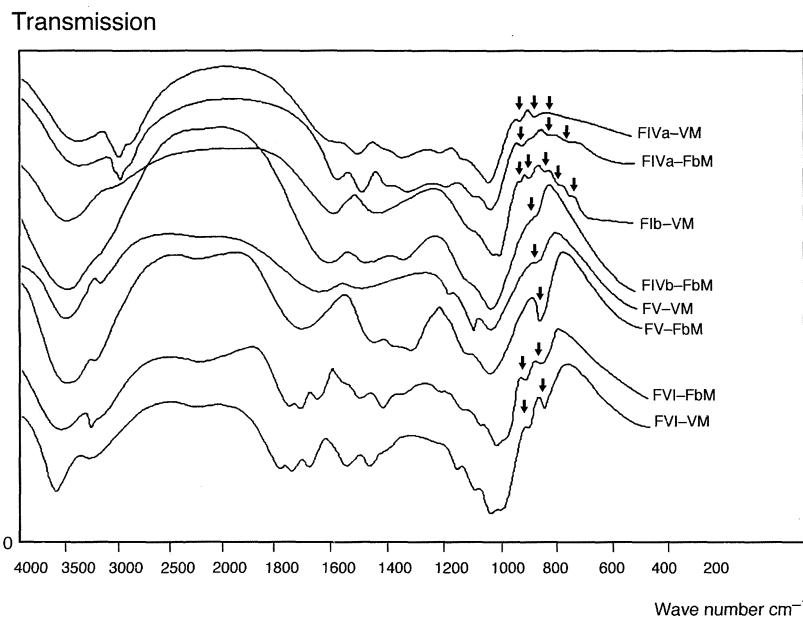


FIG. 3. Infrared spectra of the fractions FIVa, FIVb, FV and FVI of *Agaricus bisporus* vegetative and fruit body walls. Fruit body mycelium (FbM) FIVa: 930, 890, 850 and 790  $\text{cm}^{-1}$ ; vegetative mycelium (VM) FIVa: 930, 890, 850 and 790  $\text{cm}^{-1}$ ; fruit body mycelium FIVb: 890  $\text{cm}^{-1}$ ; vegetative mycelium FIVb: 930, 890, 850, 790, 760 and 710  $\text{cm}^{-1}$ ; fruit body mycelium FV: 890  $\text{cm}^{-1}$ ; vegetative mycelium FV: 890  $\text{cm}^{-1}$ ; fruit body mycelium FVI: 950 and 890  $\text{cm}^{-1}$ ; vegetative mycelium FVI: 950 and 890  $\text{cm}^{-1}$ .

glucosyl linkages only in fraction FI, but the main difference is the presence of (1 $\rightarrow$ 6) linked glucose very well represented in fractions IIII, FIVb, FV and FVI instead of the (1 $\rightarrow$ 4) glucosyl linkages as described in vegetative mycelial walls. This high proportion of (1 $\rightarrow$ 6) linkages in *A. bisporus* fruit body walls had been previously published (8, 16), but not on the basis of methylation studies as in this report. The high amount of (1 $\rightarrow$ 6) glucose linked residues in aggregated walls could have some significance in the packing of other polysaccharidic chains increasing the glucosyl (1 $\rightarrow$ 3, 6) branching points particularly in fraction IIII. The fact that fraction FII shows a rather similar structure to fraction FIVa, and also fraction IIII with respect to fraction FIVb in the two types of walls, may be interpreted as if both fractions FIV were very close associated and interwoven with fractions FII and IIII, being necessary to release fractions

FII together with IIII for further FIVa and FIVb recovery. A correlation between solubility behaviour of the fractions II, III and IV (a and b) with the wall ultrastructure previously described (9) could be interpreted as if fractions IIII and FIVb were cementing not only the more external glucan thick fibres (fraction FII) but also other more internal structurally related components (fraction FIVa).

In addition, the infrared spectra of the fractions also revealed significant differences between both types of walls. Fraction FIVb in vegetative mycelial walls seems to be mainly a configurational (1 $\rightarrow$ 4) polysaccharide. However, fruit body walls exhibited the same  $\beta$  configuration in fractions IIII, FIVb and FV.

All these results emphasize the required structural rearrangement of the polysaccharides for the transition of vegetative to fruit body walls, which should correspond with all the differences

described. By complementing wall structural studies with those for isozyme patterns and nuclear and mitochondrial RFLPs in two distinct strains of *A. bisporus*, a clear correlation between all of them has been found (5), thus indicating that wall structure constitutes a valuable biochemical criterion for phylogenetic studies and for legal protection of industrial organisms.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from the DIGICYT (Dirección General de Investigación Científica y Técnica) and the Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha. We also thank CIES (Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón, Quintanar del Rey, Cuenca, Spain), for supplying the *A. bisporus* fruit bodies.

### References

- Angyal, S. J., Bender, V. J., Ralph, B. J. (1974). Structure of polysaccharides from the *Polyporus tumulosus* cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **362**, 175–187.
- Avellán, M. A., García Mendoza, C., Novaes-Ledieu, M. (1986). Relationship between the presence of wall mucilage and the cellular disruption method employed in *Agaricus bisporus* tertiary mycelium. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**, 101–104.
- Bottom, C. B., Siehr, D. J. (1979). Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the hyphal wall of the basidiomycete *Coprinus macrorhizus* var. *microsporus*. *Carbohydr. Res.* **77**, 169–181.
- Bouveng, C. B., Fraser, R. N., Lindberg, B. (1967). Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (Tricholomataceae). Part II. Water soluble mycelium polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **4**, 20–31.
- Calonje, M., García Mendoza, C., Novaes-Ledieu, M., Labarère, J. (1995). Characterization of two commercial *Agaricus bisporus* strains by cell wall structure, isozyme patterns, nuclear and mitochondrial restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Mushroom Sci.* **14**, 133–140.
- Chung, C. W., Nickerson, W. J. (1954). Polysaccharide synthesis in growing yeasts. *J. Biol. Chem.* **208**, 395–407.
- Ciucanu, I., Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **131**, 209–217.
- García Mendoza, C., Avellán, M. A., Sanchez, E., Novaes-Ledieu, M. (1987). Differentiation and wall chemistry of *Agaricus bisporus* vegetative and aggregated mycelia. *Arch. Microbiol.* **148**, 68–71.
- García Mendoza, C., Sanchez, E., Novaes-Ledieu, M. (1987). Differences in microfibrils in the walls of *Agaricus bisporus* secondary mycelium. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**, 161–165.
- Gooday, C. W. (1975). The control of differentiation in fruit bodies of *Coprinus cinereus*. *Reports of the Tottori Mycological (Japan)* **12**, 151–160.
- Kamada, T., Takemaru, T. (1983). Modifications of cell-wall polysaccharide during stipe elongation in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 703–709.
- Laine, R. A., Esselman, W. J., Sweeley, C. C. (1972). Gas liquid chromatography of carbohydrates. *Methods Enzymol.* **18**, 156–167.
- Leal, J. A. (1994). Water soluble polysaccharides of fungal cell walls. In Prins, R. A., Stewart, C. S. (ed.), *Microorganisms in Ruminant Nutrition*, pp. 153–165. Nottingham University Press.
- Marchant, R. (1978). Wall composition of monokaryons and dikaryons of *Coprinus cinereus*. *J. Gen. Microbiol.* **106**, 195–199.
- Michalenko, G. O., Hohl, H. R., Rast, D. (1976). Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **92**, 251–262.
- Mol, P. C., Wessels, J. G. H. (1990). Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit body stipes in *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* **94**, 472–479.
- Novaes-Ledieu, M., García Mendoza, C. (1981). The cell walls of *Agaricus bisporus* and *Agaricus campestris* fruiting body hyphae. *Can. J. Microbiol.* **27**, 779–787.
- Raper, C. A., Raper, J. R., Miller, R. E. (1972). Genetic analysis of the life-cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **64**, 1088–1117.
- Siehr, D. J. (1976). Studies on the cell wall of *Schizophyllum commune*. Permethylolation and enzymatic hydrolysis. *Can. J. Biochem.* **54**, 130–136.
- Sietsma, J. H., Wessels, J. G. H. (1977). Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta* **496**, 225–239.

## Epidemiological markers of *Serratia marcescens* isolates causing nosocomial infections in Spain (1981–1991)

Teresa Boquete, Ana Vindel, Cecilia Martín-Bourgon, Luisa Azañedo,  
Juan A. Sáez-Nieto\*

*Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Madrid, España*

Received 19 February 1996/Accepted 1 July 1996

---

### Summary

The distribution of epidemiological markers (serotyping and phage-typing) of *Serratia marcescens* isolates from nosocomial episodes (63 nosocomial outbreaks with 475 isolates, and 1208 sporadic cases) received in our laboratory during the period 1981–1991 was studied. The records for 1683 isolates from Spanish hospitals have been analyzed. In relation with the sporadic cases, the predominant types were serotype O6 (13.4%) and serotype O14 (11.4%); polyagglutinable strains accounted for 15.6%; in outbreaks, type O14 is clearly predominant (27.4%). Phage-typing was a good secondary marker, with a 87.9% of typability; the number of lytic patterns was very high, extended patterns (six or more phages) being the most frequent. We have studied the characteristics of *S. marcescens* isolates causing infections in the nosocomial environment in Spain.

**Key words:** *Serratia marcescens*, phage-typing, serotyping, epidemiological markers, nosocomial infections

---

### Resumen

En este trabajo se estudia la distribución de marcadores epidemiológicos (serotipia y fagotipia) de cepas de *Serratia marcescens* aisladas de infecciones nosocomiales, de los cuales 475 aislamientos

---

\* Correspondence to: Juan A. Sáez-Nieto. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. 28220 Majadahonda. Madrid. España. Tel.: +34-1-5097972. Fax: +34-1-5097966. E-mail: jasaez@isciii.es

proceden de 63 brotes en ambientes hospitalarios, y 1208 corresponden a aislamientos de casos esporádicos. Todas las cepas fueron recibidas en nuestro laboratorio entre los años 1981 y 1991. Los resultados obtenidos con las 1683 cepas nos muestran que el serotipo más frecuentemente aislado de casos esporádicos fue el O6 (13,4%), seguido del O14 (11,4%). Las cepas poliaglutinables constituyeron el 15,6%. En brotes nosocomiales, el serotipo O14 se aisló en un 27,4% de los casos. La fagotipia se mostró como un buen marcador secundario, con un 87,9% de tipabilidad y un poder discriminatorio muy alto, ya que se encontró una gran diversidad de patrones líticos. Se han estudiado las características de las cepas de *S. marcescens* que producen infección nosocomial en el medio hospitalario en España.

## Introduction

*Serratia marcescens* is being more and more recognized as a major opportunistic pathogen. The use of intravenous solutions, disinfectants, respiratory therapy equipment and urethral and intravenous catheters contaminated by *S. marcescens* has been reported as a cause of nosocomial outbreaks (1, 11, 15).

This organism may survive in the environment, and usually attacks compromised hosts and neonates, causing a variety of infections: otitis media, respiratory and urinary tract infections, meningitis, peritonitis, ocular infections, endocarditis and others (4,12). A major characteristic of *S. marcescens* is its resistance to antibiotics, with high frequency of multiresistant isolates that could also act as a reservoir for other microorganisms frequently isolated in the hospital environment (6,13).

In Spain, this microorganism has produced, during the last years, an unusually large number of episodes (outbreaks and sporadic cases) of nosocomial infections, mainly in immunocompromised patients and in hospital units at risk (5). In this study we have analyzed the reference epidemiological markers (serotyping and phage-typing) in 1683 isolates of *S. marcescens* sent to our laboratory by different Spanish hospitals, throughout eleven years (1981 to 1991). It includes isolates from 63 nosocomial outbreaks.

The aim of the study has been the characterization of *S. marcescens* isolates which have produced nosocomial infections in Spain over that period.

## Materials and methods

Bacterial isolates consisted of 475 strains from 63 nosocomial outbreaks and 1208 strains from sporadic cases. All isolates were identified as *S. marcescens* by standard methods (7).

**Serotyping.** It was performed by using antisera against the somatic antigens (O antigens) of type strains, kindly supplied by Dr. T. L. Pitt (Central Public Health Laboratory, Colindale, London, UK). The two methods used for typing were microagglutination and slide agglutination, according to the techniques previously described (8).

**Phage-typing.** It was performed by testing the susceptibility of isolates to phages of the current international set (11 phages) at  $10 \times$  RTD, supplied also by Dr. T. L. Pitt. The methodology described by this author was followed (9).

## Results

**Sources of infection.** The source of isolates were, in sporadic cases, urine (22.5%), wounds

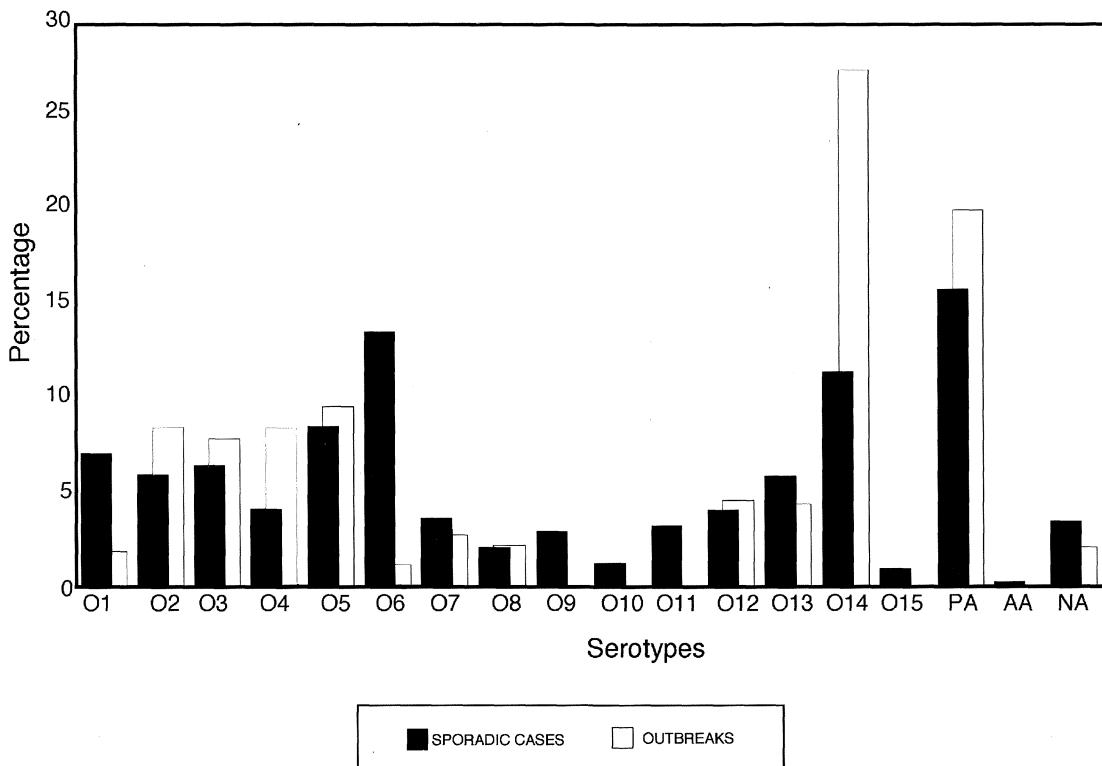


FIG 1. Distribution of serotypes of *Serratia marcescens* isolates (sporadic cases and outbreaks).

(13.1%) and respiratory tract (12%). 34.1% of the isolates are from unknown source.

In regard to outbreaks, isolates from unknown origin represent 46.5%, because the information was not supplied by the hospital. Isolates from urine, blood and respiratory tract were predominant.

**Serotyping.** Fig. 1 shows the distribution of serotypes in the two groups of isolates. Some significant differences between them were detected. Thus, serotype O6 (13.4%) and polyagglutinable strains (15.6%) were the most frequent in sporadic cases; following them, serotype O14 included 11.4% of isolates.

In outbreaks, isolates of serotype O14 were predominant (27.4%), whereas the polyagglutinable strains accounted for 19.8% of cases. The remaining serotypes were found in similar pro-

portions in both outbreaks and sporadic cases (<10%). The typability of serotyping was 93.6%.

**Phage-typing.** The activity of eleven phages was used, and 87.9% of isolates were characterized by this method. Phage 4 presented the highest lytic activity (58.6% of strains), followed by phages 2 and 1 (46.5% and 43.5%, respectively). Non-typable strains constituted 12.1% of isolates. The number of lytic patterns was very high, the broad patterns being most frequent (six to eleven phages). Table 1 indicates the distribution of the tipability of the strains assayed.

**Outbreaks.** Several clinical, epidemiological characteristics of the outbreaks should be taken into account. Among them: (i) Their occurrence over short periods of time, except for three outbreaks (examples 1, 2, 7, in Table 2), which persisted from one to three years in the

TABLE 1. Typability of bacteriophages against 1683 isolates of *Serratia marcescens*

Phage	No. strains	%
F1	732	43.5
F2	782	46.5
F3	486	28.9
F4	986	58.6
F5	648	38.5
F6	464	27.6
F7	568	33.7
F8	447	26.5
F9	465	27.6
F10	219	13.0
F11	663	39.4
Non-typable	204	12.1

hospital (outbreak 3). (ii) The source of infection in most cases was either water (taps, respirators) or catheters. (iii) They were generally limited to defined areas within the hospital, and affected a small number of patients, with the exceptions described in the Table 2. (iv) They usually manifested as urinary tract infections (outbreaks 1, 2), septicemias (outbreaks 5, 8) and respiratory tract infections (outbreaks 3, 4, 7), and the outbreaks with the high number of cases took place in nephrology and medical wards.

## Discussion

This study illustrates the efficacy of phage-typing and serotyping in the characterization of *S. marcescens*, with a typability rate of 87.9% and 93.6% respectively. A high proportion of polyagglutinable strains was found both for isolates recovered from sporadic cases and from outbreaks, as it has been described by other authors (8). These strains represented the main drawback of this method. As in other studies

(10), serotype O6 and O14 are the main types amongst polyagglutinable strains. Serotype O14 is the most frequent isolate in outbreaks, and O14 along with O6 are the most frequent in sporadic cases. Thus isolates belonging to serotypes O6, O14 and polyagglutinable (O6, O14) were the main cause of nosocomial infections in Spain. Studies from other countries in Europe and in the USA describe serotype O14 as the most frequently found in hospital infections (2, 8, 9, 14).

Phage-typing provided a great degree of discrimination. However, owing to the high number of patterns obtained, it was used as a secondary marker (after serotyping), and was very useful for the identification of the source of infection in outbreaks. A large number of isolates were lysed by several different phages, from six to eleven. Phage 4 lysed the largest number of isolates (58.6%), followed by phage 2 (46.5%) and phage 1 (43.5%).

The capacity of *S. marcescens* to survive in the environment (water, air, floor), which added to its ability to contaminate therapeutic equip-

TABLE 2. Representative outbreaks produced for *Serratia marcescens* isolates (1981–1991)

No.	Year	Location	Serotype	Phage-type	No. cases/ total isolates	Source of infection
1	1981	Santander	O14	1,2,5,6,7,9,11	37/38	Water
2	1983	Zaragoza	O12	4	14/14	Water
3	1984	Tarragona	PA(O6,O14)	5,6,7,9,11	21/21	Water
4	1986	Madrid	O1	1,2,3,4,5,6,7,9,10,11	8/8	Environment
5	1987	Vizcaya	O8	Non-typable	7/7	Catheter
6	1987	Barcelona	O3	1,4	15/15	Water
7	1988	Madrid	O2	2,4	21/21	Water
8	1989	Barcelona	O4	7	5/6	Catheter
9	1990	Madrid	O5	1,2,4,5,9,11	7/12	Water
10	1991	Barcelona	PA(O6,O14)	1,2,3,4,5,7,8,9,11	11/11	Environment

ment (catheters, respirators, etc.), accounts for the major role of this microorganism as a nosocomial pathogen (2, 3, 11, 15). During the eleven-year period covered by this study, 63 nosocomial outbreaks took place in Spanish hospitals. The type and source of infection as well as involved wards were similar to those described by other authors (3).

In Spain, *Serratia marcescens* has been responsible for episodes of nosocomial infection, following in importance to the three major nosocomial pathogens: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (5). The resistance of these pathogens to antibiotics, as well as their ability to transfer such a resistance to other nosocomial pathogens, make surveillance studies advisable in order to detect possible sources of infection in high risk units.

Classical typing methods are good tools for the characterization of *S. marcescens*, owing to its high degree of typability and discrimination. Molecular methods (ribotyping, pulsed-field

electrophoresis [PFGE], PCR-techniques) could be used to complement the techniques used in this study to elucidate the origin and spread of nosocomial infections produced by this microorganism. Presently, we have performed PFGE and ribotyping of representative strains from outbreaks, and these methods have confirmed the results obtained with the reference methods (serotyping and phage-typing; manuscript in preparation).

## References

- Allen, S. D., Conger, K. B. (1969). *Serratia marcescens* infection of the urinary tract: a nosocomial infection. *J. Urolog.* **101**, 621–623.
- Anderhub, B., Pitt, T. L., Erdman, Y. J. (1977). A comparison of typing methods *Serratia marcescens*. *J. Hyg.* **79**, 89–102.
- Dashner, F. D. (1980). The epidemiology of *Serratia marcescens*. In Von Graevenitz, A., Rubin, S. J. (ed.), *The Genus Serratia*, pp. 188–196. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Editorial. (1977). The importance of *Serratia marcescens*. *Lancet* i: 636–637.

5. Editorial. (1991). Infecciones producidas por gram-negativos declaradas al Sistema de Información Microbiológica (SIM) durante los años 1986–1990. *Bol. Microbiol. Sem. (Spain)*. **43**, 1–4.
6. Gutmann, L., Chabbert, Y. (1984). Different mechanisms of resistance to latomoxef (moxalactam) in *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* **13**, 15–22.
7. Kelly, M. T., Brenner, D. J., Farmer III, J. J. (1985). Enterobacteriaceae. In Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J., Shadomy, H. E. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 4th. ed., pp. 263–277. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Pitt, T. L., Erdman, Y. J. (1978). Serological typing of *Serratia marcescens*. In Bergan, T. (ed.), *Methods in Microbiology*, vol. 15, pp. 173–212. Academic Press, London.
9. Pitt, T. L., Erdman, Y. J., Bucher, C. (1980). The epidemiological type identification of *Serratia marcescens* from outbreaks of infection in hospital. *J. Hyg.* **84**, 269–283.
10. Rubin, S. J. (1980). Biotyping, serotyping, zymotyping and antibiogram typing of *Serratia marcescens*. In Von Graevenitz, A., Rubin, S. J. (ed.), *The Genus Serratia*, pp.102–118. CRC Press, Boca Raton, Florida.
11. Shaberg, D. R., Weinstein, R. A., Stamm, W. E. (1976). Epidemics of nosocomial urinary tract infection caused by multiply resistant gram-negative bacilli: epidemiology and control. *J. Infect. Dis.* **133**, 363–366.
12. Stamm, W. E., Kolf, C. A., Dones, E. M., Havariz, R., Anderson, R. L. Farmer III, J. J., de Quiñones H. R. (1976). A nursery outbreak caused by *Serratia marcescens* scalp-vein needles as a portal of entry. *J. Pediatr.* **87**, 96–99.
13. Watanabe, M., Kotera, Y. K., Inoue M., Mitsuhashi, S. (1990). In vitro emergence of quinolone resistant mutants of *E. coli*, *E. cloacae* and *S. marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 173–175.
14. Young, V. M., Moody, M. R., Morris, M. J. (1980). Distribution of *S. marcescens* serotypes in cancer patients. *J. Med. Microbiol.* **13**, 333–339.
15. Yu, V. L. (1979). *Serratia marcescens*. Historical perspectives and clinical review. *New Eng. J. Med.* **300**, 887–893.

## In vitro activity of fluconazole on *Candida albicans*

Luis C. Abecia,\* José M. Arévalo, M. José López

*Department of Preventive Medicine and Public Health, Faculties of Medicine and Pharmacy, University of the Basque Country, Vitoria, Spain*

Received 31 May 1996/Accepted 30 October 1996

---

### Summary

Fluconazole is a triazole antifungal compound suitable for the treatment of fungal infections, including those caused by *Candida albicans*. Fluconazole, as all azole antifungals, is a potent inhibitor of ergosterol biosynthesis. The aims of this study are to evaluate the susceptibility of *C. albicans* strains isolated from clinical specimens against fluconazole, and to assess the decrease in ergosterol produced on these strains when they are incubated in vitro with this antifungal compound. Sixty six yeast strains were isolated and identified from vaginal specimens of 710 women of a tocogynecology surgery (9.3%), *C. albicans* being the most frequent species ( $n = 52$ , ca. 79%). An agar dilution technique was used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of fluconazole for the *C. albicans* strains. The MICs rank was between 1 and 20 µg/ml (mean = 6.6 µg/ml). Ergosterol content from ten *C. albicans* strains (MIC for fluconazole = 5 µg/ml) was assessed using the method proposed by Breivik and Owades, with three concentrations of fluconazole (2.5, 5 and 20 µg/ml) and four contact times (1, 6, 12 and 24 h), in comparison to no treated strains (control). The mean content of ergosterol was lower in the treated strains than in the control ones, and became statistically significant after 12 h of incubation.

**Key words:** *Candida albicans*, fluconazole, fungal susceptibility, mycoses, ergosterol

### Resumen

El fluconazol es un antifúngico triazólico utilizado para el tratamiento de las infecciones fúngicas, entre las que se incluyen las producidas por *Candida albicans*. El fluconazol, al igual que todos los

---

\* Correspondence to: Luis C. Abecia. Departamento de Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Marqués de Urquijo, s/n. 01006 Vitoria. España. Tel.: +34-45-140005 #389. Fax: +34-45-130756.

azoles, es un potente inhibidor de la biosíntesis de ergosterol. Los objetivos planteados en este estudio son: evaluar la susceptibilidad frente al fluconazol de cepas de *C. albicans* aisladas de muestras clínicas, y valorar la disminución de ergosterol producido sobre estas cepas cuando son incubadas in vitro con este antifúngico. De un total de 710 mujeres, pacientes de una consulta privada de tocoginecología, han sido aisladas e identificadas 66 cepas de levaduras en exudados vaginales (9.29%), siendo la especie más frecuente *C. albicans* ( $n = 52$ , aprox. 79%). Para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de fluconazol frente a las cepas de *C. albicans* se ha utilizado una técnica de dilución en agar. El intervalo de las CIMs se encuentra entre 1 y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (media = 6,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El contenido de ergosterol de diez cepas de *C. albicans* (CIM para fluconazol = 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), fue valorada siguiendo el método propuesto por Breivik y Owades, con tres concentraciones de fluconazol (2,5, 5 y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y cuatro tiempos de contacto (1, 6, 12 y 24 h), en comparación con cepas no tratadas (control). La media del contenido de ergosterol fue menor en las cepas tratadas que en las que servían de control, y resultó estadísticamente significativo a partir de las 12 horas de incubación.

## Introduction

Fluconazole is a triazole antifungal compound well tolerated orally and parenterally, suitable for the treatment of both superficial and systemic fungal infections (20). Many studies have been carried out in the last few years to assess the efficacy of fluconazole on different fungi and yeast; to correlate the susceptibility test with in vivo activity; and to compare the results of those tests with those obtained for other antifungal compounds (amphotericin, fluocytosine and other azole compounds) (10, 11). Azole antifungal agents are potent inhibitors of ergosterol biosynthesis in yeast which accumulate 14-methylated sterols. An interaction is produced between azole compounds and the microsomal cytochrome P-450 (39).

Although fluconazole seems to act basically in the same way other azole derivatives do, clinical and experimental trials have shown major differences in relation to its potency and specificity of action (20, 33). This study aims to evaluate the susceptibility of *Candida albicans* strains isolated from clinical specimens against

fluconazole and to assess the depletion of ergosterol produced on *C. albicans* strains after in vitro treatment with this antifungal compound.

## Materials and methods

**Organisms.** We collected vaginal specimens from 710 women aged between 11 and 65 with tocogynecology surgery in a private clinic. Sixty six yeast strains were isolated and identified by classical methods (19). All patients suffered from vaginitis and none of them had been previously treated with fluconazole.

**Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of fluconazole for *C. albicans* strains.** Several decreasing fluconazole dilutions were prepared in sterile distilled water. At the same time, a series of tubes containing 24 ml of Sabouraud Dextrose Agar were sterilized. When the tubes were at 45°C, 1 ml of fluconazole dilution was added. This mixture was poured into sterile Petri plates, obtaining the final concentrations of: 1, 1.25, 2, 2.5, 5, 8, 10, 16, 20, 32 and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Suspensions of 52 different *C. albicans* isolates were adjusted from  $10^4$  to  $10^5$  colony forming units (CFU) per ml by using a hemacytometer. Plates were divided into four equal areas, on which *C. albicans* suspensions were streaked. Those plates were incubated at 37°C and examined after 24 h. The lowest concentration of fluconazole which completely inhibits growth was the criterion used for MIC endpoint determination (34).

**Ergosterol analysis.** We used the spectrophotometric semimicrodetermination technique by Breivik and Owades (7), modified by Athar and Winner (3) and by Merz and Sandford (21).

From the 52 *C. albicans* strains isolated, those whose MIC was 5 µg/ml were selected, because their MIC were the closest to the average ( $m = 6.6$  µg/ml) and because they were the most frequent ( $n = 10$ ). Those 10 strains were grown in 200 ml of Sabouraud Dextrose Broth in 500 ml flasks, shaken at 37°C for 48 h. Four flasks were used for each strain. Amounts of fluconazole were added to obtain a final concentration of 2.5 µg/ml (lower than the MIC), 5 µg/ml (the same as the MIC) and 20 µg/ml (higher than the MIC), respectively, in each of three flasks. No fluconazole was added to the fourth flask (control). These flasks were incubated with shaking at 37°C for an exposure (contact) time of 1, 6, 12 and 24 h.

After these times of contact, the cells were collected from all flasks, centrifuged at 3,000 rpm for 10 min, and washed three times in sterile physiological saline solution. The packed wet cells were divided into two aliquots: one was used for dry weight determination (heated at 110°C for 1 h) and the other was saponified at 80°C for 30 min with 3 ml of 40% KOH-alcohol solution in tubes. These tubes were then allowed to come to room temperature, and 1 ml of distilled water was added to each one. Afterwards,

5 ml of n-hexane was added and the tubes were inverted 20 times. The hexane layer was, removed from every tube.

Absorption spectra were observed on a Perkin Elmer spectrophotometer from 200 to 350 nm wavelength. The determination of ergosterol was performed by reading in its maximal absorption wavelength (range of 260–290 nm). The concentration was calculated by its lineal regression equations, previously determined with control samples of ergosterol (Sigma, St. Louis, MO, USA). The mean amount of ergosterol and its standard deviation were calculated.

Statistical evaluation between experimental and control means was assessed by the Student test, with  $p < 0.05$  taken as significant.

## Results

Yeast, which might have been the casual agent of vaginitis, were found in 66 (ca. 9.3%) out of the 710 samples examined. The species most frequently found in those samples was

TABLE 1 Minimal inhibitory concentration (MIC) of fluconazole for 52 *Candida albicans* strains

MIC (µg/ml)*	Frequency		Accumulated freq.	
	No.	%	No.	%
1	2	3.8	2	3.8
1.25	4	7.7	6	11.5
2	2	3.8	8	15.4
2.5	8	15.4	16	30.8
4	6	11.5	22	42.3
5	10	19.2	32	61.5
8	6	11.5	38	73.0
10	8	15.4	46	88.4
16	3	5.8	49	94.2
20	3	5.8	52	100.0

\*Mean: 6.6 µg/ml. Standard deviation: 6.2.

*C. albicans* (52 in 66 samples; 78.78%), followed by *C. glabrata* (6/66; 9.09%), *C. krusei* (3/66; 4.55%), *C. guillermondii* and *C. tropicalis* (both 2/66; 3.03%), and *C. pseudotropicalis* (1/66; 1.52%).

Table 1 shows the MIC of fluconazole on the 52 *C. albicans* strains found. It can be seen that the highest frequency (19.2%) corresponds to 5 µg/ml concentration.

Ergosterol content in mg/100 mg dry weight from the 10 *C. albicans* strains (MIC for fluconazole = 5 µg/ml) treated with three concentrations of fluconazole (2.5, 5 and 20 µg/ml) and four exposure times (1, 6, 12 and 24 h) are compared in Table 2 with those of the same untreated strains (controls). Ergosterol mean content (*m*) and its corresponding standard deviation (SD) were also calculated. The ergosterol mean con-

tent in treated strains was lower than in the control, and it became statistically significant after 24 h of exposure with a fluconazole concentration lower than MIC (2.5 µg/ml). However, when fluconazole concentration was equal to the MIC, or higher (5 and 20 µg/ml), the effect appeared after 12 h of contact.

Fig. 1 shows the spectrophotometric scan from 200 to 350 nm wavelength obtained from one of the *C. albicans* extracts without treating with fluconazole (control) and another scan after 12 h of contact with 20 µg/ml of fluconazole. A decrease in absorbance can be appreciated in the latter.

## Discussion

Yeasts are the most frequent causing agents of vaginitis. Our data agree with those from other authors (17, 24, 26, 30). The main isolated species is *C. albicans*, which is confirmed by numerous articles (18, 20, 28, 37).

The other species isolated have a more irregular occurrence, *C. stellatoidea* being the least frequent. We have not found any strain of this species, nor have other authors (28).

As it has been described, a large dispersion was observed in MICs determination for fluconazole in *C. albicans*, which ranged from 1 to 20 µg/ml in our results. Meunier et al. (22) found a range from 0.3 to 80 µg/ml and Morace et al. (25), 0.04 and 12.5 µg/ml. Dolle (9) presents a mean of 0.8 µg/ml, and Marriot and Richardson (20) a mean of 0.39 µg/ml. These different results could be due to several factors, such as medium compounds (18), inoculum size (23), reading methods (25) and pH (15, 20).

In relation to the pH, Marriot and Richardson (20) point out that fluconazole is more active at pH 7–7.5 than at lower pH values. The effect of pH on in vitro activity is observed only in solid media with *C. albicans*. The sequestra-

TABLE 2. Ergosterol in mg/100 mg dry weight of ten *Candida albicans* strains treated with fluconazole

Fluconazole (µg/ml)	Time of exposure (h)	Ergosterol (mg/100 mg)		
		<i>m</i> <sup>†</sup>	SD <sup>†</sup>	<i>p</i> <sup>†</sup>
Control		0.249	0.044	
2.5	1	0.215	0.018	ns*
	6	0.214	0.012	ns
	12	0.212	0.013	ns
	24	0.182	0.008	<0.05
5	1	0.213	0.012	ns
	6	0.186	0.068	ns
	12	0.136	0.087	<0.05
	24	0.081	0.042	<0.01
20	1	0.229	0.016	ns
	6	0.231	0.012	ns
	12	0.187	0.014	<0.05
	24	0.149	0.010	<0.01

<sup>†</sup>*m*, mean; SD, standard deviation; *p*, probability.

\*ns, not significant.

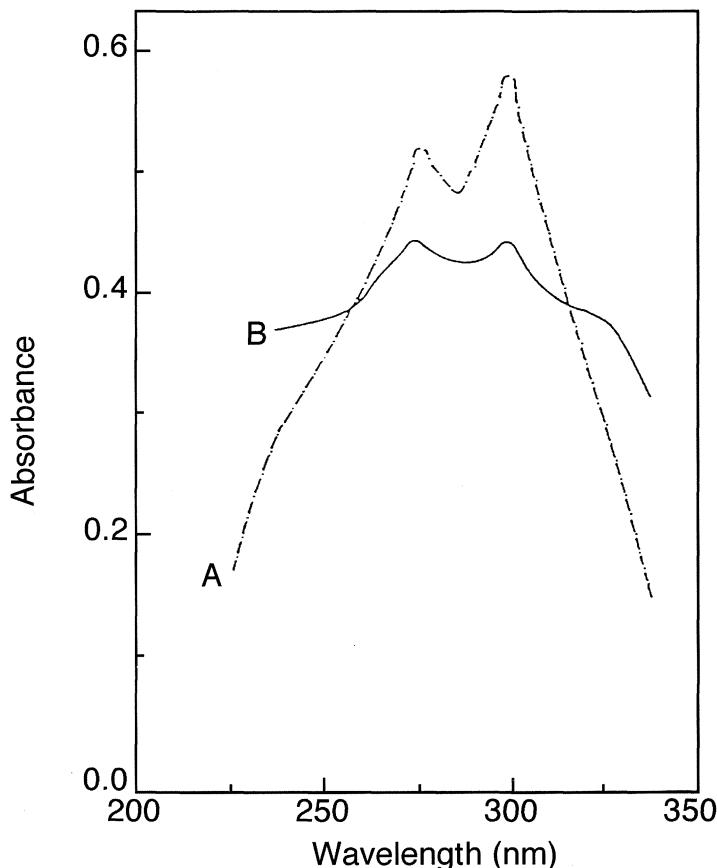


FIG. 1. Spectrophotometric scans of *Candida albicans* extracts. (A) Control (without fluconazole). (B) After 12 h contact with 20 µg/ml of fluconazole.

tion of the compounds within the agar matrix has been suggested (20). We have used a Sabouraud Dextrose Agar at a final pH of  $5.6 \pm 0.2$ ; therefore, the MIC we found might have been influenced by this pH.

The efficacy of several azole compounds has been compared. Different authors reached the conclusion that some azoles (such as ketoconazole and itraconazole) are more active in vitro than fluconazole is. For this reason, several research groups state that fluconazole is less active than ketoconazole (15), and that doses of fluconazole higher than those of other antifungals are necessary against *Candida* spp. (28). Even

more than with other azoles, in vitro test results with fluconazole are less relevant than those of *in vivo* studies (40).

Recently, many assays have been performed to test the susceptibility of yeast against azole compounds by using several methods: microtiter (2, 16), macrodilution versus microtiter (6, 8, 38), improvement of the multicenter methods (35) and trials (34, 36) according to the method proposed by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (Villanova, PA, USA). Azole resistant strains have been isolated (13, 43). New azoles have been tested (5) and the relations between their activity in vitro and in

vivo have been studied (1). We calculated the ergosterol amount by using the modified spectrophotometric method suggested by Breivik and Owades (7). Although this is a classical technique, we believe that it is still valid because of its simplicity and low cost. There are other more sophisticated techniques which require more expensive equipment, such as high resolution chromatography (31).

A significant decrease in ergosterol occurs in the yeast treated with fluconazole, in accordance with the theory of mechanism of action of that compound (41, 42). At least a 12-hour contact is needed to obtain statistically significant results.

Several authors have studied the effects of fluconazole on blastospores of *C. albicans* (29). Besides, other sterol (12) and lipids have been also isolated in *C. albicans* (14), and the inhibition of sterol synthesis in yeast produced by other substances has been tested (4).

About the efficacy of fluconazole on fungal vaginitis, Nyirjesy et al. (27) reported the cure of all cases of vaginitis caused by *C. albicans* that had been treated with that antifungal compound, whereas only 25% of non-*C. albicans* cases were cured by fluconazole treatment. This finding should be taken into account. In fact, although *C. albicans* is the most frequent causing agent for vaginitis, a significant number of cases (in our work, 21%) is originated by other *Candida* species. In consequence, we believe that, in the cases of infections by fungi, a proper identification of the causing agent is necessary, as well as the assessment of its susceptibility to a given antifungal compound.

### Acknowledgments

The authors thank the University of the Basque Country for the financial support granted to this project (UPV 171.123-EA 198/93).

### References

1. Anaissie, E. J., Karyotakis, N. C., Hachem, R., Diagnani, M. C., Rex, J. H., Paetznick, V. (1994). Correlation between in vitro and in vivo activity of antifungal agents against *Candida* species. *J. Infect. Dis.* **170**, 384–389.
2. Arévalo, M. P., Arias, A., Andreu, A., Rodríguez, C., Sierra, A. (1994). Fluconazole, itraconazole and ketoconazole in vitro activity against *Candida* spp. *J. Chemother.* **6**, 226–229.
3. Athar, M. A., Winner, H. I. (1971). The development of resistance by *Candida* species to polyene antibiotics in vitro. *J. Med. Microbiol.* **4**, 505–517.
4. Balliano, G., Millà, P., Ceruti, M., Carrano, L., Viola, F., Brusa, P., Cattel, L. (1994). Inhibition of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* by 22, 23-epoxy-2-aza-2, 3-dihydrosqualene and the corresponding N-oxide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1904–1908.
5. Barchiesi, F., Colombo, A. L., McGough, D. A., Fothergill, A. W., Rinaldi, M. G. (1994). In vitro activity of a new antifungal triazole, D0870, against *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2553–2556.
6. Barchiesi, F., Colombo, A. L., McGough, D. A., Rinaldi, M. G. (1994). Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2494–2500.
7. Breivik, O. N., Owades, J. L. (1956). Spectrophotometric semimicrodetermination of ergosterol in yeast. *Agr. Food. Chem.* **5**, 360–363.
8. Colombo, A. L., Barchiesi, F., McGough, D. A., Rinaldi, M. G. (1995). Comparison of E test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 535–540.
9. Dolle, R. E., Allaudeen, H. S., Kruse, L. I. (1990). Design and synthesis of 14 alpha-methyl-1-aza-D-homosterols as novel antimycotics. *J. Med. Chem.* **33**, 877–880.
10. Espinel-Ingroff, A. (1994). La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Rev. Esp. Quimioter.* **7**, 20–31.

11. Galgiani, J. N. (1987). Antifungal susceptibility tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1867–1870.
12. Ghannoum, M. A., Spellberg, B. J., Ibrahim, A. S., Ritchie, J. A., Currie, B., Spitzer, E. D., Edwards, J. E. Jr., Casadevall, A. (1994). Sterol composition of *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2029–2033.
13. Goff, D. A., Koletar, S. L., Buesching, W. J., Barnishan, J. (1995). Isolation of fluconazole-resistant *Candida albicans* from Human Immunodeficiency Virus-negative patients never treated with azoles. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 77.
14. Goyal, S., Khuller, G. K. (1994). Structural and functional role of lipids in yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Lipids* **29**, 793–797.
15. Guinet, R., Marlier, H. (1990). Comparative sensitivity of yeasts to ketoconazole, itraconazole and fluconazole using a liquid medium standardized micromethod. *Pathol. Biol.* **38**, 575–578.
16. Jahn, B., Matin, E., Stueben, A., Bhakdi, S. Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* species by a simple microtiter menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 661–667.
17. Job-Spira, N., Bouvet, E., Geroge-Guiton, A., Janaud, A., Caspard, H., Caspard, A. (1987). Les maladies sexuellement transmissibles en pratique libérale. *J. Gynecol. Obstet. B. Reprod.* **16**, 305–310.
18. Klietman, W., Focht, J., Nösner, K. (1990). *Candida* infection in hospitalized patients and sensitivity to four antifungal agents. 3rd Decennial International Conference on Nosocomial Infections. Atlanta.
19. Koneman, E. W., Roberts, G. D., Wright, J. E. (1978). Practical Laboratory Micology. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
20. Marriot, M. S., Richardson, K. (1987). The discovery and mode of action of fluconazole. In Fromling, R. A., (ed.), Recent Trends in Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents, pp. 81–92. Prous Science Publishers, Barcelona, Spain.
21. Merz, W. G., Sandford, G. R. (1979). Isolation and characterization of a polyene-resistant variant of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.* **9**, 677–680.
22. Meunier, F., Lambert, C., Van der Auwera, P. (1990). In vitro activity of SCH39304 in comparison with amphotericin B and fluconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**, 227–236.
23. Minagawa, H., Kitaura, K., Nakamizo, N. (1983). Effects of pH on the activity of ketoconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 105–107.
24. Monif, G. R. G. (1985). Classification and pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **152**, 935–939.
25. Morace, G., Manzara, S., Dettori, G. (1991). In vitro susceptibility of 119 yeast isolates to fluconazole, 5-fluorocytosine, amphotericin B and ketoconazole. *Chemotherapy* **37**, 23–31.
26. Narcio, M. L., Solórzano, F., Arrendondo, J. L., Calderón, E., Beltrán, M. (1989). Etiología de la infección cervicovaginal en pacientes gestantes y no gestantes. *Ginecol. Obstet.* **57**, 41–46.
27. Nyirjesy, P., Seeney, S. M., Grody, M. H. T., Jordan, C. A., Buckley, H. R. (1995). Chronic fungal vaginitis: The value of cultures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **173**, 820–823.
28. Ohnkawa, M., Tokunaga, S., Takashima, M. et al. (1990). In vitro susceptibility testing of *Candida isolates* from clinical specimens to four antifungal agents. *Chemotherapy* **36**, 396–402.
29. Pancaldi, S., Dall'Olio, G., Poli, F., Fasulo, M. P. (1994). Stimulation of the autophagic activity in blastospores of *Candida albicans* exposed in vitro to fluconazole. *Microbios* **80**, 55.
30. Parewuck, W., Claeys, G., Thiery, M., Van Kets, H. (1988). Candidiasis in women fitted with an intrauterine contraceptive device. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **95**, 408–410.
31. Peacock, G. A., Goosey, M. W. (1989). Separation of fungal sterols by normal-phase high to the evaluation of ergosterol biosynthesis inhibitor. *J. Chromatogr.* **469**, 293–304.
32. Pfaller, M. A., Bale, M., Buschelman, B., Lancaster, M., Espinel-Ingroff, A., Rex, J. H., Rinaldi, M. G. (1994). Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for in vitro susceptibility testing of yeast isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard methods. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1650–1653.
33. Pfaller, M., Riley, J. (1992). Effects of fluconazole on the sterol and carbohydrate composition of four species of *Candida*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 152–156.
34. Pfaller, M. A., Grant, C., Mothland, V., Rhine-Chalberg, J. (1994). Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 506.
35. Polanco, A. M., Rodríguez-Tudela, J. L., Baquero, F., Sánchez-Sousa, A. (1995). Improved method

- of determining the susceptibility of *Candida albicans* to fluconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**, 155.
36. Rex, J. H., Pfaller, M. A., Barry, A. L., Nelson, P. W., Webb, C. D. (1995). Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 40–44.
37. Sabaté, M., Torres, J. M., Gallach, C., Madrenys, N., Carrillo, A. (1991). Valor de la difusión en agar frente a la concentración mínima inhibitoria en el estudio de la sensibilidad a tres antifúngicos en *Candida* sp. y *Torulopsis glabrata*. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* **5**, 229–232.
38. Sewell, D. L., Pfaller, M. A., Barry, A. L. (1994). Comparison of broth macrodilution, broth micro-dilution, and E test antifungal susceptibility tests for fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2099–2102.
39. Shaw, J. T. B., Tarbit, M. H., Troke, P. F. (1987). Cytochrome P-450 mediated sterol synthesis and metabolism: differences in sensitivity to fluconazole and other azoles. In Fromling, R. A. (ed.), *Recent Trends in Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents*, pp. 125–139. Prous Science Publishers, Barcelona, Spain.
40. Troke, P. F. (1987). Efficacy of fluconazole in animal models of superficial and opportunistic systemic fungal infection. In Fromling, R. A. (ed.), *Recent Trends in Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents*, pp. 103–112. Prous Science Publishers, Barcelona, Spain.
41. Tuck, S. F., Patel, H., Safi, E., Robinson, C. H. (1991). Lanosterol 14 alpha-demethylase (P45014DM): effects of P45014DM inhibitors on sterol biosynthesis downstream of lanosterol. *J. Lipid. Res.* **32**, 893–902.
42. Vanden Bossche, H., Marichal, P., Gorrens, J., Coene, M. C., Willemens, G., Bellens, D., et al. (1989). Biochemical approaches to selective antifungal activity. Focus on azole antifungals. *Mycoses* **32**, 35–52.
43. White, A., Goetz, M. B. (1994). Azole-resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 687–692.

## Breve historia de la Sociedad Española de Microbiología, VI. De 1991 a 1995

Concepción García Mendoza

*Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España*

### **Summary**

In this sixth and final chapter of the brief history of the Spanish Society for Microbiology (SEM), the major activities carried out from 1991 to 1995 are described. During that period, the 14th and 15th SEM National Congresses took place in Saragossa (1993) and Madrid (1995), respectively. The 1995 Congress was also the occasion to celebrate the fiftieth anniversary of the SEM. During that period, three new Specialized Groups were created: Molecular Microbiology, Aquatic Microbiology, and Protozoology. All Specialized Groups held their own meetings. Courses on the introduction to research in microbiology, for undergraduate students, continued, as well as the Awards of the SEM for young researchers. During that period César Nombela was elected FEMS President, and Fernando Laborda was elected President of the Biodeterioration Society. The photographs of the Presidents and Secretaries of the SEM since its fundation until 1995 are included.

### **Resumen**

El sexto y último artículo de la serie sobre la historia de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) comprende el período de 1991 a 1995, durante el cual se celebraron los Congresos Nacionales decimocuarto (Zaragoza, 1993) y decimoquinto (Madrid, 1995); en este último se conmemoró el cincuentenario de la SEM. Durante este período se crearon los Grupos Especializados de Microbiología Molecular, Microbiología del Medio Acuático y Protozoología, y se organizaron diversas reuniones por parte de los diversos Grupos. Continuaron las actividades iniciadas en años anteriores,

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

como los Premios de la SEM, los Ciclos de conferencias de iniciación a la investigación en Microbiología, etc. En este período, César Nombela fue nombrado Presidente de la FEMS, y Fernando Laborda de la Biodeterioration Society. En este capítulo se incluyen las fotografías de los Presidentes y Secretarios de la SEM, desde su fundación hasta 1995.

Éste es el sexto y último capítulo de la pequeña historia de nuestra Sociedad —realizada con más amor que arte—, con la que hemos querido poner por escrito durante año y medio unos recuerdos y unos datos que estaban dispersos, y que consideramos útiles para que sus socios —especialmente los más jóvenes— conozcan mejor la SEM y se animen a continuar y engrandecer sus actividades. En este capítulo incluimos las fotografías de todos los Presidentes (Fig. 1, p. 623) y Secretarios (Fig. 2., p. 625) de la SEM, desde su fundación, en 1946, hasta 1995, siguiendo los datos ofrecidos en la Tabla 1 del artículo correspondiente publicado en el número de marzo pasado (*Microbiología SEM* 12, 99–106).

### Período 1991–1993

En la Asamblea celebrada en Salamanca durante el XIII Congreso Nacional, el Presidente de la SEM, Francisco Ruiz Berraquero, expuso las actividades más relevantes llevadas a cabo durante el período anterior. Citó tanto las de carácter científico como las administrativas, haciendo especial mención de los Ciclos de conferencias de iniciación a la investigación en Microbiología realizados en Segovia y Sitges. Estos cursos habían constituido un auténtico éxito, hasta tal punto, que otras sociedades científicas pensaban en llevar a cabo un proyecto semejante. La siguiente edición de estos Ciclos tendría lugar en La Rábida, siendo sus organizadores el mismo Presidente y Antonio Ventosa. Seguidamente se hizo referencia a la propuesta de varios microbiólogos, encabezados por Carlos Hardis-

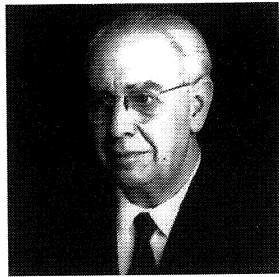
son, de creación de una Licenciatura en Microbiología, de forma semejante a la conseguida en Bioquímica. Dada la trascendencia del asunto y ante el apoyo de un considerable número de asistentes a la Asamblea, se decidió tratar dicho tema en una sesión específica, canalizando las opiniones obtenidas a través del *Boletín Informativo*, que paulatinamente iba ampliando su contenido.

La información acerca de los Grupos Especializados fue realizada por sus respectivos Presidentes, con la incorporación, como nuevos en este cargo, de José Martínez Peinado en Microbiología Industrial, y de Germán Larriba en Micología. Finalmente, recibió el nombramiento de Socio de Honor Moselio Schaechter, de la Tufts University (Boston, Massachusetts, EE. UU.) y se aceptó la oferta de Rafael Gómez-Lus de organizar el siguiente Congreso Nacional en Zaragoza, en 1993.

En los meses siguientes al Congreso de Salamanca, y tal como se había acordado en la Asamblea, la Junta Directiva llevó adelante el encargo de estudiar la implantación de una Licenciatura en Microbiología. Las propuestas recibidas ofrecían los siguientes enfoques: Como enseñanza de segundo ciclo, a la cual se accedería desde cualquier Diplomatura de primer ciclo. Como título propio, con dos años comunes seguidos de dos años de especialidad, o accediendo a dicha especialidad después de las Licenciaturas de Farmacia, Biología, etc. Tras una amplia discusión, se decidió que la SEM apoyara ante el Consejo de Universidades la propuesta —formulada por una o más Facultades, por tratarse de una demanda social— y que el mismo Consejo de Universidades reconociera las asignaturas propias



Juan Marcilla Arrazola  
(1946–1951)



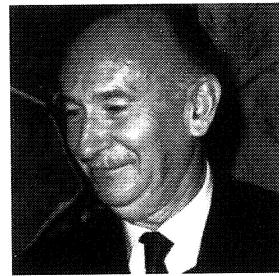
Antonio Ruiz Falcó  
(1951–1956)



Arnaldo Socías Amorós  
(1956–1957)



Gerardo Clavero del Campo  
(1957–1967)



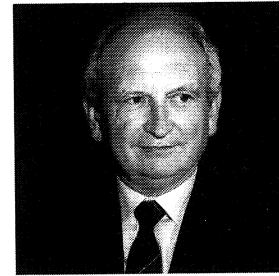
Gonzalo Urquiza Somavilla  
(1967–1971)



David Vázquez Martínez  
(1971–1974)



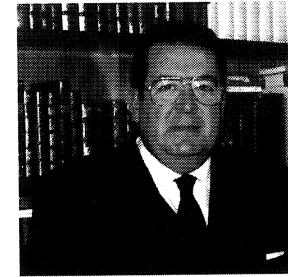
Fernando Baquero Mochales  
(1974–1978)



Rafael Gómez Lus  
(1978–1983)



César Nombela Cano  
(1983–1991)



Francisco Ruiz Berraquero  
(1991–...)

FIG. 1. Presidentes de la SEM desde su fundación en 1946 hasta 1995.

de Microbiología Industrial, Tecnología del DNA recombinante, etc., impartidas en la Licenciatura de Bioquímica, dentro del área de conocimiento correspondiente. Se encargó de esta última gestión el Vicepresidente, Rafael Rotger, quien también envió un escrito al Ministro de Educación y Ciencia, a petición de Ernesto García, relativo al recorte presupuestario en investigación, anunciado para el año siguiente. Rafael Rotger participó en la elaboración de la Monografía sobre la Microbiología como especialidad médica, junto con diferentes miembros del Grupo de Microbiología Clínica y de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEEIMC).

Por su parte, los Grupos Especializados proseguían sus actividades. El Grupo de Microbiología de Alimentos había acordado nombrar a Benito Moreno representante de la SEM en la Comisión Internacional de Alimentos e Higiene de la IUMS (International Union of Microbiological Societies). La novena reunión del grupo se realizaría en Lérida en 1994, durante el I Congreso de Microbiología de Alimentos a cargo de Vicente Sanchis. El Grupo de Microbiología Industrial había propuesto a Federico Uruburu como representante de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en la SEM y la Junta Directiva acordó concederle el título de invitado permanente. Se tenía en consideración de esta forma la participación de la SEM durante años en la CECT, junto con el CSIC y, más recientemente, con el Ministerio de Industria, para la concesión del título de Autoridad de Depósito Internacional de Patentes, además de su vinculación a la Universidad de Valencia, como Servicio General de la misma. Este mismo grupo estaba organizando en Madrid un curso sobre "Los protozoos ciliados como indicadores de lodos activados", bajo la dirección de José Martínez Peinado, a la vez que, en colaboración con el Grupo del Noroeste, se preparaba la re-

unión sobre "Biología molecular de actinomicos" a cargo de Paloma Liras.

El Grupo de Microbiología Clínica, en su nueva fase bajo la dirección de Fernando Baquero, iniciaba en Madrid la organización de reuniones temáticas y cursos formativos sobre "Mecanismos patogénicos de la peritonitis bacteriana" y "Aspectos taxonómicos e identificación de *Streptococcus*", celebrados en 1991, y "Aplicación de la técnica del PCR en microbiología diagnóstica", en 1992. Por su parte, el Grupo de Taxonomía Bacteriana organizó en 1992 su V Reunión en Santiago de Compostela, a cargo de Alicia Estévez Toranzo. A la vez, junto con las Sociedades Inglesa y Alemana de Microbiología, organizaba una reunión sobre "Identification of bacteria: present trends, future prospects", bajo la dirección de Alberto Ramos Cormenzana, en Granada, en 1993, para la cual había solicitado el patrocinio de la FEMS, a través de nuestra Sociedad. Tratado este tema en el correspondiente Consejo de FEMS celebrado en Estambul en 1991, se consiguió el informe favorable tanto para esta reunión como para la anteriormente presentada por Miguel Ángel de Pedro, a celebrar en Palma de Mallorca en 1992.

El Grupo de Biodeterioro planificaba su próxima reunión en Sevilla para 1994, a cargo de Cesáreo Sainz y se incorporaba a la Federación de Sociedades de Biodeterioro a propuesta de la Asociación Internacional. Ricardo Guerrero había propuesto al ICOME (International Committee on Microbial Ecology) organizar en Barcelona en 1992 el 6th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-6). La propuesta española, que compitió con la de Brasil y Finlandia, fue la elegida. Este congreso, que tuvo una participación de 1300 personas, contaría con la ayuda de instituciones internacionales (UNEP, UNESCO, IUMS) para la asistencia de investigadores de países en desarrollo. La SEM proporcionó ayudas para la participación de

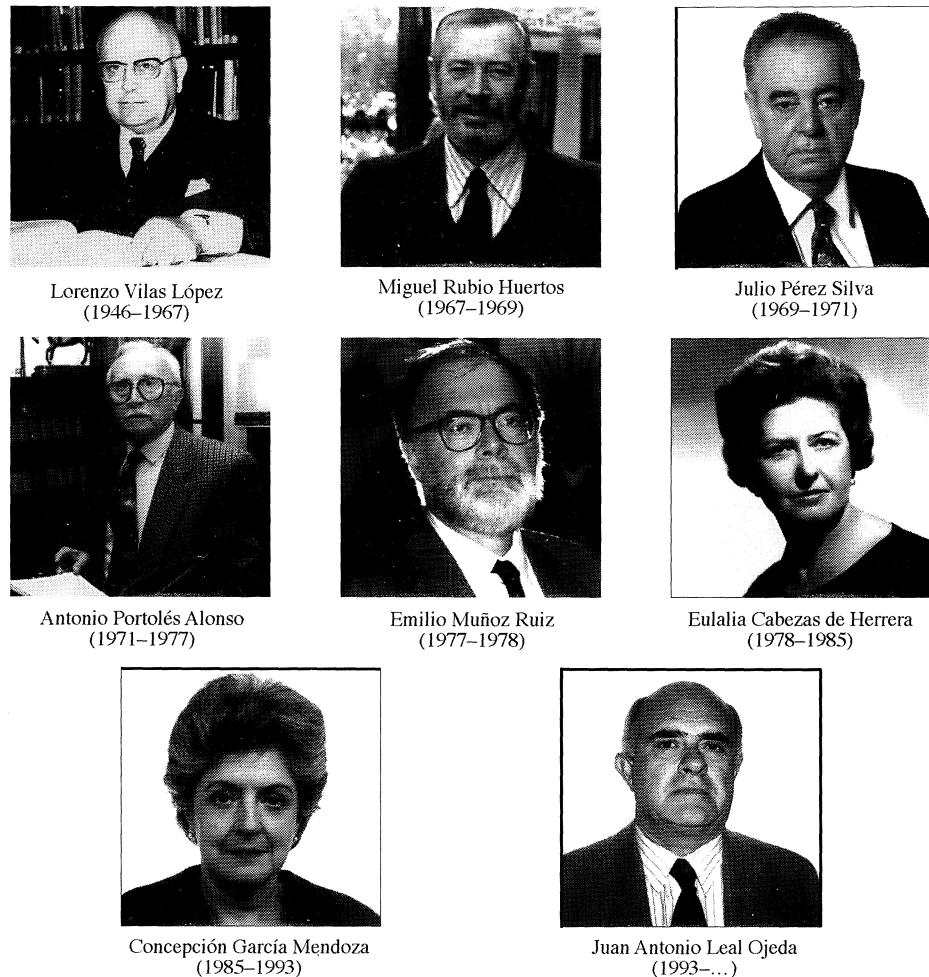


FIG. 2. Secretarios de la SEM desde su fundación en 1946 hasta 1995.

socios actuaran como ponentes y para jóvenes investigadores. También colaboró FEMS y la Societat Catalana de Biología. Finalmente, la SEM financiaría, a través de su Grupo de Microbiología Clínica, la asistencia de algunos socios que participasen activamente en el "Simposio sobre plásmidos promiscuos en bacterias Gram positivas y negativas", organizado por Manuel Espinosa en Las Navas del Marqués (Madrid) en 1992.

El III Ciclo de conferencias de iniciación a la investigación en Microbiología en La Rábida

(Huelva), realizado con financiación de la Fundación Ramón Areces, Junta de Andalucía y Rectorado de la Universidad de Sevilla, había alcanzado tanto éxito como en las ediciones anteriores. Se aceptó la oferta de Julio R. Villa-nueva de organizar el IV Ciclo en Salamanca.

Habiéndose conseguido la actualización de los datos de la mayoría de los socios, se estimó conveniente la edición de un directorio de la SEM. Incluiría tanto la listas de socios numera-rios, con sus direcciones y palabras clave, como una recopilación de las actividades más relevan-

tes llevadas a cabo por la SEM, además de una breve introducción histórica, y sería publicado en un volumen extraordinario. A su vez, la revista continuaba su aparición semestral y por primera vez se editaría un suplemento con las contribuciones más relevantes de la reciente Reunión del Grupo de Microbiología de Alimentos, celebrada en Cáceres. Por su parte, el *Boletín Informativo* había incluido una nueva sección dedicada a la crítica de libros.

Continuando sus gestiones administrativas, la SEM había tenido que darse de alta en el Impuesto de Actividades Económicas, debido a su doble actividad como organizadora de Congresos y editora de sus publicaciones periódicas. Ello le permitiría optar a subvenciones oficiales. Ricardo Guerrero presentó la propuesta de nombramiento de Thomas D. Brock (Madison, Wisconsin, EE.UU) de Socio de Honor de la SEM. Después de la consiguiente consulta a los socios, el nombramiento se realizaría durante el siguiente Congreso Nacional de Zaragoza.

La CECT en su última reunión de ECCO, celebrada en Valencia, recogió las normas aceptadas por la CE relativas al control de la patogenicidad de los cultivos, para que fuesen publicadas en el *Boletín Informativo* y conseguir su total difusión. Acababa de otorgarse a la colección el título de Autoridad de Depósito Internacional de Patentes, y se editaron unos trípticos acerca de sus actividades. Federico Uruburu fue nombrado Director del Consejo Asesor de la misma, en la reunión del Consejo para la elaboración del correspondiente reglamento.

En la renovación de las Juntas Directivas de los Grupos de Microbiología de Alimentos y Taxonomía Bacteriana, resultaron elegidos nuevos Presidentes Juan Antonio Ordóñez y Guillermo Suárez, respectivamente. Finalizaba también el período de vigencia para el cargo de Editor–Coordinador de la revista, desempeñado hasta el momento por Juan Antonio Ordóñez. La Junta Direc-

tiva propuso a Ricardo Guerrero como siguiente Editor–Coordinador, el cual tomaría posesión de su cargo durante el Congreso Nacional de Zaragoza. También cumpliéndose el plazo para la renovación parcial de la Junta Directiva de la SEM, se solicitaron las correspondientes candidaturas que, después de las votaciones pertinentes, arrojaron los siguientes resultados: Presidente Electo, Francisco Ruiz Berraquero; Tesorera, Sara Isabel Pérez Prieto; y Vocales, Alicia Estévez Toranzo, Benito Moreno García y Julio Casal Lombos.

Próxima la celebración del XIV Congreso Nacional, a cargo de Rafael Gómez-Lus en Zaragoza, se efectuó, por el correspondiente jurado, la selección del V Premio bianual de la SEM, que recayó en Alicia Estévez Toranzo. Igualmente fueron adjudicadas dos becas FEMS para investigadores jóvenes y se recibió la invitación de IUMS para que España presentase su candidatura como posible organizador del Congreso Internacional de Microbiología en 1999. Después de discutir ampliamente este tema, se acordó declinar la oferta, dada la magnitud de estos congresos internacionales, así como por los recortes presupuestarios de los últimos tiempos.

El grupo del Noroeste, inactivo durante cierto tiempo, propuso la formación de una Junta Gestora, encabezada por Carlos Hardisson. Después de diferentes contactos con la anterior Junta Directiva y miembros del grupo, se propuso su disolución, dado que la mayoría de sus socios ya pertenecían a varios Grupos Especializados. El Grupo de Micología estaba organizando, junto con la Asociación Española de Especialistas en Micología (AEEM), su II Congreso Nacional para 1994, en Santiago de Compostela, a cargo de Manuel Pereiro Miguens. El Grupo de Bioterioro participaría en el congreso de Leeds (Gran Bretaña) en 1993, coincidiendo con el Congreso Nacional de Zaragoza. El Grupo de Taxonomía Bacteriana proyectaba una Reunión en Valencia para 1994, a cargo de Federico Uruburu. Ante la

falta de estructuración en Grupos de ciertas especialidades, el Presidente promovió la creación de los de Microbiología Molecular, Microbiología del Medio Acuático y Protozoología, a cargo de José Casadesús, Juan Iribarri y Antonio Torres, respectivamente.

El IV Ciclo de conferencias de iniciación a la investigación en Microbiología, bajo la dirección de Julio R. Villanueva y Fernando Leal, financiado por la Fundación Ramón Areces y la Universidad de Salamanca, fue un éxito. Se propuso la celebración del siguiente en Palma de Mallorca, a cargo de Jorge Lalucat, aunque desde el principio se apreciaron las dificultades que entrañaba tal emplazamiento.

El nuevo Editor–Coordinador de la revista, Ricardo Guerrero, proyectaba un relanzamiento de la misma aumentando su periodicidad, a fin de conseguir su inclusión en los *Current Contents*. A la vez, presidía el Comité organizador del congreso “El Origen de la Vida”, a celebrar en Barcelona en 1993 en el que la SEM actuaría como patrocinadora. El *Boletín Informativo*, por su parte, comenzaba a incluir los currícula de los cargos salientes y entrantes de la Junta Directiva de la SEM.

La CECT continuando con su actividad internacional se integraba en un proyecto de investigación de la CE. Seguía participando en las reuniones del Microbial Information Network Europe (MINE) e intervenía en el control de alimentos contaminados (PHLS Food Microbiology External Quality Assessment Scheme).

#### XIV Congreso Nacional de Microbiología

Se celebró en la Facultad de Medicina de Zaragoza durante los días 8 a 11 de septiembre de 1993, organizado por Rafael Gómez-Lus. La conferencia inaugural fue pronunciada por Julian Davies (Vancouver, Canadá) y la de clausura por Jose

Ángel García Rodríguez. Una conferencia plenaria corrió a cargo de J. J. Farmer III (Atlanta, EE.UU). La conferencia correspondiente al Premio de la SEM, otorgado a Alicia Estévez Toranzo, estuvo dedicada nuevamente a Jaime Ferrán, en desagravio a su no siempre reconocido mérito científico. A lo largo del congreso se celebraron veintitrés simposios y siete mesas redondas. Las comunicaciones libres se expusieron en forma oral y en paneles, alcanzando la cifra de 458, repartidas en catorce secciones. Participaron cerca de mil microbiólogos españoles y un importante número de científicos extranjeros.

#### Período 1993–1995

La Junta General correspondiente tuvo lugar en Zaragoza durante el Congreso Nacional (Fig. 3) y en ella se expusieron las actividades más sobresalientes realizadas de 1991 a 1993. El diploma de Socio de Honor de la SEM se entregaría a J. J. Farmer III. Se hizo especial referencia a la formación de los nuevos Grupos Especializados de Microbiología Molecular, Microbiología del Medio Acuático y Protozoología, así como del posible cambio de denominación del Grupo de Microbiología Clínica, añadiéndole Infección e Inmunidad. Con respecto a la sede del siguiente Congreso Nacional, aunque se barajaron varias posibilidades, el Presidente pidió un margen de confianza al respecto ya que, al coincidir con el cincuenta aniversario de la SEM, se intentaría darle un carácter extraordinario.

De vuelta a sus actividades habituales, la Junta Directiva recibió la comunicación del CSIC de tener que ceder el espacio ocupado por la secretaría administrativa, en Hortaleza, 104; pero poco tiempo después le adjudicó otro local en Serrano, 117, sede actual de nuestra Secretaría. Los Grupos Especializados también proseguían sus actividades cotidianas. El Grupo de Biodete-

rioro proponía la ampliación de su nombre añadiéndole “Biodegradación”. Su Presidente, Fernando Laborda, había sido elegido Presidente de la Biodeterioration Society. Una actividad a realizar por el Grupo en 1994 era el Simposium Internacional, en colaboración con la citada Biodeterioration Society, sobre “Biosorption and Bioremediation”. Tendría lugar en Madrid, bajo el patrocinio de la Fundación Ramón Areces.

El Grupo de Microbiología Clínica estaba organizando el curso “Molecular pathogenesis in bacterial diseases” bajo la dirección de Fernando Baquero y Antonio Vázquez Boland, con la cooperación de la Fundación Complutense. El Grupo había participado en nombre de la SEM en la reunión de creación de la Federación de Asociaciones Científicas Médicas Españolas. También había manifestado a la Administración Central el malestar creado entre ciertos facultativos de la microbiología hospitalaria por el desempeño de sus funciones propias por parte de otros profesionales del área de la salud. El Grupo de Microbiología de Alimentos, por su parte, planificaba su siguiente congreso en Valencia a cargo de Daniel Ramón. Los grupos de nueva formación estaban en situación más o menos avanzada, pues mientras el de Microbiología Molecular y el de Microbiología del Medio Acuático ya habían constituido sus respectivas Juntas Gestoras, el de Protozoología todavía no había llegado a este extremo.

La revista, en su nueva etapa bajo la dirección de Ricardo Guerrero, dedicaría un número extraordinario a las contribuciones más relevantes del Congreso Nacional de Zaragoza. Con vistas a su futura posible inclusión en los *Current Contents*, podría ser necesario un cambio de denominación, así como la creación de un Comité Editor local y, más adelante, de un Comité Asesor internacional. En el número de marzo se ha publicado un detallado artículo sobre la historia de nuestra revista (*Microbiología SEM*, 12: 117–125).

Se decidió que el siguiente Congreso Nacional, conmemorativo de los cincuenta años de la SEM, tuviese lugar en Madrid bajo la dirección de César Nombela y José Martínez Peinado. El VI Premio de la SEM, a entregar dentro de este mismo Congreso, recayó sobre Sergio Moreno, después de una cada día más difícil selección, dada la gran altura científica de todos los candidatos propuestos.

El Ciclo de conferencias de iniciación a la investigación en Microbiología, después de haber sido organizado durante cuatro años consecutivos, pasó a tener un carácter bianual, por las dificultades que entrañaban tanto la financiación como la propuesta de organizadores. El V Ciclo tendría lugar en Granada en 1995, y se encargaría de su dirección Alberto Ramos Cormenzana.

La CECT había participado una vez más en las reuniones de ECCO, esta vez en su XII edición en Estambul en 1994, y la XIII Reunión sería en Lovaina en 1995, donde también tendría lugar la Reunión del MINÉ. Como consecuencia del Tratado de Budapest relativo al depósito de microorganismos con fines de patentes, se habían incorporado a la CECT 18 cepas microbianas especiales. A este respecto se decidió que el representante de la CECT en el comité de expertos sobre microorganismos manipulados genéticamente, fuese el mismo representante de la SEM en la CECT, Javier Hernández Haba, por delegación del Presidente del Grupo de Taxonomía Bacteriana.

La solicitud de la FEMS de candidaturas para la elección de nuevo Presidente llevó a la Junta Directiva de la SEM a apoyar con estos fines a César Nombela, en ese momento Vicepresidente de dicha Federación y determinó como requisito necesario el haber desempeñado este último cargo. La elección tendría lugar durante el FEMS Council Meeting, en Praga en 1994, durante el VII Congreso Internacional de las Secciones de Bacteriología y Microbiología Aplicada, y de



FIG. 3. Junta Directiva de la SEM durante el XIV Congreso Nacional de Microbiología (Zaragoza, 1993). De izquierda a derecha: Benito Moreno, Carlos Hardisson, Sara Isabel Pérez Prieto, Juan Antonio Leal, Federico Uruburu, Guillermo Suárez, Alicia Estévez, Rafael Gómez-Lus, Francisco Ruiz Berraquero, Rafael Rotger, César Nombela, Fernando Baquero, Ricardo Guerrero, Juan Antonio Ordóñez y Germán Larriba.

Micología. Además se trataría sobre la elaboración de las normas de seguridad en el manejo de microorganismos creados por ingeniería genética. En ese Congreso tendrían lugar las Reuniones Ejecutivas de la IUMS a las que asistirían, además de Juan Antonio Leal, delegado de la SEM en la FEMS, Guillermo Suárez y José Martínez Peinado como delegados de la SEM en la IUMS.

Correspondiendo la renovación parcial de la Junta Directiva de la SEM se solicitaron las candidaturas pertinentes. Tras la votación preceptiva resultaron elegidos: Vicepresidente, Rafael Rotger Anglada; Secretario Electo, Juan Antonio Leal; y Vocales, Javier Hernández Haba y Alberto Ramos Cormenzana.

Próxima la celebración del XV Congreso Nacional conmemorativo del cincuentenario de la SEM, todos los Grupos preparaban su partici-

pación. Por primera vez intervendrían los nuevos Grupos de Microbiología Molecular, Microbiología del Medio Acuático y Protozoología, ya completamente constituidos. El de Micología estaba organizando su III Congreso Nacional, a cargo de Rafael Sentandreu, en Peñíscola (Castellón) para 1996, y el de Biodeterioro lo celebraría en Santiago de Compostela bajo la dirección de Benita Silva. El Grupo de Taxonomía tendría su Reunión en Sevilla, con Francisco Ruiz Berraquero como organizador. Fernando Baquero, Presidente del Grupo de Microbiología Clínica, había representado a la SEM en el Consejo de Especialidades Médicas. En conexión con la Especialidad de Microbiología de Farmacia, y la de Microbiología Industrial, participaría, con el Forum de Microbiólogos Industriales, en la formación de científicos.

La revista había aumentado su producción a cuatro números al año desde 1994 y a la editorial (Garsi), se le entregaba el número completo en disco para su impresión, dismonuyendo así errores de transcripción. Se preparó para exponer en el Congreso Nacional un póster sobre la historia de la revista, y se planificó la edición para entregar el número del tercer trimestre durante el mismo Congreso.

El Director de la CECT, Federico Uruburu, había pasado información sobre la orden que regulaba el empleo de microorganismos en alimentación animal y la ley sobre la utilización, liberación y comercialización de microorganismos modificados genéticamente. Informó también de la creación de la Comisión Nacional de Bioseguridad y propuso que el representante de la SEM en dicha Comisión fuese el Presidente del Grupo de Microbiología Molecular, José Casadesús.

En relación con el tema pendiente, que ya se había discutido con anterioridad, de creación de una Licenciatura en Microbiología, se decidió que se tratase en una sesión especial durante el próximo Congreso Nacional de Microbiología. Por otro lado, el V Ciclo de conferencias de iniciación a la investigación en Microbiología organizado en Granada, tendría lugar a primeros de septiembre de 1995 y, seguidamente, allí mismo, se celebraría el simposio “Olive Oil Processes and Byproducts Recycling”, ambos bajo la dirección de Alberto Ramos Cormenzana. Finalmente, en el FEMS Council Meeting celebrado en Bulgaria días antes del Congreso Nacional de la SEM, César Nombela tomó posesión como Presidente de FEMS.

## XV Congreso Nacional de Microbiología

El XV Congreso Nacional de Microbiología fue organizado por César Nombela y José Mar-

tínez Peinado en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid durante los días 25 al 28 de septiembre de 1995. La sesión inaugural estuvo a cargo de Fernando Baquero, Rafael Nájera y José Prieto, que representaron, respectivamente, a la SEM, y las Sociedades surgidas a lo largo de su trayectoria, la Sociedad Española de Virología y a la Sociedad Española de Quimioterapia. Durante el Congreso se proyectó el vídeo “Cincuenta años de Microbiología en España” y se inauguró la exposición conmemorativa del cincuenta aniversario. La conferencia correspondiente al Premio de la SEM fue pronunciada por Sergio Moreno, y la de clausura por Helena Mäkelä (Helsinki, Finlandia). El congreso incluyó diez simposios, quince mesas redondas y un curso. Las comunicaciones libres, todas expuestas en forma de panel, fueron agrupadas en diecisésis secciones. Participaron en el Congreso más de mil microbiólogos españoles y una nutrida representación de microbiólogos extranjeros.

## Presente y futuro de la SEM

Aquí finaliza la historia de los cincuenta primeros años de la SEM. Durante este tiempo han tenido lugar muchos cambios, tanto en nuestro país como en la microbiología, cambios que seguirán sucediéndose. A los más de dos mil miembros de la Sociedad, donde caben los compañeros y los herederos de aquellos cuarenta y ocho microbiólogos que en 1945 pusieron en marcha una idea, nos toca proseguir la tarea que ellos iniciaron, manteniendo el espíritu inicial y mejorando la actividad científica que la anima. Así, podremos obtener cada vez mayores y mejores frutos del esfuerzo de todos los que han hecho posible que nuestra Sociedad haya cumplido su medio siglo y haya alcanzado un notable nivel internacional.

## David Vázquez (1930–1986). Recuerdos de una época\*

Julio R. Villanueva

Departamento de Microbiología e Instituto de Microbiología Bioquímica,  
CSIC–Universidad de Salamanca, Salamanca, España

Este año se cumple una década del fallecimiento de un gran investigador español, David Vázquez Martínez (24.03.1930–15.02.1986). Destacado científico, figura internacional en el tema de los mecanismos de acción de los antibióticos, experto en el campo de la síntesis de proteínas, maestro de varias generaciones de investigadores españoles, y entrañable amigo.

### David, estudiante en León

David Vázquez nació en Tucumán (República Argentina). Vino a España a los dos años, cuando sus padres, David y Rosario, naturales de Feleches (concejo de Siero) regresan a Asturias, junto con Florencio, hermano mayor de David.

Al finalizar la Guerra Civil muchos chicos asturianos próximos a los diez años de edad no

podíamos iniciar los estudios de Bachillerato en Oviedo, debido a la falta de colegios y centros, como consecuencia de la guerra. Ante esta situación, nos vimos forzados a salir de Asturias en busca de un centro donde realizar los estudios de enseñanza secundaria. Éste fue también el caso de David Vázquez, que tenía nueve años, y el de su hermano Florencio, por lo que su madre, que había enviado en 1933, se trasladó a León, para facilitar así los estudios de sus hijos. En mi caso, ingresé en octubre de 1938 como alumno interno en el Colegio de los Padres Agustinos de León, donde conocí a David. Florencio estudiaba en un curso anterior al mío y David, por el contrario, cursaba en el siguiente. Estas diferencias en los respectivos cursos escolares no impidió un trato asiduo entre nosotros aunque, a decir verdad, la auténtica amistad con David se forjó entre 1946 y 1955 en la Facultad de Farmacia de

\* David Vázquez fue Presidente de la Sociedad Española de Microbiología en el período de 1971 a 1974 (véase la Tabla 1, p. 109, de *Microbiología SEM 12*, 107–116). Véase también, en este mismo número de la revista, la p. 623.

Correspondencia: Julio R. Villanueva. Departamento de Microbiología. Instituto de Microbiología Bioquímica. CSIC–Universidad de Salamanca. Plaza de la Merced, s/n. 37008 Salamanca. España. Tel.: +34-23-294461. Fax: +34-23-267970.

la Universidad de Madrid. Posteriormente, esta amistad se fue acrecentando en la sede del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en la calle Serrano, y en el ámbito del Instituto de Edafología, un poco en la esfera que por entonces gobernaba el Prof. José María Albareda, Secretario General del CSIC y verdadero artífice del mismo. El Prof. Albareda tenía la habilidad de reunir a no pocos alumnos de Farmacia, ciertamente sobresalientes, en el denominado Club Edaphos, por entonces muy activo organizando conferencias, reuniones y seminarios. Durante algún tiempo, el club constituyó un auténtico semillero de vocaciones científicas, que pasando el tiempo iban a ejercer una notable influencia en la ciencia española. (Véase el artículo sobre José Luis Cánovas en *Microbiología SEM* 12, 465–468.)

David Vázquez concluía brillantemente sus estudios de Farmacia en la Universidad de Madrid y, casi al mismo tiempo, los de Ciencias Químicas en la Universidad de Oviedo. Por entonces, un personaje entrañable y realmente especial, Avelino Pérez Geijo, leonés, profesor auxiliar en la Facultad de Farmacia y gran amigo de David y mío, desempeñó un papel más que importante organizando frecuentes reuniones y dando lugar a que entre nosotros naciera una verdadera amistad que, además, resultaría sumamente útil en la orientación futura de David Vázquez.

Fue entonces cuando le pusimos en contacto con el grupo de fermentaciones y microbiología industrial que dirigía José Márquez, con la colaboración de Íñigo Leal, en los laboratorios y planta de fermentación instalados en la calle Castelló de Madrid. En esos laboratorios David Vázquez se inició en las fermentaciones, concretamente en la fabricación de la sidra. Allí David trabajó durante varios meses con enorme dedicación en su tesis doctoral, que presentaría en la Universidad de Madrid.

### Salida al extranjero

David había obtenido una beca para realizar un curso de microbiología en el Instituto Nacional Agronómico del CNRS en París, con el Dr. R. Cheerlier. Trabajó sobre bacteriófagos que afectaban a la fermentación de la leche durante la fabricación del queso. Pensaba todavía en su regreso a un centro de investigación aplicada en Asturias. En la etapa siguiente se planteó una nueva estancia en el extranjero, y la opción que eligió fue ir a trabajar durante varios meses en el Institute of Dairing Research, de Reading. El trabajo allí, aunque productivo, no le llenaba por completo. En esa circunstancia yo le sugerí ir al Sub-Department of Chemical Microbiology de la School of Biochemistry de la Universidad de Cambridge. Yo había concluido mi Ph. D. en aquella institución y me ofrecí para realizar gestiones con el Prof. Ernest F. Gale, que dirigía el potente grupo de investigación bioquímica microbiana. El Prof. Gale había sido mi director de tesis doctoral y, he de confesar que en un principio se mostró reacio a su admisión. Sin embargo, aceptó a David durante un año, que luego, dado el resultado de sus trabajos y la elevada producción científica, se prolongó por más de seis.

David llegó a ser uno de los científicos más destacados del Departamento y, desde luego, uno de los investigadores más entregados y de mayor productividad. Fue elegido Fellow del nuevo Fitzwilliam College y alcanzó un prestigio y reconocimiento enormes, que más tarde habría de traducirse en igual o mayor reconocimiento en los distintos trabajos emprendidos a lo largo de su total dedicación al CSIC.

### El regreso a España

El regreso de David era un problema a resolver. Varios viajes míos, realizados por aquella

época a la Universidad de Cambridge sirvieron para que, poco a poco fuera convenciendo a David de la conveniencia de su regreso a Madrid y la continuación y consolidación de su trabajo en España en un grupo de investigación. Finalmente, tomada la decisión, regresó en 1966, justo unos meses antes de que me trasladara a la Universidad de Salamanca al obtener la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias. Las relaciones a partir de entonces se hicieron intensas, sobre todo a través de nuestra amistad con Avelino Pérez Geijo. Nos reuníamos con cierta frecuencia y así teníamos ocasión de hablar de nuestros proyectos, de cuestiones científicas y de la formación de investigadores y del personal joven que empezaba.

### La labor en el Instituto de Biología Celular

Una vez en lo que es hoy el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), en Madrid, en el edificio situado en la confluencia de las calles Velázquez y Joaquín Costa, David se incorporó al Instituto de Biología Celular, que se había formado anteriormente por la unión de tres grupos, el de Manuel Losada, el de Gonzalo Giménez Martín y el nuestro, que posiblemente, era el más numeroso de los que trabajaban en el Consejo.

Tras mi traslado y el de Isabel García Acha a Salamanca, David asumió las funciones de dirección del grupo y, sin tardar mucho, inició la labor de constituir el suyo propio dedicado al modo de acción de los antibióticos, especialmente en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Varios de nuestros antiguos colaboradores, como Juan Pedro García Ballesta y Antonio Jiménez, se incorporaron a su grupo e igualmente lo hicieron Rafael Fernández Muñoz y María Luisa Celma, que concluyeron sus tesis doctorales bajo la dirección de David. Luego se incorpo-



FIG 1. David Vázquez en su laboratorio.

rían otros investigadores, entre ellos Mariano Barbacid y Joan Modolell, convenciendo a Rubén Monro, que realizó el doctorado en Cambridge al mismo tiempo que yo, para que viniese a trabajar durante algún tiempo a Madrid.

En relación con la actividad del centro en esos años, podemos recordar unos párrafos escritos recientemente por Mariano Barbacid en la memoria del CIB, que sirven para iluminar un poco lo que representó el grupo de David Vázquez en los años setenta. "Por aquel entonces no sabía mucho sobre síntesis de proteínas pero me impresionó el récord de publicaciones de aquel grupo. Tal y como he indicado al comienzo de estos Recuerdos, considero mi estancia en el laboratorio de David como la etapa más importante y definitiva de mi carrera, ya que la orientó en la dirección idónea. David me enseñó cómo plantear un problema científico y cómo resolverlo. En su laboratorio aprendí a diseñar experimentos de tal forma que se pudiera obtener el máxi-

mo de información con el mínimo de ambigüedades. En fin, con David aprendí a investigar.”

### El recuerdo de los discípulos

Interesa así mismo subrayar otro párrafo del mismo Barbacid, que dice así: “Independientemente de la huella que imprimió David en mí, como investigador y como persona, no sería justo olvidar la influencia que ejercieron otros muchos investigadores y compañeros de tesis. David había sabido atraer a científicos jóvenes ya formados en el extranjero como Joan Modell, Juan P. García Ballesta y, más tarde, Antonio Jiménez, que jugaron un papel muy importante en mi formación científica. Siempre recordaré de Joan, además de sus consejos científicos, el amor y el respeto con que trataba los instrumentos, conceptos que trato de inculcar —no siempre con éxito— entre mis ‘postdocs’. No menos importante para mi formación fue la presencia en el laboratorio de becarios que estaban a punto de terminar su tesis doctoral, como Enrique Battaner, María Luisa Celma, y sobre todo, Rafael Fernández Muñoz, de quien aprendí muchas de las técnicas y conceptos que me sirvieron para hacer mi tesis.”

Desde Salamanca, orienté a Enrique Battaner para que trabajara con David, a cuyo grupo se incorporó avanzados los años setenta. Posteriormente, pasados ya algunos años, íbamos a ser colegas en la Universidad de Salamanca, donde actualmente desempeña funciones de Catedrático de Bioquímica en la Facultad de Medicina.

Desde otro punto de vista, me parece oportuno subrayar que para escribir algo en estos momentos sobre David Vázquez resulta obligado consultar el excelente libro de Miguel Somovilla, titulada *Retrato de David Vázquez 1930–1986. De la sidra a los antibióticos*, con un prólogo del Prof. Severo Ochoa y un epílogo de

Federico Mayor Zaragoza, y en la que han colaborado un gran número de profesores e investigadores españoles y extranjeros. En esta obra se recogen, además, intervenciones de otros compañeros y amigos con motivo de diferentes actos de homenaje a la figura del gran investigador asturiano. También aparece una conferencia mía, pronunciada en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Oviedo el 1 de julio de 1986, es decir pocos meses después de su fallecimiento.

Del libro de M. Somovilla, que pudo llevarse a cabo gracias al interés de la Comisión Homenaje a David Vázquez, de La Felguera, desearía entresacar o resumir frases de algunas intervenciones que me parecen particularmente adecuadas. Se menciona en esta obra que al concluir su estancia en el National Institute for Research in Dairing, en Reading, ciudad situada al suroeste de Londres y en donde estudiaba cepas bacterianas implicadas en la fermentación del yogur y el queso, estaba pensando en otra fase formativa. Con ocasión de estos trabajos, David confesaba: “En estos alimentos había una presencia indeseable de antibióticos y curiosamente, a partir de ese tema me interesé ya por los antibióticos y por la investigación básica, en la cual continué el resto de mi carrera, durante los últimos veinticinco años”.

### La proyección de Cambridge

Como ya hemos mencionado, David se trasladó de Reading a la Universidad de Cambridge, lugar que en algunos de sus escritos ha considerado que fue “mi mejor época”. En algunas entrevistas manifestó la importancia de su etapa en Cambridge: “Fue realmente muy agradable, sin duda la época de formación más sólida de mi carrera investigadora. Allí pude alternar con los científicos de más alta talla del mundo, en el campo de la investigación. Solamente en el labo-

ratorio donde trabajábamos en biología molecular, en Cambridge, había cinco premios Nobel, en realidad seis porque a uno de ellos, Frederick Sanger, le habían concedido dos veces el galardón. Era un ambiente muy estimulante."

En otras declaraciones posteriores se refería a lo que había significado su estancia en la Universidad de Cambridge, en donde obtuvo el Ph. D. en Bioquímica en 1965, que era en realidad su tercer doctorado, después del de Farmacia y del de Ciencias Químicas en la Universidad de Madrid, en 1957 y 1959 respectivamente. Y subrayaba: "Haber vivido en un ambiente adecuado de investigación, sin ningún tipo de burocracia, ni de problemas importantes, sino completamente entregado a mi formación y al conocimiento de sus distintos aspectos, ha sido para mí de una importancia decisiva. Allí me inicié en la línea de trabajo que después continuaría; allí adquirí los conocimientos que podría considerar más importantes, y allí se decidió cuál iba a ser mi carrera."

Al hablar de la estancia de David Vázquez en Cambridge, resulta obligado recordar algunos párrafos del Prof. Ernest F. Gale, maestro de David y director de su tesis doctoral y de la mía, que realicé unos años antes, durante la segunda mitad de los cincuenta. Los trabajos sobre el modo de acción de algunos antibióticos, principalmente la estreptogammina y después el cloranfenicol, reflejaron, según el Prof. Gale, la capacidad de científico reflexivo y hábil de David, y continuaba: "También demostró lo bien que se integraba en el equipo, con su tranquilo sentido del humor y sus amplios conocimientos, tanto de bioquímica como de microbiología. El primer antibiótico que demostró inhibir la síntesis de proteínas en las bacterias fue el cloranfenicol. David lo estudió, junto con la estreptogammina, para mostrar sus semejanzas y diferencias." Y continuaba Gale: "David pudo disponer de cloranfenicol marcado con <sup>14</sup>C, lo que le permitió

llevar a cabo un análisis mucho más detenido y detallado. Descubrió que el antibiótico radiactivo se fijaba a los ribosomas bacterianos."

### El trabajo en síntesis de proteínas

Las aportaciones de David Vázquez al conocimiento de la síntesis de proteínas fue realmente importante. Trabajar con ribosomas bacterianos no sólo significaba que una partícula específica reaccionaba con el cloranfenicol, sino que tenía un papel fundamental en la síntesis de proteínas. Y quizás más importante es concluir que a raíz de sus investigaciones con los antibióticos cloranfenicol y estreptogammina, a decir del Prof. Gale, David cobró nuevo entusiasmo para continuar sus estudios sobre el mecanismo de síntesis de proteínas y los antibióticos que lo atacaban.

Los trabajos posteriores sobre otros antibióticos de acción parecida propició que este campo de investigación se volviera cada vez más activo y competitivo. Con la experiencia que había adquirido en esta clase de trabajo y sus extensos conocimientos, David profundizó en cada nuevo enfoque —el uso de mensajeros sintéticos— la purificación del RNA de transferencia y el creciente número de nuevos antibióticos que actuaban sobre lugares determinados.

En la época en que David trabajaba en Cambridge coincidió con varios jóvenes investigadores y colegas realmente sobresalientes. Así, Eric Cundliffe estudiaba el efecto de inhibidores sobre la síntesis de proteínas bacterianas, Peter Reynolds analizaba cómo actuaba la vancomicina, Michael Waring, por último, investigaba la acción de drogas que interaccionaban con el DNA. La amistad que todos estos investigadores forjaron cuando eran estudiantes se mantuvo hasta su muerte. Es por ello interesante recordar frases del artículo de David Kerridge, como

miembro del Sub-Department of Chemical Microbiology, de la School of Biochemistry, cuando afirmaba:

“Me alegra constatar que los estudios realizados en nuestro grupo habrían de constituir la base de su brillante carrera como investigador, que le llevaría a convertirse en un experto mundial en antibióticos antibacterianos.” Y continuaba: “La producción científica de David era impresionante.” Y para concluir, unas frases finales: “David era un trabajador incansable y meticuloso en el laboratorio y sus investigadores se caracterizaron siempre por una elegante sencillez. Todos los experimentos estaban bien pensados y prestaba gran atención a los detalles. Nos impresionaba el que al final del día su mesa estaba siempre inmaculada, todo ordenado y dispuesto para el experimento del día siguiente.”

### El retrato del amigo

Podría recordar impresiones de varios de sus colaboradores españoles y sobre todo de algunos de sus primeros becarios. Evoco así, frases que oí y sentimientos que conocí de María Luisa Celma y Rafael Fernández Muñoz, que se habían iniciado en la investigación conmigo en 1966 y que, al trasladarnos en 1967 a la Universidad de Salamanca, continuaron el trabajo con David Vázquez en su pequeño laboratorio del CIB. De hecho, María Luisa y Rafael, unidos a Charo (Rosario Santiago) como secretaria, formaron el equipo inicial al que, sin tardar mucho, se uniría durante algún tiempo Robin E. Monro, un buen biólogo molecular que había realizado su tesis doctoral sobre la síntesis del cristal de proteína de *Bacillus thuringiensis*, al mismo tiempo que yo, en el mismo grupo del Prof. Ernest F. Gale, en la Universidad de Cambridge. María Luisa Celma y Rafael Fernández Muñoz recuerdan aquellos primeros años con David como de tra-

bajo duro, en los que el jefe era exigente en el ritmo de trabajo, manteniendo en cierto modo las distancias. Más tarde, siguiendo mis consejos, se incorporó al grupo de David, Enrique Battaner, médico que contaba con una amplia erudición humanística, que se insertó en el grupo sin ningún tipo de problema.

Por el laboratorio de David Vázquez, pasaron también Alfredo Toraño, asturiano como él, Michael Waring, uno de los primeros en demostrar experimentalmente que el bromuro de etidio se intercalaba entre las bases del DNA. Por allí pasó también George Cross, que trabajó en biología molecular de protozoos, y Ramón Torres Pinedo de la Universidad de Puerto Rico. Más tarde, se incorporaron al laboratorio Joan Modolell, Juan P. García Ballesta y Antonio Jiménez, que suponían excelentes fichajes. Y no tardó mucho en llegar una nueva generación de becarios, como Bartolomé Cabrer, Vicente Montejo, Luis Carrasco, Mariano Barbacid, y tantos otros, de forma que el pequeño laboratorio de David se convirtió en un departamento de auténtico nivel investigador y excelente producción científica.

De un artículo de Juan P. García Ballesta, merece la pena destacar algunos párrafos, sobre todo por lo que tienen de significativo acerca de la personalidad científica de David Vázquez. Describe García Ballesta las preferencias de David en las investigaciones con antibióticos, orientadas principalmente a su utilización como herramientas para investigar los procesos celulares que son bloqueados en su acción. Precisamente, a comienzos de los años setenta, estaba realizando un gran esfuerzo para identificar los lugares del ribosoma que intervenían directamente en los distintos pasos del proceso de síntesis de proteínas, los sitios activos del ribosoma.

Es cierto que los resultados del grupo de David Vázquez, habían levantado controversias en relación con los resultados de otros prestigio-



FIG 2. David Vázquez, con Rafael Sentandreu y César Milstein, en el Instituto de Biología Celular.

sos laboratorios sobre la actividad ribosómica, sin embargo la habilidad y el prestigio de David fueron determinantes para defender argumentos en los que el tiempo les iba a dar la razón.

García Ballesta, gran conocedor de David en el área de la investigación, le definía como hombre de gran imaginación y de ideales que siempre fueron el motor importante del trabajo del grupo. Y proseguía: "David, con su mente perfectamente organizada, con su clarividente visión del futuro y con su prodigiosa memoria, fue constantemente un acicate del trabajo en el laboratorio." Y cuando más tarde el trabajo de ambos científicos tomaba derroteros diferentes, el contacto científico siguió siendo continuo, reconociendo García Ballesta, que "su extenso conocimiento fue aún fuente de ideas provechosas y fructíferas".

Aunque con un enfoque algo distinto, merece la pena recordar frases del escrito enviado por el

Dr. Mariano Barbacid, discípulo de David Vázquez y gran admirador suyo, aun en la distancia. Después de algunos párrafos en los que describe muchas de las cualidades científicas y humanas de su maestro y amigo, Mariano Barbacid describía así al gran investigador: "David Vázquez ha sido uno de los pocos científicos que con su esfuerzo e incansable dedicación a la ciencia fue capaz de crear un ambiente científico en España, que permitiera reunir esa masa crítica en investigación biomédica, que hoy empieza a ser una realidad. A su esfuerzo, orientado en gran medida a crear ese sólido pilar donde se han podido asentar las siguientes generaciones de biólogos y bioquímicos españoles, seguirá un amplio y profundo reconocimiento." Merece la pena recordar la presencia de Mariano Barbacid en Oviedo, con motivo de la concesión del Premio Príncipe de Asturias a David Vázquez, momentos en los que junto a Charo, su esposa, tuvimos ocasión de

compartir algunos momentos de alegría y de celebración por la distinción concedida, justo reconocimiento a la labor de toda una vida dedicada a la investigación científica.

No quisiera dejar de mencionar algunos comentarios del por entonces colaborador becario de David, Luis Carrasco en los que destaca la gran personalidad y méritos científicos de su maestro: “Uno de ellos es la proyección y presencia de David en congresos, reuniones, etc., en el extranjero. Era un científico constantemente invitado a participar en este tipo de reuniones, lo que hacía que, por un lado, estuviera muy al día en su campo de trabajo y, por otro, que a la labor que realizábamos se le diera enseguida difusión internacional; esto se unía además al impulso renovador que traía después de estos congresos.”

### Apuntes de una vida

David era un trabajador incansable y perseverante, muy madrugador, sacaba adelante su trabajo y sus ideas, que eran muchas y muy buenas. Tenía una memoria excepcional, y frecuentemente recordaba fechas y horas de cualquier intervención en juntas y reuniones en las que a menudo puntualizaba a los participantes la defensa de determinadas posturas y situaciones.

Humanamente, decía Luis Carrasco, David era increíble. Le encantaba la juerga y la diversión al salir con los miembros de su grupo. Era entretenidísimo. No se callaba nunca. Contaba anécdotas de todo el mundo. En este sentido, quisiera yo recordar lo sucedido en una de esas excursiones que los alumnos del Prof. Albareda, Secretario General del CSIC, hacíamos a lugares más o menos próximos a Madrid. En esta ocasión visitábamos Aula Dei, el centro del CSIC en Zaragoza. A mediodía la Diputación de Zaragoza nos había ofrecido un succulento almuerzo,

David había quedado situado cerca del centro, al lado de su buen amigo Avelino Pérez Geijo. Como segundo plato nos habían puesto parte de un buen pollo asado. David se las veía para descuartizar la pieza con los cubiertos, y en ese momento, después de mucho luchar, exclamó: “En condiciones normales (se entiende sin las autoridades presentes) ya habría liquidado yo este pollo hace media hora”. Todos los que estábamos cerca de él nos reímos claramente. Y terminaba Luis Carrasco: “Creo que todos nosotros mantendremos intacto ese recuerdo de David, de David en el trabajo, del David alegre, y sin duda su recuerdo seguirá marcando una pauta de buen hacer en nuestras vidas”.

Quisiera terminar esta aportación recordando comentarios y proposiciones de Federico Mayor Zaragoza, sobre todo en ocasión de las batallas mantenidas desde el Ministerio de Educación y Ciencia para sacar adelante primero el Centro de Biología Molecular (CBM), y más tarde la Fundación, que hoy lleva el nombre de Severo Ochoa. Podría contar anécdotas y recuerdos referidos por Federico Mayor en su relación intensa con David a lo largo de muchos años, en horas vividas en el nuevo CBM, y con ocasión de viajes con David por España, y después a la Unión Soviética, a un simposio internacional “Frontiers in Biorganic Chemistry and Molecular Biology”, celebrado en Moscú. Y, más tarde, con motivo de algunas conferencias desarrolladas en Alma-Ata. Federico Mayor, recuerda siempre a David como hombre y científico brillante y destacado, al mismo tiempo que manifestaba su tristeza cuando tan inesperadamente nos abandonó. Y por eso concluía con esta frase: “David se nos fue. David con quién tanto quería nos ha dejado, sin embargo, algo inmarcesible: su trayectoria humana y científica, el ejemplo de su vida.”

No podía faltar por último, referencia al Prof. Severo Ochoa, gran admirador del trabajo y del

nivel científico de David Vázquez. Ochoa conoció y trató a David en el CBM, donde junto con otros distinguidos investigadores, dieron la batalla para crear y sacar adelante el CBM, con las ideas y la ilusión de centro de excelencia, que por entonces tenía muy claras. No es de extrañar que D. Severo escribiera con ocasión de su muerte estas frases: "David Vázquez sobresalió en la creación de una escuela de jóvenes científicos, lo que hace que su pérdida sea todavía más penosa. Las vocaciones pueden fomentarse en el aula, pero, aunque esto es importante, una escuela se crea en el laboratorio compartiendo y discutiendo las ideas con los estudiantes graduados, y posdoctorales, así como con los colaboradores. Varias generaciones de distinguidos jóvenes científicos deben a David su inspiración y formación." Y añadía: "El prestigio de David en el ámbito de la actividad científica era universal y figuraba siempre como conferenciente en todos cuantos congresos sobre biosíntesis de proteínas o el mecanismo de acción de los antibióticos se celebrase en cualquier parte del mundo."

Me parece que ya nos hemos extendido suficientemente sobre la vida y obra de David. Ahora sólo me queda dedicar a su esposa Rosario Santiago (Charo) e hijos el mejor de los recuerdos y el homenaje a ese investigador reconocido e incansable. Dejó en España una ingente obra traducida en un elevado número de discípulos sobresalientes, y una amplia producción científica en una de las áreas de investigación más atractivas y de mayor repercusión internacional. Desde aquí y ahora le dedicamos el más entrañable de los recuerdos.

### Cronología abreviada

- 1930 El 24 de marzo nace David Vázquez, en Tucumán (Argentina).
- 1932 La familia regresa a España y vive en Feleches (Siero) y Gijón.
- 1933 Se produce el fallecimiento de su padre el 21 de diciembre, en Laviana (Asturias).
- 1934 Estalla la Revolución de Octubre en Asturias. David Vázquez vive con su familia en Casa Riera, en Laviana.
- 1936 Estalla la Guerra Civil. David Vázquez se encuentra con su familia en León.
- 1940 Deja la Escuela Nacional de Laviana para iniciar el Bachillerato en el Colegio de los Padres Agustinos de León, ciudad a la que se había trasladado con su madre y su hermano Florencio.
- 1947 Finaliza sus estudios de educación secundaria.
- 1948 Estudia durante unos meses para funcionario de aduanas. Más adelante se matricula en el curso preparatorio de Farmacia en la Universidad de Oviedo.
- 1949 Continúa los estudios de Farmacia en Madrid y empieza la carrera de Química, como alumno libre, en la Universidad de Oviedo. Durante esta etapa hace las milicias en La Granja (Segovia).
- 1954 Termina la Licenciatura de Farmacia, con Premio Extraordinario Fin de Carrera.
- 1955 Becario del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Comienza la preparación de sus dos tesis doctorales, una en la Facultad de Farmacia y otra en la de Químicas. Ambas versarán sobre la fermentación de la sidra, dedicando especial atención a los aspectos microbiológicos, la primera, y a los químicos, la segunda.
- 1956 Abre una oficina de Farmacia en La Felguera (Asturias).
- 1957 Obtiene la Licenciatura en Ciencias Químicas por la Universidad de Oviedo. También el título de Doctor en Farmacia por la Universidad de Madrid.
- 1959 Obtiene el doctorado en Ciencias Químicas. Prepara sus primeras salidas al extranjero.
- 1960 Permanece cerca de un año en París, con una beca para ampliar estudios en el Institut National Agronomique del CNRS. Investiga sobre fermentaciones lácticas.
- 1961 Curso en Reading (Reino Unido) con una beca del British Council. Continúa con las fermentaciones de los lácteos pero comienza a interesarse por los antibióticos. A finales de año se incorpora a la Universidad de Cambridge, al laboratorio de Bioquímica que dirigía el Prof. Ernest F. Gale.
- 1965 Doctor (Ph. D.) por la Universidad de Cambridge. Es elegido *Research Fellow* del Fitzwilliam College.

- 1967 Contrae matrimonio con Rosario Santiago el 18 de diciembre. Comienza a montar su laboratorio en el Instituto de Biología Celular (Centro de Investigaciones Biológicas). Ya es Investigador del CSIC, después de permanecer cuatro años como Colaborador.
- 1968 Es nombrado Director del Instituto de Biología Celular del CSIC.
- 1969 Nace su primera hija, María.
- 1971 Nace su hijo David (Pelayo). Es elegido Presidente de la Sociedad Española de Microbiología. Vicepresidente del Patronato Santiago Ramón y Cajal del CSIC. Consejero de número del CSIC. Miembro del Comité Editorial de la revista *Journal of Antibiotics*. Es nombrado "Popular" del diario *Pueblo de Madrid*.
- 1972 Miembro del Comité Editorial de la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- 1973 Miembro del Comité Editorial de la revista *Biochimica et Biophysica Acta*.  
Nace su hija Paloma.
- 1975 Es elegido Presidente del Patronato Santiago Ramón y Cajal del CSIC. Director del Instituto de Bioquímica de Macromoléculas. Director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Miembro del Comité Editorial de la revista *European Journal of Biochemistry*. Catedrático *Ad Honorem* de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Asesor para Biología de la Fundación Juan March.
- 1978 Vicedecano de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.
- 1979 Miembro de la International Cell Research Organisation (ICRO). Miembro de la European Molecular Biology Organization (EMBO). Miembro del European Region Expert Committee on Biomaterials de la UNESCO. Se publica su libro sobre los antibióticos inhibidores de la biosíntesis de proteínas.
- 1981 Es nombrado Director del Centro de Biología Molecular, cargo que ocupa hasta 1982.
- 1982 Presidente electo de la Sociedad Española de Bioquímica. Presidente del Survey Group of Life Sciences de la División de Asuntos Científicos de la OTAN. Académico de Número de la Real Academia Española de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- 1983 Recibe el Premio de los Colegios Farmacéuticos Oficiales de España.
- 1984 Es elegido Presidente de la Sociedad Española de Bioquímica.
- 1985 Recibe el Premio Príncipe de Asturias de Ciencia y Tecnología.
- 1986 El 15 de febrero David Vázquez fallece en Madrid a consecuencia de un cáncer de colon.

## Los paradigmas perdidos, Thomas S. Kuhn

Carmen Chica

*Redacción de Microbiología SEM, Barcelona, España*

El pasado 17 de junio moría en Cambridge, Massachusetts (EE.UU.), Thomas Samuel Kuhn, un filósofo revolucionario de la ciencia, a juicio de su colega, David L. Hull, y que, junto con Karl Popper, es uno de los pensadores que más influencia ha ejercido sobre la moderna epistemología de la ciencia. D. L. Hull, también filósofo de la ciencia, autor de numerosas y conocidas publicaciones sobre el tema y conocedor de primera mano de la vida y obra de Thomas Kuhn, le dedica, a raíz de su muerte, un comentario en la revista *Nature* (*Nature* 382, 1996, 18.07.96 pp. 203–204). Con el mismo motivo, el Prof. Jesús Mosterín realiza un lúcido análisis de la obra y el pensamiento del filósofo en el diario *El País* del 11 de septiembre, página 24.

Kuhn nació en Cincinnati el 18 de julio de 1922, obtuvo el doctorado en física por la Universidad de Harvard (Cambridge, Massachusetts) en 1949. Permaneció en esa universidad hasta 1956 ocupando diferentes puestos (becario y

ayudante en la organización e impartición de materias de educación e historia de la ciencia). De 1956 a 1964 trabajó en la Universidad de Berkeley (California) y de 1964 a 1979 ocupó la cátedra M. Taylor Pyne como Profesor de Filosofía e Historia de la Ciencia en la Facultad de Princeton. En 1979 se incorporó a MIT (Cambridge, Massachusetts) como profesor de estas mismas materias y en 1983 obtuvo la cátedra Laurence S. Rockefeller de Filosofía que ocuparía hasta 1991, en que fue nombrado profesor emérito de la misma institución, MIT.

Recibió numerosos premios a lo largo de su vida, entre ellos la Medalla George Salton de Historia de la Ciencia que le fue concedida en 1982 y las menciones honoríficas de prestigiosas instituciones universitarias de Estados Unidos y Europa.

Autor de varios libros, ensayos y artículos sobre filosofía e historia de la ciencia (al final de este trabajo se ofrece una relación de sus escri-

tos), la obra kuhniana por excelencia es *La estructura de las revoluciones científicas*. Por tanto, más que referirse a ella como el trabajo más conocido resulta más adecuado mencionarlo como la obra del autor. Y es que además de la importancia que ha llegado a alcanzar, una buena parte de la producción posterior ha girado en torno a ella. Publicada en 1962, ha sido traducida a veinticinco idiomas, y sólo en inglés se han vendido alrededor de un millón de ejemplares. En la actualidad, continúa siendo una de las lecturas obligadas en las asignaturas de filosofía e historia de la ciencia. A partir de su publicación la noción de «paradigma» va indisolublemente ligada a este teórico y filósofo de la ciencia y, desde entonces, prácticamente todas las obras sobre teorías filosóficas relacionadas con la ciencia, su historia y desarrollo, mencionan, incorporan o debaten el punto de vista de Kuhn. Y esto puede decirse tanto en relación con las ciencias de la naturaleza, química, física o biología, como con las ciencias humanas, sociología, psicología o lingüística.

### Cómo y por qué concibe La estructura de las revoluciones científicas

Kuhn era un joven físico, a punto de presentar su tesis doctoral, cuando hacia 1947 una serie de circunstancias ponen en marcha un proyecto que concluiría quince años más tarde en *La estructura de las revoluciones científicas*. En el curso de esos años, lo que había sido mera afición por la filosofía de la ciencia, llega a convertirse en su interés principal. Todo arranca cuando James B. Conant, entonces presidente de la Universidad de Harvard, le pide que imparta unas clases de física para estudiantes universitarios de materias humanísticas. Al documentarse para cumplir el encargo, entra en contacto con los procedimientos (enseñanza y literatura dis-

ponible) de la historia de las ciencias y percibe que ésta se fundamentaba en teorías y prácticas científicas anticuadas por inadecuadas. Encuentra un relato histórico científico por acumulación, de hechos e información, que es lo que han contenido durante épocas la mayoría de textos científicos históricos. De todo ello emergió una concepción personal de lo que tendría que ser la historia de las ideas científicas, a la vez que un cambio en su futura orientación profesional. Significativamente, *La estructura de las revoluciones científicas* aparece dedicada “a James B. Conant, que puso esto en marcha”.

Tras su doctorado, la concesión de un puesto como investigador becado (Junior Fellow) por la Society of Fellows de la Universidad de Harvard (Cambridge, Massachusetts), durante tres años, le permiten ir adquiriendo una formación profunda en filosofía e historia de la ciencia, y en otras materias humanistas. Será la clave para su dedicación continuada al estudio y posterior enseñanza de esas materias. Tiene ocasión de conocer la obra de Jean Piaget, la psicología de la *Gestalt*, y la monografía de Ludwick Fleck *La génesis y el desarrollo de un hecho científico*. Kuhn pondrá explícitamente de manifiesto la impresión que le causó la obra de estos pensadores y la influencia o paralelismo de su propia obra con ellos.

No resulta difícil encontrar alguna similitud entre los conceptos de Piaget y los que posteriormente aplicará Kuhn en la elaboración de sus teorías, en especial los conceptos piagetianos de asimilación y acomodación en el desarrollo intelectual del niño por medio de estadios. Jean Piaget, psicólogo suizo con formación biológica, cuya tesis doctoral se centraba en temas zoológicos, opta por una aproximación genética cuando se ocupa del origen y desarrollo de la inteligencia en el niño. Para ello, realiza una serie de trabajos experimentales y prospecciones a partir de cuyos resultados establece sus

principios, bien conocidos en el campo de la psicología evolutiva (entiéndase aquí el concepto evolutivo referido al proceso de crecimiento global, físico y mental, del ser humano desde el nacimiento hasta la adolescencia o edad adulta, según los autores). En la teoría piagetiana la inteligencia es adaptación, que se consigue a partir de los mecanismos de acomodación (ajuste de las estructuras mentales a la realidad externa) y asimilación (de la realidad a las propias estructuras). Todo ello se produce a través de estadios evolutivos, asignados a períodos de edad, desde la temprana infancia hasta la adolescencia. Piaget los establece con bastante precisión, y propone que en cada nivel se mantienen o transforman adquisiciones de la etapa previa mediante los mecanismos indicados. Piaget considera que es posible explicar la evolución del ser humano a partir de los resultados de sus estudios con niños.

### El descubrimiento de Fleck

Thomas Kuhn contribuyó también en buena parte a dar a conocer la obra del médico polaco Ludwig Fleck, de quien se declara admirador y coincidente en muchos puntos. Él mismo manifiesta la impresión que le causó el descubrimiento y lectura de su monografía. La sola mención del nombre de Fleck y de su obra *La génesis y el desarrollo de un hecho científico* contribuyó a su difusión, al menos en medios más amplios de los que entonces era conocida, en los que, de otra forma, posiblemente hubiera tardado muchos más años en saberse de ella. (véase R. Guerrero *Maneras de hacer ciencia*, en *Microbiología SEM* 12, 131–136) y el trabajo de J. J. Marcén, en este mismo número. Tanto es así que la traducción del original alemán al inglés que The University of Chicago Press, publicó de la monografía de Fleck en 1981 fue prologada por el



FIG. 1. Thomas S. Kuhn 1922–1996.

propio Thomas Kuhn, quien afirma haber estado insistiendo desde largo tiempo en la necesidad de esa traducción para dar a conocer la obra al público de habla inglesa. Kuhn tenía 28 años (era hacia 1949) cuando, no sin cierta dificultad debido al idioma, como él mismo confiesa, leyó esa monografía que se había publicado en Basilea en 1935.

Con Fleck, Kuhn compartirá una adhesión no exenta de crítica a los principios de la escuela psicológica de la *Gestalt* en la percepción, en la que predomina la forma sobre el fondo y la captación del conjunto en detrimento de las partes componentes. Principio que queda bien plasmado en la frase que todos hemos oído alguna vez, “el todo es más que la mera suma de las partes”. En las *Revoluciones científicas* aparecen repetidas menciones a los principios defendidos por los seguidores de esta orientación psicofilosófica.

La palabra alemana *Gestalt* significa estructura, forma, y adquiere importancia en psicología merced a dos escuelas. La austriaca, que se sitúa en Graz en 1890 basada en los trabajos de Ehrenfels, y la alemana, la más conocida, fundada en 1912 en Berlín por Wertheimer. Explica,

en resumen, que el intelecto capta los rasgos generales del fenómeno mediante un proceso de autorreflexión, aunque esto es otra escuela, la de la fenomenología. A vueltas con diferencias sobre los mismos o parecidos conceptos filosóficos se dio una profusión de escuelas y tendencias en los principios de la psicología.

Retornando a la similitud de pensamiento entre Kuhn y Fleck, ambos coinciden en el valor que atribuyen a la experiencia en el ajuste de la percepción y, especialmente importante, comparten la creencia de que no cabe fijar los descubrimientos científicos en un momento determinado, ni atribuirse a un solo individuo. Es un proceso de percepción, interpretación, experimentación, en el que cuentan las aportaciones, prácticas y teóricas, que otros han realizado. Pero, si en el campo de las ideas existe coincidencia entre ambos científicos, la trayectoria vital de cada uno fue totalmente diferente. La dedicación principal de Fleck fue el ejercicio y la investigación en medicina, actividad en la que realizó notables contribuciones. Tanto es así que cuando fue confinado en campos de concentración, los nazis, a pesar de tratarse de un judío, no quisieron prescindir de sus conocimientos y le destinaron a los servicios médicos, en Auschwitz a serología y en Buchenwald a los laboratorios en que se realizaba una búsqueda de formas más rentables para la producción de vacunas contra el tifus. A pesar de todo, consiguió, junto con otros colegas confinados en el mismo lugar, sabotear la actividad que se veían obligados a llevar a cabo.

La inclinación de Fleck hacia la filosofía de la ciencia no provino, como en el caso de Kuhn, de un encuentro inesperado con una situación que le hizo cuestionar el fundamento de los conocimientos y la organización de los mismos para su transmisión en la enseñanza. Surgió de forma natural por su contacto y formación en el ambiente intelectual, estimulante y liberal, de su

época de estudiante, en Lwów, en la confluencia pacífica y fructífera de la cultura alemana y la polaca que años más tarde se vería trágicamente interrumpida.

Pero, al margen de estas consideraciones que afectan a las trayectorias personales y profesionales de ambos científicos, lo cierto es que, a raíz del “descubrimiento” de la obra de Fleck, editores, y escritores señalan la coincidencia en unas ideas que no era frecuente considerar en la historia y en la teoría de la ciencia y que, en síntesis, constituye una incorporación de elementos subjetivos, psicológicos y sociológicos al quehacer y la explicación científica.

Thomas Kuhn pasaría un año como invitado en el Center for Advances Studies in the Behavioral Sciences, donde establecería contacto directo con una comunidad de científicos en materias sociológicas y humanistas. Confiesa la extrañeza que le produce la ausencia de acuerdo que percibe entre estos científicos en relación a conceptos y leyes de la naturaleza, a diferencia de lo que ocurre en el caso de biólogos, físicos y químicos, entre los que no es frecuente la controversia sobre los fundamentos de tales materias. Quizá estaba reparando en la discusión acerca de la raíz ideológica que psicólogos y sociólogos buscan en cada disciplina y en la práctica y teoría de la misma. El cuestionamiento proviene de esa raíz ideológica que orientará una tendencia, escuela, o método de trabajo y su cuerpo teórico.

### **La estructura de *Revoluciones científicas*. La contribución de Kuhn a la filosofía de la ciencia**

Al preparar su ensayo, *Revoluciones científicas* ya dentro del dominio de la filosofía y la teoría de la ciencia, Kuhn se propone, lo manifiesta explícitamente, demandar un cambio en la percepción y la evaluación de los datos conocidos.

Puntos esenciales de su contribución son una explicación de los períodos de normalidad y crisis en ciencia, el concepto de «paradigma» como patrón de investigación incorporado a la práctica de una comunidad científica, y la descripción de la forma en que se desarrollan estos procesos. Ciencia normal es la ciencia establecida que, por lo general, se mantiene durante períodos prolongados, y en cada uno de cuyos campos, investiga y trabaja una comunidad científica. Da lugar a los textos científicos (artículos, libros, etc.), elementales y avanzados, a través de los cuales se difunden y afianzan las teorías sustentadas, se encuentran aplicaciones y se comparan con experimentos y observaciones que sirven de ejemplo. El propio avance tecnológico, el diseño de instrumentos, va dirigido a afianzar los resultados del trabajo científico.

La ciencia normal se mantiene hasta que surgen las anomalías, cuando determinado problema científico se resiste, no se obtienen soluciones satisfactorias con los planteamientos hipotéticos y prácticas habituales. Se inician entonces períodos de crisis que, finalmente, darán lugar a un nuevo procedimiento que no se ajustará a los cánones anteriores, produciéndose un cambio de paradigma que sustituirá al anterior. Los períodos de crisis producen lo que Kuhn denomina “articulaciones”, que son intentos de ajuste del problema y la teoría y que denotan la resistencia al cambio.

La emergencia de teorías y paradigmas va precedida de períodos de crisis, en los que la experimentación, según la ciencia establecida, no aporta respuestas a los problemas. En ocasiones, la solución al problema que origina la crisis viene por parte de la técnica y, entonces, no se produce el cambio de paradigma. Pero, a la vez, los propios avances tecnológicos sí contribuirían en otros casos a cambios y establecimiento de nuevos paradigmas. Kuhn compara los períodos de crisis y revolución científica a las revolu-

ciones sociales, al encontrar un paralelismo en las situaciones que las producen, como insatisfacción ante la falta de solución a los problemas, intentos de reajuste, crisis y, finalmente, revolución e implantación de un nuevo sistema. La incorporación de un paradigma implica un grado de aceptación, mediante el cual se adapta el trabajo ulterior a los nuevos cánones propuestos.

Como toda contribución filosófica de la ciencia, y como cualquier reflexión sobre la misma, la orientación desarrollada por Kuhn en *Revoluciones científicas* recibió críticas, tanto por parte de colegas como de otros teóricos de la ciencia; críticas referidas a una falta de precisión conceptual, contradicciones, falta de elementos para catalogar acontecimientos científicos como revoluciones, ambigüedad, excesivas dosis de psicologismo, etc. Respondió a algunas de ellas en una postdata añadida a la edición siguiente del libro que aparecería en 1970 y lo haría en sucesivos trabajos. La referencia a *Revoluciones científicas* devendría prácticamente omnipresente en ensayos, recopilaciones, nuevas obras, y en los debates científico-filosóficos de múltiples disciplinas. Pero una cuestión particularmente importante es la que plantea el profesor Jesús Mosterín acerca de la vigencia de los planteamientos científico revolucionarios de Kuhn en la ciencia actual.

Habrá que esperar a la aparición del libro póstumo de Kuhn que, en palabras de D. L. Hull (artículo en *Nature* mencionado), dejó acabado en los aspectos esenciales, para evaluar cuánto de novedad, explicación o cambio aporta respecto a su previa y reconocida contribución a la filosofía de la ciencia, habida cuenta de la evolución de su propio pensamiento a través de los años y de las críticas. Sin embargo, independientemente de todo ello y sea cuál sea hoy en día el grado de aceptación, rechazo, indiferencia o desconocimiento hacia el filósofo y su obra, no deja de ser ciertamente hermoso que alguien

postula, como hace, e insiste y recapitula en las páginas finales de su famoso libro, que la investigación avanza a través de pacíficas revoluciones, aunque, añadimos, sean científicas.

### Principales trabajos de Thomas S. Kuhn

- Kuhn, T. S. (1952). Robert Boyle and structural chemistry in the seventeenth century. *Isis*, **XLIII**, 12–36.
- Kuhn, T. S. (1957). *The Copernican Revolution*. Harvard University Press. Cambridge, Mass.
- Kuhn, T. S. (1958). The caloric theory of adiabatic compression. *Isis*, **XLIV**, 132–140.
- Kuhn, T. S. (1958). Newton's optical papers. In Cohen, I. B. (ed.), *Isaac Newton's Papers and Letters in Natural Philosophy*. Cambridge, Mass.
- Kuhn, T. S. (1961). The function of measurement in modern physical science. *Isis*, **LII**, 161–193.
- Kuhn, T. S. (1962). The historical structure of scientific discovery. *Science*, **cxxxvi**, 760–764. (número de 1 de junio 1962).
- Kuhn, T. S. (1962). *The structure of scientific revolutions*. Chicago University Press. Chicago. Reeditado en 1970 con la inclusión de Postscript-1969. Primera edición en español 1970, 1971. Fondo de Cultura Económica, México.
- Kuhn, T. S. (1975). La estructura de las revoluciones científicas. Fondo de Cultura Económica. Es la edición en español disponible actualmente.
- Kuhn, T. S. (1963). The essential tension: Tradition and innovation in scientific research. In Taylor, C. W., Barron, F. (ed.), *Scientific Creativity: Its Recognition and Development*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 341–354.
- Kuhn, T. S. (1963). The function of dogma in scientific research. In Crombie, A. C. (ed.), *Scientific Change*. Basic Books, N.Y., pp. 347–369.
- Kuhn, T. S. (1968). History of science. Internat. Encyclopedia of the Social Sciences, pp. 74–83.
- Kuhn, T. S. (1970). Logic of discovery or psychology of research? In Lakatos, I., Musgrave, A. (ed.), *Criticism and the Growth of Knowledge*. Cambridge Univ. Press. Cambridge, Mass.
- Kuhn, T. S. (1970). Reflections on my critics. In Lakatos, I., Musgrave, A. (ed.), *Criticism and the Growth of Knowledge*. Cambridge Univ. Press. Cambridge, Mass.
- Kuhn, T. S. (1971). Notes on Lakatos. In Cohen, R., Buck, R. (ed.), *Boston Studies in the Philosophy of Science* 8. Reidel, Dordrecht, pp. 137–146.
- Kuhn, T. S. (1972). Second thoughts on paradigms. In Suppe, F. (ed.), *The Structure of Scientific Theories*. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- Kuhn, T. S. (1976). Theory change as structure change: Comments on the snead formalism. *Erkenntnis* **10**, 179–199.
- Kuhn, T. S. (1979). History of science. In Asquith, P. (ed.), *Current Research in Philosophy of Science*. Philosophy of Science. Ass. Ann Arbor. pp. 121–128.
- Kuhn, T. S. (1981). What are scientific revolutions? Center for Cognitive Science. MIT, Cambridge, Mass.
- Kuhn, T. S. (1983). Commensurability, Comparability, Communicability. In Asquith, P. D., Nickles, T. (ed.), *PSA 1982*, vol. 2. Philosophy of Science Association. East Lansing, pp. 669–688.
- Kuhn, T. S. (1983). Rationality and theory chice. *J. Philosophy* **80**, 563–570.
- Kuhn, T. S. (1986). The histories of science: diverse worlds for diverse audiences. *Academe*, pp. 29–33.
- Kuhn, T. S. (1987). Afterword: revisiting Planck. In Kuhn, T. S. (ed.), *Black-Body Theory and the Quantum Discontinuity, 1894–1912*. University of Chicago Press, Chicago. pp. 349–370.

### Algunas obras recientes sobre historia y filosofía de la ciencia

- Collins, H., Pinch, T. (1993). *The Golem: What everyone Should Know about Science*. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Dupré, J. (1995). *The disorder of Things. Metaphysical Foundations of the Disunity of Science*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Gleick, J. (1987). *Chaos. Making a New Science*. Penguin Books, London.
- Horgan, J. (1996). *The End of Science. Facing the Limits of Knowledge in the Twilight of the Scientific Age*. Addison-Wesley Pub. Co.
- Hull, D. H. (1988). *Science as a Process. An Evolutionary Account of the Social and Conceptual Development of Science*. The University of Chicago Press.
- Mayr, E. (1988). *Toward a New Philosophy of Biology*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Shapin, S., Schaffer, S. (1985). *Leviathan and the Air-pump. Hobbes, Boyle and the Experimental Life*. Princeton University Press.

## Revistas latinoamericanas: un grano de arena a la ciencia universal

Ana María Cetto\*

*Instituto de Física, UNAM, México*

En América Latina se publican varios miles de revistas científicas, cerca de 10.000 títulos, de acuerdo con los registros del ISSN. De esta cifra, continúan activas alrededor del 80%. No hay ninguna duda del impresionante esfuerzo editorial que esto supone. La historia y características de algunas de estas revistas están documentadas con detalle en Cetto & Hillerud 1995 (2).

Pero, surge la pregunta: ¿dónde están esas revistas, de qué tratan, quién las lee y quién las usa?

Poco sabemos de ellas, aunque existen algunos estudios bien documentados a nivel regional (5). El 70% de nuestros títulos no aparece registrado en ningún índice internacional de publi-

caciones periódicas. Las bases de datos regionales más completas contienen pocos más de 2000 títulos vigentes, abarcando prácticamente todas las disciplinas del conocimiento (véase la Tabla 1). Teniendo en cuenta que son cerca de 25 países los que ocupan tan vasta región del planeta, el número de títulos por disciplina resulta más bien modesto. Estos títulos representan en general las revistas más establecidas, las que tienen una mayor circulación y son relativamente puntuales en su aparición. Algunas llevan más de 50 años saliendo con regularidad y se distribuyen fuera de los países de origen; las hay con comités internacionales y que publican también en inglés; las hay, y no pocas, que siguen rigurosos procesos de selección y revisión y

---

\* Ana María Cetto, doctora en física, es investigadora en fundamentos de la mecánica cuántica. Ha dirigido la *Revista Mexicana de Física* y ha participado como autora en *La Ciencia desde México*, del Fondo de Cultura Económica. Es vicepresidenta de Committee on Science and Technology in Developing Countries (COSTED) y miembro de International Council of ScientificUnions (ICSU) Press.

TABLA 1. Títulos de publicaciones periódicas latinoamericanas vigentes indizados en CLASE y PERIODICA (CICH-UNAM), 1996

Administración	23	Política y Rel. Internacionales	73
Antropología	51	Psicología	23
Arte	29	Religión	23
Bibliotecología	32	Sociología	58
C. Inform. y Comunicación	12	Agrociencias	180
Derecho	53	Biología	246
Economía y Demografía	154	Ciencias Exactas	48
Educación	78	Geociencias	89
Filosofía e Historia	90	Ingeniería	98
Literatura y Lingüística	46	Medicina	336
Multidisciplinarias	285	Química	41

publican sólo trabajos originales que cumplen con todos los cánones internacionales; otras publican trabajos pioneros en temas de relevancia local o regional pero que no son de interés para los editores de otros países y algunas, incluso, abren nuevos campos de investigación inexplorados a escala mundial. Cuando más del 95% de la actividad científica en el mundo —incluida una buena parte de la nuestra— gira en torno a los proyectos definidos por los países centrales, resulta especialmente importante atender a los intereses y problemas específicos de la periferia.

Algunas revistas latinoamericanas han desempeñado un papel significativo como vía de expresión y comunicación de una comunidad científica, incluso como testimonio del desarrollo de esa comunidad. También han contribuido a definir e impulsar líneas de investigación —función especialmente importante en circunstancias típicas de una ciencia incipiente—; han servido para que nuestros jóvenes científicos en período de formación se ejercitaran como lectores, como autores, como árbitros y en ocasiones como editores; han ayudado a avanzar en la incorporación y el desarrollo de las tecnologías asociadas a procesos editoriales; también han servido para dar a conocer algo de nuestra pro-

ducción científica en el exterior y, aunque en menor grado, proveen un espacio para autores extranjeros que trabajan en temas de interés común.

En varios de los aspectos mencionados, estas revistas se parecen a la mayoría de las publicaciones hermanas de otras regiones del mundo: son un reflejo de lo mejor que nuestros países producen en conocimiento científico y de lo que nuestros autores consideran digno de dar a conocer. Sin embargo, existe un extendido menosprecio hacia ellas. En el ámbito internacional, esto se refleja de varias maneras. Baste mencionar que de la enorme producción de revistas en los distintos campos científicos, el ISI (Institute of Scientific Information) considera sólo 49 de los títulos editados en América Latina, que corresponden a 17 de Brasil, 12 de México, 7 de Chile, 5 de Argentina, 3 de Venezuela, y 1 de cada uno de los siguientes países: Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador y Perú. Esto contrasta con el total de 7000 títulos incluidos por el ISI en sus diversas bases de datos. Las citas de los trabajos publicados en dichas revistas son comparativamente muy escasas, lo que contribuye a su bajo factor de impacto (1). Rara vez se encuentra un título latinoamericano en los estantes de las bibliotecas europeas o estadounidenses, menos

aún de las de otros países del Sur. No importa que los precios de suscripción sean ridículamente bajos, ni que se haga un esfuerzo por cumplir puntualmente con los envíos. Nuestros colegas de otros países, o no se interesan por nuestras contribuciones a la ciencia (será por qué las consideran de escaso interés?), o no tienen confianza en nuestros resultados. Solamente se produce una excepción a esta tónica general cuando logramos publicar en las "revistas de corriente principal" (las principales revistas del Norte) y dicho sea de paso, las cifras muestran que en promedio publicamos la mitad de nuestros trabajos en aquellas revistas del Norte.

En el ámbito interno, es común toparse con las herencias o los reflejos de este menoscenso, de manera que a menudo son los propios colegas los primeros en descalificar nuestras publicaciones, por su escasa circulación internacional, su bajo factor de impacto, la desconfianza en la capacidad científica de sus autores, el uso del español, ...en suma, por las mismas viejas razones ya conocidas. La resistencia de los propios autores a enviar sus buenos artículos a las revistas latinoamericanas en uno de los principales elementos en perjuicio de éstas. Y resultan doblemente perjudicadas cuando en los procesos de evaluación de la trayectoria y producción científica de los investigadores, los artículos en estas revistas se consideran "de menor valor" frente a los publicados en las de "corriente principal". Todavía se produce un triple castigo cuando, debido a su escasa presencia y a su cuestionada calidad (correcta o incorrectamente catalogada), se les niega el apoyo institucional y financiero que requiere una publicación periódica para seguir siéndolo, aumentar su presencia y elevar su calidad. En ciencia, como en casi todo, tenemos un primer, un segundo y un tercer mundo. Pero el instrumento ha sido creado por el primero, con lo cual, cabe preguntarse acerca de su objetividad a la hora de medir y evaluar la

actividad de los países no integrados en el área directriz. Para muchos, la objetividad hacia ellos está viciada desde el principio por prejuicios, lo cual crea una situación indeseada porque constituye a la vez un elemento que justifica la tendencia a evitar esas publicaciones.

Cuando, a fines del siglo xvii, comenzaron a publicarse las primeras revistas científicas en Europa, no tenían regularidad, los procedimientos editoriales no eran para nada ejemplares, y la circulación era sumamente restringida; sin embargo, la decisión de apoyar su publicación fue estratégica, y, seguramente, no ha sido lamentada por nadie. Algunas de estas revistas evolucionaron, junto con las comunidades que les dieron origen, y siguen vivas después de varias transformaciones; otras dejaron de existir en el camino, y muchos más títulos han surgido, conforme se han multiplicado las disciplinas, el número de autores, y los consumidores.

En un mundo donde se publican ya cerca de 80.000 títulos, el sub-continente latinoamericano ofrece unos cuantos miles que, si bien compiten con desventaja, cumplen una función y tienen un sentido. La publicación científica culmina partes de un proceso que es la investigación y, ésta, se desarrolla con los recursos materiales y humanos de que se dispone. En muchos casos, además, esas mismas publicaciones vienen avaladas por sociedades científicas que han aulado esfuerzos y prestado su apoyo para conseguir que la actividad científica que desarrollan pueda ser conocida y beneficiarse, por ambas partes, del necesario intercambio (3). La labor de esas sociedades nunca será suficientemente reconocida y, sin embargo, han supuesto en la mayoría de los casos un auténtico acicate. También nosotros poseemos, aunque sea en parte, los medios de producción científica, y los empleamos para impulsar el desarrollo de nuestra ciencia y, con ello, nuestra contribución a la ciencia mundial. También desarrollamos investigacio-

nes de interés básico y aplicado y colaboramos en los que realizan otros países. Cuando la ciencia sea verdaderamente internacional, será porque se nutra de las aportaciones de colegas de todos los países al conocimiento universal. La diversidad de ambientes y de culturas, la complejidad de los problemas que requieren ser comprendidos y resueltos, la riqueza de disciplinas e interdisciplinas, nos obligan a crear y cultivar los espacios necesarios para recoger todas estas aportaciones.

Puede decirse que ninguno de los elementos que rigen en la publicación científica de los países de primera línea está ausente en las revistas latinoamericanas que se han mantenido, tras haber superado las diferentes cribas. Tampoco se puede negar la ausencia de un espíritu crítico que ha llevado en muchas ocasiones a replantearse los criterios de rigor y calidad que tenían que tener las publicaciones, tanto por iniciativa de la propia revista como para poder acceder a financiación por parte de organismos públicos. El requisito de que la revista aparezca en los índices internacionales puede decirse que es el de más peso a la hora de obtener ese apoyo público que en muchos casos es vital para su continuidad. A pesar de ello, los resultados no están en consonancia con el esfuerzo dedicado por parte de autores y editores.

Recientemente Richard Horton, director de *The Lancet*, refiriéndose a la diseminación de enfermedades infecciosas originadas en países en desarrollo, afirmaba (4) : “La única forma de entender este proceso y sus efectos, es publican-

do trabajos de los investigadores locales”. Bien, estamos de acuerdo en muchos aspectos, pero no en que sea la única forma, es necesario y, por ello, invitamos muy fraternalmente a los especialistas de otros países a leer nuestras revistas, a publicar en ellas, y a acercarse, así, a nuestros problemas comunes para entenderlos mejor. Somos muchos, afortunadamente, los seguidores de la ciencia que estamos convencidos de la gran contribución que se puede realizar desde esos países tan cercanos en tantos aspectos. El paulatino y esperanzador despegue que, a todas luces, se viene produciendo en los últimos años en el desarrollo de los diversos campos de la ciencia en nuestros países es necesario que sea reconocido en su medio natural, la publicación científica.

## References

1. Cetto, A. M. (1993). ¿Por qué producir revistas científicas en América Latina? *Science International* **52**, 33–34.
2. Cetto, A. M., Hillerud, K. I. (compiladores) (1995). *Publicaciones científicas en América Latina*, Fondo de Cultura Económica, México.
3. Chica, C., Berlanga, M. (1995). To be or not to be an editor of national non-indexed journals. Abstracts 8th IFSE Conference, Barcelona p. 86.
4. Gibbs, W. W. (1995). Ciencia en el tercer mundo. *Investigación y ciencia*. pp. 70–79. Diciembre.
5. Valerio, P. M. (1994). *Espelho da Ciencia. Avaliação do programa setorial de publicações em ciência e tecnologia da FINEP*, p. 141. FINEP/IBICT, Brasília.

## Kenia: la sabana científica\*

Alfredo Mayor

*ICIPE Science Press, Nairobi, Kenia*

Después de muchos años de predominio de instituciones carentes de dinamismo, África ha reconocido que no puede evolucionar sin revolucionar su base tecnológica. Esto ha llevado al convencimiento de que ciencia y tecnología son los mejores instrumentos para facilitar el desarrollo económico, político y social del continente. Paralelamente, se ha insistido en que el único camino para potenciar su base tecnológica es comprometer a la comunidad científica en la vida social y económica de los países. A raíz de estos argumentos, Kenia se ha propuesto la tarea de crear las relaciones necesarias entre ciencia, instituciones tecnológicas, industria y gobierno. Por supuesto, no es una tarea fácil y, en muchas ocasiones se corre el peligro de quedarse en buenas palabras.

En enero de 1974, tuvo lugar la Conferencia de Dakar, donde se propuso que cada país africano debería tener al menos, un departamento

responsable de la coordinación científica y tecnológica. En 1979, en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, celebrada en Viena, se sostuvo que las políticas nacionales de ciencia y tecnología serían los principales catalizadores en el proceso de desarrollo social y económico en África.

Pese al paulatino reconocimiento del papel de la ciencia en el desarrollo, los países africanos (y Kenia, su paradigma) no invierten ni en investigación, ni en formación de personal especializado, lo suficiente como para sostener la creatividad científica y la innovación tecnológica. Desde 1970, África ha gastado menos del 0,4% de su Producto Nacional Bruto en investigación, mientras que el mundo desarrollado invierte un 2,23%. El desarrollo científico y tecnológico no puede ir separado del establecimiento de una red institucional que facilite

\*Este artículo constituye un informe sobre la orientación y características del desarrollo científico y tecnológico en Kenia en investigación microbiológica y médica. Su autor ha colaborado durante cuatro meses en el Programa sobre Biotecnología y Desarrollo Científico del Centro Internacional de Fisiología y Ecología de Insectos de Nairobi. Además de su aportación al conocimiento de la situación en el país, el artículo ofrece datos de indudable interés microbiológico.

la transferencia de tecnología desde los países industrializados hacia África. Kenia ha desarrollado instituciones científicas y tecnológicas modernas, pero es aún deficiente en el establecimiento de una base científica propia. Esto ha hecho que la contribución de los centros de investigación haya sido siempre menor de lo que se esperaba para aumentar el desarrollo social y económico del país.

Un problema fundamental es que en Kenia las instituciones científicas y tecnológicas están totalmente desconectadas del sector productivo. La causa de esta descoordinación es doble. Por un lado, el sistema educativo ha primado la formación de tecnócratas y burócratas, al servicio de la organización administrativa de los gobiernos coloniales, sin preocuparse por educar al científico nativo. Por otro lado, ha sido necesaria una industrialización previa para desarrollar la economía, y reducir así la dependencia de los países avanzados. Pero, la sustitución de productos importados por autóctonos, exige incorporar la maquinaria y el personal técnico de los que carece el país. En Kenia, la relación entre ciencia e industria está tomando forma; pero, para continuar en una línea de progreso es necesario que los científicos sean vistos como generadores de nuevas ideas e innovaciones que estimulen la adaptación y el progreso industrial.

La carencia de equipamiento científico, que en gran parte ha de ser importado, retrasa los programas de investigación y desarrollo y es que los recursos económicos disponibles no permiten, o no se dedican a su adquisición y mantenimiento. Una solución, tanto para Kenia como para el resto de países africanos, es aumentar el flujo de ciencia y tecnología desde universidades y otras instituciones de investigación hacia el sector industrial, para reducir su dependencia de los países del Norte.

Por el momento, menos del 10% del financiamiento de la investigación en Kenia proviene

del sector privado. Las mayores aportaciones, aún insuficientes, están a cargo del *Kenya Agricultural Research Institute*, *Kenya Forestry Research Institute* y *Kenya Medical Research Institute*. La proliferación de centros científicos, que se caracterizan por su escasa productividad, contrasta con la carencia de recursos económicos e instrumentales.

La búsqueda de una atmósfera apropiada para la investigación ha planteado la necesidad de adoptar y difundir una cultura científica. Para ello, se ha empezado desde los niveles de la educación primaria incorporando los aspectos científicos y tecnológicos adecuados, se están abriendo museos de ciencia y tecnología, a la vez que se introducen estos temas en los programas de radio y televisión.

El perfil del investigador en Kenia sorprende cuando se considera desde la perspectiva occidental. Por ejemplo, hay un predominio masculino (91,2%), y la mayoría (38,5%) tienen de 31 a 35 años. Es difícil encontrar investigadores activos menores de 25 años. Estos rasgos provienen de factores socioculturales de la época postcolonial, cuando la educación estaba muy limitada (ahora ya mucho menos) a los hombres. Además, la escolarización, cuando la había, empezaba más tarde que en los países desarrollados.

Se puede apreciar claramente una escasez de investigadores jóvenes en los centros y esto plantea un problema de formación y reciclaje de personal. La falta de recursos económicos no permite la admisión de universitarios en los centros de investigación y esto desanima a los jóvenes a emprender carreras científicas. El flujo entre la universidad y los otros centros, que podría permitir cierta independencia científica, es mínimo. La solución pasa por un apoyo de la industria a los científicos locales y por el ofrecimiento de incentivos económicos a los jóvenes. El número de científicos en Kenia, según estadísticas de la UNESCO, constituye el

0,4% de la población activa frente al 1,1% de los países desarrollados. La presencia de científicos extranjeros es mínima (destaca la ausencia de investigadores españoles), debido al escaso interés de los países desarrollados en trabajar en las instituciones de Kenia, a la carencia de recursos económicos y a la desconfianza del papel de los inmigrantes en el mundo africano. Esta limitación sociocultural supone una traba para el flujo de conocimientos. La comunidad científica tiende a aislararse de los países desarrollados, con lo que no existe un trabajo integrado de los proyectos, aunque algunos centros empiezan a establecer gradualmente relaciones con centros extranjeros, como por ejemplo el ILRAD (International Laboratory for Research on Animal Diseases), que intenta conectar con instituciones españolas que trabajen con *Theileria*.

De la gran cantidad de centros de investigación instalados en Nairobi nos centraremos en cuatro de los más importantes para ofrecer una perspectiva del trabajo científico que se lleva a cabo en el país.

*The Nairobi Microbiological Resource Centre (MIRCEN)*: Fundado en 1977, forma parte de la Universidad de Nairobi, y cuenta con 16 trabajadores. Su objetivo es ofrecer la infraestructura necesaria para la cooperación entre laboratorios que estudian la aplicación de la genética microbiana a la agricultura. La investigación básica se centra en la colección y mantenimiento de cultivos, aislamiento, selección y ensayo de cepas de *Rhizobium*, procesos de fijación de nitrógeno y estudios de factores nutricionales y edafológicos que afecten a los microorganismos.

*International Laboratory for Research on Animal Diseases (ILRAD)*: Fundado en 1973 tiene 360 empleados, de los cuales 74 son científicos. Posee unas grandes instalaciones y es uno de los más reconocidos de Kenia. Hay

una intensa colaboración entre científicos nativos y extranjeros, y, a diferencia de los otros centros del país, se trabaja de forma constante y productiva. Su objetivo es servir de centro mundial para estudios sobre estrategias de control de las principales enfermedades animales. Al principio, la investigación se limitaba a dos de las enfermedades más importantes para el ganado del continente africano: tripanosomiasis y teileriosis. Para el futuro sus actividades se han ampliado a los patógenos cuyos vectores son la mosca tsetsé (*Trypanosoma*) y las garrapatas (*Theileria, Babesia, Anaplasma* y *Cowdria*). Se hace hincapié en la disección de los componentes moleculares de estos parásitos y las respuestas inmunitarias de los animales infectados. El centro ha sido pionero en Kenia en el desarrollo de métodos para cultivar las tres especies principales de tripanosomas, y en la determinación de las bases de la estructura antigénica de *Theileria parva* y sus variantes. Se están probando formas de inmunizar el ganado contra esas enfermedades con parásitos vivos atenuados. También se están publicando trabajos sobre los elementos celulares y humorales de la respuesta inmunitaria bovina, y varios estudios sobre citoquinas.

Se estudian también enfermedades del ganado transmitidas por garrapatas: anaplasmosis (*Anaplasma marginale*), babesiosis (*Babesia bigemina* y *B. bovis*), cowdriosis (*Cowdria ruminantium*), telieriosis tropical (*Theileria annulata*), y fiebre de la Costa Este (*Theileria parva*). Se han desarrollado vacunas basadas en la inoculación de parásitos vivos atenuados para *T. annulata*, *A. marginata*, *Babesia spp.*, *C. ruminantium* y *T. Parva*. Mediante el uso de RFLP en el material genético del parásito se han distinguido diferentes cepas de *T. parva*. Los RFLP fueron identificados por hibridación con secuencias repetitivas Tpr, ribosómicas y teloméricas. En estos momentos el centro está trabajando sobre el gen p67, de *T. parva*, que

parece un posible candidato para una nueva vacuna. Este gen se expresa en la superficie de los esporozoítos, y se ha demostrado que la inmunización con una forma recombinante de la molécula antigénica p67 protege aproximadamente a un 70% del ganado. La expresión estable del antígeno recombinante se consiguió en 1993 dirigiendo la proteína al espacio periplasmático, en vez de al citoplasma de *Escherichia coli*. Por otro lado, un antígeno de 200 kDa de *Babesia bigemina* se ha elegido como molécula candidata para el desarrollo de un método de selección de anticuerpos. El gen de 3,8 kb está clonado en un vector de expresión pGEX, y se está completando su secuenciación.

Otros grupos de trabajo caracterizan vacunas recombinantes virales que incorporan genes de vaca codificantes de citoquinas (construcciones con los genes de IL2, IL4 e IL6). En esta misma línea, se ha estudiado la posibilidad de generar bacterias atenuadas de *Salmonella* que contienen el gen p67. Varios recombinantes están ya disponibles, y se está comprobando su estabilidad en animales inoculados.

Pero el tema central de estudio del ILRAD es la tripanosirosis. Los estudios epidemiológicos se apoyan en trabajos de diagnóstico, como el desarrollo de reactivos, ELISAs, ensayos de hibridación y PCR. Paralelamente, varios antígenos de *Trypanosoma* se han clonado en sistemas de expresión de baculovirus. También se ha puesto a punto la técnica RADES-PCR (Randomly Amplified Developmentally Expressed Sequences by PCR), que permite la identificación rápida de genes de *Trypanosomas* expresados durante su desarrollo. Se ha comprobado que las VSG (Variable Surface Glycoproteins) de *T. congolense* estimulan la producción in vitro de TNFalfa por macrófagos, lo cual inicia una posible vía de control de la enfermedad.

El centro consta de un programa de impacto socioeconómico y ambiental, encargado de la

predicción y cuantificación de posibles consecuencias epidemiológicas, económicas, socio-culturales y ambientales de enfermedades en la producción de ganado. Este programa también evalúa los beneficios de intervenciones alternativas de control de las enfermedades en diferentes sistemas de producción y zonas agro-económicas de Kenia.

*Kenya Medical Research Institute (KEMRI)*: Es uno de los seis institutos públicos de investigación del Ministerio de Investigación, Ciencia y Tecnología. Es un centro biomédico, pionero en el estudio de la malaria. De especial interés es el trabajo que desarrollan dos científicos, el Dr. Michael Fried y el Dr. Patrick Duffy, quienes han publicado recientemente un artículo en *Science*. Su trabajo consiste en el estudio de un parásito malarial que afecta a mujeres embarazadas, y que abre un nuevo horizonte para el desarrollo de una vacuna. La malaria materna provoca anemia en la mujer, retraso en el crecimiento del feto, parto prematuro y, en ocasiones la muerte del feto. A diferencia de las formas comunes de malaria, el cuerpo no desarrolla fácilmente inmunidad contra el parásito, aparentemente debido a su unión a células de la placenta. Los estudios de estos investigadores han demostrado que en Kenia esta forma de malaria la sufren el 25–26% de las mujeres embarazadas. Las líneas de investigación en desarrollo se centran en el estudio de la reacción inmunitaria contra el parásito en la placenta, y en el aislamiento de la proteína núcleo a la que, al parecer, se une. Estos hallazgos permiten pensar en una vacuna después de aislar la molécula receptora que atrae los parásitos a la placenta.

*International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE)*: Fundado en 1969, dispone de 346 trabajadores, de ellos 118 son personal investigador. Suecia, Noruega, Holanda, Kenia, Francia, Dinamarca, Australia, Bélgica, Alemania,

y organismos como la FAO y la UNEP financian la investigación, esencialmente de tipo aplicado, que se realiza sobre insectos. Se trabaja sobre (1) vectores y plagas, que permitan plantear estrategias de control ecológico, (2) establecimiento de una comunidad científica y tecnológica sobre insectos, principalmente para formación de futuros investigadores, (3) colaboración e intercambio entre investigadores nativos y de países desarrollados, (4) publicación y divulgación de resultados e información. Pese a todos estos objetivos prácticos, el trabajo del centro se ciñe a aspectos esencialmente teóricos.

Se investiga en metodologías integradas de control de insectos y otros artrópodos relacionados directamente con plagas de cultivos y ganado, además de insectos vectores de enfermedades tropicales. El centro publica muchos documentos y pocos artículos en revistas internacionales. También hace varias contribuciones a libros y publica una revista profesional (*Insect Science and its Application*).

Uno de los más significativas contribuciones del ICIPE ha sido el descubrimiento de la base química de la comunicación y comportamiento de langostas, de interés para el control de estas plagas. Otros éxitos han sido el desarrollo de trampas efectivas para tsetsé libres de insecticidas, introducción de enemigos naturales contra plagas de cereales, y técnicas de control biológico de plagas de banana y cereales. Otro aspecto lo constituye el estudio de la biología y ecología de artrópodos para establecer formas de control autosostenibles.

A pesar de la enorme cantidad de pesticidas en uso, las plagas destruyen cerca del 40% de la producción mundial de alimento. Existe un aumento progresivo de las enfermedades transmitidas por insectos en humanos y animales. Los artrópodos han mostrado una gran habilidad para desarrollar resistencias a casi cualquier forma de pesticidas sintéticos, debido a su gran potencial

reproductivo y a la naturaleza estática de agentes de control no biológicos. Con la mayor necesidad de alimento durante los próximos años para una población en continuo crecimiento, y frente a la dificultad de conseguir nuevos y sustanciales incrementos en el rendimiento de las prácticas agrícolas, es urgente reducir las pérdidas en los países en desarrollo. Teniendo en cuenta estos principios impulsores, las actividades del ICIPE se concentran en las siguientes áreas, en orden de prioridad: biocontrol, resistencias huésped-planta, administración del hábitat (coordinación de prácticas culturales y sistemas agroecológicos), y pesticidas vegetales.

El programa de control de plagas de plantas tiene varias líneas de investigación. Una de ellas se centra en la langosta del desierto (*Schistocerca gregaria*), cuya forma gregaria es una de las plagas más perjudiciales en Kenia. El ICIPE intenta desarrollar un método de interrupción ecológico, fisiológico o etológico usando patógenos de la langosta. Por otro lado, recientemente, se ha descubierto que el sistema de feromonas de esta langosta es una mezcla compleja de sustancias volátiles emitidas en diferentes estadios del desarrollo del insecto, y se está estudiando uno de estos elementos, constituido por compuestos anafiláticos lineales, que parecen interrumpir la agregación en estadios ninfales. Paralelamente, se están considerando varios agentes biológicos de control. El protozoo *Malamoeba locustae* causa una disminución gradual de la población de langosta, debido a una caída en la fertilidad de las hembras, que retrasa la puesta de huevos e interrumpe el sistema reproductivo. Se está estudiando la posibilidad de una infección crónica con el protozoo para retrasar sustancialmente el crecimiento de la población, lo cual podría ser una forma útil de control de la plaga.

Otra línea de investigación inscrita en este programa se centra en insectos que se alimentan

de cereales como maíz y sorgo (*Chilo partellus* y *Busseola fusca*). La búsqueda de una forma de control empieza por investigar el comportamiento del insecto, su biología y ecología, para disponer del conocimiento básico que permita desarrollar una estrategia útil. En este sentido se han diseñado trampas bañadas de una feromonas sexual que atrae a *C. partellus* y *C. orichalcociliellus*, y se ha seleccionado entre varios genotipos de sorgo que han mostrado resistencia combinada a *C. partellus*. También se ha visto que *C. partellus* sucumbe al ataque de las avispas parasitantes *Cotesia flavipes*. Estas avispas atacan la larva de *C. partellus* en sus túneles en el interior de tallos, e inyectan de 30 a 50 huevos en el huésped, que muere en 3 días. El ICIPE importó estas avispas de Pakistán, y desde 1991 se han liberado en gran número en la costa de Kenia, donde las pérdidas mayoritarias en cultivos se deben a especies de *Cotesia*. Se han obtenido resultados positivos.

También se están estudiando agentes de biocontrol microbiológico. Los insectos sufren el ataque de *Bacillus thuringiensis* por sus propiedades entomopatogénicas. Una cepa local de esta bacteria es específica para *C. partellus* y se usa en pulverizadores acuosos en la zona de la costa. Esta técnica ha dado resultados positivos en el control de plagas de maíz y sorgo. Dentro de esta línea, se está intentando solucionar el problema del gorgojo de la banana (*Cosmopolite sordidus*), que ataca el rizoma de banana, y se han obtenido genotipos tolerantes del rizoma. Igualmente, se trabaja en la identificación de la tolerancia al nemátodo *Pratylenchus goodei*, que ataca a la planta.

El programa de control de vectores de enfermedades es una pieza clave dentro de las líneas de trabajo del centro. África constituye un ambiente ideal para insectos dañinos y artrópodos vectores de enfermedades que afectan a humanos y animales. Dos artrópodos en particular, la mosca tsetse (*Glossina* spp.) y las garrapatas,

son responsables de muchas de las pérdidas en el ganado. El impacto sobre el ser humano es muy grave, con enfermedades como malaria, enfermedad del sueño, filariasis linfática y oncocerciasis. Además, existe el fenómeno de las nuevas epidemias (enfermedades virales de Marburg y Ébola), cuya dinámica es un misterio, aunque se piensa en una posible transmisión por artrópodos.

La mosca tsetse transmite la tripanosomiasis animal (nagana) y humana (enfermedad del sueño). Como una primera forma de control, se han desarrollado trampas usando la capacidad atractiva de fenoles de la orina bovina. Actualmente, se están realizando estudios en feromonas de larviposición, que apuntan hacia futuros métodos de control de hembras grávidas. Los trabajos sobre *Trypanosomas brucei* se centran en el estudio de un complejo tripsina-lectina que parece controlar el establecimiento del parásito en el intestino de la mosca y se está tratando de correlacionar el potencial infectivo de la mosca con la actividad enzimática en el intestino.

Se están estudiando dos formas de biocontrol de las garrapatas. Una mediante el uso de un parasitoide (*Ixodiphagus hookeri*), que deja sus huevos en la garrapata (*Amblyomma variegatum*), y la mata. Otra, con hongos patógenos (*Beaveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliae*), que influyen en la fecundidad y supervivencia de garrapatas como *Rhipicephalus appendiculatus* (vector de la enfermedad de la fiebre de la Costa Este).

Existe una atractiva línea de trabajo que se centra en enfermedades tropicales humanas, especialmente malaria, fiebre amarilla, filariasis, leishmaniasis cutánea y visceral, y tripanosomiasis. La vía de biocontrol que se está estudiando más a fondo consiste en el uso de bacterias entomopatogénicas activas contra larvas de mosquitos. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) produce un cristal proteico tóxico que causa interrupción del intestino del insecto, y conduce

a su muerte. Han sido aisladas varias cepas de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), y se están realizando bioensayos con *Aedes aegyti*, *Anopheles* spp. y *Culex* spp. con clones *Bti*. A partir de estos estudios, se quiere desarrollar y perfeccionar un larvicio, mediante transferencia del material genético que codifica la proteína tóxica producida por *Bti* a otra bacteria (*Bacillus sphaericus*), de mayor persistencia en el ambiente. Se están haciendo progresos en la determinación del LD<sub>50</sub> de los clones de las dos bacterias. Por el momento, se han desarrollado biopesticidas a partir de *Bt* contra larvas de moscas.

Un producto del ICIPE, el Dusdustop, se ha empleado para sanear letrinas en áreas densamente pobladas. Para estos estudios de campo se usa un precipitado de *Bt*, producido en un fermentador de 2 m<sup>3</sup> (volumen de trabajo de 1200 l). Cinco meses después de empezar los ensayos, todas las concentraciones usadas permanecen efectivas en el control de las moscas. La concentración inicial de la preparación bacteriana no es, por tanto, determinante.

La Unidad de Microbiología del ICIPE concentra sus esfuerzos en la optimización de las condiciones de fermentación para la producción de pesticidas basados en *Bt*, la aplicación masiva en el campo de *Bt* serotipo HI (Dusdustop), y el aislamiento e identificación de las cepas de *Bt* insecticidas. La producción de formulaciones óptimas de los bioinsecticidas incluye la incorporación de cortinas para radiaciones ultravioleta y desarrollo de modos de aplicación. La producción de pesticidas basados en *Bt* se hace en un fermentador Biostat R<sup>E</sup> 15-1, tanto para trabajos de laboratorio como programas de campo más amplios. Se han establecido las condiciones para la producción de 10<sup>9</sup> cél/ml o 10<sup>9</sup> esporas/ml en 20 h. Las bacterias crecen en un medio de bajo coste, con materiales localmente disponibles, que incluyen soja, melaza y fosfatos.

Como *Bt* es sensible a la luz ultravioleta, es necesario incorporar protectores baratos de amplio espectro para que el patógeno retenga su actividad durante largos períodos de tiempo.

Se puede usar un sistema activo de matrices de levadura seca para encapsular *Bt var kurstaki*, de forma que mantenga su actividad biológica. Por otro lado, esporas y cristales de *Bt*, encapsulados junto con un extracto de levadura que contiene Orzan (lignosulfonato) o Coax (estimulante), muestran una viabilidad de la espora moderada, y retienen al menos un 50% de su toxicidad 30 y 14 h, respectivamente, después de exposición a una fuente de radiación ultravioleta.

Se están probando medios de fermentación que tratan la bacteria con varios conservantes. De ellos, el cloruro sódico y el ácido propiónico son los más prometedores. Junto a este trabajo sobre *Bt*, la Unidad de Microbiología continúa desarrollando controles de calidad de todos los microorganismos del Banco de Patógenos, que cuenta con aproximadamente 2000 muestras, la mayoría de las cuales se mantienen en glicerol a 4°C. Los organismos siguen siendo viables dos o tres años después.

El desarrollo de la agricultura, el control de las plagas mediante sistemas no contaminantes y el establecimiento de programas de salud para prevenir y controlar las enfermedades, en humanos y en animales, son las prioridades en el desarrollo científico de Kenia. Estas líneas de investigación responden al imperativo de que el trabajo científico tiene que armonizarse con las necesidades del país. Sin embargo, a pesar de los numerosos centros de investigación existentes, ni los resultados científicos ni los avances tecnológicos son los que cabría esperar. Falta personal experimentado, falta coordinación entre los centros y la universidad, aunque parece que se está tomando conciencia de estas carencias y se intenta poner remedio.

En cualquier caso, se está empezando a entender la importancia de la ciencia como instrumento de desarrollo, aunque existe un fondo de ignorancia que dificulta las posibilidades de los científicos. Un ejemplo es la mentalidad burócrata en la administración de los centros de investigación, los cuales disponen de un número exagerado de tecnócratas comparado con el de investigadores. Evidentemente, la carencia de recursos económicos es una barrera, pero también se hace necesario un cambio de actitudes que estimule la creación de un ambiente apropiado para el trabajo científico y el desarrollo de una cultura nacional que reconozca el papel de la ciencia en el progreso y el bienestar de los pueblos.

Pese a que los gobiernos africanos dicen apoyar los objetivos globales de rápida industrialización y desarrollo tecnológico para aumentar la producción nacional y la dinámica de una economía automantenida, los mecanismos para lograrlo no son efectivos. La partida económica dedicada a ciencia, desarrollo y formación de personal para mantener la creatividad y la innovación tecnológica es mínima. En este sentido, uno de los primeros objetivos sería la inversión económica en investigación agroalimentaria y agroindustrial para asegurar una autosuficiencia económica que permitiera mejorar la industrialización. El estímulo privado para financiar la investigación sería mayor si se confiara en la obtención de beneficios.

La Asociación de Universidades Africanas (AAU) debe desempeñar un papel muy im-

portante en el desarrollo científico de Kenia, destacando el nivel práctico de los estudiantes y permitiendo una colaboración entre universidades y el resto de institutos y centros de investigación. Estos esfuerzos están plagados de problemas con raíces históricas como son el fraccionamiento de África durante la época colonial y la dependencia de sus economías, políticas de desarrollo insostenibles, el alto nivel de analfabetismo, y la no adopción de una cultura científica.

Sería necesario crear una red de asociaciones científicas y tecnológicas que asegurara la existencia y correcto empleo del material adecuado, la formación y adiestramiento de los recursos humanos, la divulgación efectiva de los resultados de la investigación, el acceso a las redes internacionales de datos e información científica, la disponibilidad de recursos técnicos e infraestructura. Proporcionar incentivos para los investigadores es otro aspecto que el gobierno keniata empieza a considerar. Con este fin, es fundamental la comunicación y colaboración entre científicos y el sector industrial, ya que ambos colectivos se complementan.

Por último, hay un aspecto sociocultural que muchas veces se omite cuando se considera el desarrollo de estos países desde la perspectiva de los países avanzados, y es que la investigación y el desarrollo científico en África deben tener en cuenta los factores culturales del continente. Ninguna nación puede desarrollarse sin sufrir un proceso de evolución. Y esta evolución, empezando por la científica, no puede realizarse a expensas y/o en contra de la cultura del país.

## En el centenario de Ludwik Fleck

Juan J. Marcén

*Instituto Municipal de Salud Pública, Zaragoza, España*

Si el año 1995 fue el del centenario de la muerte de Pasteur, ampliamente recordado en medios especializados y profanos, 1996 es el centenario del nacimiento de Fleck, un oscuro médico polaco, casi desconocido, cuya contribución a la historia del pensamiento está siendo, por fin, reconocida.

Ludwik Fleck nació el 11 de julio de 1896 en la ciudad polaca de Lwów, actualmente Ucrania. Estudió medicina en la antigua universidad local, que por entonces vivía un esplendoroso renacimiento. Se sintió atraído por el novedoso campo de la microbiología y dirigió salas destinadas a enfermos de tuberculosis y de sífilis.

Fleck nunca se limitó a ser sólo médico. En las tertulias de su ciudad conoció las tendencias más novedosas de la psicología y la sociología, además de mantener una estrecha relación con la importante escuela filosófica de Lwów-Varsovia. El espíritu abierto de Fleck, su independencia y su curiosidad, se plasmarían en numerosos trabajos de investigación y, sobre todo, en su obra maestra *La génesis y desarrollo de un hecho científico*, publicada en Basilea el año 1935. En este libro, que pasó desapercibido en su tiempo, Fleck presentó un estudio histórico del

concepto de sífilis y de los descubrimientos que llevaron a la reacción de Wassermann, principal prueba para el diagnóstico de esta enfermedad y punto de partida de la serología.

Fleck se había formado en la escuela alemana de microbiología. Reflexionando sobre su experiencia profesional, y a la vista de la abundante bibliografía germánica, se aventuró en un asombroso vuelo solitario sobre las alas de la filosofía de la ciencia. El afán divulgador y el interés por la historia de las teorías científicas le llevaron a plantear la importancia que tienen los componentes psicológicos y sociológicos en los descubrimientos científicos. Fleck denominó “estilo de pensamiento” al sistema de creencias dominante en cada campo de conocimiento, y “colectivo de conocimiento” a la comunidad que mantiene un mismo estilo. Los distintos colectivos tienen dificultades para comunicarse entre sí; dentro de un colectivo de expertos se elabora un lenguaje esotérico y una organización que tiende a reforzar el estilo de pensamiento, orientando los experimentos e interpretando las observaciones. En condiciones habituales, los científicos mantienen una armonía de ilusiones que sólo se quebranta cuando se impone un nuevo estilo.

Fleck señaló las debilidades de la teoría microbiana de las enfermedades infecciosas, cuestionando sobre todo la noción de agente patógeno. Prefería referirse al ser humano como un complejo para cuyo desarrollo armonioso son absolutamente necesarias muchas bacterias, con lo que contribuyó al necesario cambio desde un paradigma microbiano a otro, que podríamos caracterizar como microcósmico. Fleck mantenía que el enfoque de la bacteriología se había desplazado desde el campo de la botánica hasta el de la medicina, cuyo estilo de pensamiento consideraba no biológico e influido por viejas ideas sobre los demonios microbianos causantes de enfermedades. En la actualidad, a pesar de nuestro mejor conocimiento de la microbiología, todavía persisten anacronismos que dificultan el enfoque adecuado de la interacción macrobio–microbios.

El ambiente político de la Alemania nazi impidió el reconocimiento de la obra de un judío polaco. La invasión de los ejércitos hitlerianos supuso para Fleck el comienzo de un amargo cautiverio. Internado en el “ghetto” judío de su ciudad natal, consiguió elaborar vacunas eficaces a partir de orina de enfermos.

Después de la guerra, el genial polaco continuó sus trabajos en Lublin y Varsovia, dirigiendo 50 tesis y publicando 87 trabajos de microbiología e inmunología. No volvió a publicar sobre filosofía de la ciencia. Su colaboración científica con el matemático Steinhaus se centró en el fenómeno de la leuquermia, o sea, la reacción de los leucocitos ante ciertas infecciones.

Durante años, el distanciamiento entre la ciencia del Este y la Occidental nos mantuvo en el olvido la obra de Fleck. Los últimos cuatro años de su vida transcurrieron en Israel, donde murió el 5 de junio de 1961. Un año más tarde aparecía el libro de Kuhn, *La estructura de las revoluciones científicas*, que contenía muchas de las concepciones del microbiólogo polaco. El impacto y difusión de ese libro renovó el interés por la “monografía casi desconocida de Ludwik Fleck” que Kuhn mencionó en el prefacio de su obra. (Véase el artículo de C. Chica “Los paradigmas perdidos. Thomas S. Kuhn (1922–1996)”, en este mismo número, pp. 641–646)

Hubo que esperar hasta 1979 para que apareciera la edición inglesa del principal libro de Fleck (*Genesis and Development of a Scientific Fact*, The University of Chicago Press, Chicago, 1979, ISBN 0-226-25325-2). Y hasta 1986 para que saliera en español (La génesis y desarrollo de un hecho científico, Alianza Editorial, S.A., Madrid, 1986, ISBN 84-206-2469-1). Las dos ediciones tienen una valiosa introducción de la que se han extraído los datos biográficos de esta nota. (Véase revisión del libro en este mismo número, pp. 667–668)

No es la primera ocasión en que se cubre de olvido a un científico y a su esclarecedora obra. Afortunadamente, las personas que trabajamos en los variados campos de la microbiología, tenemos en la vida y en la obra de Ludwik Fleck un estímulo ejemplar y un especial motivo de orgullo.

## ¿Investigación básica o aplicada?

José Olivares

*Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España*

Es motivo de preocupación creciente entre los científicos españoles oír hablar con insistencia de la tendencia a primar la investigación aplicada en detrimento de la básica. Esto es, del dominio del Desarrollo sobre la Investigación. Teniendo en cuenta que no hay investigación básica ni aplicada, sino investigación de calidad, no cabe establecer diferencias en cuanto al apoyo institucional se refiere. A una investigación básica de altura sigue tarde o temprano su desarrollo en un campo más o menos relacionado. El investigador por naturaleza es básico, profundamente fundamentalista. Tiende a preguntarse primero el porqué de las cosas antes que para qué sirven. Cuando averigua el porqué se ocupará, él mismo u otro, de su utilidad, y sólo si se encuentra motivado por alguna razón, como puede ser compromiso con quien financia la investigación, proyección social evidente, etc. Por ello, sin investigación básica potente no cabe aplicación importante.

Desde el pluralismo científico de Vannevar Bush, consejero de Roosevelt y Truman, al quasi dirigismo de hoy en todos los países y en la política de la UE (por motivos económicas, protección del medio ambiente, creación de

empleo) hay una gran diferencia. Aunque puede que ninguna postura sea la mejor, la del pluralismo científico ha dado hasta ahora mejores frutos. Prácticamente todos los adelantos científicos relevantes han llegado de la mano de la investigación básica, incluso en las áreas donde un gran apoyo dirigido (cáncer y sida) no se ha visto reflejado en resultados espectaculares.

El temor de los científicos hacia la investigación dirigida obedece a la falta de mentalización hacia esa forma de trabajar, motivada en parte por la ausencia de un tejido industrial que sirva de conexión entre ambas partes y el menor incentivo que encuentran. Se ha dicho que las universidades, con su libertad de cátedra, son las indicadas para el desarrollo de la investigación fundamental, mientras que los otros organismos públicos, como el CSIC, deben ocuparse del desarrollo. Pero se olvida que más del 90% de la investigación que se realiza en España, corresponde al trabajo de tesis doctorales. La falta de personal técnico especializado y, posiblemente, la inexistencia de otras salidas profesionales para los licenciados, ha determinado la constitución de grupos integrados principalmente por personal en formación. Todo el mundo

conoce la dificultad de sacar adelante un proyecto de tesis en un tema aplicado, carente, muchas veces, de la vistosidad de un tema básico, independientemente de su valía y utilidad. Esto hace que se rehuyan los temas cuyo desarrollo no permita el lucimiento del equipo investigador entre sus pares que, en definitiva, determinará su promoción y gratificaciones.

La evolución de la investigación es lenta. La aparición de resultados requiere su tiempo. La empresa desea plazos cortos. Le es más rentable adquirir patentes que desarrollar o contratar investigación, salvo que sea fiscalmente inducida a ello. Daniel Cohen en su libro *Genes para la Esperanza* (Seix Barral, 1994), afirma que la investigación privada sólo se justifica si el beneficio comercial está asegurado. Toda investigación comporta su parte de riesgo, por lo que difícilmente se puede convencer a los empresarios para que fomenten una investigación de resultados dudosos o cuyos principales beneficiarios sean los países en vías de desarrollo. Corresponde al gobierno suplir estas carencias con aportaciones a la investigación básica de calidad en los diferentes campos de la ciencia.

Por otra parte, la distinción entre investigación básica, que no tiene otro objetivo que el avance de los conocimientos, y la aplicada, con sus objetivos prácticos, no tiene ya razón de ser, cuando hoy día la transferencia del conocimiento fundamental desde la naturaleza a su aplicación puede ser muy rápida gracias a los avances científicos y a las nuevas tecnologías (enzimas de restricción, PCR).

Como había comentado anteriormente (Boletín nº 7 de la Sociedad Española de Genética), es necesario un equilibrio para evitar que las áreas de investigación que aumentan el conocimiento de los procesos fundamentales de la naturaleza, pero que no ejercen una repercusión inmediata la sociedad, sean relegadas, mientras que las áreas de importancia social,

pero de limitado interés científico sean sobrevaloradas. Este difícil equilibrio requiere una colaboración más activa e imaginativa entre los políticos de la ciencia con las comunidades científica e industrial.

Y en relación al apoyo a la investigación básica, se podría ampliar la propuesta que Arthur Kornberg expuso en una entrevista aparecida en la revista *Fronteras de la Ciencia y la Tecnología* (núm. 4, pp. 8–13, CSIC, 1994) sobre la financiación de los jóvenes investigadores. Según él, al joven que termina su formación postdoctoral y ha demostrado su valía, se le debería ofrecer subvención para desarrollar las ideas que estime oportunas, diciéndole: vuelva a los cinco años y cuéntenos lo que ha hecho. Esta genialidad, desde luego exagerada, llevaría aún más lejos el destrozo de los grupos y la balcanización de la ciencia, pero como idea se podría aplicar a los investigadores consagrados, que han demostrado, a lo largo del tiempo, después de una serie ininterrumpida de proyectos subvencionados, que son dignos de confianza. Podrían disponer de una ayuda durante cinco años sin tener que ajustarse a unos objetivos preconcebidos y al cabo de ese tiempo rendir cuentas. A mi entender, trabajar con unos objetivos previamente fijados, seca, ahoga la creatividad. Todo el mundo es consciente de la cantidad de ideas que por mor de justificar una subvención quedan en la cuneta y que posiblemente podían haber sido germe de algo quizás más interesante que el propio proyecto en marcha. Muchas de tales ideas nunca podrán ser objeto de un proyecto de los que se acostumbra a presentar a las instituciones. La modalidad de la DGICYT, vulgarmente conocida como de excelencia, pudiera ser útil en este sentido si se eliminara la necesidad de unos objetivos y un plan de trabajo. Este sistema contribuiría de forma importante al aumento de los conocimientos susceptibles más tarde de ser ampliados y desarrollados en su caso.

## Revisión de libros

### **La producción científica española en biomedicina y ciencias de la salud a través de las bases de datos SCI y SSCI. Estudio del período 1990–93 y comparación con el cuatrienio 1986–89.**

Isabel Gómez, Jordi Camí

*CSIC e IMAS, Madrid y Barcelona, 1996.  
2 volúmenes. 673 pp. Edición no venal.*

Esta publicación es el resultado de un laborioso estudio llevado a cabo por equipos del Centro de Información y Documentación Científica (CINDOC) de Madrid, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y del Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), de Barcelona. Han coordinado el trabajo Isabel Gómez Caridad y Jordi Camí. La publicación constituye la memoria final del proyecto FIS 950082(01/02) subvencionado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS).

Claramente expresado por los autores del trabajo, su objetivo ha sido cuantificar y caracterizar la producción española en biomedicina. La metodología con la que se ha llevado a cabo el estudio ha empleado indicadores bibliométricos agrupados en dos tipos: cuantitativos, que toman básicamente en consideración el nú-

mero de artículos para situar el lugar de la producción española en biomedicina en la producción internacional, y cualitativos, que estudian el tipo de investigación que se realiza y su influencia. Ambos enfoques se complementan, aunque no cabe duda que la información más utilizable y, por tanto más abundante tanto en éste como en otros estudios, es la de tipo cuantitativo. La situación de España en relación al resto de países se ha realizado por medio de indicadores de la actividad e índice relativo de citaciones.

En el trabajo se indican las revistas que se han utilizado, con el número de artículos por año y el factor de impacto. Se aporta detallada información sobre la producción científica por comunidades autónomas y por centros, y se analiza la producción en las distintas áreas temáticas. Se incorpora también un apartado donde se comparan los resultados obtenidos con los de otros países, principalmente de la Unión Europea. No falta en la presentación un comentario donde los autores exponen la utilidad, pero también las limitaciones, del trabajo; la dificultad de evitar riesgos de información sesgada cuando se trabaja con indicadores muy dependientes del tamaño de las muestras; y su utilización a efectos comparativos.

Los autores del estudio han analizado un número de hasta 21.434 trabajos sobre temas de biomedicina, recogidos en las bases de datos multidisciplinares del *Science Citation Index* (SCI) y del *Social Science Citation Index* (SSCI)

durante los años 1990 a 1993, en las que figura, como mínimo un centro español de investigación. La publicación de esos trabajos, de los cuales, un 88% son considerados "artículos citables" y el resto, básicamente, comunicaciones a congresos, se realizó en 1396 revistas (todas las cuales se detallan en el trabajo que comentamos). Durante esos cuatro años la producción científica española creció un 67,6% respecto al anterior período estudiado (1986-1989), alcanzando la sexta posición dentro de la Unión Europea, con una aportación del 5,3%. La gran mayoría de los trabajos, el 92,4%, están escritos en lengua inglesa,

De las distintas áreas temáticas, la mayor producción correspondió a las de bioquímica y biología molecular, (13%), manteniéndose la tendencia de la etapa anterior para ambas disciplinas, y el quinto lugar fue para la microbiología, con el 5,3% (Tabla 1). Respecto a colaboraciones entre centros, el 47,9% de los artículos fueron firmados por autores de un solo centro, mientras que el 17,8% fue resultado de una colaboración internacional, especialmente con países de la Unión Europea, seguidos de los Estados Unidos de América. La media de auto-

res por artículo fue de 4,5 y, como dato de interés, entre otros muchos, en el estudio se han registrado los centros de todos los firmantes de los artículos, no sólo del primero.

Las Comunidades Autónomas de Madrid (31,9%) y Cataluña (26,9%) concentran la mayor parte de la producción científica absoluta, seguidas por Andalucía (11,7%), Comunidad Valenciana (7,8%) y Castilla-León (5,2%). Cuando se relaciona la producción científica con el PIB o con el número de habitantes de cada comunidad autónoma, Navarra, Cantabria y Murcia se unen a Madrid y Cataluña en los primeros puestos.

En cuanto a la distribución entre los sectores institucionales, el 42,7% de los firmantes de los trabajos pertenecen a la universidad, el 39,6% al sector hospitalario y 7,7% al CSIC. Los centros o facultades más productivos son, en primer lugar, el Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, con 1057 artículos durante el período analizado, al que siguen, por este orden, el Hospital Ramón y Cajal de Madrid (595 artículos), el Centro de Biología Molecular de Madrid (566 artículos) y el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (491 artículos). La primera institución universitaria que aparece es la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, con 393 artículos.

Si nos centramos específicamente en el área temática de *microbiología*, del informe se deduce que la producción española ocupa el quinto puesto en Europa, por detrás del Reino Unido, Alemania, Francia y Holanda (Tabla 1). Durante ese período, la microbiología española contribuyó con 1135 artículos, todos escritos en inglés, que fueron publicados en 53 de las 59 revistas del SCI analizadas y alcanzaron un factor de impacto medio del 2,006. En cuanto a la distribución geográfica por provincias, Madrid (28,6%) y Barcelona (15,6%) ocupan los primeros puestos, seguidas por Sevilla (8,7%) y

TABLE 1. Lugar que ocupa la producción científica en microbiología por áreas y por países

Por áreas:

1. Bioquímica
2. Biología molecular
3. Neurociencias
4. Farmacología
5. Microbiología

Por países

1. Reino Unido
2. Alemania
3. Francia
4. Holanda
5. España

Granada (7,7%). Por comunidades autónomas, Madrid, Andalucía, Cataluña y Castilla-León se sitúan en cabeza. En cuanto a sectores institucionales, el 60,2% corresponde a la universidad, el 23,3% a los hospitales y el 14,2% al CSIC. Sin embargo, analizando el factor de impacto medio de las publicaciones, los hospitales ocupan el primer lugar, con un 2,277, seguidos del CSIC (2,051) y de la universidad (1,836).

Entre las diferentes áreas temáticas, la microbiología ocupa, en cuanto a número de artículos publicados, el puesto decimocuarto en los

son el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (56 artículos), la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (43 artículos), el Centro de Biología Molecular de Madrid (42 artículos) y la Facultad de Medicina de Oviedo (42 artículos). En cuanto a factores de impacto, lidera este período la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de León (2,941), seguida muy de cerca por la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria (2,915).

Merece la pena destacar que entre 1990 y 1993 sólo se han publicado 25 artículos de

TABLE 2. Relación de las diez revistas con más artículos de investigadores españoles

Revista	Número de artículos por año			
	1990	1991	1992	1993
FEMS Microbiology Letters	33	29	27	30
European J. Clinical Microbiology	18	17	36	25
Journal of Bacteriology	19	21	21	23
Applied and Environmental Microbiology	16	15	20	21
Antimicrobial Agents and Chemotherapy	21	19	13	14
Journal of Applied Bacteriology	11	9	11	15
Molecular Microbiology	3	8	12	21
Journal of Clinical Microbiology	12	8	12	12
Journal of General Microbiology <sup>1</sup>	11	12	10	10
Journal of Antimicrobes	7	10	14	12

<sup>1</sup> Su nombre actual es *Microbiology*

hospitales, el cuarto en la universidad, y el tercero en el CSIC. Debe tenerse en cuenta que en este estudio se separa la microbiología de la virología y la micología. En estos casos, por delante de ella se sitúan la bioquímica y biología molecular, las neurociencias y la farmacología/farmacología. Sin embargo, en cuanto a factor de impacto medio de las publicaciones en microbiología, éstas se encuentran en el duodécimo lugar en los hospitales, el decimoséptimo en la universidad y el vigesimoquinto en el CSIC. Los centros más productivos en microbiología

microbiología por parte de la industria, ya sea con autores únicos o en colaboración con investigadores de otros centros y sectores. Este dato no deja de llamar la atención, dado el interés manifestado, desde ámbitos gubernamentales, tanto estatales como autonómicos, en potenciar una investigación de rápida aplicación.

Las revistas internacionales de microbiología en las cuales se han publicado más artículos de investigadores españoles durante el período estudiado (Tabla 2) son *FEMS Microbiology Letters* (10,49%), *European Journal of Clinical*

*Microbiology* (8,46%), *Journal of Bacteriology* (7,40%), *Applied and Environmental Microbiology* (6,34%) y *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (5,90%).

En conjunto, la labor descrita en la publicación que revisamos es el trabajo más conseguido que conocemos sobre el análisis de la producción científica en un campo y país determinados (ciencias biomédicas en España) y hay que felicitar a los autores que han llevado a cabo un estudio tan detallado y riguroso.

Cuando Eugene Garfield, fundador del Institute for Scientific Information, y pionero del análisis cuantitativo de la producción científica, visitó Barcelona con motivo de su participación en el 8º Congreso de la International Federation of Scientific Editors, (IFSE) presentó un detallado análisis de la producción científica de diversos centros de Barcelona. Sin embargo, en su elaboración se habían cometido errores tan evidentes como contar en lugares separados el mismo centro según que su nombre constara en inglés, español o catalán en el apartado correspondiente. O también el de no registrar revistas europeas relativamente importantes pero prácticamente desconocidas en Estados Unidos. Por supuesto, no se pretende restar méritos a la labor, internacionalmente reconocida, de Eugene Garfield, quien, sin ninguna duda, ha realizado una de las aportaciones más significativas para la cuantificación de la producción científica.

No obstante, un trabajo de este tipo, induce también a reflexión y, en nuestro caso, en relación a la microbiología, (como seguramente lo será también respecto a otras materias), consideramos que delimitar una área científica es una tarea muy difícil, y registrar todas las revistas científicas donde pueden aparecer artículos, casi imposible. El área científica se define mejor por el contenido del artículo que por la revista que lo publica. Por otro lado, un artículo sobre distribución de *Vibrio* en

*Microbial Ecology* o en *Hydrobiologia* (revistas que no hemos visto entre las 59 estudiadas) no será considerado, mientras que sí lo será otro sobre la estructura de la pared de *Hypomicrobium* publicado en el *Journal of General Microbiology* (denominada *Microbiology* desde enero de 1994) o en el *International Journal of Systematic Bacteriology*.

La biología molecular, la bioquímica y la microbiología no son áreas excluyentes; mantienen muchos puntos de contacto y diversas zonas de superposición. Por ello, cuando se considera una subárea, como la microbiología, dentro de una gran área, "biomedicina y ciencias de la salud", deben considerarse otras "microbiologías" que no han sido recogidas. Un panel de expertos puede complementar en poco tiempo las deficiencias o imprecisiones que puedan detectarse.

El estudio refleja de manera clara, precisa y detallada la situación de la producción científica española en biomedicina durante el período 1990–93. Es de obligada consulta para los responsables de política científica de las diferentes administraciones públicas, facultades universitarias, CSIC, industria y de todas las entidades relacionadas con la investigación científica. Como ya hemos dicho, es un trabajo que estimula la reflexión sobre los indicadores disponibles para medir la actividad científica y sus posibilidades de mejora. Posiblemente, el resultado del trabajo sorprenderá a más de una persona.

Sería de desear que otros investigadores, capaces de dedicar el esfuerzo, interés e inteligencia que han mostrado los autores de este trabajo, acometieran idéntico trabajo en las diversas áreas del conocimiento científico, tecnológico y humanístico.

Jordi Mas-Castellà

Redacción de Microbiología SEM

## La génesis y el desarrollo de un hecho científico

Ludwick Fleck

*Alianza Editorial, S.A., Madrid, 1986. 200 pp.  
Precio: 1750 PTA. ISBN 84-206-2469-1.*

Hace diez años que apareció la traducción en español de este libro singular y, al igual que pasó con las ediciones en otras lenguas, también ha pasado bastante desapercibida. Ludwik Fleck escribió esta obra movido por su interés en la epistemología, estudio crítico de los principios, hipótesis y resultados generales que subyacen en la teoría y práctica científica. La edición original en alemán se publicó en 1935. La versión española, traducción de una edición alemana de 1980 de la editorial Suhrkamp Verlag, ofrece una excelente introducción a cargo de Lothar Schäfer y Thomas Schnelle, a modo de síntesis biográfica de Fleck, sobre quien apenas existe bibliografía.

Fleck se propuso dividir su discurso en cuatro capítulos simétricos: en el primero y tercero revisó la historia de la sífilis y de la reacción de Wassermann; en el segundo y cuarto analizó las consecuencias epistemológicas de los capítulos precedentes.

En el primer capítulo desarrolla la historia de la sífilis que, a lo largo del siglo XVI englobaba a todas las enfermedades de transmisión sexual. El mercurio fue el principal recurso terapéutico, incluso diagnóstico. En el siglo XIX surgieron multitud de interpretaciones contradictorias sobre las enfermedades venéreas. Fleck señaló que, según cómo se definía la sífilis, así se orientaban las investigaciones para obtener los resultados que respaldaban la definición inicial. Existía una conexión de estilo entre los conceptos de una época y las teorías científicas, basada en su influjo recíproco.

El ser humano ve de forma confusa los fenómenos naturales; su comprensión del mundo no

es posible sino a través de sistemas de creencias. Al final de este capítulo se relata el descubrimiento del agente causal de la sífilis que fue, según Fleck, el resultado del trabajo lógico y constante llevado a cabo por funcionarios, muy distinto del que condujo al descubrimiento de la Reacción de Wassermann.

En el segundo capítulo, el autor se propuso extraer consecuencias epistemológicas de la historia de la sífilis. Consideraba importante conocer la evolución histórica de las ciencias pues es imposible cortar los lazos con la historia y peligroso ignorar los acontecimientos pasados que marcan el desarrollo histórico. Muchos hechos científicos establecidos se encuentran unidos a ideas precientíficas.

A fin de explicar la evolución de las ideas científicas, Fleck acuñó el término *estilo de pensamiento*, como sistema de opiniones predominante en cada época y en cada campo del saber científico. Los hechos y las pruebas tienden a acomodarse al estilo de pensamiento; las contradicciones se intentan ignorar, rechazar o reinterpretar; se llega a una armonía de las ilusiones. Llega un momento en que los nuevos conceptos no tienen explicación dentro del estilo dominante, todo se vuelve más y más complicado.

El autor advirtió que muchas teorías viven dos épocas: primero una clásica, en la que todo curiosamente concuerda, y después una segunda, en que las excepciones comienzan a hacerse notar. Entre otros ejemplos, el autor señaló que la teoría microbiana de las enfermedades infecciosas, tras su éxito inicial, presentaba crecientes dificultades para explicar las infecciones que no se ajustaban a los postulados de Koch.

Para Fleck, el saber nunca es un proceso individual, sino que surge dentro del colectivo de pensamiento (comunidad científica que mantiene un estilo común), portador de conocimientos muy superiores al de los individuos que lo

componen. El autor se muestra especialmente irónico contra el sentimiento de que el desarrollo actual de la ciencia merezca una consideración especial, como si nos hubiéramos vuelto inteligentes de repente, y rechaza el viejo punto de vista bueno o malo aplicado a los estilos y colectivos de pensamiento. Concluye este capítulo señalando que el camino que proporciona las ideas y las verdades se mantiene sólo mediante el movimiento y la interacción.

En el comienzo del tercer capítulo, Fleck menciona que reflexionó durante bastante tiempo sobre cómo exponer la Reacción de Wassermann a alguien que no fuera especialista. Al documentarse sobre las investigaciones que tuvieron lugar en el año 1906, descubrió que el inicio de los trabajos fue motivado por decisiones políticas del gobierno alemán, y detectó graves errores en los planteamientos iniciales del equipo de Wassermann que no habían impedido que la investigación llegase al éxito práctico.

Para todos aquellos de nosotros que tuvimos que aprender y realizar fijaciones del complemento nos será especialmente ameno este capítulo, incluso divertido cuando el autor ironiza sobre la «intuición serológica» y sobre la primera lección del «catecismo» o manual de Citron de 1910. Es en este capítulo donde Fleck expone su crítica a la teoría del agente patógeno, rechazando el término invasión a cambio del de revolución en la unidad compleja de la vida.

El último capítulo es una extensa reconsideración sobre los temas que aparecen en los anteriores, con interesantes observaciones sobre la estructura de los colectivos de pensamiento (núcleos esotéricos rodeados de público creyente), sobre las diferencias bibliográficas

(ciencia popular, de revista y de manual), sobre la reducción de la bacteriología a sus aplicaciones médicas, sobre la variabilidad de las especies bacterianas.

En la nota final, Fleck propone su postulado del máximo de conocimientos: “Ningún sistema de conocimientos debe ser considerado cerrado de tal forma que puedan rechazarse nuevos conocimientos al ser considerados como superfluos.”

La redacción de la obra fue poco esquematizada, ningún capítulo se limita a desarrollar su título, sino que se enmaraña en múltiples disquisiciones y reiteraciones. Este defecto es disculpable en un texto lleno de espontaneidad y felices hallazgos, aunque exige paciencia en la lectura.

Fleck desafió la concepción ortodoxa de la ciencia, pero se mostró respetuoso con el sistema de adquisición de conocimientos. Descubrió las imperfecciones y limitaciones de los hechos y estilos científicos, pero confesó desconocer otro sistema que garantizara el avance de las ciencias.

Este es un libro conveniente para quien sufra el dogmatismo de la ciencia, valioso para los que sientan el deseo de conocer el lado más humano del saber. No es fácil su lectura, pero encierra abundantes destellos de sabiduría y genialidad. Sus observaciones son arriesgadas, intuitivas y muy discutibles. Para los profesionales de la microbiología, este libro constituye una excelente introducción al mundo de la filosofía de la ciencia, una lectura sentida que atempera la frialdad de la bibliografía especializada.

*Juan J. Marcén*

*Instituto Municipal de Salud Pública de Zaragoza*

## Gaia in Action. Science of the Living Earth

Peter Bunyard (ed.)  
*Floris Books, 1996. 351 pp. Precio: £ 14.99.*  
*ISBN 0-86315-202-2.*

La ciencia es un sistema de conceptos y de herramientas que nos sirve para conocer la naturaleza con la que vivimos y que proporciona además posibilidades de transformar algunos de sus fenómenos. Mientras que las culturas prehistóricas convivían con la naturaleza, usando la totalidad de la experiencia personal y tribal para ganar conocimiento, los seres humanos de las civilizaciones actuales tienden a situarse fuera de ella, negándose así un conocimiento real del medio natural.

El dualismo cartesiano (mente vs. materia) y la mecánica newtoniana iniciaron un proceso de disolución de nuestro ser natural, completado por Darwin, que redujo los organismos (incluyendo a los humanos) a objetos, aislandolos de su ambiente. La hipótesis (ahora teoría) de Gaia, propuesta hace ya más de veinte años por James Lovelock, en cambio, presupone que la Tierra se comporta como un organismo vivo unitario, en el cual sus diferentes componentes se interrelacionan simbióticamente para crear un conjunto integrado.

Las relaciones entre las diferentes partes que componen Gaia son, por lo tanto, relaciones de cooperación, de tal modo que no tiene sentido considerar ningún tipo de actividad aisladamente del resto. Gaia es también una teoría de la evolución. A diferencia del darwinismo, que propugna que las especies evolucionan para adaptarse a su ambiente, Gaia analiza el fenómeno como un proceso en el que las distintas formas de vida han co-evolucionado junto con su ambiente. Toda esta interacción ha permitido el mantenimiento de un flujo constante de materia y energía.

Varias de las ideas en que se sustenta la teoría tienen su origen en épocas anteriores a la que fuera expresada formalmente. Pero es a partir de su formulación cuando se suscitan interrogantes e hipótesis de trabajo en las mentes de los investigadores que se plasman en nuevos modelos matemáticos. Es indudable que a partir de esos modelos, la visión holista de los fenómenos que ocurren en nuestro planeta puede lograr un palpable avance en nuestro conocimiento y comprensión. El principio esencial de Gaia se demuestra empíricamente creando una biosfera auto-replicativa que mantenga activamente las condiciones óptimas para su supervivencia.

El objetivo de este libro, según las propias palabras de su editor, Peter Brunyard, es proporcionar al lector interesado los principales artículos relacionados con la teoría. Así, *Gaia in Action*, es una recopilación de artículos escritos por diversos autores, conocidos internacionalmente. Con la excepción de un par de capítulos (uno de ellos es una revisión histórica del concepto de simbiosis, de Jan Sapp; el otro, de Kate Rawler, ofrece una visión de las implicaciones éticas de la teoría de Gaia), el libro reúne las contribuciones a tres simposios celebrados en el Wadebridge Ecological Centre en Worthyvale Manor (Reino Unido), entre 1988 y 1990. La mayoría de los textos pertenecen al tercero de dichos simposios, que versó sobre "Gaia y simbiogénesis". A lo largo de los 21 capítulos, el lector se adentra en esta joven teoría desde sus diferentes puntos de vista, y se acerca a los últimos descubrimientos realizados bajo la mirada de este nuevo paradigma, que muestra, una vez más, la capacidad homeostática de la Tierra como sistema.

La obra ha sido editada por Peter Bunyard, uno de los fundadores de la revista *The Ecologist* y actualmente investigador del Wadebridge Ecological Centre (Cornwall, UK). Contiene

las contribuciones de veinticuatro conocidos científicos, entre los cuales citamos a James Lovelock, Lynn Margulis, Peter Saunders, Michael Whitfield, Brian Goodwin, Mae-Wan Ho, David Abram, Kate Rawles, Peter Westbroek, Elisabet Sahtouris, Ricard Guerrero, Jacques Grinevald, Wolfgang E. Krumbein y A.V. Lapo. A lo largo de sus 350 páginas, se explica el significado de la teoría de Gaia y las vicisitudes de su trayectoria, los descubrimientos que la apoyan y la trascendencia del modelo del universo de las margaritas. Se discute si la teoría ofrece una explicación de la composición química de la atmósfera y de los océanos y, por tanto, de la estabilidad climática, y cuál es el papel de la vida en el mantenimiento de estos equilibrios. Trata también de la simbiosis como mecanismo evolutivo y de su función (que ejemplifica con los fascinantes oasis abisales recientemente descubiertos y con los organismos edáficos), en el mantenimiento de la estabilidad ambiental, al permitir que los organismos que habitan y modifican un ambiente determinado obtengan allí mismo los recursos que precisan. Otros temas tratados son el desarrollo histórico de la idea de biosfera y del concepto de geofisiología, la proposición de que el orden y la coherencia son fenómenos que emergen naturalmente de la célula viva o las relaciones de mutualismo entre los organismos del suelo.

La obra no olvida cuestionar el papel de la ética en lo que se refiere a nuestra relación con el mundo natural, ni preguntarse si la teoría de Gaia posee o no valores inherentes. De hecho, este aspecto se trata ampliamente a lo largo de los seis últimos capítulos, y desde ópticas muy distintas. Se discuten cuestiones como las consecuencias epistemológicas de Gaia, o el papel de la industrialización y de la economía de mer-

cado en la alienación de los humanos respecto de la naturaleza. Este último punto se ilustra con el caso de una tribu amazónica, cuya economía se basa en la reciprocidad y el intercambio, situación comparable a los procesos de interdependencia que ocurren en la naturaleza.

Cada capítulo ofrece una bibliografía específica sobre el tema tratado. Al final del libro se presenta una relación (a cargo de Lynn Margulis) de obras más generales, que han sido divididas en dos apartados. Uno que contiene bibliografía profesional, o que exige un mayor conocimiento previo, y otro de obras divulgativas acerca de Gaia. Es obvio que ésta es una teoría que, por su visión globalizadora, ha calado en un público no necesariamente científico, interesado en temas sociológicos y de gestión ambiental. Por este motivo, el editor ha considerado adecuado proporcionar una información asequible al público en general.

La teoría heliocéntrica y la darwiniana contribuyeron a alejar al ser humano de la posición en el centro del universo que se había autoatribuido. Gaia acorta aun más, si cabe, nuestra modesta posición al atribuir a la especie humana un papel más, entre muchos otros, dentro de la gran “fisiología” terrestre.

Aceptada o criticada, pero no rebatida, Gaia ofrece una explicación coherente de la vida y la evolución en nuestro planeta y de las consecuencias de nuestras acciones sobre la totalidad del sistema. Consecuencias que ya no pueden considerarse de forma aislada, como tampoco las posibles soluciones, tanto para reparar el daño ocasionado como para impedir una mayor destrucción.

*Ugo d'Ambrosio*

*University of Massachusetts, Amherst, MA*

## Brock Biology of Microorganisms, 8th ed.

Michael T. Madigan,

John M. Martinko, Jack Parker

*Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1997. Precio: \$ 70. 986 pp.  
ISBN 0-13-520875-0.*

Fiel a la cita bienal a la que nos tiene acostumbrados, se acaba de publicar (con fecha de 1997) la octava edición del libro que los microbiólogos conocen como *el Brock*, en referencia a Thomas D. Brock, el investigador que inició la obra. La edición que comentamos incorpora incluso su nombre al título cuando Brock mismo deja ya de participar en su redacción. Madigan, Martinko y Parker se comprometen a mantener la consideración que ha gozado la obra desde que se publicó por primera vez en 1970. El libro, al que también se alude como BOM y, a partir de ahora, BBOM, sigue defendiendo la ciencia sólida y bien documentada, actitud que ha hecho de Brock uno de los principales investigadores y educadores de la universidad estadounidense en la segunda mitad del siglo xx.

Como ocurre con cada nueva edición, un primer examen puede dar la impresión de que las novedades en relación a la anterior versión son mínimas, excepto en los casos de cambios llamativos, como la ampliación de su formato o la incorporación del color a sus páginas en la quinta (esto último fue ignorado en las ediciones españolas, por lo menos en la sexta edición en rústica que hemos examinado, completamente en blanco y negro). Sin embargo, al comparar dos ejemplares separados por dos o tres ediciones se aprecia una notable diferencia.

Las personas familiarizadas con el libro observarán en la presente edición algunos cambios en su organización. Tras examinar un buen número de programas de cursos de introducción a

la microbiología y conocer la opinión de distintos usuarios, los autores trasladaron al final de la obra los capítulos de microbiología médica e inmunología. Por consiguiente, los capítulos sobre diversidad metabólica, ecología, evolución y los principales grupos microbianos se encuentran ahora a continuación de los que introducen conceptos básicos de microbiología y genética microbiana. También se ha desplazado el capítulo sobre crecimiento bacteriano, ahora a continuación de la nutrición y el metabolismo. En general, los autores han seguido las líneas didácticas de la American Society for Microbiology (ASM).

Como en anteriores ediciones, el texto ha sido revisado completamente, incorporando los últimos conocimientos, especialmente en el campo de la genética, que afectan a casi todas las áreas de la microbiología. De esta forma, han surgido dos nuevos capítulos, "Regulación de la expresión génica" (Cap. 7) con parte del material que se hallaba en el capítulo que ahora le precede, "Macromoléculas y genética molecular", donde confluyen el estudio de fenómenos ya clásicos, como la inducción y la represión génica, con conceptos muy nuevos relacionados con los mecanismos globales de regulación. El quimiotactismo bacteriano sirve de ejemplo para ilustrar el tema de la transducción de señales, proceso muy complejo de regulación, en el que intervienen sistemas con dos componentes. Este capítulo puede ahora centrarse en la síntesis de macromoléculas básicas y en las estructuras y proteínas básicas necesarias para llevar a cabo dicha síntesis.

El otro capítulo nuevo, "Control del crecimiento microbiano" se centra en el conocimiento del modo de acción de los antibióticos, los agentes quimioterapéuticos y otros utilizados para impedir el crecimiento microbiano. El capítulo dedicado a microbiología industrial contiene también información sobre antibióticos, pero

trata más bien de los mecanismos de aislamiento y caracterización y de su producción industrial, pasando por alto sus propias características. Aunque el BBOM informa ampliamente sobre la aplicación de la microbiología a campos tan distintos como pueden ser la medicina, la agricultura o el tratamiento de residuos, sigue teniendo a los microorganismos como protagonistas de esta obra no por lo que hacen, sino por lo que son. El estudio de la biología y la ecología de los microorganismos es el eje que vertebría el libro.

La calidad del BBOM como obra didáctica va pareja a su calidad científica. La presente edición incorpora algunos dibujos en los temas que se tratan por primera vez. El color predomina en los esquemas, dibujos y fotografías, excepto en las electromicrografías, con imágenes en blanco y negro, sin utilizar colores falsos, práctica llevada a cabo en algunos libros de texto. Los breves resúmenes al final de algunas secciones han sido substituidos por unos apartados que, bajo el título "revisión de conceptos", ofrecen un compendio de la sección, seguido de preguntas de autoevaluación.

Una novedad de la octava edición son las "llamadas" que, mediante una figura con dos eslabones de una cadena, remiten a otros lugares del libro donde se halla información relacionada con el tema que se está considerando. Sería algo así como la representación en "soporte papel" del hipertexto de la www de Internet. Referencia directa a este nuevo medio de comunicación y fuente de información, la hallamos al final de cada capítulo, tras una bibliografía actualizada. Un ícono nos recuerda la existencia de recursos "online" en la "web" que la casa editorial tiene en Internet, cuyo URL indicamos para quien desee consultarlos:

<http://www.prenhall.com/~brock>

Las preguntas al final de cada capítulo no son ninguna novedad, pero presentan ahora dos niveles de dificultad. El primer grupo son un complemento a las preguntas de cada apartado de revisión de conceptos. El segundo ofrece al estudiante la ocasión de probar su habilidad en la resolución de problemas y su capacidad de establecer relaciones entre distintos conceptos. Aunque ya presentes en la edición anterior, debemos mencionar también los útiles miniglosarios y los recuadros que ofrecen información adicional sobre temas destacados. Los recuadros comprenden tres categorías: referencias históricas, descripción de métodos o aplicaciones específicas de algún método microbiológico, y ampliaciones de aspectos particulares de algunos de los temas tratados.

Ahora que la mayoría de planes de estudio han reducido considerablemente los programas de microbiología, esta obra puede parecer excesiva para un curso general sobre la materia. Sin embargo, contiene todo lo que es necesario aprender y saber, independientemente de la organización y contenido de la asignatura. Con sus frecuentes ediciones, que incorporan la información que en campos como la genética aumenta considerablemente, el BBOM mantiene siempre su vigencia. Seguimos echando en falta una versión en castellano que se publique puntualmente, no cuando está a punto de aparecer la siguiente edición original, y que considere que una obra de microbiología debe cuidar no sólo el rigor científico de su contenido, sino también la corrección del lenguaje que facilita la exacta comprensión. Nos gustaría que este deseo se pudiera cumplir pronto.

*Mercè Piqueras*

*Redacción de Microbiología SEM*

## Careers in Microbiology. Choose Microbiology. The World of Microbes

Recopilado por Janet Hurst y Chris Thurston

© Society for General Microbiology, 1994

Dirección: SGM. Malborough House,  
Basingstoke Road. Spencer Wood, Reading RG7  
IAE, Reino Unido

E-mail: admin@socgenmicrobiol.org.uk

Siguiendo la recomendación del Prof. Jordi Barbé, solicitamos a SGM (Society for General Microbiology) el opúsculo *Careers in Microbiology*, sobre las salidas profesionales de los microbiólogos, que había sido anunciado en el boletín de mayo de 1996 de dicha sociedad (Quarterly SGM, 23:2). A los pocos días recibimos, además del mencionado opúsculo, el folleto *Choose Microbiology* y un magnífico póster a todo color sobre "El mundo de los microbios". Dicho folleto, que ha sido distribuido a todos los departamentos de microbiología del Reino Unido explica qué es la microbiología, indica las salidas profesionales y describe cómo obtener una formación adecuada para acceder a la profesión. Incluye un boletín de pedido para recibir *Careers in Microbiology*, que es una atractiva publicación de 16 páginas realizada por Janet Hurst y Chris Thurston, en la que se amplía aquella información a los estudiantes que se planteen seguir el camino de la microbiología. Se inicia con una breve introducción a la microbiología (Introducing Microbes) y a su finalidad (The Scope of Microbiology); sigue una descripción de sus distintos campos de acción (Areas of Employment) y especialidades, destacando sus relaciones con la medicina, industrias biotecnológicas (Microbes mean Business), de producción de alimentos y bebidas (Food & Drink), agricultura, protección ambiental (The Great Outdoors) y salidas profesionales relacionadas

indirectamente con la formación microbiológica. También se describen las posibles vías de formación: escuelas técnicas, licenciatura universitaria y estudios de postgrado (Courses and Qualifications). Cada apartado incluye la opinión personal de algunos jóvenes microbiólogos y microbiólogas, que describen el trabajo que llevan a cabo, cómo accedieron a él y cuáles son sus perspectivas de futuro. Finalmente, proporciona direcciones de entidades a las que se puede recurrir para solicitar información sobre aspectos específicos de diferentes campos profesionales, y recomienda la lectura de los libros *Microbes & Man*, de John Postgate, *Power Unseen: How Microbes Rule the World*, de Bernard Dixon [véase *Microbiología SEM* 10 (4), 449], y *The Outer Reaches of Life*, de John Postgate. Tanto el texto como el aspecto gráfico del opúsculo han sido muy cuidados. Quizás en busca de un mayor atractivo visual se ha caído en la práctica, por otra parte bastante frecuente en muchos libros de microbiología, de colorear la mayoría de fotografías de microorganismos. Una práctica a la que el Brock, en su 8<sup>a</sup> edición (véase la reseña en la página 671 de este número), ha renunciado, imprimiendo las micrografías en su color natural, es decir en blanco y negro. Aunque el folleto, el opúsculo y el póster hayan sido realizados por una sociedad científica británica y estén pensados para informar a los futuros microbiólogos del Reino Unido, creemos que pueden ser de utilidad en cualquier departamento de microbiología universitario o de escuela superior, independientemente de su ubicación geográfica. Al fin y al cabo, la ciencia y el conocimiento humano carecen de fronteras.

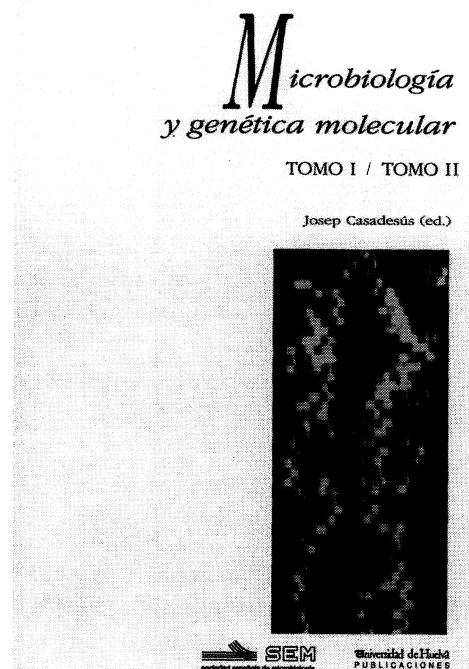
Este material puede solicitarse a la Society for General Microbiology, a la dirección indicada en el encabezamiento.

Ricard Guerrero  
Editor-coordinador

# *Microbiología y genética molecular*

*Josep Casadesús (ed.)*

Coedición de la Sociedad Española de Microbiología y la  
Universidad de Huelva



Precio: 6.000 PTA  
898 páginas, en dos volúmenes

ISBN: 84-88751-24-9

**Pueden hacerse pedidos a:**

Servicio de Publicaciones  
Universidad de Huelva  
Miguel de Unamuno, s/n  
21071 Huelva

Tel. y Fax: 959-251583

## **Algunos temas tratados:**

Genética de la virulencia de *Salmonella*. Mutagénesis por agentes alquilantes. Genética de microorganismos productores de  $\beta$ -lactamas. Viroídes. Ribonucleotidil reductasas microbianas. Desarrollo multicelular de myxobacterias. Virus RNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Estructuras del DNA y regulación de la transcripción. Polisacáridos capsulares de bacterias Gram positivas. Interacción molecular microbio-plantilla. Transducción de señales. Replicación del DNA. Capas cristalinas de la envoltura bacteriana. Regulación de la síntesis de aminoácidos en levaduras. Resistencia a quinolonas. Hidrogenasas de *Rhizobium*. Proteínas de tipo histona. Evolución de la función metabólica. Biología molecular de las micobacterias. Replicación de plásmidos mediante círculo rodante. Microbiología y genética de las bacterias del ácido láctico. Bacteriófago  $\phi$ 29. División celular de *E. coli*. Polisacáridos superficiales de *Rhizobium*. Apoptosis inducida por virus y bacterias. Metilación del DNA en bacterias y fagos. Retrotransposones en hongos filamentosos. Colicinas. Asimilación del nitrógeno. Poxvirus: su utilización como vacunas. Recombinación y estabilidad de secuencias repetidas de DNA en levaduras. Introducción en el ambiente de OMG.

LIBROS REVISADOS  
VOLUMEN 12

**Automated Microbial Identification and Quantitation.**

**Technologies for the 2000s.**

Wayne P. Olson (ed.)

*Interpharm Press, Inc. Buffalo Grove, IL, EE. UU., 1996. 397 pp. Precio: \$ 189.  
ISBN 0-935184-82-1.*

Revisado en 12 (3), 499–500

**Bacteriological Analytical Manual, 8th ed.**

*AOAC International, Gaithersburg, MD, EE. UU., 1995. Precio: \$145 (en Europa).  
ISBN 0-935584-59-5.*

Revisado en 12 (3), 501

**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.)*

Revisado en 12 (1), 137–138

**Brock Biology of Microorganisms, 8th ed.**

Michael T. Madigan, John M. Martinko,  
Jack Parker

*Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1996. 986 pp. Precio: \$ 70.  
ISBN 0-13-520875-0.*

Revisado en 12 (4), 671–672

**Careers in Microbiology. Choose Microbiology. The World of Microbes**

© Society for General Microbiology, 1994  
Revisado en 12 (4), 673

**Diccionario terminológico de ciencias médicas, 13<sup>a</sup> ed.**

*MASSON, S. A., Barcelona, 1995. 1648 pp.  
Precio: 11.100 PTA. ISBN 84-458-0095-7.*

Revisado en 12 (3), 487–488

**DNA Repair and Mutagenesis**

Errol C. Friedberg, Graham C. Walker,  
Wolfram Siede

*American Society for Microbiology. Washington, D.C., EE. UU., 1995. 698 pp. Precio: \$ 79.  
ISBN 1-55581-088-8C.*

Revisado en 12 (3), 493–494

**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.*

Revisado en 12 (1), 142

**Entendre la biodiversitat**

Xavier Bellés

*Edicions de la Magraner. L'Esparver Ciència, Barcelona, 1996. 162 pp. ISBN 84-7410-856-X.*

Revisado en 12 (1), 145

**Fields Virology, 3rd ed.**

Bernard N. Fields, David M. Knipe, Peter M. Howley (editors-in-chief)

*Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia EE. UU., 1996. 2 volúmenes, 3216 pp.  
Precio: \$ 339,50. ISBN 0-7817-0253-4.*

Revisado en 12 (3), 489–490

**Fonaments de Bioquímica**

Juli Peretó, Ramon Sendra, Mercè Pamblanco, Carme Bañó

*Universitat de València, 1996. 310 pp. Precio: 2.400 PTA.  
ISBN 84-370-2323-8.*

Revisado en 12 (3), 497–498

**Fundamental Virology, 3rd ed.**

Bernard N. Fields, David M. Knipe, Peter M. Howley (editors-in-chief)

*Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, EE.UU., 1996. 1340 pp. Precio: \$ 97,75.  
ISBN 0-7817-0284-4.*

Revisado en 12 (3), 489–490

**Gaia in Action.**

**Science of the Living Earth**

Peter Bunyard (ed.)

*Floris Books, 1996. 351 pp. Precio: £ 14.99.  
ISBN 0-86315-202-2.*

Revisado en 12 (4), 669–670

**Guía de Terapéutica Antimicrobiana, 6<sup>a</sup> ed.**

Josep Mensa, Josep M. Gatell, M. Teresa Jiménez de Anta, Guillem Prats, Manuel Corachan, M.

Carmen Escofet, José A. Martínez, Laura Zamora  
*MASSON, S. A., Barcelona, 1996. 475 pp.  
ISBN 84-458-0437-5.*

Revisado en 12 (2), 325–326

**Internet y medicina**

Luis G. Pareras

*MASSON, S. A., Barcelona, 1996. 702 pp.  
ISBN 84-458-0450-2.*

Revisado en 12 (2), 329–330

**Intoxicaciones por plantas y hongos**

Josep Piqueras

*MASSON, S. A., Barcelona, 1996. 153 pp.  
Precio: 5.400 PTA. ISBN 84-458-0416-2.*

Revisado en 12 (3), 495–496

**Introductory Microbiology***J. Heritage, E. G. V. Evans, R. A. Killington  
Cambridge University Press, Cambridge,  
Great Britain, 1996. 234 pp. ISBN 0-521-44977-4.  
Revisado en 12 (2), 328***La génesis y desarrollo de un hecho científico**

Ludwick Fleck

*Alianza Editorial, S.A., Madrid, 1986. 200 pp.  
Precio: 1750 PTA. ISBN 84-206-2469-1.  
Revisado en 12 (4), 667–168***La producción científica española en biomedicina y ciencias de la salud a través de las bases de datos SCI y SSCI. Estudio del período 1990–93 y comparación con el cuatrienio 1986–89.***Isabel Gómez, Jordi Camí  
CSIC e IMAS, Madrid y Barcelona, 1996.  
2 volúmenes. 673 pp. Edición no venal.  
Revisado en 12 (4), 663–166***Manual de terapéutica médica****El manual Washington, 9<sup>a</sup> ed.***Gregory A. Ewald, Clark R. Mckenzie  
MASSON - Little, Brown, S. A., Barcelona, 1996. 735 pp.  
ISBN 84-8227-013-3.  
Revisado en 12 (2), 326–327***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.  
Revisado en 12 (1), 137–138***Microbiología y genética molecular**

Josep Casadesús (ed.)

*Coadición de la Sociedad Española de Microbiología y la Universidad de Huelva. Publicaciones de la Universidad de Huelva, Huelva, 1995. 2 volúmenes.  
898 pp. Precio: 6.000 PTA.  
ISBN 84-88751-24-9.*

Revisado en 12 (3), 485–486

**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.  
Revisado en 12 (1), 143–144***Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed.***Patricia Cunniff (ed.)  
AOAC International, Arlington, VA, 1995.  
2 volúmenes. ISBN 0-935584-54-4.  
Revisado en 12 (1), 139–140***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.  
Revisado en 12 (1), 141***Science for the Earth****Can Science Make the World a Better Place?***Tom Wakeford, Martin Walters (ed.)  
John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, Gran Bretaña, 1995. 370 pp. Precio: £ 7,99.  
ISBN 0-471-95284-2.  
Revisado en 12 (3), 491–493***Vocabulario científico y técnico, 3<sup>a</sup> ed.****Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales***Editorial Espasa Calpe, S. A., Madrid, 1996. 1628 pp.  
ISBN 84-239-9407-4.  
Revisado en 12 (2), 323–324*

## 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. They will be written in English. 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 when indicated. 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., 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.

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 × 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, su redacción se solicitará a especialistas y se escribirán siempre en inglés. Sin embargo, si algún autor está interesado en publicar artículos de Revisión, podrá enviarlos a la revista. 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 que se indique. 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 desean más, deberá indicarse cuando se devuelvan las 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, España, 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

---

*Continued from p. 516*

Harlyn O. Halvorson  
Policy Center for Marine Biosciences and  
Technology  
University of Massachusetts-Dartmouth  
North Dartmouth, MA 02747-2300. USA

John L. Ingraham  
Department of Microbiology  
University of California-Davis  
Davis, CA 95616. USA

Juan Iribarri  
Departamento de Microbiología  
Universidad del País Vasco  
Apartado 644  
48080 Bilbao. Spain

Germán Larriba  
Departamento de Microbiología  
Universidad de Extremadura  
06071 Badajoz. Spain

Paloma Liras  
Área de Microbiología  
Facultad de Biología  
Universidad de León  
24071 León. Spain

Juan M. López Pila  
Institute for Environmental Hygiene  
Corrensplatz, 1  
D-1000 Berlin 33. Germany

Rubens López  
Centro de Investigaciones Biológicas  
CSIC  
Velázquez, 144  
28006 Madrid. Spain

Michael T. Madigan  
Department of Microbiology  
University of Southern Illinois  
Carbondale, IL 62901. USA

M. Benjamín Manzanal  
Dpto. Interfac. de Microbiología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Oviedo  
33071 Oviedo. Spain

David A. A. Mossel  
Eijkman Found. for Medical Research  
P. O. Box 6025  
3503 PA Utrecht  
The Netherlands

José Olivares  
Estación experimental del Zaidín, CSIC  
Profesor Albareda, 1  
18008 Granada. Spain

Juan A. Ordóñez  
Dpto. de Higiene y Microb. Alimentos  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
28040 Madrid. Spain

J. Claudio Pérez Díaz  
Servicio de Microbiología  
Hospital Ramón y Cajal  
28034 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. Rossmoore  
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

Francisco Ruiz Berraquero  
Rectorado  
Universidad de Huelva  
Plaza de la Merced  
21002 Huelva, Spain

Moselio Schaechter  
Department of Biology  
San Diego State University  
San Diego, CA 92182. USA

Hans G. Schlegel  
Institut für Mikrobiologie  
Universität Göttingen  
Grisebachstraße 8  
D-37077 Göttingen. Germany

Marie-Odile Soyer-Gobillard  
Dépt. de Biologie Cellulaire et Moléculaire  
Observatoire Océanologique  
CNRS  
66651 Banyuls-sur-Mer. France

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  
Pg. Marítim, 25-29  
08003 Barcelona. Spain

Hans G. Trüper  
Institute of Microbiology  
University of Bonn  
Meckenheimer Allee, 168  
D-5300 Bonn 1. Germany

José A. Vázquez-Boland  
Departamento de Patología Animal I  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
28040 Madrid. Spain

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

AUTHOR INDEX  
VOLUME 12

- Abecia, L. C., 613  
Acero, N., 417  
Agüero, J., 207  
Aguilar, J., 99  
Alkenany, K. I., 91  
Amils, R., 75  
Arévalo, J. M., 613  
Ayala, F. J., 163  
Azañedo, L., 607  
Bandín, I., 439  
Barja, J. L., 439  
Barredo, J. L., 359  
Bartolomé, C., 51  
Beier, D., 185  
Béjar, V., 55  
Benítez, T., 371  
Berche, P., 245  
Bernárdez, I., 51  
Blanco, J. E., 385  
Blanco, J., 385  
Blanco, M., 385  
Blanco, P., 449  
Boquete, M. T., 607  
Borrego, J. J., 425  
Bosch, A., 489  
Brehm, K., 219  
Caba, M. A., 55  
Caldwell, D. E., 347  
Calonje, M., 599  
Calvo, C., 55  
Cetto, A. M., 647  
Cascante, M., 497  
Chakraborty, T., 237  
Chapman, M., 571  
Chica, C., 641  
Codón, A. C., 371  
Colwell, R. R., 519  
Cornelis, G. R., 267  
Costerton, J. W., 347  
d'Ambrosio, U., 142, 145, 669  
Davies, J., 9  
de Lucas, J. R., 585  
de Pedro, M. A., 485  
Demnerová, K., 85  
Díaz, M., 585  
Díez, B., 359  
Dixon, B., 321  
Dizer, H., 525  
Dodd, H. M., 61  
Dolan, M., 29  
Dorau, W., 525  
Dornand, J., 197  
El-Sabaeny, A. H., 411  
Esteve, I., 563  
Fernández de Castillo, A., 117  
Fernández, I., 585  
Fernández, L., 385  
Fernández, M. J., 385  
Ferrer, M. R., 55  
Fouces, R., 359  
Frias, C., 395  
Fuchs, T. M., 185  
Gaju, N., 563  
García Mendoza, C., 107, 307, 457, 599, 621  
García-del Portillo, F., 259  
Ghanem, K. M., 593

- Giménez Martín, G., 465  
Gozalbo, D., 443  
Graeff-Wohlleben, H., 185  
Gross, A., 197  
Gross, R., 185  
Guerrero, R., 131, 323, 523, 563  
Guillemette, T., 571  
Gutiérrez Mañero, F. J., 417  
Gutiérrez-Martín, C. B., 171  
Halvorson, H. O., 343  
Hidalgo, E., 99  
Hinkle, G., 17  
Iborra, A., 443  
Iriarte, M., 267  
Isamat, D., 117, 137  
Ivanovsky, R. N., 317  
Jean-Mairet, Y., 43  
Keller, E. F., 127  
Köhler, S., 197  
Králová, B., 85  
Kreft, J., 219  
Laborda, F., 585  
Liautard, J. -P., 197  
Limón, A., 99  
Llimona, X., 495  
Llobet, T., 395  
López Piñero, J. M., 469  
López, M. J., 613  
López, N. I., 557  
López-Pila, J. M., 525  
Lorén, J. G., 405  
Lucas, J. A., 417  
Ludwig, A., 281  
Luttikhuizen, F., 477  
MacIntyre, F., 29  
Majò, M., 395  
Marcén, J. J., 659, 667  
Marcén, J.-J., 143  
Margall, N., 395  
Margulis, L., 29, 571  
Martín, F., 43  
Martin-Bourgon, C., 607  
Martínez, P., 371  
Martínez-Checa, F., 55  
Mas, J., 563  
Mas-Castellà, J., 139, 493, 663  
Mata, M., 51  
Mayor, A., 487, 491, 651  
Mellado, E., 359  
Méndez, B. S., 557  
Meseguer, I., 75  
Mirelis, B., 395  
Mora, A., 385  
Moriñigo, M. A., 425  
Morrison, H. G., 17  
Muñoz, M. A., 425  
Navarrete, A., 117, 141, 328, 499  
Navas, J., 297, 305  
Nieto, J. M., 481  
Novaes-Ledieu, M., 599  
Olendzenski, L., 29  
Olivares, J., 661  
Orrego, C., 7  
Palomar, J., 435  
Pedregosa, A. M., 585  
Pettinari, M. J., 557  
Piqueras, M., 329, 671  
Platas, G., 75  
Prado, C., 385  
Prats, G., 395  
Probanza, A., 417  
Quesada, E., 55  
Ràfols, D., 501  
Ramos, B., 417  
Reboredo, N. M., 449  
Río, M., 385  
Ripio, M. T., 219  
Riquelme, M., 537  
Rius, N., 405  
Rodríguez, C., 325, 326  
Rodríguez, F., 425  
Rodríguez, J. M., 61  
Rodríguez, M., 359  
Rodríguez-Barbosa, J. I., 171

- Rodríguez-Ferri, E. F., 171  
Romalde, J. L., 547  
Rouquette, C., 245  
Sabra, W. A., 593  
Sabry, S. A., 593  
Sáez-Nieto, J. A., 607  
Sáinz, V., 385  
Sánchez, J. M., 425  
Sangari, F. J., 207  
Santos, Y., 439  
Schaechter, M., 7  
Sentandreu, R., 443  
Sieiro, C., 449  
Silberman, J. D., 17  
Silhánková, L., 85  
Sogin, M. L., 17  
Taj-Aldeen, S. J., 91  
Talavera, A., 43  
Tascón, R. I., 171  
Teal, T. H., 571  
Toranzo, A. E., 439  
Torralba, S., 585  
Trüper, H. G., 473  
Valentová, O., 85  
Valle, L., 425  
Vázquez-Boland, J. A., 167, 171, 219, 305  
Villa, T. G., 449  
Villanueva, J. R., 631  
Viñas, M., 435  
Vindel, A., 607



## **GLOSARIO DE TERMINOS EN ACUICULTURA**

La Acuicultura ha experimentado en España un gran desarrollo en los últimos diez años, debido en gran parte a los diferentes planes de I+D. Este desarrollo ha tenido como efecto secundario no deseado, que se hayan incorporado al léxico especializado de esta disciplina muchos términos foráneos (extranjerismos) y traducciones heterogéneas en unos casos y en otros inadecuadas.

Este glosario tiene como finalidad primordial intentar homogeneizar y racionalizar la terminología específica utilizada en este campo. Recoge unos dos mil términos, que incluyen desde la estricta nomenclatura científica de especies de interés en Acuicultura, y su denominación popular, hasta los que designan aspectos biológicos,

técnicas, procesos o equipos relacionados con ella.

Cada término en castellano, seguido de sus sinónimos, va acompañado de su correspondencia en inglés, francés, italiano y alemán y el nombre científico latino, cuando corresponde. El glosario se completa con varios índices: el primero de términos científicos y a continuación los de cada uno de los idiomas indicados que remiten al término castellano correspondiente.



Centro de Información y Documentación Científica  
CINDOC

Joaquin Costa, 22 - 28002 Madrid (España)

Tels.: (91) 563 54 82/87/88. Fax: (91) 564 26 44

E-mail: sdi@cti.csic.es



Para su adquisición enviar este boletín acompañado de talón bancario nominal a nombre del CINDOC o fotocopia de giro postal por un importe de 3000 Pts. (IVA incluído).

### **BOLETIN DE PEDIDO**

Nombre ..... Dirección .....

Población ..... Provincia ..... Cód. Postal .....

KEY WORD INDEX  
VOLUME 12

**A**

- Acremonium chrysogenum*, 359  
ActA nucleator, 237  
*Actinobacillus pleuropneumoniae*, 171  
actin-based motility, 237  
actynomycetes, 297  
*Agaricus bisporus*, 599  
aggregated mycelium, 599  
alginate production, 593  
amitochondriate protists, 29  
anaerobic digestion, 425  
anoxic ecosystems, 563  
antibiotic resistance, 9  
Apx toxins, 171  
*Aspergillus nidulans*, 585  
    *niveus*, 91  
autopoiesis, 347  
*Azotobacter vinelandii*, 593

**B**

- bacterial  
    growth, 593  
    pathogenicity, 281  
    virulence, 219  
bacteriocin, 61, 75  
biofilms, 425  
biological control, 537  
biosurfactants, 55  
biosynthesis, 593  
*Bordetella pertussis*, 185  
*Brucella*, 197, 207  
buffering capacity, 405

**C**

- Candida albicans*, 443, 613  
cell  
    culture, 395  
    ultrastructure, 563

- chemical structure, 599  
*Chlamydia pneumoniae*, 51  
chromosomal polymorphism, 371  
community  
    theory, 347  
    -acquired pneumonia, 51  
culture  
    conditions, 55  
    media, 439  
cyanobacterial-algal overgrowth, 525  
cysteine, 439  
cytokines, 197  
cytolysins, 281

**D**

- Darwinian selection theory, 347  
denitrification, 417  
*Dipodascus magnusii*, 85  
DNA  
    detection, 557  
    uptake, 435  
dried whey, 411

**E**

- electron microscopy, 563  
electrophoretic karyotype, 371  
electroporation, 435  
endoglucanases, 91  
Enterobacteriaceae, 9  
enterohaemorrhagic strains, 385  
environmental samples, 557  
enzyme  
    activity, 85  
    immunoassay, 395  
    purification, 91, 585  
epidemiological markers, 607  
ergosterol, 613  
*Escherichia coli*, 99, 385, 395

eukaryotic lineages, 17  
 exopolysaccharides, 55, 593  
 extracellular enzymes, 91

**F**

*FLO1* and *FLO5* genes, 449  
 fluconazole, 613  
 fluidized-bed digesters, 425  
 food microbiology, 385  
 FPLC, 85  
 free-living spirochetes, 571  
 fungal susceptibility, 613

**G**

Gaia, 347  
 $\beta$ -galactosidase, 585  
 $\beta$ -galactoside substrates, 585  
*gap* gene, 99  
 gene  
   acquisition, 9  
   duplication, 99  
   exchange, 9  
   mapping, 449  
   products, 207  
   targeting, 43  
 genetic probes, 547  
 glucose-6-P dehydrogenase, 85  
 $\beta$ -glucosidase, 91  
 glyceraldehyde-3-P dehydrogenase, 99

**H**

$H^+$  conductance, 405  
 haemolysins, 281  
 haloarchaea, 75  
*Halobacterium halobium*, 405  
 halocin, 75  
*Haloferax mediterranei*, 75  
 halophilic bacteria, 405  
 heavy metals toxicity, 417  
 hemoglobin, 359  
 hepatitis A virus, 547  
 heterologous gene expression, 443

homologous recombination, 297

horizontal  
   gene transfer, 9  
   transfer, 99

host resistance, 197  
 hydroxamate, 537

**I**

in situ transcription, 547  
 in vivo growth, 439  
 indirect immunofluorescence, 51  
 industrial yeast, 371  
 infección  
   cycle, 219  
   processes, 245  
 integration, 43  
   defective mutants, 43  
 intracellular  
   parasitism, 219, 245  
   proliferation, 259  
   survival, 207  
   trafficking, 259  
 invasins, 267  
 iron competition, 537

**K**

kinetids, 29  
 kingdom and phyla definitions, 29

**L**

lactic acid, 411  
 bacteria, 61  
 dehydrogenase (LDH), 411  
*Lactobacillus delbrueckii*, 411  
*Lactococcus lactis*, 61  
 lantibiotics, 61  
*Leptospira*, 571  
*Listeria monocytogenes*, 237, 245  
*Listeria* pathogenesis, 219  
 listeriosis, 245  
 lipopolysaccharide, 171  
 lysosome, 259

**M**

- macrophages, 197  
 membrane permeability, 405  
 meningoencephalitis, 245  
 methanogenic bacteria, 425  
 microbial interactions, 537  
 microfiltration, 525  
 mtDNA polymorphism, 371  
 molecular systematics, 17  
 mRNA, 443  
 mycoses, 613  
 Myf fibrillae, 267

**N**

- NAD/NADP, 85  
 nisin, 61  
 Norwalk viruses, 547  
 nosocomial infections, 607  
 nutrient requirements, 439

**O**

- O-antigen, 435  
 outer membrane proteins, 171, 207

**P**

- pathogenic nocardioforms, 297  
 patients sex and age, 51  
 PCR, 395, 557  
 penicillin, 359  
 phage-typing, 607  
 phagocytosis, 197  
 phagosome, 259  
 phospholipase D, 297  
 phosphoprotein (VASP), 237  
 phylogeny, 17  
 plasmids, 443  
 polyphosphate, 557  
     kinase, 557  
 production optimization, 75  
 profilin, 237  
 proliferation theory, 347  
 protists, 17  
 public health, 525  
 purple sulfur bacteria, 563
- R**
- Renibacterium salmoninarum, 439  
 respiratory tract infection, 51  
 retroviral vectors, 43  
 retrovirus, 43  
 rheology, 55  
 RTX-toxins, 281
- S**
- Saccharomyces cerevisiae*, 371, 443, 449  
*Salmonella*, 259  
 sensor proteins, 185  
 sepiolite, 425  
 serotype O157:H7, 385  
 serotyping, 607  
*Serratia marcescens*, 435, 607  
 sexual life cycles, 29  
 shellfish quality, 547  
 siderophore, 537  
 single cell protein (SCP), 411  
 soil  
     microbiota, 417  
     respiration, 417  
*Spirochaeta bajacaliforniensis*, 571  
     *halophila*, 571  
 spirochete desiccation resistance, 571  
*Spirosymplokos deltaeiberi*, 571  
 statistical analysis, 417  
 storage inclusions, 563  
 strain improvement, 359  
 substrate affinity chromatography, 585  
 surface proteins, 449
- T**
- toxin promoters, 185  
 transcripcional activation, 185  
 transformation efficiency, 435  
 transposon mutagenesis, 297  
*Treponema*, 571

**U**

undulipodia, 29

**V**

vasodilator stimulated, 237

vegetative mycelium, 599

verotoxins, 385, 395

virulence

    factors, 171, 207, 281

    gene regulation, 219

    regulation, 185

*Volcaniella eurihalina*, 55

**W**

wall polysaccharides, 599

wastewater treatment, 525

water pollution, 525

**Y**

yeast flocculation, 449

*Yersinia*, 267

Yop proteins, 267

Yst enterotoxin, 267

**Other**

7-aminocephalosporanic acid (7-ACA), 359

16S rRNA, 17

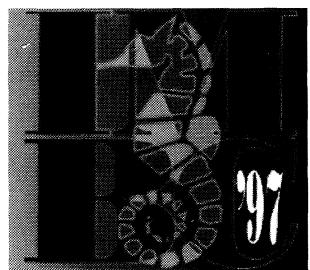
Socios Protectores de la  
Sociedad Española de Microbiología

**bioMérieux España, s.a.**

**Francisco Soria Melguizo, S.A.**

**Valenciana de Acuicultura, S.A.**

**Gamaser, S.L.  
(grupo de aguas de Valencia)**



# 4<sup>th</sup> International Marine Biotechnology Conference

## IMBC '97

22–29 September 1997

Sorrento, Paestum, Capo Rizzuto, Oranto Pugnochiuso – Italy

IMBC '97 will consist of two phases: Phase I will take place in Sorrento from September 22 to 25 and will focus on research presentations and poster sessions. Phase II will consist of a four-day scientific working tour of southern continental Italy: In the evenings, Keynote lectures will be delivered by: B. S. Blumberg, Philadelphia, USA, A. Kornberg, Standford, USA, J. Lederberg, New York, USA, M. Rodbell, Research Triangle Park, USA, H. K. Schachman, Berkeley, USA, M. Smith, Vancouver Canada.

Conference accomodation, meals and transportation during the program will be covered by grant from the European Union, the Italian Goverment and the Stazione Zoologica "Anton Dohrn". The program is totally integrated and attendance for both phases is mandatory. A fee of US\$ 300 (not refundable) is due for organizational expenses.

**Harlyn O. Halvorsen**, Dartmouth, USA  
Chair, International Organizing Committee

**Lucio Cariello**, Naples, Italy  
Chair, National Organizing Committee

**Frank Gaunon**, Heidelberg, Germany  
Chair, International Program Committee

**Gaetano Salvatore**  
President, Stazione Zoologica

### Pugnochiuso Topics

#### I. Marine Organisms as Biological Models for Marine Biotechnological Biomedical Applications

- Cell and Molecular Biology
- Developmental Biology
- Biomedical Implications
- Environmental Adaptation and Evolution
- Others

#### II. Natural and Cultural Industrial Marine Resources in Marine Biotechnology

- Aquaculture
- Fisheries; Biology and Management
- Natural Products
- Conservation
- Others

#### III. Marine Biotechnological Interactions

- Bioremediation
- Extremophiles
- Host-Pathogen Interactions
- Biodiversity
- Symbiosis
- Viruses
- Others

#### IV. Social-economic and Regulatory Aspects of Marine Biotechnology

- Marine Policy Issues
- UN Convention of Law of the Sea
- Intellectual Property
- UN Convention on Biodiversity
- Others

Deadline for abstract submission is January 15, 1997. Acceptance is subject to stringent peer review. Each participant may submit only one abstract and may not coauthor more than two abstracts.

**For further information and advance registration contact:** IMBC '97, Attn. Donatella Capone. Stazione Zoologica "Anton Dohrn", Villa Comunale. I-80121 Naples, Italy.  
Tel.: +39-81-5833215. Fax: +39-81 764 1355. E-mail: imbc@alpha.szn.it



## Boletín de inscripción

El que suscribe solicita ser admitido en la SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA en calidad de **socio numerario/estudiante\*** y se compromete a cumplir las normas reglamentarias.

Apellidos ..... Nombre .....

Titulación .....

Domicilio particular ..... Teléfono .....

Ciudad ..... CP ..... Provincia .....

Lugar de trabajo.....

Dirección .....

Teléfono ..... Fax ..... E-mail .....

Ciudad ..... CP ..... Provincia .....

¿Desea pertenecer a algún grupo especializado? .....

Deseo que envíen la correspondencia a:  Domicilio particular  Lugar de trabajo

Presentado por los Socios:

Nombre ..... Firmado:

Nombre ..... Firmado:

..... de ..... de 199 .....

\* Tácheselo lo que no corresponda. Cuotas para 1997: socio numerario, 6.000 PTA; socio estudiante, 3.000 PTA. La cuota de socio da derecho, entre otros beneficios de pertenecer a la SEM, a recibir gratuitamente la revista *Microbiología SEM*.

### ORDEN DE DOMICILIACIÓN DE RECIBOS

Autorizo a la SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA para que con cargo a mi cuenta corriente:

Banco ..... Sucursal .....

Calle .....

Ciudad ..... CP ..... Provincia .....

Entidad

Oficina

D.C.

Número de cuenta

cobre la cuota anual como socio de la mencionada Sociedad.

Nombre .....

Fdo:

..... a ..... de ..... de 199 .....

# Microbiología SEM

## Revista Oficial de la Sociedad Española de Microbiología

### BOLETÍN DE SUSCRIPCIÓN, AÑO 1997

**Importe de la suscripción, 1997**

Vol. 13, 4 números. Aprox. 600 pp.

España (I.V.A. incluido) ..... 20.000 PTA

Internacional ..... 180 US \$

**Dirección de envío**

Nombre y apellidos .....

Entidad .....

Dirección .....

Código Postal ..... Población .....

Provincia ..... País .....

FORMA DE PAGO:  Cheque nominativo que se adjunta

Domiciliación bancaria

**ORDEN DE DOMICILIACIÓN DE RECIBOS**

Autorizo a la SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA para que con cargo a la cuenta corriente:

Banco ..... Sucursal .....

Calle .....

Código Postal ..... Población ..... Provincia .....

Entidad .....

Oficina .....

D.C. .....

Número de cuenta .....

cobre la suscripción anual de la revista oficial de la Sociedad.

Titular de la cuenta .....

Fdo:

..... a ..... de ..... de 199 .....