

VOLUMEN 11

JULIO - SEPTIEMBRE 1958

NUMERO 3

Microbiología Española

*publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISILOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Cantinuadores de los "Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal". Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE "AULA DEI".—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de "Aula Dei", Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. I, contiene unas 300 páginas, distribuidas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

Ejemplar, 40 pesetas. Suscripción, 120 pesetas.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO "A. J. CAVANILLES".—Publicación del Instituto "Antonio J. de Cavanilles".

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Ejemplar, 110 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Ganadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 pesetas. Extranjero: número suelto, \$ 1.5. Suscripción, \$ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto "José Celestino Mutis".

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto "José Celestino Mutis".

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L' ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 30 pesetas. Suscripción anual (4 números): 110 pesetas.



CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

S U M A R I O

	Págs.
Acción <i>in vitro</i> de la fenacina alfa-carboxilamida sobre el crecimiento de algunos hongos patógenos y <i>Streptomyces</i> , por Gonzalo Sierra y H. A. Veringa... ..	199
Estudios sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos de las bacterias.—III. Actividad enzimática específica de filtrados de <i>Escherichia coli</i> y <i>Sarcina lutea</i> sobre los ácidos nucleicos, por Ramona Vaamonde Fernández y Benito Regueiro Varela... ..	207
Cytoarjesis in potato tubers.—IV. Importance of maturity of tubers and presence of sprouts on the arrest of infection, por Román Vicente Jordana	219
Las bacterias de la fermentación del tabaco, por Antonio Izquierdo Tamayo, Alejandro de Medeiros Alvarez y Rodrigo Cota Galán	243
Nota previa acerca de un nuevo antibiótico, por J. Pérez Silva y R. Lahoz... ..	255
Control microbiológico de conservas vegetales (conclusión), por Pedro Alonso Carrión	265
Comunicación previa sobre la clasificación y estudio enológico de las levaduras encontradas en los vinos de Jerez, por Juan Zájara Jiménez	313
“Revista Latinoamericana de Microbiología”	323
Renovación de Directiva	325

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOQUIMICA

LABORATORIUM VOOR MICROBIOLOGIE. AMSTERDAM

ACCION *IN VITRO* DE LA FENACINA ALFA - CARBOXILAMIDA SOBRE EL CRECIMIENTO DE ALGUNOS HONGOS PATOGENOS Y *STREPTOMYCES* *

POR

GONZALO SIERRA y H. A. VERINGA

I. INTRODUCCION

Hazen y Brown, en 1950, descubren la nistatina, antibiótico activo sobre hongos; preparaciones de nistatina parcialmente purificada prolongaron la vida de ratones inoculados con dosis altas de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. Rappenfort y Schnall, en 1951, demostraron que una de las complicaciones que se pueden presentar después de una continuada antibioterapia es el desarrollo de infecciones secundarias producidas por hongos (candidiasis principalmente). Estudios posteriores (Seligman, 1952; Rankin, 1953, y Levy y Cohen, 1955) confirmaron los encuentros de Rappenfort y Schnall. Es quizás esta observación la que ha estimulado la búsqueda de nuevos antibióticos activos contra hongos. Así, en años sucesivos se descubrieron nuevas sustancias dotadas de esta propiedad. Davisson y colaboradores (1951) describen la rimocidina; Hickey y colaboradores (1952), la ascosina, y Raubitscheck y colaboradores (1952) aislan un metabolito de *Streptomyces aureus* con propiedades antifúngicas.

Un año más tarde Lechevalier y colaboradores (1953) descubren la candidina. Durante estos mismos años un grupo de investigadores ja-

(*) Un resumen de esta comunicación ha sido ya publicado en "Nature", 182, 265 (1958).

poneses aislaron también varios antibióticos activos contra hongos, y que está íntimamente relacionada su estructura con los encontrados por los investigadores americanos.

En el año 1955, por medio de cuatro comunicaciones, se notificó el descubrimiento de las anfoterinas A y B (Gold y colaboradores, 1955; Vandeputte y colaboradores, 1955; Teimberg y colaboradores, 1955, y Sternberg y colaboradores, 1955).

Al parecer, ninguno de los antibióticos mencionados son tóxicos, cuando se administran por vía oral. A pesar de ello, se tiene muy poca información sobre su actividad terapéutica *in vivo*, lo que no quiere decir que no se investigue activamente sobre ellos. El Instituto Squibb, de Estados Unidos, trabaja con intensidad sobre la acción de la anfoterina B., con resultados prometedores.

En general todos los antibióticos de los que hemos hablado son insolubles e inestables, lo que constituye un serio problema para combatir a los dermatofitos.

La capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano que presentan los líquidos metabólicos o extractos de *Pseudomonas aeruginosa*, atribuida en principio a la enzima bacteriolítica "piocianasa", ha sido dilucidada en el transcurso del tiempo. Hoy se han aislado ya en estado cristalino más de diez metabolitos de *Ps. aeruginosa*. La piocianina (Wrade y Strack, 1929; Hillemann, 1938), la alfa-oxi-fenacina (Schoental, 1941), la clororafina (Birkofer, 1947), un glucolípido (Jarvis y Johnson, 1949) y tres compuestos designados por Hays y colaboradores (1945) como Pio I b, Pio I c, y Pio III (Wells, 1952) se han caracterizado plenamente. De otros metabolitos de *Ps. aeruginosa* aislados en forma cristalina, sólo se conoce su fórmula empírica (Hays y colaboradores, 1945). En general todos ellos se han ensayado como inhibidores del crecimiento bacteriano y todos ellos, excepto el compuesto $C_{10}H_8NSO_3$ presentan acción bacteriostática, mientras que sólo uno de ellos, la alfa-oxi-fenacina tiene propiedades fungistáticas (Stokes y colaboradores, 1942). Algunos de estos compuestos son tóxicos; por ejemplo, la piocianina, la alfa-oxi-fenacina y el glucolípido (Sierra, 1958).

En 1944 Schales y colaboradores investigaron la actividad de diez derivados sintéticos de la fenacina sobre algunas bacterias y encontraron una débil actividad sobre el desarrollo del *Micrococcus pyogenes*, var. *aureus*.

Durante el curso de otras investigaciones nosotros encontramos que el líquido metabólico de ciertos cultivos sumergidos de *Ps. aeruginosa* inhibe fuertemente el desarrollo de *Streptomyces sp.* (441) y de algunos hongos patógenos.

La fenacina alfa-carbonamida se produce por oxidación de la clororafina (complejo bimolecular formado por la fenacina alfa-carbonamida y por la dehidrofenacina alfa-carbonamida) cuando se expone al aire al separarse el H₂ del complejo bimolecular, por lo cual la llama también oxi-clororafina. La estructura de la clororafina y de la fenacina alfa-carbonamida ha sido resuelta por Kögl y Postowsky (1930).

Lasseur (1911) y Lasseur y Girardet (1926) son los primeros que encontraron la clororafina en cultivos de *Ps. chlororâfis*. Más tarde Birkofer (1947) demostró que también *Ps. aeruginosa* produce este compuesto. McIlwain (1941) ha investigado la actividad antibacteriana de la clororafina.

En esta comunicación describimos la acción *in vitro* de la oxi-clororafina sobre el desarrollo de varios hongos patógenos y ciertas cepas de *Streptomyces*; este metabolito de *Ps. aeruginosa* lo aislamos como el compuesto responsable de la actividad antifúngica que observamos previamente en el líquido metabólico de esta bacteria.

II. MATERIAL Y METODOS

a) Cepas utilizadas.*

Utilizamos como microorganismos "test" cepas de *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) Blanchard, n.º 539 C.; *Microsporum audouini* Gruby, n.º 1.666; *Epidermophyton floccosum* (Harz) Langeron y Milochévitch, cepa "Oswald"; *Blastomyces dermatitidis* Gitchrist y Stokes (Sin. *Oidium dermatitidis*) cepa K; *Candida albicans* (Sin. *Monilia albicans*) (Rolein Berkhout, n.º 2.747; *Streptomyces* 404; *Streptomyces* 411; *Streptomyces* 421, y *Streptomyces* A. 425.

Todas las cepas se mantuvieron en medio de Sabouraud haciendo fre-

(*) Se consiguieron los hongos por cortesía del "Centraalbureau voor Schimmelcultures", Baarn, Holanda. La cepa de *Candida albicans* de la División de Levaduras del mismo Centro en Delft. Las cepas de los Actinomicetos proceden del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Amsterdam.

cuentes resiembras. En los casos en que el hongo está en fase levaduriforme, utilizamos como inóculos de las placas una suspensión de células procedentes de un cultivo de 48 a 50 horas. Cuando el hongo forma conidios, se realiza la siembra de las placas con una suspensión de conidios preparada de micelios crecidos durante diez días.

b) *Aislamiento de la oxi-clororafina.*

Separamos la clororafina cristalizada (P.F. 225° C. en atmósfera de N₂) por centrifugación de un cultivo (*) sumergido en un medio con glicerina de cinco días de incubación (Sierra y Veringa, 1957).

Siguiendo este procedimiento obtenemos un rendimiento de 0,53 gramos por litro. Rendimiento muy alto comparado con el de 5 a 15 mg. por litro obtenido por Birkofer (1947) en medio glucosado de cultivos de catorce días a 28° C.

Obtuvimos cristales puros de oxi-clororafina, disolviendo clororafina en acetona (descartando la fracción insoluble). En contacto con el aire y después de refrigerar la solución, se obtienen la oxi-clororafina cristalizada. Para conseguir el compuesto puro (P.F. 242° C.) fueron necesarias varias recrystalizaciones.

Análisis: ** Calculado para C₁₃H₉ON₃: C, 69,92; H, 4,07; N, 18,84
Encontrado: C, 69,69; H, 4,05; N, 18,92

Resultados que confirman que la sustancia aislada es oxi-clororafina. Otras propiedades del compuesto obtenido por nosotros, por ejemplo: solubilidad en varios disolventes orgánicos, producción de N₂ en forma de amoníaco juntamente con el compuesto C₁₃H₈O₂N₂ cuando se trata con álcalis, decarboxilación, pasando a fenacina (éste con propiedades de fenol) al ser tratado con CaO + NaOH, reducción a clororafina en agua con cinc en polvo, están también de acuerdo con las propiedades encontradas por Kogl y Postwsky (1930) para la oxiclорorafina.

(*) Las propiedades de la cepa utilizada de *Ps. aeruginosa*, en la preparación de clororafina, se expondrán en otra comunicación (Sierra y Zagt, 1958).

(**) Los análisis de C, H₂ y N₂ fueron realizados por el Sr. Hubers, del Departamento de Microanálisis del Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Amsterdam.

c) *Ensayo de la actividad.*

La actividad se ensayó por el método usual, esto es, añadiendo a un medio apropiado la oxiclrorafina en concentraciones escalonadas. El medio de cultivo utilizado es el agar Sabouraud glucosado compuesto de 0,5 % de glicerina, 2 % de glucosa, 2 % de agar y 1,5 % de Bacto-peptona Difco. El pH se ajustó entre 5,6 y 5,8. El compuesto se disolvió directamente en el medio fundido. Los cultivos de *Streptomyces* se incubaron a 25° C. y los inoculados con cepas de hongos patógenos a 37° C.

d) *Efecto sobre la respiración.*

La influencia de la oxi-clororafina sobre la respiración se estudió en el aparato de Warburg a $37,0 \pm 0,05^\circ$ C. con una disolución de NaOH en el vasito central. Las células de *Candida albicans* en fase levaduriforme se recolectaron de cultivos sumergidos en el medio líquido de Sabouraud glucosado, después de lavadas dos veces con tampón de fosfatos (pH 6,4) se hace una nueva suspensión en el mismo tampón. Una vez establecida la autorespiración de las células en el tampón, se añadieron 0,2 c. c. del medio de Sabouraud glucosado, contenido hasta entonces en el brazo lateral de los respirómetros. El volumen total del líquido en los respirómetros fué de 3 c. c.: 1 c. c. de la suspensión del hongo; 0,2 c. c. del medio que lleva los substratos; 0,2 c. c. de disolución de NaOH, y 1,6 c. c. de agua corriente o de oxi-clororafina en agua. La suspensión de células en el tampón de fosfatos se incubó con oxi-clororafina durante sesenta minutos, a $37 \pm 0,05^\circ$ C., añadiéndose después el substrato. La cantidad de O₂ consumido se midió durante un período de cuarenta minutos a intervalos de diez minutos. En cada serie de experimentos se emplearon respirómetros de control y cada experimento se hizo por duplicado.

III. RESULTADOS

Los resultados presentados en la tabla 1 indican que la oxi-clororafina en concentraciones comprendidas entre 6,3 y 50 ppM inhibe el crecimiento en medio de Sabouraud de varias cepas de *Streptomyces* y hongos patógenos. Los experimentos manométricos realizados demues-

tran claramente que una concentración de oxi-clororafina (333 ppM) muy superior que la necesaria para inhibir completamente el desarrollo de *Candida albicans* en el medio de Sabouraud (tabla 1) no afecta la respiración (O_2 consumido) de suspensiones lavadas de este hongo. La oxi-clororafina (333 ppM) tampoco afecta la auto-respiración de suspensiones lavadas de *Candida albicans* en el tampón de fosfatos.

TABLA 1.

Acción de la fenacina alfa-carboxilamida sobre el crecimiento de algunos hongos patógenos y Actinomicetos.

MICRO-ORGANISMO	Concentración de oxi-clororafina (ppM) (*)	
	Inhibición	
	Completa	Parcial
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	12,5	6,3
<i>Epidermophyton floccosum</i>	25,0	12,5
<i>Candida albicans</i>	50,0	12,5
<i>Microsporium audouini</i>	25,0	12,5
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	25,0	12,5
<i>Streptomyces 404</i>	25,0	6,3
<i>Streptomyces 411</i>	12,5	6,3
<i>Streptomyces 421</i>	25,0	6,3
<i>Streptomyces A. 425</i>	25,0	6,3

(*) Partes por millón.

El ratón (20 g.) tolera bien 100 mg. de una suspensión en aceite de oliva inyectada intraperitonealmente. No se observaron síntomas de enfermedad.

IV. DISCUSION

Al no actuar la oxi-clororafina como un antiséptico, los cuales, como es sabido, actúan como veneno protoplasmático general inhibiendo rápidamente la respiración y teniendo en cuenta además que el efecto de este compuesto es más fungistático que fungicida, nosotros podemos suponer que su poder antibiótico se deba a una acción de antagonismo.

La tabla 1 indica que la oxi-clororafina tiene una fuerte actividad

in vitro sobre *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, etc., gérmenes bien conocidos como causantes de candidiasis y otras micosis. Debido a que los ratones toleran concentraciones mucho más elevadas que las suficientes para inhibir completamente el crecimiento de las cepas de hongos y actinomyces utilizados, es probable que este compuesto pueda utilizarse como un antibiótico eficaz en casos de candidiasis y actinomicosis, enfermedades ambas internas y de distribución universal.

Agradecimiento.

Agradecemos al Prof. Dr. Ing. T. Y. Kingma Boltjes su continuo interés, que nos sirvió de estímulo durante la realización de este trabajo.

RESUMEN

Se ha encontrado que la oxi-clororafina inhibe *in vitro* el crecimiento de varios hongos patógenos y algunos *Streptomyces*. El compuesto no es tóxico para el ratón en una dosis máxima empleada de 500 mg. por kilo, inyectados por vía intraperitoneal. Actualmente realizamos estudios para dilucidar el mecanismo de acción y el efecto *in vivo* de este compuesto.

SUMMARY

Oxy-chlororaphin is active *in vitro* against a number of pathogenic fungi and some *Streptomyces* species. The compound shows no toxicity to mice at doses of 500 mg. per kg. given intraperitoneally. Studies are under way to elucidate further the mechanism of action *in vitro* as well as the behavior of this compound *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- BIRKOFER, L. 1947. Chem. Ber., 80, 212.
DAVISSON, J. W.; TANNER, F. W.; FINLAY, A. C. y SOLOMONS, I. A. 1951. Antibiotics and Chem., 1, 289.
GOLD, W.; STOUT, H. A.; PAGANO, J. F. y DONOVICK, R. 1955-1956. Antibiotics Annual, 579.
HAZEN, E. L. y BROWN, R. 1950. Science, 112, 423.
HICKEY, R. J.; CORUM, C. J.; HIDEY, P. H.; COHRN, I. R.; NAGER, U. F. B. y

- KROPP, E. 1952. *Antibiotics and Chem.*, 2, 472.
- KOGL, F. y POSTOWSKY, J. J. 1930. *Liebig Ann.*, 480, 280.
- LASSEUR, P., 1911. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad de Nancy.
- LASSEUR, P. y GIRARDET, R. 1926. *Bull. Trimestriel Soc. Sci. Nancy. Serie 4, n.º 1.*
- LECHEVALIER, H.; ACKER, R. F., HAENSELER, C. M. y WAKSMAN, S. A. 1952. *Mycologia*, 45, 255.
- LEVY, E. S. y COHEN, D. B. 1955. *A. M. A. Arch. Int. Med.*, 95, 118.
- MCILWAIN, H. 1941. *Nature Lond.*, 148, 628.
- RANKIN, N. E. 1953. *Brit. Med. J.*, 1, 918.
- RAPPENFORT, R. B. y SCHNALL, E. S. 1951. *A. M. A. Arch. Int. Med.*, 88, 729.
- RAUBITSCHCK, F.; ACKER, R. F. y WAKSMAN, S. A. 1952. *Antibiotics and Chem.*, 2, 179.
- SELIGMANN, E. 1952. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 79, 481.
- SIERRA, G. 1958. Comunicación presentada al VII Congreso Internacional de Microbiología. Estocolmo.
- SIERRA, G. y VERINGA, H. A. 1957. Inédito.
- SIERRA, G. y ZAGT, R. 1958. *A. v. Leeuwenhoek. J. Microbiol and Serol.* En prensa.
- SEIMBERG, B. A.; JAMBOR, W. P. y SUYDAM, L. O. 1955-1956. *Antibiotics Annual*, 574.
- STERNBERG, T. H.; WRIGHT, E. T. y OURA, M. 1955-1956. *Antibiotics Annual*, 566.
- VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J. y STILLER, E. T. 1955-1956. *Antibiotics Annual*, 587.

ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS DE LAS BACTERIAS

III. Actividad enzimática específica de filtrados de *Escherichia coli* y *Sarcina lutea* sobre los ácidos nucleicos.

POR

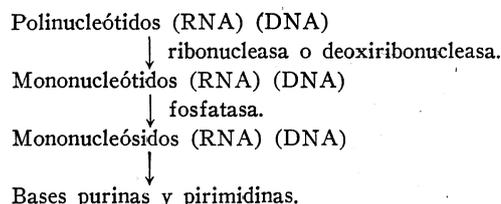
RAMONA VAAMONDE FERNANDEZ y BENITO REGUEIRO VARELA

REVISION HISTORICA

En trabajos anteriores, Vaamonde y Regueiro (1957) (1958), estudiaron el contenido en ácidos nucleicos del *Escherichia coli* y *Sarcina lutea* en caldo común y en medio sintético, en diferentes fases de crecimiento. No estaría completo el estudio del metabolismo de los ácidos nucleicos, si no se estudiaran al mismo tiempo los enzimas específicos que intervienen en tal metabolismo; éste es el objeto del presente trabajo.

Sabemos que, tanto en la biosíntesis, como en la degradación de los ácidos nucleicos (RNA) y (DNA), intervienen varios enzimas. Nosotros estamos particularmente interesados en los procesos de degradación, y los enzimas que intervienen en la misma reciben el nombre general de nucleasas.

Según el lugar de acción de los enzimas en la cadena de degradación, podemos diferenciar los tipos siguientes:



Nosotros estudiamos específicamente los enzimas: RN-asa y DN-asa, que rompen los ácidos nucleicos o mononucleótidos, y la fosfatasa, que separa fosfato de los anteriores.

Aunque en menor abundancia que sobre el contenido en ácidos nucleicos en microorganismos, también existe bibliografía sobre el contenido en enzimas específicos. Zamenhoff y Chargaff (1949), dicen que una de las dificultades para el buen aislamiento del DNA de las bacterias, es la presencia en las mismas de una DR-asa. Brown (1950), estudia el contenido en RN-asa y DN-asa en filtrados de 24 grupos de estreptococos, observando que existen unos que poseen los dos enzimas y otros solamente uno de ellos.

Muggleton y Webb (1952), estudiando la acción lítica de filtrados de *Streptomyces* sobre bacterias Gram positivas, encuentran actividad RN-asa, DN-asa y fosfatasa, haciendo la interesante observación de que cuando el RNA o el DNA se tratan por RN-asa o DN-asa pancreática, queda siempre una parte que es resistente a estos enzimas y que, sin embargo, es sensible a los de los *Streptomyces*, lo cual les sugiere una diferencia en los dos tipos de enzimas. Born (1952), también estudia una RN-asa en filtrados de *Streptomyces*.

Manson (1953), estudiando el metabolismo del *Escherichia coli*, normal o infectado por fagos, encuentra una RN-asa capaz de desintegrar el RNA celular.

Kay (1954), estudia una DN-asa del bacilo tífico, viendo su efecto sobre el DNA, del fago específico, su actividad es catalizada por el magnesio y la acción se aumenta por calcio. Esta DN-asa es intracelular, en oposición a la del *Bacillus subtilis*, que es extracelular.

Chargaff y Shapiro (1955), también estudian DN-asas y el efecto del magnesio en las mismas. También Smithies y Gibbons (1955), estudian el DNA, de las cápsulas de algunas bacterias, observando que el tratamiento de las mismas con una DN-asa elimina las cápsulas sin afectar a la viabilidad.

Holden y Pirie (1955), comparan una RN-asa pancreática con otra obtenida de hojas vegetales; ésta hidroliza más el RNA que la primera y es más afectada por agentes inhibidores, lo que demuestra diferencias entre ambos enzimas, que también se observa en el pH óptimo y en la termoestabilidad.

Manzy, Braun y Whallon (1955), estudian el DNA y la DN-asa

específica, en filtrados de *Brucella suis* y *Brucella abortus*, observando que la acumulación de DNA y la actividad de la DN-asa, dependen del medio utilizado, observando que en medio sintético, se forma más DNA.

Esta es la bibliografía que hemos podido recoger sobre la existencia de enzimas nucleicos en microorganismos. Como se observa, poco se ha trabajado sobre el contenido de estos enzimas en diferentes fases de crecimiento de los gérmenes y en diferentes condiciones de desarrollo, y esto es lo que nosotros tratamos de ver en el *Escherichia coli* y en la *Sarcina lutea*.

METODOS Y TECNICAS

Se utilizan como gérmenes, el *Escherichia coli* y la *Sarcina lutea*, en diferentes condiciones de crecimiento a partir de cultivos de veinticuatro horas a 37°, en agar-caldo.

Tanto medios de cultivo, como el desarrollo de los citados gérmenes en diferentes condiciones, se indicaron en el trabajo de Vaamonde y Regueiro (1957) y son las mismas que aquí se utilizan.

Para determinar la actividad enzimática de los filtrados, utilizamos la técnica modificada de Muggleton y Webb (1952), que consiste en lo siguiente:

RN-fosfatasa y *RN-asa*: En un tubo centrífuga de 10 c. c. se colocan por orden los compuestos siguientes: 1 c. c. de ribonucleato sódico al 0,1 %; 1 c. c. de cloruro sódico al 0,85 %; 3 c. c. de "buffer" veronal 0,1 M/(pH = 7.0) y 1 c. c. de enzima (líquido de cultivo filtrado). Primero se ponen los tres primeros compuestos a 37° y cuando llegan a esta temperatura se añade el enzima y se deja dos horas. Al cabo de este tiempo, se separan los tubos del baño, enfrían y se añade 4 c. c. de reactivo MacFadyen's (1,25 gr. de acetato de uranio en 100 c. c. de ácido tricloracético al 10 %), el cual precipita el RNA no hidrolizado. Se centrifuga, decanta el líquido, lava el precipitado con más reactivo y en los líquidos reunidos se determinan: fósforo inorgánico por el método de Fiske y Subbarrow (1925) que da la actividad fosfatasa; el fósforo total, por el mismo método, y la ribosa por el método del orcinol de Mejbaum (1939) que dan la actividad RN-asa. Los controles utilizados son tres tubos: uno sin el enzima, otro sin el sustrato y un tercero calentado a 60° por diez minutos para inactivar el enzima. La diferencia

entre el problema y estos controles da la actividad enzimática. Las determinaciones son colorimétricas en fotocolorímetro Kipp, con filtro 66 para el fósforo y la ribosa.

DN-fosfatasa y *DN-asa*: En un tubo de centrífuga de 10 c. c. se colocan por orden, los compuestos siguientes: 1 c. c. de deoxiribonucleato sódico al 1 %; 1 c. c. de cloruro sódico al 0,85 %; 2 c. c. de "buffer" veronal; 1 c. c. de sulfato magnésico 0,1 M/ y 5 c. c. de enzima. A continuación se hacen todas las operaciones indicadas para los enzimas anteriores y en los líquidos reunidos se determinan: fósforo inorgánico, por el método de Fiske y Subbarrow (1925), que da la actividad fosfatasa; el fósforo total, por el mismo método, y la deoxiribosa por el método de la difenilamina de Dische y Schwarz (1937), que dan la actividad DN-asa. Los controles utilizados son los mismos que en los enzimas anteriores y las determinaciones son las mismas, únicamente que para la deoxiribosa se usa el filtro 59.

RESULTADOS

Las experiencias de este trabajo se pueden dividir en dos fases: La primera es la que fija las curvas de crecimiento del *Escherichia coli* y la *Sarcina lutea* en diferentes condiciones de desarrollo, con objeto de determinar los tiempos de cada fase (lag, logarítmica, estacionaria y declive); esta fase está indicada en el primer trabajo de Vaamonde y Regueiro (1957). La segunda fase de experiencias consiste en la determinación de la actividad enzimática de los filtrados que corresponden a cada una de las fases anteriores, que es lo que se incluye en el presente trabajo.

En todos los casos se utilizan sustratos comerciales de: ribonucleato sódico (RNA) y deoxiribonucleato sódico (DNA), que no dan fósforo inorgánico, ni fósforo total libre y sí dan: 4 gammas/c. c. de RNA libre y 40 gammas/c. c. de DNA libre, respectivamente.

1.º *Actividad enzimática de filtrados de Escherichia coli.*

La actividad enzimática de los filtrados de *Escherichia coli* se determina en las condiciones que se mencionan a continuación:

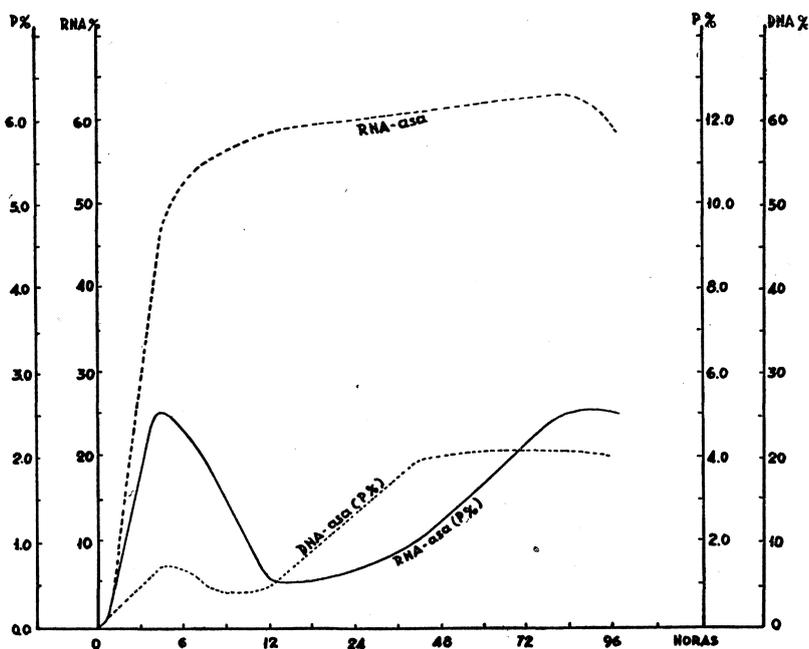
a) Cultivo de *Escherichia coli* en caldo común, a 37°, en estufa.

La curva de crecimiento en estas condiciones está en el primer trabajo nuestro (gráfica 5). El cuadro final, cuyas cifras indican la actividad enzimática en cada fase de crecimiento, es el siguiente:

Horas	RN - fosfatasa P % (inorgánico)	RN - asa		DN - asa	
		P % (total)	RNA %	P % (total)	DNA %
4	0,5	2,5	46,0	1,5	0,0
7	3,5	2,0	54,0	1,0	0,0
12	0,5	0,5	59,0	1,0	0,0
43	0,0	1,0	61,0	4,0	0,0
80	1,0	2,5	63,0	4,0	0,0
96	0,0	2,5	58,0	4,0	0,0

Se puede señalar que existe un máximo de producción de fosfatasa durante la fase logarítmica y que corresponde al máximo de actividad metabólica del *Escherichia coli*.

Con relación a la producción de RN-asa y de DN-asa, son más de tener en cuenta los números basados en las determinaciones de azúcares



GRÁFICA I.

que los fundados en las determinaciones de fósforo total, por ser más específicos. Según esto, se observa un aumento de actividad RN-asa durante la fase lag y logarítmica bastante grande y aumento lento durante el resto del desarrollo bacteriano. No se observa actividad DN-asa en los filtrados en ninguna fase de crecimiento. Los resultados se expresan también en la gráfica 1.

b) *Cultivo de Escherichia coli en caldo común, a 28°, en agitación.*

La curva de crecimiento en estas condiciones está en el primer trabajo nuestro (gráfica 3). El cuadro final, cuyas cifras indican la actividad enzimática en cada fase de crecimiento, es el siguiente:

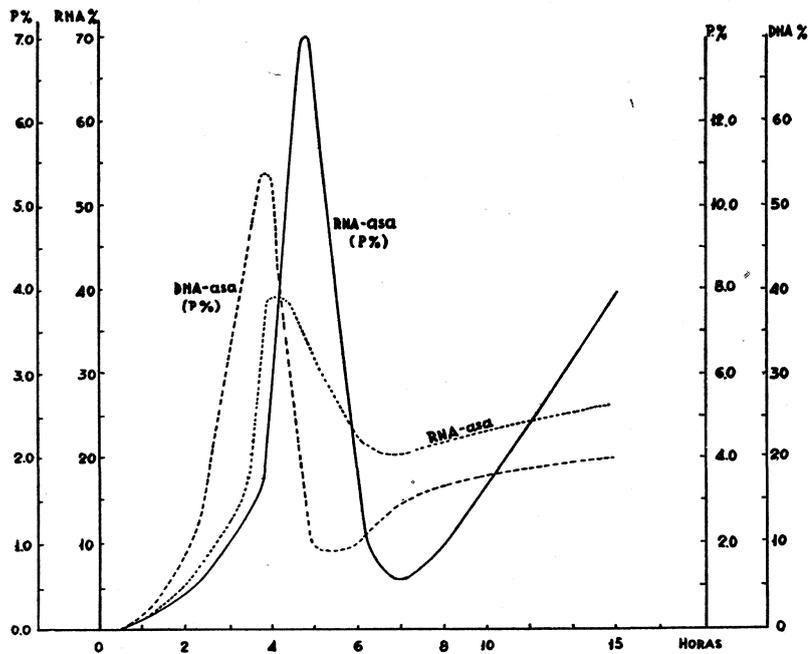
Horas	RN - fosfatasa	RN - asa		DN - asa	
	P % (inorgánico)	P % (total)	RNA %	P % (total)	DNA %
4	0,5	2,0	38,0	11,0	0,0
5	2,5	7,0	34,0	2,0	0,0
6	0,5	1,5	24,0	2,0	0,0
7	0,0	0,5	21,0	3,0	0,0
15	0,5	4,0	27,0	4,0	0,0

Se puede señalar que existe un máximo de producción de fosfatasa durante la fase logarítmica y que corresponde al máximo de actividad metabólica del *Escherichia coli*.

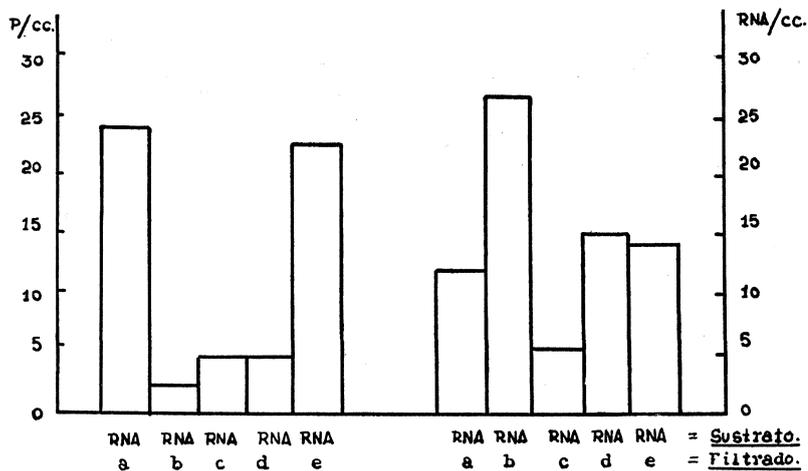
En cuanto a la actividad RN-asa, se observa en la gráfica correspondiente (2), un incremento, tanto por determinación de fósforo, como de azúcar durante la fase logarítmica, con un máximo a las cinco horas y disminución rápida a las siete horas, a partir de las cuales queda casi estacionaria; se observa que dichas curvas son casi paralelas a las del contenido en ácidos nucleicos.

Sobre actividad DN-asa no se observa actividad, en cuanto al contenido en azúcar, aunque sí en cuanto al de fósforo total.

Se observa que, en relación con los ácidos nucleicos, el óptimo de enzimas RN-asa y posible DN-asa se produce una hora más tarde, lo que concuerda con el tiempo de hidrólisis de ambos ácidos nucleicos.



GRÁFICA 2.



GRÁFICA 3.

c) *Cultivo de Escherichia coli en medio sintético, 28°, en agitación.*

En este caso se trata de ver la influencia de la composición del medio en la actividad enzimática de filtrados de cuarenta y ocho horas, sobre RNA y DNA comerciales. El medio sintético y las técnicas son las indicadas por Vaamonde y Regueiro (1958), y el cuadro final, cuyas cifras indican la actividad enzimática de cada filtrado de cuarenta y ocho horas, es el siguiente:

	RN -fosfatasa	RN - asa		DN - asa	
	P % (inorgán.)	P % (total)	RNA %	P % (total)	DNA %
Medio completo	32,0	24,0	11,0	0,0	0,0
Sin fosfato monopotásico	10,0	2,0	24,0	0,0	0,0
Sin fosfato dipotásico ...	4,0	4,0	6,0	0,0	0,0
Sin magnesio	8,0	4,0	15,0	0,0	0,0
Sin hierro	32,0	22,0	14,0	0,0	0,0

Gráficamente se expresan estos resultados de RN-asa en la gráfica 3. En estos resultados puede observarse que: en ausencia de fosfato o de magnesio casi no existe actividad RN-fosfatasa, lo que indica que este enzima es de tipo adaptativo o necesita magnesio para su formación. También actividad RN-asa se observa, sobre todo en filtrado de medio completo o en ausencia de hierro, magnesio o fosfato monopotásico, en cuanto a los resultados expresados en azúcar y en medio completo o en ausencia de hierro en los expresados en fósforo total. No se observa formación de DN-asa en ningún caso.

2.º *Actividad enzimática de filtrados de Sarcina lutea.*

La actividad enzimática de los filtrados de *Sarcina lutea*, se determina en las condiciones que se mencionan a continuación:

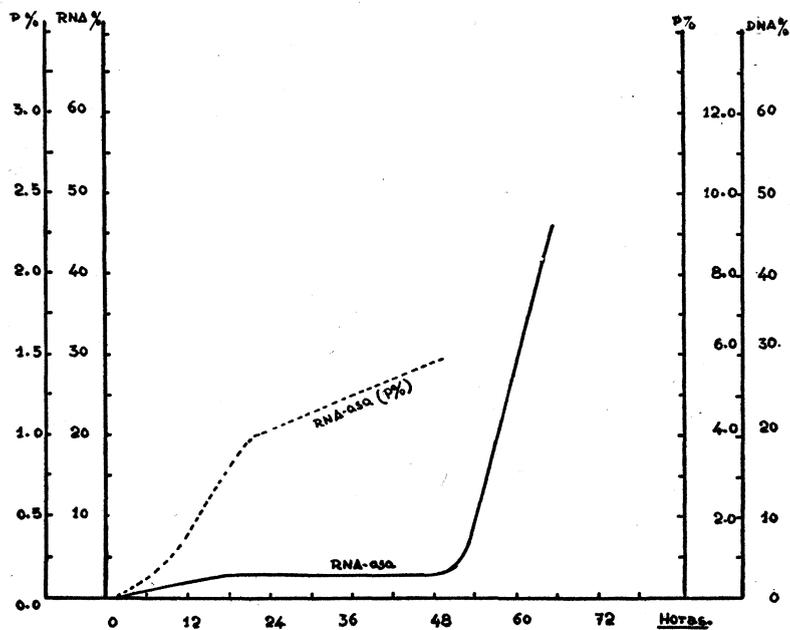
a) *Cultivo de Sarcina lutea en caldo común, a 37°, en estufa.*

La curva de crecimiento en estas condiciones está en el primer tra-

bajo nuestro (gráfica 7). El cuadro final, cuyas cifras indican la actividad enzimática en cada fase de crecimiento, es el siguiente:

Horas	RN - fosfatasa	RN - asa		DN - asa	
	P % (inorgánico)	P % (total)	RNA %	P % (total)	DNA %
14	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
20	0,0	1,0	2,0	0,0	0,0
50	0,0	1,5	2,0	0,0	0,0
66	0,0	0,0	47,0	0,0	0,0

Se observa ausencia de fosfatasa y DN-asa en todos los casos; en cambio en la RN-asa, hay ligera formación al principio, y al final parece que aumenta, como se indica en la gráfica 4.



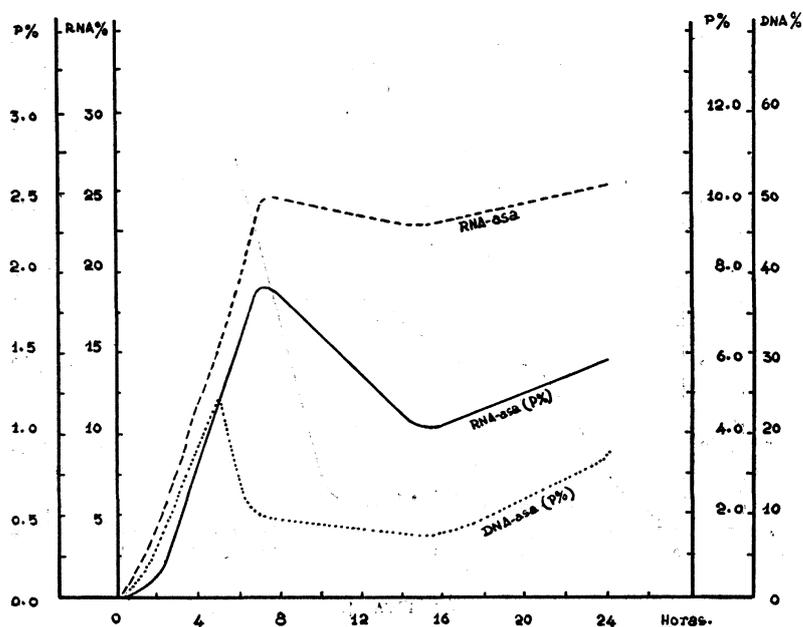
GRÁFICA 4.

b) *Cultivo de Sarcina lutea en caldo común, a 28°, en agitación.*

La curva de crecimiento en estas condiciones está en el primer trabajo nuestro (gráfica 6). El cuadro final, cuyas cifras indican la actividad enzimática en cada fase de crecimiento, es el siguiente:

Horas	RN - fosfatasa	RN - asa		DN - asa	
	P % (inorgánico)	P % (total)	RNA %	P % (total)	DNA %
5	0,0	1,0	16,0	5,0	0,0
6	0,0	1,5	18,0	3,0	0,0
7	0,0	2,0	24,0	2,0	0,0
15	0,0	1,0	23,0	1,5	0,0
24	0,0	1,5	26,0	3,5	0,0

Estos resultados se expresan en la gráfica 5, viéndose ausencia de actividad fosfatasa.



GRÁFICA 5.

En cuanto a RN-asa, se observa un aumento hacia las ocho horas, tanto en fósforo total como en azúcar, y después de la máxima producción de RNA, para luego disminuir y quedar estacionario, como en la producción del ácido nucleico correspondiente.

Sobre la producción de DN-asa no da resultado la determinación de azúcar, pero la determinación de fósforo total indica un aumento de enzima en las primeras horas, para luego disminuir y quedar estacionario.

DISCUSION Y RESUMEN

Si un microorganismo se coloca en un medio nutritivo apto para su desarrollo, éste pasa por una serie de fases con las cuales se puede construir una gráfica representativa. Estas fases pueden seguirse por diferentes métodos, y las que se estudian aquí del *Escherichia coli* y la *Sarcina lutea*, se dan en nuestro primer trabajo, como hemos indicado anteriormente.

En trabajos anteriores hemos estudiado el contenido en ácidos nucleicos de las diferentes fases de crecimiento; en éste se determina la actividad enzimática exocelular específica, sobre los citados ácidos RNA y DNA.

Como resumen de este trabajo, pueden derivarse las conclusiones siguientes:

1.^a Se produce gran cantidad de RN-fosfatasa, en medio sintético completo o sin hierro, menos en medio sintético sin fosfato o sin magnesio y menos en la fase logarítmica en caldo común, durante el crecimiento de *Escherichia coli*. Este enzima no es producido por la *Sarcina lutea*.

2.^a Se observa producción de RN-asa, en medio sintético, en todos los casos y en caldo común, sobre todo en fase logarítmica, en el *Escherichia coli*. Asimismo, se produce durante el crecimiento de la *Sarcina lutea*, aunque en menor cantidad.

3.^a En cuanto a la producción de DN-asa, puede señalarse su ausencia en el crecimiento del *Escherichia coli* en medio sintético y poca producción en caldo común, así como en el caso de la *Sarcina lutea* en caldo común.

SUMMARY

As a summary of this work, the following conclusions can be derived:

1st —A great quantity of *R N-phosphatase* is produced, in a complete synthetic medium or without iron, a smaller quantity appears in a synthetic medium without phosphate or without magnesium and smaller too, in the logarithmic phase in common broth during the growth of *Escherichia coli*. This enzyme is not produced by *Sarcina lutea*.

2nd —The production of *R N-ase* is observed, in synthetic medium, in all cases and in common broth, above all in the logarithmic phase, in *Escherichia coli* -It is also produced during the growth of *Sarcina lutea*, though in smaller quantity.

3rd — As to the production of *D N-ase* we can mention its absence during the growth of *Escherichia coli* in a synthetic medium and a small production in common broth, the same in the case of *Sarcina lutea* in common broth.

BIBLIOGRAFIA

- BORN, G. V. R. 1952. J. Gen. Microbiol. 6. 344.
 BROWN, A. L. 1950. J. Bacteriol. 60. 673.
 CHARGAFF, E. SHAPIRO, H. S. 1955. Exp. Cell. Res. Suppl. 3. 64.
 DISCHE, Z. SCHWARZ, K. 1937. Mikrochim. Acta. 213.
 FISKE, C. H. SUBBAROW, 1925. J. Biol. Chem. 66. 375.
 HOLDEN, M. PIRIE, N. W. 1955. Biochem. J. 60. 53.
 JONES, A. S. SWALLOW, A. J. WEBB, M. 1948. Biochem. Biophys. Acta, 2. 167.
 KAY, D. 1954. J. Gen. Microbiol. II. 45.
 MANSON, L. A. 1953. J. Bacteriol. 66. 703.
 MANZY, W. BRAUN, W. WHALLON, J. 1955. Bact. Proc. 46.
 MEJBAUM, W. 1939. Z. physiol. Chem. 258. 117.
 MUGGLETON, P. W. WEBB, M. 1952. Biochem. Biophys. Acta, 8. 431.
 MUGGLETON, P. W. WEBB, M. 1952. Biochem. Biophys. Acta, 8. 343.
 SMITHIES, W. R. GIBBONS, N. E. 1954. Can. J. Microbiol. 1. 614.
 VAAMONDE, R. REGUEIRO, B. 1957. Microbiol. Española. 10. 461.
 VAAMONDE, R. REGUEIRO, B. 1958. Microbiol. Española. 11.
 ZAMENHOFF, S. CHARGAFF, E. 1949. J. Biol. Chem. 180. 727.

CYTOARJESIS IN POTATO TUBERS

IV. Importance of maturity of tubers and presence of sprouts on the arrest of infection.

BY

ROMÁN VICENTE JORDANA

The fact that maturation of potato tubers and a state of pre-germination prevent infection by pathogenic fungi and bacteria seems to have been known empirically for a long time. Enquiries made recently from experienced farmers and other individuals familiar with the conservation or storage of tubers have supported this fact; which has also been considered by Bennett (1946), Focke (1952) and Boyd and Henderson (1953). However, it was found that a state of active germination was apparently necessary to arrest infection (Vicente Jordana, 1953, 1954).

As was stated in these latter references, the germinated tuber of potato at its fullest stage of active germination acts as a buffer in preventing the spread of micro-organisms. Resting tubers or slices are rotted more easily when in contact with water. If environmental conditions are good enough to maintain an active development of buds, the mature tuber becomes hard, consistent and firmly coherent. In this condition, infection is normally arrested and the bacteriostatic effect is clearly shown.

Since in early stages of development some tubers have immature tissues susceptible to rot whilst more mature ones resist infection, it was necessary to establish the real stage of maturity. It was arbitrarily stated (Vicente Jordana, 1958a) that a tuber is mature for the bacteriostatic effect when infection is arrested for at least ten days in the whole tuber, although well-developed buds might maintain the effect for longer periods of time (3-4 months).

The following experiments demonstrated that the presence of buds is not the sole condition for achieving maturity for the bacteriostatic effect, but this maturity is reached after a short period of bud activity.

A) DEVELOPMENT OF SOFT-ROT AND OTHER INFECTIONS IN THE PRESENCE OF BUDS. NATURAL INCIDENCE OF DISEASE

I. *Dry state.*

a) *After storage above 10° C.*

It was reported (Vicente Jordana, 1955b) that germinated potato tubers which were inoculated with soft-rot bacteria had arrested infection at 25° C. in dry conditions after 45 days, but this effect was not so marked after holding at 34.5° C. for the same period of time. No natural incidence of disease in uninoculated tubers was recorded at that time.

Tubers of the varieties King Edward, Majestic and Sharpe's Express were washed with water, placed in trays and held for three months at 22.5° C. Tubers of varieties Catriona, Ulster Prince, Eclipse and Arran Pilot were kept under similar conditions for one month and a half. The incidence of disease development (table no. 1) was much lower than that obtained with peeled potato tubers after 2 months at room temperature, 17-20° C. (Vicente Jordana, 1958b). All tubers had sprouted by the end of the experiment. Only 7 tubers out of 210 (3.3 %) showed infections of the internal tissues. Scabs and other superficial infections were present in some other tubers. In general all lesions were arrested. Plate no. 1, taken a few hours after cutting open the tubers, shows the appearance of some of them.

Comparable estimates were obtained with tubers of varieties Turia and Heida stored at 11° C. an 18-20° C. held in the dark. Tubers kept at the latter temperature were better preserved than those kept at 11° C. Dry-rot developed in one tuber out of ten (random sample) of variety Turia and surface contamination was observed on 1 tuber of variety Turia and on another of Heida. In general, preservation of buds and their ap-

TABLE I.

incidence of infection in uninoculated germinated tubers of 7 varieties kept in a dry atmosphere (64 % R. H.) at 22.5°C.

VARIETY	STORAGE		No. tubers	INCIDENCE OF INFECTION		
	Date of commencement	Duration		Healthy	Type of lesion	% of infected tubers
King Edward ...	19-7-56	3 months	30	30	—	0.0
Majestic.....	»	»	30	27	3 tubers with internal lesions.	10.0
Sharp's Express	»	»	30	29	1 tuber with a superficial lesion.	3.3
Ulster Prince....	2-11-56	46 days	20	20	—	0.0
Catriona.....	»	»	40	38	1 dry-rot and. 1 soft-rot.	5.0
Eclipse.....	»	»	20	20	—	0.0
Arran Pilot.....	»	»	40	39	1 dry-rot.	2.5

xes were also better at 18-20° C., as is seen in plate no. 2. Apexes of buds at 18-20° C. are clean, while at 11° C. buds show some necrotic areas.

The incidence of infection at other temperatures and in other varieties will be reported in a subsequent study on the effect of germinative activity.

b) *After storage at 5° C.*

No special investigation has been made in the present study on tubers kept at 5° C., but it was found that tubers of the varieties Palogan, Ulster Supreme, Arran Peak, Majestic, King Edward and Dr. McIntosh, held at that temperature for six months and a half were more susceptible than usual to development of scabs, "darkening of the flesh" and other damage when transferred to higher temperatures (22.5° C.).

As quoted by Smith and Smart (1955), there is much evidence that

cooling contributes to decay and surface browning after tubers are removed to higher temperatures. These observations have also been reported by Smith (1933), Wright et al. (1927, 1934), and Smith (1952). Moderate susceptibility to experimental infection in tubers kept at 6° C. was found in early experiments (Vicente Jordana, 1955b).

2. *In the presence of water.*

a) *At low temperatures.*

According to these facts and that potato tubers of a number of varieties do not produce buds at 5° C. it could be possible that some

TABLE 2.

Provisional data on biochemical activities of cultures isolated on nutrient (meat-infusion + glucose) agar plates from buds of potato tubers disrupted at the temperature of 3,5-4° C. Results obtained after 12 days at the same temperature. Further studies of identification are followed.

Source	Ref.	MORPHOLOGY	Gram	Growth on nutrient broth + glucose	Dextrose		Mannose	Galactose	Dulci
					b. c. p.	Andr.	b. c. p.	b. c. p.	b. c.
From variety HEIDA	H 1	Rods.....	+	++	A+++	»	Ai	»	»
		No spores.....							
	H 2	Large rods.....	±	++	A++++	»	»	»	»
		No spores.....							
H 3	Short rods.....	+	+++	A+++	»	A++++	»	»	
	Central spores		Gi			Gi			
H 4	Large rods.....	+	++	(-)	»	(-)	»	»	
From variety TURIA	T 1	Large rods.....	+	++	A++++	A+	Ai	(-)	(-
	T 2	Short rods.....	+	+++	A++++	A++++	A++++	A+++	(-
		Central spores		Gi		G+	Gi	Gi	
T 3	Large rods ...	+	++	(-)	Ai	A+	Ai	(-	

b.c.p. = bromcresol purple.—Andr. = Andrade's indicator.—
(-) = Growth. Negative reaction.—i = incipient. ± =

micro-organisms developing at this temperature may increase the rate of infection or at least the susceptibility of tubers when their growing activities are arrested by low temperatures. Previous experiments (Vicente Jordana, 1958b) on the activity of *Erwinia carotovora*, var., *aroideae*, proved that this variety was slightly active for the production of soft-rot in peeled tubers as well as in pure culture at the temperature of 10-12° C. An experiment was performed to ascertain this possibility.

To force conditions for natural infection, ten uninoculated tubers of the variety Palogan were immersed in tap water and placed in a chamber at 3° C. After 40 days the water level had been lowered by evaporation. The surface of the tubers (as well as the water) appeared to be contaminated (plate no. 3). Isolations on Sabouraud, Czapeck and other culture media allowed the separation of two fungi, 2 bacteria, and one yeast-like organism. Cultures of the organisms in a few media proved that they grow and had biochemical acti-

Sucrose		Lactose		Maltose		Rafinose	Starch	Salicin	NH ₃	NO ₂	Voges-Proskauer Reaction
b. c. p.	Andr.	b. c. p.	Andr.	b. c. p.	Andr.	b. c. p.		b. c. p.			
A +	»	(-)	»	(-)	»	»	(-)	(-)	+	+	(-)
+++	»	(-)	»	A + R	»	»	±	A +++	+	+	+
+++ Gi	»	R ±	»	A ++ Gi	»	»	±	A +++ Gi	(-)	+	+
(-)	»	(-)	»	(-)	»	»	(-)	(-)	(-)	(-)*	(-)
»	(-)	(-)	(-)	»	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	±
»	A +++ G +	R	A ++ Gi	»	A +++ G +	(-)	+	A +	(-)	+	+
»	(-)	(-)	(-)	»	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	(-)

R = Reduction.—A = Acid produced.—G = Gas.—
Slight reaction.—* It does not reduce with Zn powder.

vities at 3°C. After the experiment the tubers were left for another 35 days at 8-9°C. The internal tissues were soft-rotted and contaminated to a greater or lesser extent.

The experiments were repeated with 10 tubers of variety Heida and another 10 of variety Turia. After 35 days some of the tubers (five) were still immersed. The water was contaminated and a broken film of microbial growth had been produced on the surface. The surfaces of the emerged tubers were also contaminated by fungi and the buds were easily disrupted by scraping. The tuber flesh was well preserved, although it was slightly soft at some points and easily disrupted over an area in places attached to buds. Isolations were made on nutrient (meat infusion + glucose) agar plates from the basis of disrupted buds after cutting open the tubers. Cultures on various media again proved that the isolated bacteria had metabolic activities at 3,5-4° C. (table no. 2).

These experiments ascertain the fact that saprophytic fungi and bacteria, and possibly pathogenic forms in slow development, may use inactive tubers for their growth. In this case low temperature (3-4° C.) and immersion of tubers in water hindered the development of buds and allowed to some extent that of the micro-organism. These experiments are also in close connection with those previously reported in relation with the inactivation of tubers by temperature (Vicente Jordana, 1955b) and by blockage of their respiration (same author, unpublished work), as well as with the effect of humidity in the susceptibility of potato tissues to soft-rot (same author, 1958b).

b) *At the temperature of 22.5° C.*

When well sprouted tubers, either inoculated or not, are placed in a small amount of water no general infection, or in many instances no marked contamination, takes place. The surface of the tubers is clean and the water appears to be uncontaminated. Sometimes tubers may show some degree of infection (mainly soft-rot and fungal growth) which however is normally arrested or develops slowly. If the germinative points are removed by a scalpel or if tubers do not sprout, infections develop in a short time.

Results from uninoculated tubers which developed soft-rot after 20 days in water at 22.5° C. are shown in table no. 3 and in plate no. 4. It may be noted that 3 tubers (1 of variety Arran Pilot and 2 of variety Eclipse) out of a total of 50 developed neither buds nor soft-rot.

TABLE 3.

Soft-rot development in uninoculated potato tubers stored at 18-22.5°C for 5 months, after standing in water for 20 days. Sprouts were removed during storage. Incubation at 22.5°C.

VARIETY	Total	TUBERS CONDITION			
		No. with soft-rot		No. sound	
		Sprouted	Unsprouted	Sprouted	Unsprouted
Catriona.....	12	0	3	9	0
Ulster Prince.....	12	0	0	12	0
Eclipse.....	12	0	10	0	2
Arrant Pilot.....	14	0	3	10	1

In plate no. 5 are seen healthy sprouted tubers of the variety Sharpe's Express after seven days in water. Only 1 tuber out of 12 showed an early stage of soft-rot. Plate no. 6 shows the same tubers 15 days after removing buds. As a check on the influence of buds in arresting infection, a group of them were left in one tuber. This tuber was the only one which remained sound, as seen in the picture.

B) IMPORTANCE OF MATURITY ON THE ARREST OF INFECTION

1. *Inoculated tubers in the presence of free moisture.*

Since the object of this work was to study the difference in development of infection between resting tubers and those which may be influenced by meristematic activity, it was thought that storage at a low temperature would stop either the germinative activity or that activity

TABLE 4.

Germinative activity of the host and extent of soft-rot in tubers kept for six months and a half at 5° C. Results were taken after inoculation with *E. carotovora*, var. *aroideae* and 10 days incubation at 22.5°C. Inoculations were carried out immediately after tubers were removed from the cool chamber. Moisture content of pumice powder 33 %.

Variety	Extent of soft-rot				Germination		Situation of buds and soft-rot
	E. W. (mm.)	I. W. (mm.)	D. (mm.)	Fresh weight (g.)	No. of germinative points	Fresh weight of buds (g.)	
Ulster Supreme.	38	43	24.5	46.5	0	0.0	—
	46	22.5	18	23.0	0	0.0	—
	45	35	26	45.5	0	0.0	—
	47	39	23.5	33.5	0	0.0	—
	58	31	30	58.5	0	0.0	—
Arran Peak.	18	22	21	6.62	4	0.02	
	54	26.5	22	35.5	0	0.0	—
	7	7	9	0.27	5	0.016	—
	7	7	7.5	0.21	7	1.348	—
	8	8.5	9	0.51	6	0.923	—
Majestic.	31	31	22	26.0	0	0.0	—
	18	21	21	7.82	8	0.267	
	53 (R. 9)	—	—	20.88	3	0.349	
	23-31	28.5	21	19.20	4	i	—
	12	9-13-16	17.5	1.70	5	0.099	—
King Edward.	10.5	13	10	0.61	9	0.659	—
	5	8	7	0.27	8	0.272	—
	50 (R. 6.5)	31	24	11.38	5	0.251	
	15-25 (R. 5)	12	11	5.93	4	0.252	—
	7	8	8	0.33	8	0.563	—
Dr. McIntosh.	6	6	6.5	0.16	5	0.373	—
	6	6	7	0.16	7	2.356	
	9	27	22	8.41	5	1.576	—
	22	26	18.5	9.76	4	0.045	
	21-45	—	—	23.5	0	0.0	—

E.W. = External width of the lesion.—I.W. = Internal width of the lesion.—
D = depth.—i = incipient.—R = radius.—● = point of inoculation.—
III = buds.— = soft rot.

Diagrams: Soft-rot developed opposite to buds.

which would remain after growth. Under these conditions germination would occur very slowly and it should be possible to obtain tubers having different degrees of activity.

Tubers of five varieties were collected from the Rockefeller Field Station (Cambridge) and placed after lifting at 5° C. They were kept in these conditions for six months and a half. Inoculation with *E. carotovora*, var. *aroideae*, by method (2) (Vicente Jordana, 1958a) was carried out immediately after removal from the cool chamber. Tubers were wrapped in muslin and half buried in pumice powder with a moisture content of about 33 %. Results after incubation for 10 days at 22.5°C. are given in table no. 4. These results record the development of buds as well as the increase of soft-rot in single tubers. From this table it is seen that tubers in which no development of buds occurred were rotten to a considerable extent. Sprouted tubers arrested infection. A few germinated tubers showed a development of soft-rot, but as seen in the adjoining diagrams, buds maintained their influence for defence in the surrounding tissues.

This table no. 4 also shows that tubers of variety Ulster Supreme were the least matured of the lot. They did not develop buds and soft-rot increased greatly. To accomplish these observations of the state of maturity, two other experiments with the same variety were performed.

One took place after tubers had been for a few days at a temperature suitable for sprouting. A number of tubers were inoculated with *E. carotovora*, var. *aroideae*, and placed in water with the lesion immersed. After 10 days at 22.5° C. the tubers were cut open and photographed (plate no. 7). The sprouted ones arrested infection completely, whilst those with incipient germination arrested infection after some development of soft-rot: unsprouted tubers were rotten.

The other experiment was performed after 23 days when all the tubers had sprouted at the temperature of 15-18° C. Tubers were inoculated by method (2) with *E. carotovora* var. *aroideae*, and maintained for ten days at the same temperature of 22.5° C. at which immature tubers had been placed.

The difference in the average results obtained from the two experiments is clearly shown in table no. 5. Further details of the latter experiment will be given in a subsequent study on the lack of varietal differences.

TABLE 5.

Importance of maturity.—Average mean of soft-rot increase in tubers of variety Ulster Supreme (formerly stored at 5° C.) according to their state of maturity and development of buds. Tubers were inoculated with *E. carotovora* var. *aroideae* and maintained at 22.5°C for 10 days. Mean of 5 tubers.

Time of inoculation	% Moisture (p. p.)	Fresh weight of rotted material (g)	Fresh weight of buds (g.)
Immediately after removal from the chamber at 5° C.	33	41.4	0.0
When tubers had sprouted for 23 days at the temperature of 15-18° C.	30	0.29	0.556

p.p. = pumice powder.

2. Natural incidence of disease in the presence of water.

25 uninoculated tubers of variety Heida and another 25 of variety Turia were placed in a small amount of distilled water and incubated at 23° C. for 12 days. At the same time another 11 tubers of Turia and 12 of Heida, after being washed, were incubated at 25° C. in dry-environmental conditions for 10 days. Then, the sprouted tubers were likewise placed in water and incubated at the same temperature of 23° C. for 12 days. As seen in plates no. 8 and no. 9, natural incidence of disease was greater in immature tubers than in tubers in which maturity had been stimulated (plate no. 10).

As seen in the picture (plate no. 10), one tuber of variety Heida started rot. This was possibly due to the fact that a change of susceptibility in potato tissues seems to occur at some stages of inactivation (Vicente Jordana, 1958c): more active tissues for the bacteriostatic effect become the most sensitive when biological activity is arrested. As it will be explained in a further study of this type of inactivation, buds immersed in water start rot which is transmitted to their germinative points inside the tuber, although other buds might maintain the bacteriostatic effect throughout the other parts of the tuber.

This seems to be the case with that tuber of variety Heida. It is possible that at an early stage of maturity, when the single developed bud remained immersed in water, rot started. However, after the tuber was turned upwards and left for another 15 days at the same temperature of 23°C, new buds developed and infection was arrested. The bacteriostatic effect was also clearly shown in this tuber as soon as it reached its state of maturity and when buds were able to maintain their growth. Table no. 6 expresses the natural incidence of disease in tubers of varieties Heida and Turia according to their state of maturity. As seen in the table, variety Heida was the least mature for the bacteriostatic effect as well as for sprouting when the experiments started.

TABLE 6.

Importance of maturity.—Incidence of natural disease developed in uninoculated tubers of Turia and Heida varieties of potato according to their state of maturity and development of buds. Tubers were partially immersed in water and incubated for 12 days at 23°C.

Time of preparation	Variety	Total	TUBERS CONDITION				Tubers showing the bacteriostatic effect	
			Sprouted	Rotted	Partially Rotted	Wholly Sound	No.	%
Immediately after tubers were received from storage (unknown conditions).....	Turia	25	10 (8)	12	5	8	10	40
	Heida	25	5	20	5	0	5	20
When tubers had been for 10 days at the temperature of 25° C. to favour their maturity.....	Turia	12	(12)	0	0	12	12	100
	Heida	11	11 (10)	0	1	10	11	100

Between brackets, fully sprouted.

C) THE CONDITION OF TUBERS TO ACHIEVE MATURITY FOR THE MICROSTATIC EFFECT

When the bacteriostatic effect in potato tubers was first described (Vicente Jordana, 1953), it was said that "when germination starts after tuber maturity has been completed, it is observed that the tuber acquires a compact consistency and a relative degree of hardness; this condition becomes more marked if the tuber is transferred to favorable conditions of development. Rot is slowly produced and it often seems as if infection were arrested. Sometimes infection is reduced to a mere thread of soft-rot no greater than a few millimeters of extension in the line of inoculation".

As said before, the same condition was reported later (Vicente Jordana, 1954), when it was considered that the state of maturity for the bacteriostatic effect is obtained at that moment in which, "if environmental conditions are good enough for the fullest development of buds, the tuber presents a consistent, compact aspect with a relative degree of hardness". At present no changes in this concept can be made. Since the phenomenon not only concerns bacteria, but also arrest of the development of fungi, it might be said that maturity for a microstatic effect is achieved in potato tubers when the tuber becomes hard, consistent and firmly coherent during an active development of buds.

This condition of tubers seems to require the direct influence of water, because it has mainly been found when tubers were partially immersed in water or when they were placed in moist sand, pumice, peat or soil if precautions were taken to maintain activity in the tubers.

A comparative example to show more clearly the condition of tubers for the microstatic effect is seen in plate no. 11 taken during one experiment. Tubers of variety Turia were more sensitive to their immersion in water during 10 days at 3°C than tubers of variety Heida. After leaving the tubers for another 10 days in dry-environmental conditions at 25°C. to allow them to recover their germinative activity, tubers of Turia (which hardly recovered) were left at room temperature and exposed to light for over one month. Meanwhile, tubers of Heida were submitted to other observations and later partially immersed in water.

and twice desprouted. Incidence of disease (dry-rot and soft-rot) was found in five unsprouted tubers of Turia out of twenty, three other unsprouted tubers were not much damaged and four sprouted tubers showed internal lesions and diseases of the skin.

The twenty sprouted tubers of variety Heida appeared as seen in the picture. Cut open in two parts only one of these tubers presented an arrested lesion. It should be noticed that the tubers of Turia were left in dry condition to avoid the development of microorganisms. These results with Turia variety may also be compared with those expressed in table no. 6 (in which 12 tubers of this variety had arrested infection after reaching maturity) and plate no. 10. This plate together with plates nos. 5 and 11 show the special condition of tubers for the microstatic effect. Sometimes tubers are split open, but this does not mean that infection is developing.

Although active tubers in dry condition may generally maintain the effect, it is considered that dryness is not the best state for this type of study. Dry condition of tubers might be misleading for a true knowledge of the effect of germination in tuber defence. The main reason is due to the fact that free water is required for the increase of soft-rot (Vicente Jordana, 1958b); consequently the arresting of infection may be due sometimes to a lack of suitable humidity and not to the bacteriostatic effect itself. It has also been found that sometimes dryness may reduce germinative activities and organisms other than soft-rot bacteria can develop to some extent. Normally, buds facing the air develop more slowly than those in contact (but not immersed) in water. On the other hand the water content of some tubers which have been inactivated may favour the development of infection including soft-rot, giving an erroneous idea on the importance of water on the breakdown of tissues.

D) DISCUSSION

The experiments reported above conclusively show that the presence of buds have a definite influence on the arrest of infection. However, the same experiments demonstrate that presence of buds alone is not enough reason to consider their activity for defence on the whole tuber, unless a state of maturity is reached.

To achieve maturity, tubers require some time at a temperature suitable for sprouting, which seems to be the time necessary for a diffusion factor to spread all round the tubers. The fact that tubers at an early stage of maturity may be rotted to some extent seems to confirm this idea.

The results obtained on the development of disease in the presence of water using immature tubers, or those in which buds were removed, agree with results of experiments on the susceptibility of potato tissues to soft-rot (Vicente Jordana, 1958b). On the contrary, no susceptibility of the tissues is found in the presence of active buds unless, as said before, some stage of immaturity remains in the tuber. Tables no. 5 and no. 6 conclusively show that the direct influence of water had no effect on the soft-rot production in very active tubers although they were partially immersed in water. Plates nos. 5 to 11 also give a good example of the strength of the defensive system. As was previously stated (Vicente Jordana, 1955a) attention must be paid to the fact that in general active mature tubers are neither affected nor contaminated by the rotted ones and/or the mass of putrid material in which they are placed.

These facts demonstrate again the critical value of humidity for a better understanding of the bacteriostatic effect. It is just when tubers are partially immersed in water that they acquire the full state of consistency and hardness required to show clearly the microstatic effect.

In this condition tubers sprout strongly. It is likely that the direct influence of humidity favours the spread and maintenance of the diffusion factor by directly helping the development of germinative processes; consequently water, which has been considered to be an important factor for the breakdown of potato tissues by aiding the growth of the parasite microorganism has a reversible action when it aids growth activities in the host. Then micro-organisms can hardly develop.

It is easily understandable that the experimental condition of previous dryness for achieving tuber maturity is an artificial way to avoid an early development of disease by the influence of water.

SUMMARY

The fact that maturation of potato tubers and a state of pre-germination prevent infection by pathogenic fungi and bacteria seems to have long been known. However it was found that a state of active germination was apparently necessary to arrest infection.

The experiments reported in this paper conclusively show that the presence of buds is not the sole condition for achieving maturity for the bacteriostatic effect, because to achieve a true state of active defence in the whole tuber a special stage of maturity is required.

To achieve this latter stage of maturity tubers require some time at a suitable sprouting temperature, which seems to be the time necessary for a diffusion factor to spread throughout the tuber.

It is also considered that a tuber is mature for the bacteriostatic effect when infection is arrested for at least ten days in the whole tuber, although well developed buds might maintain the effect for a longer period of time.

Since the phenomenon not only concerns bacteria but also the development of fungi it might be said that the condition of a potato tuber to achieve maturity for a microstatic effect is obtained when, during an active development of buds, the tuber becomes hard, consistent and firmly coherent. This stage of the tuber is mainly acquired in the presence of water.

The fact is discussed that while tissues in immature tubers are highly susceptible to infection, as they were in peeled potato tubers (Vicente Jordana, 1958b), no susceptibility is found in mature tubers. Again, the critical value of humidity is considered, because it seems that water has a reversible action in the manifestation of the phenomenon: it helps the breakdown of potato tissues of inactive tubers by aiding the development of parasite, but favours the defensive system of the tuber when it aids growth activities in the host.

For these reasons, the maintenance of tubers in dry condition might be misleading in this type of study.

RESUMEN

Las indagaciones realizadas cerca de agricultores y otras personas relacionadas con el cultivo y almacenamiento de la patata han proporcionado la convicción de que el fenómeno de bacteriostasia natural que ofrecen estos tubérculos es conocido de siempre empíricamente. No obstante, los estudios realizados han permitido revelar que el fenómeno sólo se produce en período de germinación activa.

Este trabajo viene a demostrar que la presencia de brotes no es suficiente para paralizar totalmente la infección del tubérculo, a menos que éste haya adquirido un estado especial de madurez. Para alcanzar el cual parece necesario que pase cierto tiempo desde el momento en que se inicia la germinación y que se favorece mediante el mantenimiento del tubérculo a una temperatura adecuada. Este tiempo podría ser el que tardaría en extenderse por el tubérculo un factor de difusión procedente de los brotes activos.

A pesar de que, como ya se ha expuesto anteriormente, los tubérculos bien germinados pueden mantener el efecto por períodos mayores de tiempo, se considera que un tubérculo está maduro, para el efecto bacteriostático, cuando es capaz de paralizar la infección en la totalidad del tubérculo por un período mínimo de diez días.

Considerando que el fenómeno no sólo se acusa en presencia de las bacterias, sino que también afecta al desarrollo de hongos, se podría decir que un tubérculo de patata alcanza la plena madurez para demostrar su efecto microstático, cuando, en un estado de activa germinación, adquiere una consistencia dura y firmemente coherente. Este estado viene favorecido por la acción directa de la humedad y puede obtenerse colocando los tubérculos ya maduros directamente en agua.

Esta influencia directa de la humedad en favorecer el efecto microstático trae nuevamente a la consideración el valor crítico de la humedad para el conocimiento y estudio del fenómeno de citoarjesis en los tubérculos de patata. Los resultados expuestos demuestran que los tejidos que no maduraron suficientemente son tan sensibles a la putrefacción como demostraron serlo los correspondientes a tubérculos pelados (Vicente Jordana, 1958b). Sin embargo, los tejidos que han madurado bajo el influjo de la actividad germinativa demuestran ser insensibles a la infección,

y, como ya se ha dicho otras veces, no son afectados ni por los tubérculos putrefactos con los que están en contacto, ni por la masa pútrida en que con frecuencia se encuentran situados.

De estos hechos se puede considerar que la humedad o, por mejor decir, el agua, ejerce una acción reversible en la manifestación del fenómeno. De una parte, ayuda a la destrucción de los tejidos del tubérculo favoreciendo la acción del microorganismo parásito. De otra, preserva esos mismos tejidos favoreciendo asimismo el sistema defensivo del huésped.

Por estas razones, las experiencias que se realizan en estado seco pueden enmascarar el estudio del fenómeno y dar conclusiones ajenas al fin propuesto.

REFERENCES

- BENNETT, F. T. 1946. Soft-rot of potatoes in 1945 crops. *J. Minist. Agric.* 53, 2, 56.
- BOYD, A. E. W. and HENDERSON, J. M. 1953. Susceptibility of immature potato tubers to blight. *Plant. Pathol.* 2, 4, 113.
- FOCKE, R. 1952. Der Einflub von Ausspflanzzeit und vorkeimung der Kartoffel auf die Höhe der durch *Rhizoctonia solani* hervorgerufenen Schäden. *Wiss. Z. Univ. Rostock*, 1, 2, 47.
- SMITH, W. L. and SMART, H. F. 1955. Relation of soft-rot development to protective barriers in Irish Potato slices. *Phytopath.* 45, 12, 649.
- VICENTE JORDANA, R. 1953. Un efecto bacteriostático en los tubérculos germinados de patata. *Real Academia de Farmacia. Madrid* (not. published).
- VICENTE JORDANA, R. 1954. Paralización de la podredumbre del tubérculo de patata durante su período de germinación. *Anal. Edaf. Fisiol. veg.* 13, 9-10, 705.
- VICENTE JORDANA, R. 1955a. Acción bacterio-fungistática de la patata germinada. *Ibid.* 14, 1, 51.
- VICENTE JORDANA, R. 1955b. Influencia de la temperatura de germinación en la manifestación del fenómeno de bacteriostasia natural de la patata. *Anal. Edaf. Fisiol. veg.* 14, 9-10, 519.

VICENTE JORDANA, R. 1958a. Cytoarjesis in potato tubers. I. Fundamentals and methods. *Microbiol. esp.* 11, 1, 1.

VICENTE JORDANA, R. 1958b. Cytoarjesis in potato tubers. III. Susceptibility of living potato tissues to soft-rot: Effects of humidity and temperature. *Microbiol. esp.* 11, 1, 37.

VICENTE JORDANA, R. 1958c. Advances in the study of Cytoarjesis. VII International Congress for Microbiology. Stockholm. Abstracts, 192, 10ff.

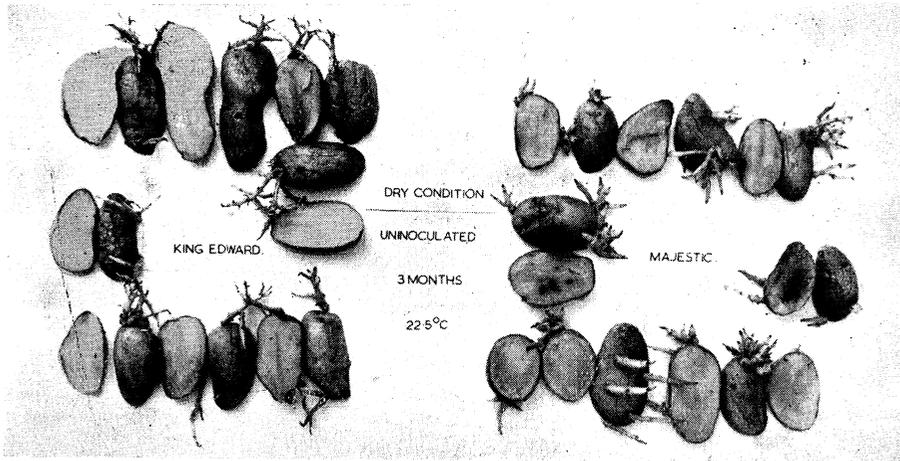


PLATE I.

The condition of tubers after 3 months storage at 22.5° C. in a dry atmosphere (R. H. of about 64 %).

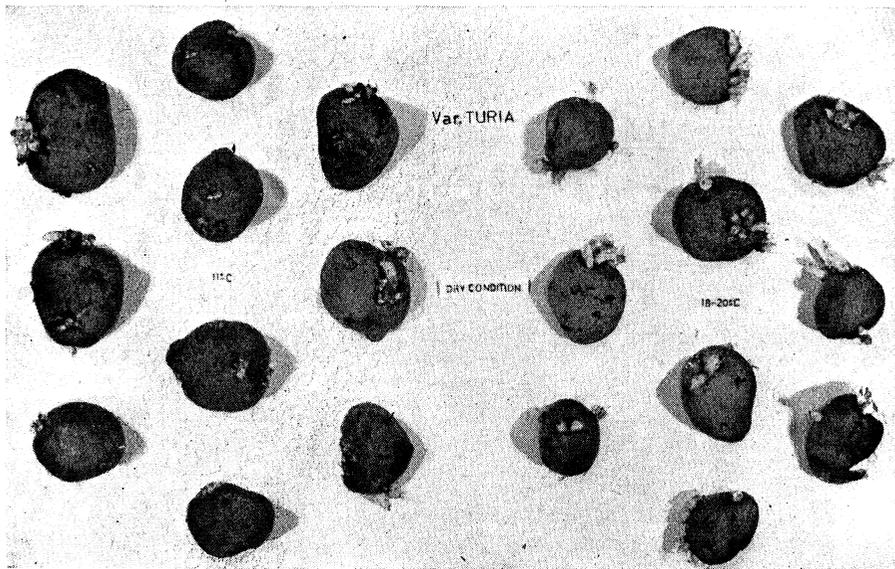


PLATE 2.

Random samples of tubers of variety Turia stored at 11° C. and 18-20° C. for two months. Buds in tubers held at the latter temperature were suppressed at the beginning of the experiment. Buds at 18-20° C. are clean, while at 11° C. present some necrotic areas.

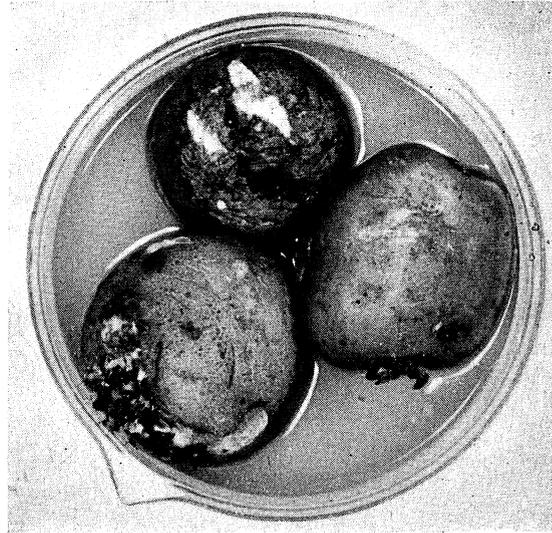


PLATE 3.

Tubers of variety Palogan previously immersed in water and placed in a chamber at 3-4° C. for 40 days. Development of micro-organisms is observed on the tuber surfaces after the water level had been lowered by evaporation.

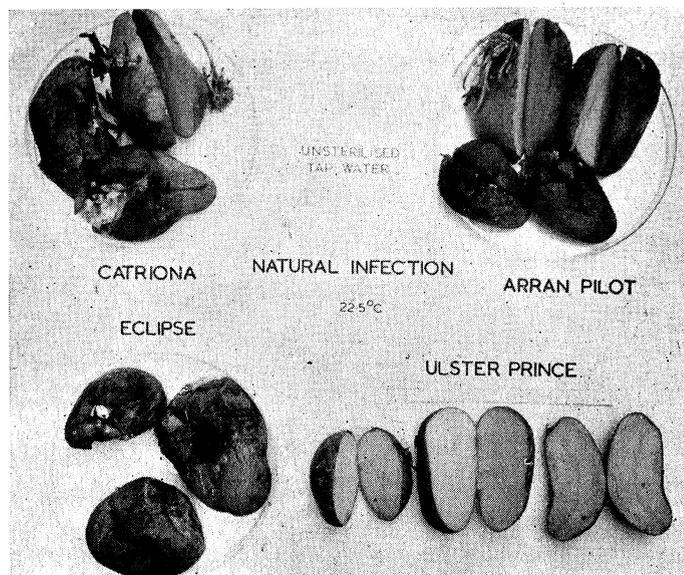


PLATE 4.

Development of natural infection in potato tubers after 20 days incubation at 22,5° C. Tubers were kept in a small amount of water. Healthy tubers had sprouted.

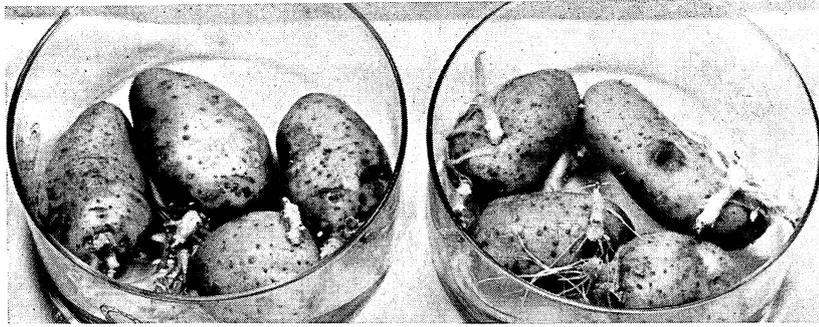


PLATE 5.

Arrest of natural infection in germinated tubers. These uninoculated tubers of Sharp's Express variety were placed in unsterilised tap water for 7 days at the temperature of 22.5° C.



PLATE 6.

Development of natural infection in tubers of plate no. 5, 15 days after removing buds. A group of buds was left in one of the tubers (left, bottom): this tuber remained sound.

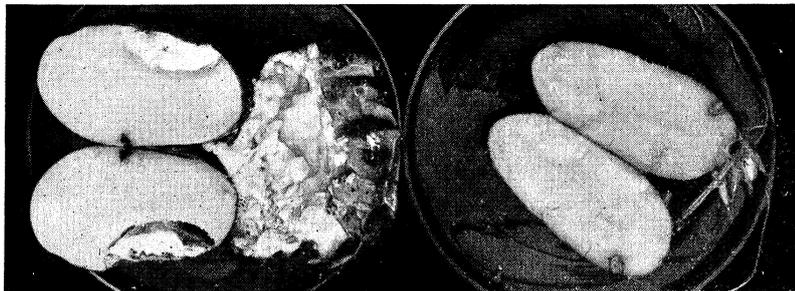
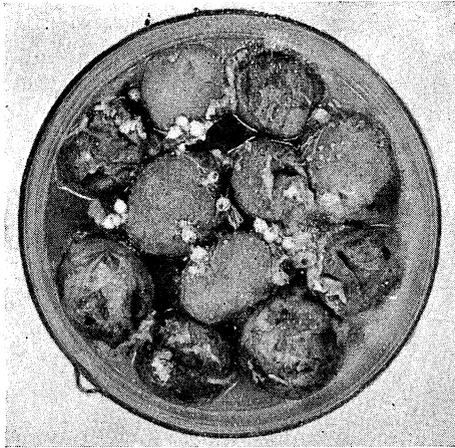
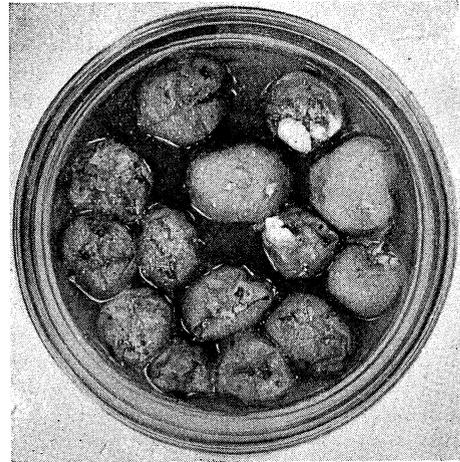


PLATE 7.

The importance of active sprouting and/or maturity of tubers in arresting soft-rot. Variety Ulster Supreme. The tubers were inoculated with *E. carotovora*, var. *aroidae*, and placed in water with the lesion immersed. Results after 10 days at 22.5° C. Left, unsprouted; right, sprouted.



Var. *Turia*.
PLATE 8.



Var. *Heida*.
PLATE 9.

The condition of immature tubers placed in water after 12 days at 23° C.

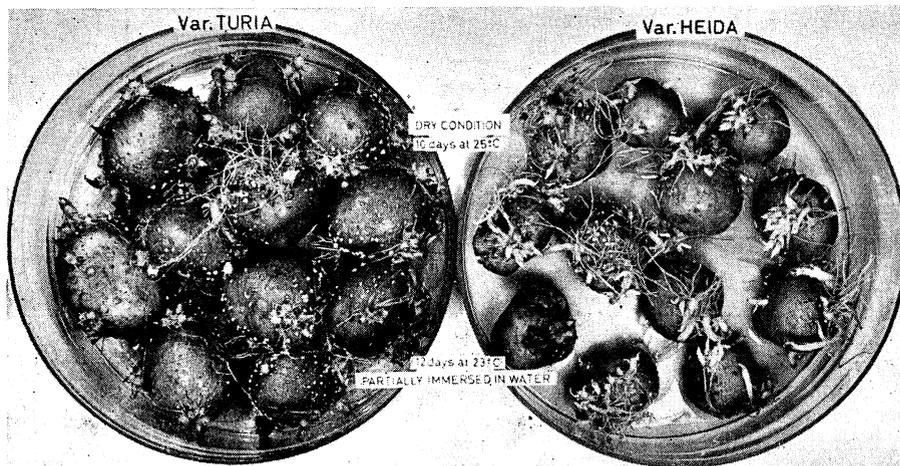


PLATE 10.

The condition of mature tubers (same lots, varieties and conditions of above) after 12 days at 23° C. Maturity of tubers was stimulated at 25° C. for 10 days in dry environmental state.

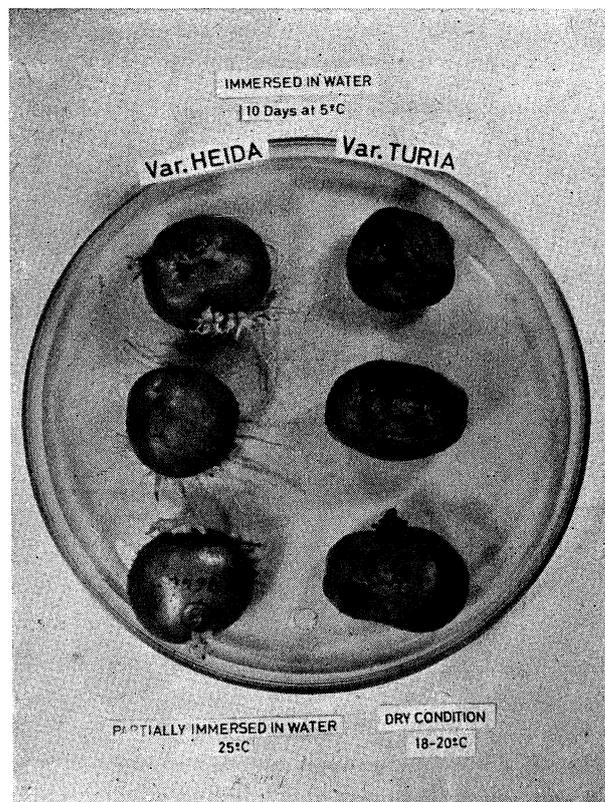


PLATE II.

The condition of tubers after achieving maturity for the microstatic effect (left).

DIRECCION GENERAL DE AGRICULTURA
INSTITUTO DE BIOLOGIA DEL TABACO. SEVILLA (*Heliópolis*).

LAS BACTERIAS EN LA FERMENTACION DEL TABACO *

POR

ANTONIO IZQUIERDO TAMAYO, ALEJANDRO DE MEDEIROS ALVAREZ
y RODRIGO COTA GALAN

Con objeto de investigar el posible papel que las bacterias puedan jugar durante la fermentación del tabaco, se han realizado inoculaciones con cultivos puros de *Bacillus* y *Micrococcus*, analizando las muestras antes y después del desarrollo de los microorganismos. Para llevar a cabo este trabajo hemos tomado como punto de partida la idea de Frankenburg (2) de investigar entre las varias transformaciones que sufren las hojas de tabaco, cuáles requieren enzimas bacterianos indispensables como catalizadores y cuáles otras pueden ser explicadas por mecanismos diferentes.

Las cepas utilizadas han sido aisladas por uno de nosotros en un extenso estudio sobre la flora bacteriana del tabaco (11 y 12). Los cultivos se preparaban inoculándolos en infusión de tabaco, peptonada y glucosada, según preconiza Giovannozzi (6 y 7), e incubándolos durante 24-48 horas a 37°; con estos cultivos se riegan después muestras de tabaco seco, picado, según técnica que detallamos a continuación.

EXPERIENCIA

Se prepararon seis matraces de dos litros de capacidad, depositando en cada uno 250 gramos de tabaco curado Burley, de pH = 5,63 y 3,33 % de nicotina.

Muestra P₁.—Regada con 100 c. c. de agua destilada estéril.

(*) Véase el trabajo sobre "La Flora Bacteriana del Tabaco", publicado por A. IZQUIERDO TAMAYO, en esta misma Revista, Vol. 10, n.º 4, octubre-diciembre 1957.

Muestra P².—Regada con 50 c. c. de infusión de tabaco, peptonada y glucosada (Giovannozzi), más 50 c. c. de agua destilada, estéril y neutra.

Muestra B₃₅.—Regada con 50 c. c. de un cultivo de la cepa 35-B (*Bacillus subtilis*), más 50 c. c. de agua estéril.

Muestra B₈₅.—Regada con 50 c. c. de la cepa 85-B (*B. megatherium-cereus*), más 50 c. c. de agua estéril.

Muestra C₃₆.—Regada con 50 c. c. de un cultivo de la cepa 36-C (*Micrococcus candidus*), más 50 c. c. de agua estéril.

Muestra C₃₈.—Regada con 50 c. c. de un cultivo de la cepa 38-C (*M. aurantiacus*), más 50 c. c. de agua estéril.

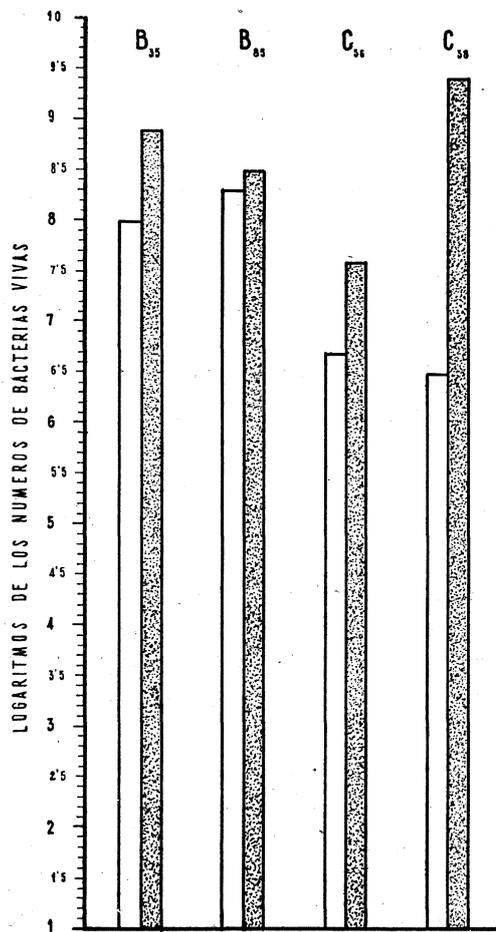
Las muestras se incuban en una estufa de convención forzada B. T. L., de Baird y Tatlock; en ésta se regula la humedad ambiente a un 90 %, que corresponde a una humedad del 40 % en el tabaco. (Véase Cota-I.)

Después de realizada la inoculación se toma un gramo de cada muestra y se realiza un recuento de microorganismos. A continuación pasan todas las muestras a la estufa a 40°; a las setenta horas de incubación se toma otro gramo de cada muestra y se realiza otro recuento. En el cuadro siguiente recogemos los resultados de ambos recuentos.

CUADRO I
Multiplicación de bacterias inoculadas en el tabaco.

Muestra	Especie bacteriana	Microorganismos por gramo		Número de veces multiplicados
		En el momento de la inoculación	Después de setenta horas de incubación a 40°	
B-35	<i>B. subtilis</i> ...	103.000.000	937.000.000	9,35
B-85	<i>B. megatherium-cereus</i> ...	235.000.000	366.000.000	1,56
C-36	<i>M. candidus</i> ...	6.000.000	50.000.000	8,38
C-38	<i>M. aurantiacus</i> ...	3.000.000	3.090.000.000	858,50

Debemos añadir que en el tabaco regado con infusión glucosada y peptonada (*Muestra P²*) ha habido también una multiplicación moderada de los microorganismos que, naturalmente, tenía el tabaco. En cambio en el tabaco regado sólo con agua no ha habido multiplicación (*Muestra P₁*).



B₃₅ Muestra inoculada con cultivo de *Bacillus subtilis*.

B₈₅ Muestra inoculada con cultivo de *Bacillus megatherium-cereus*

C₃₆ Muestra inoculada con cultivo de *Micrococcus candidus*.

C₅₈ Muestra inoculada con cultivo de *Micrococcus aurantiacus*.

□ Microorganismos por gramo en el momento de la inoculación
 ■ Microorganismos por gramo a las 72 horas de incubación a 40°

GRÁFICA I

Los resultados pueden verse reflejados también en la gráfica 1; tanto en ésta como en el cuadro I puede verse que todos los microorganismos inoculados se han multiplicado, destacando particularmente el *Micrococcus aurantiacus*.

A continuación, las muestras volvieron a la estufa, donde permanecieron veintiséis días, subiéndoles la temperatura hasta los 62°, a intervalos de 40°-45°-50°-55°-60°, cinco días a cada temperatura. Pasada esta fase se les dió un segundo riego, idéntico al primero, pasando nuevamente a la estufa, de 35° a 40° durante cuarenta y ocho horas; cinco días de 45° a 50° y otros cinco de 50° a 60°. Con esto se dió por terminada la experiencia.

El aroma ha mejorado en los tabacos inoculados, particularmente en las muestras C-36 y C-38.

ANALISIS DE LAS MUESTRAS

Las muestras se extienden en bandejas, en capa fina de unos 0.5 centímetros de espesor, manteniéndolas en contacto con el ambiente durante setenta y dos horas, para conseguir su homogeneización; son después guardadas en frascos cerrados, cuando la humedad es del 76 % y la temperatura de 16,25° C.

La *humedad* se ha determinado sobre unos 0,5 gramos de cada muestra, desecándolos a 70° C. durante cinco horas en estufa B. T. L.

Para el pH se ha seguido la técnica de Giovannozzi y De Bonis (5).

Para la *nicotina* se ha seguido el método gravimétrico, mediante el ácido sílico-wolfrámico. (Véase R de la Burbolla y Castro-14.)

El *nitrógeno* se descompone en las fracciones siguientes:

$$\text{N. total.....} \left\{ \begin{array}{l} \text{N. proteínico.} \\ \text{N. soluble.....} \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \text{N. alcaloide.} \\ \text{NH}_3 + \text{Aminas} + \text{Amidas} + \text{NO}_3^- + ? \end{array} \right.$$

El N. total se determina por el método de Gunning, modificado para incluir nitratos, según indican Loomis y Shull (15); véase también el trabajo de Ranker (16) y de Pucher y colaboradores (17).

Para el N. proteínico seguimos el método de Mohr, determinando el

nitrógeno del residuo seco por el método oficial de Kjeldhal-Cunning-Arnold. (Véase también Loomis y Shull-15).

El N. soluble y N₂ de materias amídicas es la diferencia entre el total y el proteínico. Véase Treadwell y Hall (18).

Los resultados se reúnen en el cuadro que se inserta a continuación.

CUADRO II
Variaciones del tabaco en pH, humedad y nitrógeno.

Muestra	Humedad %	pH (A 20° C)	Nicotina	NITROGENO				
				Total	Proteínico	Soluble	Alcaloide	NH ₃ + Aminas + Amidas + NO ₃ + ?
Testigo.	12,4	5,63	3,33	2,93	0,98	1,95	0,55	1,40
P-1	14,5	6,00	2,64	2,95	1,16	1,79	0,44	1,35
P-2	15,6	7,68 (*)	2,65	2,98	1,52	1,46	0,44	1,02
B-85	14,1	6,15	2,83	2,90	1,02	1,88	0,47	1,41
B-35	14,3	7,00	2,58	3,24	0,99	2,25	0,43	1,82
C-38	15,4	6,70	2,51	2,82	0,66	2,16	0,42	1,74
C-36	14,2	6,90	2,49	2,47	0,33	2,14	0,41	1,73

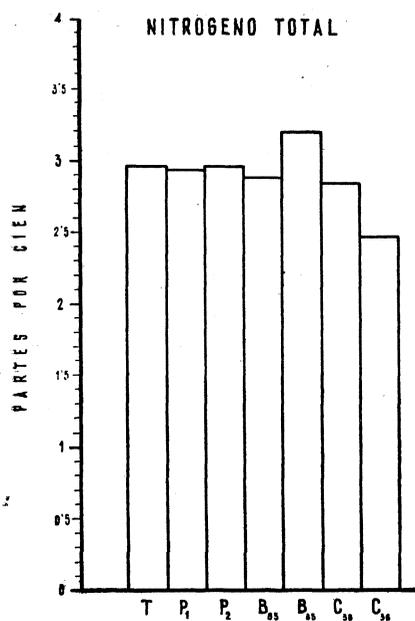
(*) Esta muestra fué atacada por mohos.

DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

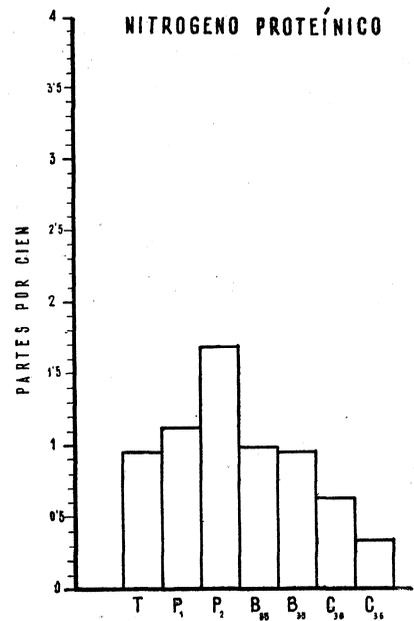
A la vista de estos resultados y de las gráficas adjuntas, pueden hacerse los siguientes comentarios:

1.º El nitrógeno total disminuye ligeramente en las muestras regadas con *B. megatherium-cereus* y *Micrococcus aurantiacus*, más en la regada con *M. candidus*; el *B. subtilis* lo ha hecho aumentar. (Véase gráfica II.)

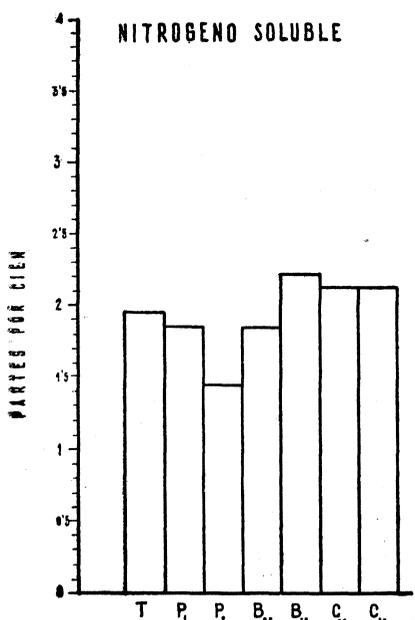
2.º En el nitrógeno proteínico es, quizá, donde se aprecian las variaciones más notables. En las muestras regadas con agua y con infusión de Giovannozzi estéril, ha aumentado con respecto al testigo; en la muestra P-2 se comprende esto quizá por la peptona que lleva el medio añadido. En las muestras regadas con *Bacillus*, la proporción vuelve a ser análoga a la del testigo, lo que prueba que los microorganismos al mul-



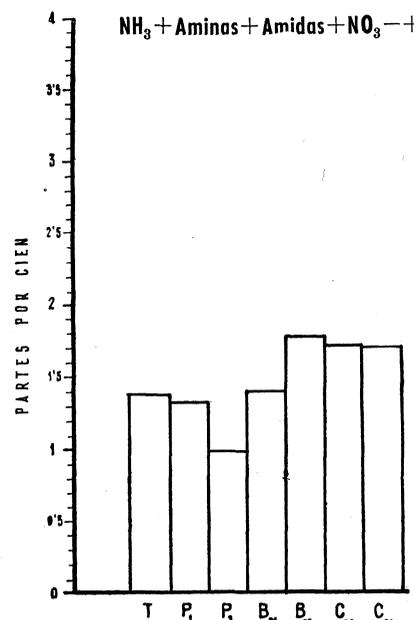
GRÁFICA II



GRÁFICA III



GRÁFICA IV



GRÁFICA V

tiplicarse han consumido el N₂ contenido en la peptona. En las muestras regadas con *Micrococcus* baja a una cifra notablemente inferior a la del testigo; de ello puede deducirse que tales bacterias, al multiplicarse, no sólo han consumido el N₂ protéinico de la peptona, sino que han atacado también a las proteínas del tabaco; esta acción es más destacada para el *M. candidus*.

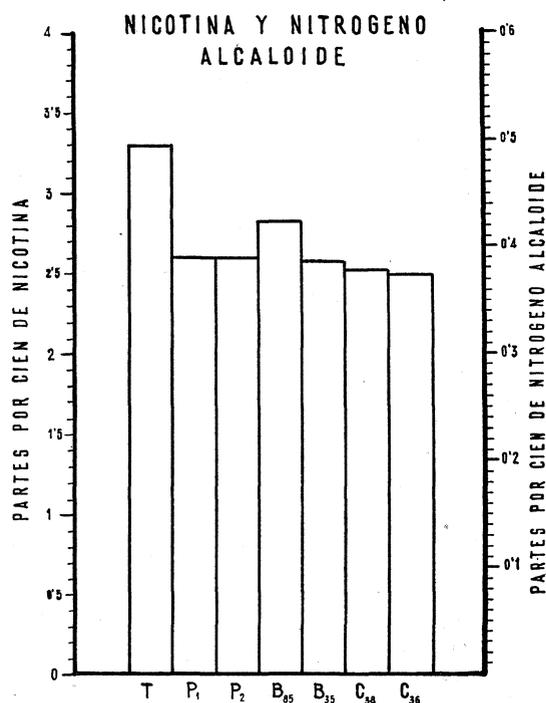
3.º Como consecuencia lógica de la descomposición de nitrógeno protéinico, aumenta la proporción de compuestos nitrogenados que pueden considerarse como procedentes de la digestión de proteínas: amoníaco, aminas, amidas, nitratos, etc.; así, en la gráfica V pueden verse las proporciones aumentadas por los *Micrococcus* y *B. Subtilis*, y muy ligeramente por *B. megatherium-cereus*; es de notar que los *Bacillus* que no atacaron el nitrógeno protéinico, aumentan en cambio éste; no debemos olvidar que estos microorganismos pueden reducir nitratos hasta amoníaco, por lo que puede pensarse en otro origen, para las formas de nitrógeno que estamos considerando, distinto al que tenga en las muestras regadas con cocos.

4.º El nitrógeno soluble, constituido en parte por las formas consideradas anteriormente aumenta también, como es lógico y en proporciones paralelas a ellas, como puede verse en la gráfica IV. Otra fracción está formada por el nitrógeno alcaloideo.

5.º Los alcaloides (nicotina, principalmente) disminuyen en el curso de la fermentación; así en la gráfica VI puede verse claramente, con respecto a la muestra testigo. Pero no puede afirmarse nada, acerca de que dicha disminución se deba a un ataque de microorganismos, ya que también ha disminuído en la muestra regada simplemente con agua. De todas formas, no cabe duda que el riego con *Micrococcus* ha ocasionado una pérdida algo mayor de alcaloide. Ya Frankenburg (4) ha supuesto que, en la degradación de la nicotina, pueden intervenir las bacterias. En Italia, Giovannozzi ha experimentado, en escala industrial, con tabacos tipo Kentucky, entre 1940-42 (9) ,a los que añadía cultivos puros de *Micrococcus nicotianae*, consiguiendo con ello una disminución en el porcentaje total de nicotina; ello, no obstante, sostiene la duda de si se trata de una acción directa del microorganismo o tan sólo de un proceso fermentativo más intenso, provocado por la adición del cultivo.

Frankenburg y colaboradores (3) han realizado un detenido estudio sobre las transformaciones de los compuestos nitrogenados durante el

secado y la fermentación; las proteínas sufren una proteólisis, iniciada en el secado y que continúa después, lo que trae como consecuencia un aumento considerable de aminoácidos, los cuales sufren una desaminación oxidativa con formación de amoníaco; éste, después de alcanzar en las hojas una cierta concentración, se evapora gradualmente. Otros amino-



GRÁFICA VI

ácidos pueden reaccionar con otros constituyentes de las hojas, formándose compuestos moleculares mayores. Es evidente que, al menos los *Micrococcus*, pueden influir favorablemente en esta descomposición de proteínas, dando origen no sólo a amoníaco sino a otras materias volátiles que pueden comunicar aroma y sabor al tabaco. Las proteínas comunican al tabaco olores y sabores desagradables. Giovannozzi (9) afirma que la fermentación de los tabacos alcalinos debe conducir a una descomposición, lo más completa posible, de sus materias proteicas.

Por lo que se refiere a las variaciones del pH, hemos de prescindir de la muestra P-2, ya que sufrió un intenso ataque de mohos. La fermentación produce una elevación del pH (véase el cuadro II). Esta alcalinización ha sido, en la muestra regada con *B. megatherium-cereus*, pequeña, pero más acusada en las regadas con *B. subtilis* y con *Micrococcus*; para estos últimos puede explicarse, en parte, por la producción de materias amoniacaes procedentes de la digestión de proteínas.

En cuanto a la humedad, la experiencia anterior no parece suministrar consecuencias claras; pero, en cambio, sí pueden deducirse de otra experiencia realizada posteriormente, según se recoge en el cuadro siguiente:

CUADRO III

Determinaciones de humedad en tabaco regado con bacterias.

MUESTRA	Humedad %
7 (Regada con agua)	12,62
6 (Idem con infusión de tabaco)... ..	12,79
1 (Idem con cultivo de <i>M. aurantiacus</i>).	13,73
2 (Idem id. de <i>M. candidus</i>)	13,05
3 (Idem id. de <i>B. subtilis</i>)... ..	14,82
4 (Idem id. de <i>B. megatherium-cereus</i>)	14,59
5 (Idem id. mezcla de <i>Bacillus</i> y <i>Micrococcus</i>)	15,22

De este cuadro se deduce que todas las muestras que recibieron cultivos microbianos poseen un porcentaje mayor de humedad, lo que supone que ha aumentado su facultad de retención de agua. El porcentaje más elevado corresponde, precisamente, al tabaco que recibió el riego de una mezcla de *Bacillus* y *Micrococcus*. Además de la retención, se puede pensar en una producción más intensa de agua, como consecuencia de la actividad respiratoria de las bacterias.

RESUMEN

Se realizan una serie de experiencias de inoculación de cultivos puros de bacterias en el tabaco, comprobándose que se multiplican en el mismo, cuando se le somete a temperatura y humedad adecuadas; destacan por su multiplicación los *Micrococcus*, particularmente *M. aurantiacus*. Los tabacos inoculados mejoran en su aroma y características, particularmente los que recibieron *Micrococcus*, y más los que fueron regados con cultivos-mezcla de *Bacillus* y *Micrococcus*. En el tabaco inoculado con *Micrococcus* disminuye el porcentaje de nitrógeno proteínico, aumentando el de nitrógeno soluble, particularmente en sus formas NH_3 aminas y amidas, hecho particularmente interesante, ya que en la fermentación de los tabacos alcalinos debe producirse una proteólisis lo más completa posible. Los alcaloides (nicotina principalmente) disminuyen en el curso de la fermentación, particularmente en el tabaco regado con *Micrococcus*. También hay aumento del pH en el tabaco fermentado, destacándose igualmente el inoculado con *Micrococcus*. Los tabacos regados con cultivos de bacterias tienen un porcentaje de humedad superior a los regados con agua o con infusión de tabaco.

SUMMARY

In the present paper, it is carried out a series of experiences of inoculation of pure cultures bacteria on the tobacco. It is checked that they increase in the same when are submitted to the fitting temperature and humidity. For its increase, stand out the *Micrococcus*, especially the *M. aurantiacus*. The inoculated tobaccos ameliorate in their aroma and characteristics, especially that have received *Micrococcus* and more yet, that what were irrigted with a mixture of cultures from *Bacillus* and *Micrococcus*. In the tobacco inoculated with *Micrococcus*, decrease the percentage of proteinic nitrogen, increasing, however, that of soluble nitrogen, especially in their forms NH_3 , amines and amides. It is a fact very interesting, inasmuch as in the fermentation of alkaline tobaccos, it must to be produced a proteolysis the most complete as possible. In the course of the fermentation, decrease the alkaloids (nicotine princi-

pally) and especially in the tobaccos irrigated with *Micrococcus*. There are also increase of the pH in the fermented tobacco, standing out, likewise, the inoculated with *Micrococcus*. The tobaccos irrigated with bacteria cultures, have a percentage of humidity higher than the irrigated with water or with infusion of tobacco.

BIBLIOGRAFIA

- (1) COTA GALÁN (R.). Influencia de la humedad en la combustibilidad del tabaco. Bol. Inst. Nac. Inv. Agron. Diciembre, 1953. Separata N.º 196.
- (2) FRANKEMBURG (W. G.). Chemical changes in the harvested tobacco leaf. Advances in enzymology. Vol. X. Interscience Publishers. New York-London. 1950.
- (3) FRANKEMBURG (W. G.), A. M. GOTTSCHO, A. A. VAITEKUNAS and R. ZACHARIUS. The effect of drying and fermentation on the nitrogen compounds in cigar tobacco leaves. Premier Congrès Scientifique International du Tabac. Paris-Bergerac, Septiembre 1955. Tomo II; págs. 426-431.
- (4) FRANKEMBURG (W. G.), A. M. GOTTSCHO and A. A. VAITEKUNAS. Biochemical changes of nicotine. Prem. Cong. Sc. Int. du Tabac. Paris-Bergerac. 1955. Tomo II; págs. 419-422.
- (5) GIOVANNOZZI (M.) y DE BONNIS (E.). Ricerche sui valori del pH dei Tabacchi. Bol. Tec. Scafati. XIV. 1935. N.º 4. Págs. 313-316.
- (6) GIOVANNOZZI (M.). Studi sulla fermentazione dei Tabacchi. 2.^a Nota. Scelta del terreno culturale per la numerazione e l'isolamento dei microbi del tabacco per sigari. Boll. Tec. Scafati. XIV. 1936. N.º 4. Pág. 186.
- (7) GIOVANNOZZI (M.) Studi sulla fermentazione dei Tabacchi. V.^a Nota. Prove comparative di fermentazione di Kentucky con aggiunta di culture micro-biche. Boll. Tec. Scafati. XVIII. 1940. N.º 2. Pág. 3.
- (8) GIOVANNOZZI (M.). Studi sulla fermentazione dei Tabacchi. XI nota. Sulle temperature delle masse per sigari toscani e sviluppi microbici, e nuovi confronti tra terreni colturali per la numerazione. Il tabacco. N.º 582. Roma. Enero 1948. Págs. 3-15.
- (9) GIOVANNOZZI (M.). Rapport general sur la Biochimie du Tabac. Premier Cong. Sc. Int. Tabac. Paris-Bergerac. Sept. 1955. Tomo II; págs. 355.
- (10) GRIBBINS (M. F.), D. E. HALEY and J. J. REID. The Fermentation of cigar-leaf tobacco as influenced by the addition of yeast. Journal of Agricultural Research. Vol. 69, N.º 9, Washington, D. C. November 1. 1944.
- (11) IZQUIERDO TAMAYO (A.) et F. GONZÁLEZ CANCHO. La Flore microbienne du Tabac. Prem. Cong. Sc. Int. Tabac. Paris-Bergerac. Sept. 1955. Tomo II.

- (12) IZQUIERDO TAMAYO (A.). Estudios sobre la flora bacteriana del tabaco. *Anales Inst. Nac. Inv. Agron. Madrid*. Vol. V. N.º 1. 1956.
- (13) IZQUIERDO TAMAYO (A.), A. MEDEIROS y R. COTA. Estudios sobre la Flora bacteriana del Tabaco. II. Observaciones sobre la multiplicación de bacterias inoculadas al tabaco y modificaciones que producen en el mismo. *Bol. Inst. Nac. Inv. Agron. Cuaderno N.º 264*. Junio. 1958.
- (14) RODRÍGUEZ DE LA BORBOLLA (J. M.) y A. DE CASTRO BRZEZICKI. Análisis de plantas. II. La determinación de la nicotina. *Anales Inst. Esp. Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal*. Tomo V. Vol. I. Madrid. 1946.
- (15) LOOMIS and SHULL. *Methods in Plant Physiology*. Mc Graw-Hill Book Co. New York, 1937. Págs. 309 y 313.
- (16) RANKER (E. R.). *Ann. Missouri Botanical Gardens*. 13; págs. 391-424. 1926.
- (17) PUCHER (G. W.), C. S. LEAVENWORTH and H. B. VICKERY. *Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition*. 2 págs. 191-193. 1930.
- (18) TREADWELL y W. T. HALL. *Química Analítica*. Tomo II. (Traducción castellana de Francisco Rived). Marín, editor. Barcelona, 1949. Tomo II.

NOTA PREVIA
ACERCA DE UN NUEVO ANTIBIOTICO *

POR
J. PEREZ SILVA y R. LAHOZ

Como continuación de trabajos anteriores de uno de los autores (20), llegamos al conocimiento de que la mayoría de las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas de embutidos, pueden producir una sustancia que inhibe el desarrollo de levaduras, especialmente las de los géneros *Debaryomyces* y *Saccharomyces*, y que, con una sola excepción, no presenta actividad frente a las bacterias que hemos probado.

Consultada la bibliografía sobre antibióticos producidos por *B. subtilis*, llegamos a la conclusión de que se trata de un nuevo antibiótico, para el que hemos propuesto (**) el nombre de *debariocidina*.

En la presente comunicación tratamos de exponer la actividad *in vitro* del antibiótico, parcialmente purificado, frente a diversos microorganismos.

MATERIAL Y METODOS

Hasta ahora, de 63 cepas de *Bacillus subtilis* estudiadas, hemos encontrado 56 que producen el antibiótico, pero todos los experimentos que aquí expondremos han sido realizados con la cepa R-XV de nuestra colección.

Como medio de cultivo para la producción de debariocidina empleábamos primeramente un extracto acuoso de pimientos maduros; pero, ante los inconvenientes de los medios naturales, tanteamos la posibilidad de un medio sintético y, entre los varios probados, elegimos uno

(*) Este trabajo ha servido de base a J. Pérez Silva para la obtención de una beca de la Fundación "Juan March".

(**) Comunicación al VII Congreso Internacional de Microbiología.

(glucosa-glutamato-sales minerales) que, además, da un rendimiento mucho mayor que el extracto de pimienta.

Medimos la actividad por el método de los cilindritos; éstos son de vidrio, de 10 mm. de altura, 6,9 mm. de diámetro interno y 8,5 mm. de diámetro externo. Al colocar el cilindro en la superficie de la placa, ejercemos una ligera presión para que quede sujeto. Mediante una pipeta Pasteur calibrada, dejamos caer dentro del cilindrito 0.05 c. c. de la sustancia activa, consistente en una fracción parcialmente purificada del líquido metabólico de un cultivo de diez días a 24° C.

Como medios de cultivo para probar la actividad *in vitro* hemos utilizado agar común, agar-malta y medio de Sabouraud-glicerina; el primero para bacterias y los otros dos para hongos. En el caso de *Mycobacterium tuberculosis* y *M. avium*, utilizamos medio de Lowenstein.

RESULTADOS

Vamos a expresar el comportamiento de la debariocidina frente a diversas bacterias y hongos en forma de cuatro tablas (I, II, III y IV), donde el signo + indica que hay inhibición, y el signo —, que no ha habido inhibición; en el primer caso, el número que figura a la derecha del signo + corresponde a la medida en milímetros del halo de inhibición. El número entre paréntesis, que se coloca a continuación del nombre de las levaduras, es el que les corresponde en la colección de levaduras del Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología.

TABLA I

Acción de la Debariocidina sobre algunos hongos dermatofitos.
(Medio de cultivo: Sabouraud-glicerina)

DERMATOFITO	Efecto
<i>Blastomyces dermatitidis</i> , K (C. B. S.)	+ 9
<i>Candida albicans</i> , C. B. S. 2.747... ..	+ 27
<i>Candida albicans</i> (193)... ..	+ 22
<i>Candida albicans</i> (417)... ..	+ 18
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> C. B. S. 539 C.	—

TABLA II

Acción de la Debarioidina sobre diversas bacterias.
(Medio de cultivo: agar común, excepto para *Mycobacterium tuberculosis* y *M. avium*, que se sembraron en medio de Lowenstein)

BACTERIA	Efecto
<i>Bacillus cereus</i> N. R. S., 232	—
<i>Bacillus coagulans</i> N. R. S., 784	—
<i>Bacillus lentus</i> N. R. S., 883... ..	—
<i>Bacillus megatherium</i> N. R. S., 239	—
<i>Bacillus subtilis</i> N. R. S., 231	—
<i>B. subtilis</i> , var. <i>aterrimus</i> N. R. S., 230	—
<i>B. subtilis</i> , var. <i>niger</i> N. R. S., 220... ..	—
<i>Corynebacterium</i> sp. (aislado de embutidos)	—
<i>Escherichia coli</i> N. C. T. C., 86... ..	—
<i>Micrococcus pyogenes</i> , var. <i>aureus</i> N. C. T. C., 6,571	—
<i>Micrococcus</i> sp. (aislado de embutidos)... ..	+ 18
<i>Mycobacterium avium</i>	—
<i>Mycobacterium phlei</i>	—
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain R.)	—
<i>Rhizobium leguminosarum</i> , 113 (Fraile)	—
<i>Rhizobium meliloti</i> , 144 (Fraile)... ..	—

TABLA III

Acción de la Debarioidina sobre algunos mohos.
(Medio de cultivo: agar-malta.)

MOHO	Resultado
<i>Aspergillus amstelodami</i>	—
<i>Aspergillus niger</i>	—
<i>Aspergillus oryzae</i>	—
<i>Botrytis cinerea</i> (I)	—
<i>Botrytis cinerea</i> (II)	—
<i>Botrytis cinerea</i> (III)	—
<i>Penicillium claviforme</i>	—
<i>Penicillium notatum</i>	—
<i>Penicillium patulum</i>	—
<i>Penicillium terreum</i>	—

TABLA IV
Acción de la Debarioidina sobre diversas levaduras.
(Medio de cultivo: agar-malta.)

LEVADURA	Efecto
<i>Candida heveanensis</i> (39)	+ 29
<i>Candida melinii</i> (102)	—
<i>Candida tropicalis</i> (40)	—
<i>Debaryomyces hansenii</i> (214)	+ 30
<i>Debaryomyces klockeri</i> (206)	+ 15
<i>Debaryomyces klockeri</i> (535)	+ 25
<i>Debaryomyces klockeri</i> (537)	+ 28
<i>Debaryomyces</i> sp. (LXXX)	+ 21
<i>Debaryomyces</i> sp. (LXXXI)	+ 17
<i>Geotrichum, lactis</i> (227)	—
<i>Hansenula anomala</i> (25)	—
<i>Hansenula anomala</i> (26)	+ 27
<i>Hansenula anomala</i> (27)	—
<i>Hansenula pseudopeliculosa</i> (268)	—
<i>Kloeckera apiculata</i> (225)	—
<i>Picchia farinosa</i> (108)	—
<i>Picchia membranefaciens</i> (233)	—
<i>Rhodotorula glutinis</i> (98)	—
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (96)	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)	+ 30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (246)	+ 13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (256)	+ 22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (281)	+ 18
<i>Saccharomyces chevalieri</i> (8)	—
<i>Saccharomyces chevalieri</i> (262)	+ 28
<i>Saccharomyces chevalieri</i> (264)	+ 18
<i>Saccharomyces pasteurianus</i> (75)	+ 22
<i>Saccharomyces pasteurianus</i> (119)	+ 24
<i>Saccharomyces pasteurianus</i> (247)	+ 19
<i>Saccharomyces delbrückii</i> (219)	+ 12
<i>Saccharomyces exiguus</i> (250)	+ 24
<i>Saccharomyces exiguus</i> (282)	+ 19
<i>Saccharomyces exiguus</i> (285)	+ 22
<i>Saccharomyces rosei</i> (277)	—
<i>Saccharomyces rosei</i> (254)	+ 18
<i>Saccharomyces rosei</i> (249)	—
<i>Saccharomyces rouxi</i> (286)	+ 20
<i>Sporobolomyces albidus</i> (502)	—
<i>Sporobolomyces odorus</i> (123)	—

Además de estos resultados que acabamos de exponer de la acción *in vitro* de la debariocidina, hemos de señalar tres características que nos han de servir para la discusión del trabajo, y que son: *la debariocidina es una sustancia extracelular, no tóxica para el ratón y que dializa a través de celofán*, propiedades que, aunque hayan sido deducidas del comportamiento de una fracción activa del líquido metabólico, pueden ser atribuídas desde ahora a la sustancia purificada.

DISCUSION

Dado que son relativamente numerosos los antibióticos descritos como producidos por *Bacillus subtilis*, sería engorroso y oscuro hacer una comparación de cada uno de ellos con la debariocidina; en consecuencia, hemos optado por confeccionar una tabla (tabla V) en la que resumimos las características de cada uno, de tal modo, que pueden ser comparadas cómodamente con las de la debariocidina.

Los antibióticos más parecidos a la debariocidina son los que presentan actividad sobre hongos y no sobre bacterias; entre éstos, el más parecido es la bacilomicina, que se diferencia por su distinto comportamiento frente a *Trichophyton mentagrophytes* y porque no dializa a través de celofán. También los factores *Aspergillus* y *Rhizoctonia* son parecidos a la debariocidina, de la que se diferencian por su distinto comportamiento frente a *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*.

Debido a que aún no tenemos purificada la sustancia activa, hemos de emplear métodos de difusión para valorar en cierto modo el poder de inhibición frente a los distintos microorganismos y, por consiguiente, los valores numéricos que resultan están sujetos a posibles modificaciones cuando podamos trabajar con la sustancia aislada y purificada, con la que, además, podremos emplear otros métodos de valoración (4) más exactos que el método de los cilindritos.

De los resultados que hasta ahora hemos conseguido, se deduce que nuestro antibiótico ha de tener muy poca aplicación en Medicina, puesto que, de los microorganismos patógenos que hemos probado, sólo *Candida albicans* se muestra sensible. Sin embargo, dado que inhibe el desarrollo de varias especies de *Saccharomyces*, la debariocidina puede tener apli-

TABLA V

Comparación entre la Debariocidina y los demás antibióticos producidos por *Bacillus subtilis*.

ANTIBIOTICOS PRODUCIDOS POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	ACCION ANTIMICROBIANA											Otras caracteris- ticas				
	<i>Micrococcus pyogenes aureus</i> .	<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	<i>Mycobacterium phley</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . .	<i>Rhizobium sp.</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i> . . .	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . .		<i>Debaromyces sp.</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Antibiótico XG (8)	+	+	»	»	»	+	»	»	»	»	»	»	»	+	»	E
Bacilina (5)	+	+	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	E
Bacilipina (17)	+	-	»	»	-	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	E
Bacilisina (17)	+	+	+	+	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	E
Bacilomicina (14) (15)	»	»	»	»	»	»	+	+	+	»	»	»	»	»	»	E, ND
Bacitracina (10)	+	+	»	»	+	+	+	»	»	»	»	»	»	»	»	E
DEBARIOCIDINA	-	-	-	-	-	-	+	-	(+)	+	+	-	-	-	-	E, D, NT.
Endosubtilisina (19)	+	+	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	I, NT.
Eumicina (11)	(+)	-	+	»	+	»	»	-	+	»	»	»	»	»	»	E
Factor "Aspergillus" (16).	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	+	+	+	+	+	E, ND
Factor "Rhizoctonia" (16)	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	+	+	+	+	+	E, D
Fungocidina (2)	»	»	»	»	+	»	»	»	»	»	»	»	+	»	»	
Fungocina (3)	+	»	»	»	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	
Globicidina (18)	+	»	+	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	
Micosubtilina (25)	»	»	»	»	»	»	»	»	+	»	»	»	»	-	»	I, T.
Neocidina (22)	+	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	
Rizobacidina (1)	»	»	»	»	»	»	+	»	»	»	»	»	»	»	»	
Subtilina (9)	+	-	+	+	+	-	»	-	»	»	»	»	»	»	»	I, NT.
Subtilina C (6)	+	-	»	+	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	I,
Subtilisina (24)	-	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	
Subtenolina (7)	+	+	»	»	»	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	E, D
Toximicina (21)	+	»	»	»	+	»	»	»	+	»	+	»	»	»	»	
[Knecht y McCleskey (13)]	+	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	T
[Tsukamura (23)]	+	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	I,
[Woerner y Mueller (26)].	(+)	-	»	»	+	-	»	»	»	»	»	»	»	»	»	

+ = Inhibición. - = No inhibición. (+) = Ligera inhibición. I = Intracelular. E = Sustancia extracelular. T = Tóxico para el ratón. NT = No tóxico para el ratón. D = Dializa. ND = No dializa.

cación en Enología, en el sentido de que podría detener oportunamente la fermentación del mosto, que, como es sabido, es un paso requerido en la fabricación de ciertos tipos de vinos.

Nos queda, por último, aclarar un punto que puede inducir a error. En nuestra comunicación al VII Congreso Internacional de Microbiología, dijimos que *Candida albicans* y *Blastomyces dermatitidis* no eran sensibles a la debarioidina; estos resultados fueron debidos a que entonces empleábamos el medio original de Sabouraud para probar la actividad *in vitro*, donde no se muestran sensibles estos dermatofitos; mientras que posteriormente hemos empleado el medio de Sabouraud-glicerina, donde se consiguen los resultados que hemos dado en la tabla I.

RESUMEN

Se estudia la actividad *in vitro* de una fracción parcialmente purificada del líquido metabólico de una cepa (R-XV de nuestra colección) de *Bacillus subtilis* aislada de embutidos españoles. Este líquido metabólico inhibe el desarrollo de levaduras de los géneros *Saccharomyces* y *Debaryomyces*; también es activo frente a *Candida albicans*. Se propone para este antibiótico el nombre de *Debarioidina*.

SUMMARY

The *in vitro* activity of a partially purified fraction of the metabolic liquid or a strain of *Bacillus subtilis* (R - XV, of our collection) isolated from spanish sausages has been studied. The liquid inhibits the growth of some *Saccharomyces* and *Debaryomyces*, and also shows activity against *Candida albicans*. The name *Debarioidina* is proposed for this antibiotic.

BIBLIOGRAFIA

- (1) CASAS-CAMPILLO, C. 1951. Rizobacídina, un antibiótico con particular actividad para las bacterias de los nódulos de las leguminosas. *Ciencia*, 11: 21-28.
- (2) CERCOS, A. P. 1951. Actividad *in vitro* de la fungocídina. *An. Soc. Cient. Argentina*, 152: 68-74.
- (3) CERCOS, A. P. 1954. Fungocina, antibiótico sintetizado por *Bacillus subtilis*. *An. Soc. Cient. Argentina*, 157: 38-46.
- (4) FLOREY H. W. y otros. 1949. *Antibiotics*. Reinhold Publishing Co.: New-York.
- (5) FOSTER, J. W. y WOODRUFF, H. B. 1946. Bacillin, a new antibiotic substance from a soil isolate *Bacillus subtilis*. *Jour. Bact.*, 51: 363-369.
- (6) HASSALL, C. H. 1948. Subtilin C, an antibiotic concentrate from *Bacillus subtilis*. *Nature*, 161: 317-318.
- (7) HIRSCHHORN, H. N.; BUCCA, M. A. y THAYER, J. D. 1948. Subtenolin, an antibiotic from *Bacillus subtilis*. I.—Bacteriologic properties. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 67: 429-432.
- (8) HOBBY, G. L., REGNA, P. P., DOUGHERTY, N. y STIEG, W. E. 1949. The antifungal activity of antibiotic XG. *J. Clin. Investigation*, 28: 927-933.
- (9) JANSEN, E. F. y HIRSCHMANN, D. J. 1944. Subtilin, an antibacterial product of *Bacillus subtilis*; culturing conditions and properties. *Arch. Biochem.*, 4: 297-309.
- (10) JOHNSON, B. A., ANKER, H. y MELENEY, F. L. 1945. Bacitracin, an new antibiotic product by a member of the *Bacillus subtilis* group. *Science*, 102: 376-377.
- (11) JOHNSON, E. A. y BURDON, K. L. 1946. Eumycin, a new antibiotic active against pathogenic fungi and higher bacteria, including bacilli of tuberculosis and diptheria. *Jour. Bact.*, 51: 591.
- (12) KAREL, L. y ROACH, E. S. 1951. *A dictionary of antibiotics* Columbia University Press, New-York.
- (13) KNECHT, A. T. y MCKELSKY, C. S. 1955. Studies on an antibiotic produced by a strain of *Bacillus subtilis*. *Proc. Louisiana Acad. Sci.*, 18: 16-22.
- (14) LANDY, M., ROSENMAN, S. B. y BARREN, G. H. 1947. An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Jour. Bact.* 54: 24.
- (15) LANDY, M.; BARREN, G. H.; ROSENMAN, S. B. y COLIO, L. G. 1948. Bacillomycin, an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 67: 539-541.
- (16) MICHENER, H. D. y SNELL, N. 1949. Two antifungal substances from *Bacillus subtilis* cultures. *Arch. Biochem.*, 22: 208-214.
- (17) NEWTON, G. G. F. 1949. Antibiotics from a strain of *Bacillus subtilis*: bacilipin A and B and bacilysin. *Brit. J. Exptl. Path.*, 30: 306-319.
- (18) QUIN, L. I. 1952. Globicidin, a new antibiotic from *Bacillus subtilis*, morphotypic globigii. *Antibiot. and Chemother.*, 2: 221-224.

- (19) SAINT-RAT, L. y OLIVIER, H. R. 1946. Extraction and purification of endosubtilysin. *Compt. Rend. Acad. Sc.*, 222: 297-299.
- (20) SOCIAS, A. y PÉREZ-SILVA, J. 1957. Contribución al estudio de la microbiología de los embutidos. *Microbiol. Española*, 10: 287-304.
- (21) STESSEL, G. J.; LEBEN, C. y KEITT, G. W. 1953. Partial purification and properties of the antifungal antibiotic, toximycin. *Phytopath.*, 43: 23-26.
- (22) TSUKAMURA, M. 1950a. Studies on the antibiotic substances produced by spore-forming bacteria. III.—Neocidin, a new antibiotic substance produced by a number of the *Bacillus subtilis* group. *Jour. Antibiotics (Tokyo)*, 3: 499-511.
- (23) TSUKAMURA, M. 1950b. Studies on the antibiotic substances produced by spore-forming bacteria. IV.—An antibiotic from bacterial bodies of 0-3 strain -a strain of the *Bacillus subtilis* group. *Jour. Antibiotics (Tokyo)*, 3: 569-572.
- (24) VALLÉE, M. y SAUDINOS, S. 1946. Assay of subtilysin: relation between its bacteriolytic and amynolytic activities. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 140: 850-851.
- (25) WALTON, R. B. y WOODRUFF, H. B. 1949. A crystalline agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth. *J. Clin. Investigation*, 28: 924-926.
- (26) WOERNER, H. y MUELLER, J. 1953. Ueber aerobe Sporenbildener mit antibiotis Wirksamkeit und die Beeinflussung dieser Eigenschaft durch Formenwechsel und Pepton. *Zentralbl. Bakt. Abt. I Orig.*, 159: 198-201.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE CONSERVAS VEGETALES (Conclusión.)

POR
PEDRO ALONSO CARRION

RESULTADOS

Antes de pasar a describir los resultados de nuestras experiencias, indicaremos que todas las determinaciones expuestas han sido realizadas por triplicado, utilizando para ello materiales procedentes de diversas conservas vegetales, tanto normales como alteradas, pero cuyos productos se han elegido al azar en el comercio, con el fin de poder llegar a tener una visión general del problema planteado.

En todas estas investigaciones hemos seguido la guía de trabajo anteriormente mencionada, así como las normas generales y clásicas para cualquier trabajo de tipo microbiológico.

JUGO DE TOMATE.

Envase.

Material: Hoja de lata.
Incubación: Cincuenta días, a 25° C.
Examen exterior: Normal.
Examen interior: Normal.

Contenido.

Examen macroscópico. Normal. Producto líquido.
Examen microscópico: Se observan cocos aislados y en cadenas cortas rodeados por masas mucilaginosas; bacilos medianos y otros degene-

rados, así como esporas. Todos ellos en abundancia y Grampositivos. (Véase foto 1.)

pH determinado con electrodo de vidrio: 3.92.

Crecimiento en los medios de cultivo.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos sin masas mucilaginosas; pequeños bacilos y esporas.
- M. 4: Negativo a los siete días. Temperatura de incubación, 55° C.
- M. 5: Negativo a los siete días.
- M. 6: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos aislados y en cadenas cortas rodeados por masas mucilaginosas. Bacilos medianos y finos, así como abundantes esporas.
- M. 4: Positivo a las cuarenta y siete horas. Temperatura de incubación, 37° C. Abundantes cocos aislados y reunidos en cadenas de 3 a 4 células, todos envueltos por masas mucilaginosas. Bacilos medianos y finos. (Véase foto 2.)
- M. 8: Positivo a las veinticuatro horas. Gran cantidad de cocos rodeados por masas mucilaginosas, así como algunos bacilos medianos y finos. (Véase foto 3.)
- M. 11: Positivo a las veinticuatro horas. Gran cantidad de bacilos medianos y esporulados, así como también cocos aislados o en cadenas cortas, rodeados por masas mucilaginosas. (Véase foto 4.)
- M. 13: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Temperatura de incubación, 25° C. Algunos cocos envueltos por masas mucilaginosas.

De interés sanitario.

M. 7: Negativo.

M. 15: Negativo.

Aislamientos.

Resiembra del M. 11 en el medio Agar-Caldo glucosado-Jugo de tomate (M. 12).

Temperatura de incubación: 37° C.

Tiempo: Cuarenta y ocho horas.

*Identificación.*a) *Microorganismo X.*

Colonias: Blancas; de borde entero, puntiformes y de estructura finamente granulosa.

Morfología: Cocos aislados, en parejas y en cadenas cortas. Sin esporas por los métodos de Wirtz y Dorner.

Tinción al Gram: Positivos.

Gota pendiente: Inmóviles.

Caldo glucosado: Enturbiamiento en las primeras veinticuatro horas, pasadas las cuales se forma un sedimento viscoso y queda el medio claro y transparente.

Patata: No es visible el crecimiento.

Medios con azúcares: En ellos se rodean de una gruesa mucilaginosa e incolora membrana consistente, especialmente, en aquellos que contienen sacarosa.

Comportamiento frente al oxígeno del aire: Aerobios y anaerobios facultativos.

Pruebas bioquímicas.—Gelatina: No la fluidifica, pero presenta crecimiento a lo largo de la picadura.

Indol: Negativa.

Caldo nitrado de Sagen: Nitritos negativa.

Acido y gas: A partir de arabinosa, glucosa, maltosa y sacarosa.

Acido, pero no gas: De lactosa, salicina y xilosa.

Resultado.—Con arreglo a los caracteres anteriores, identificamos a este microorganismo como *Leuconostoc mesenteroides* (*Leuconostoc pleofructi* de Savage y Hunwicke).

b) *Microorganismo Y.*

Colonias: Opacas, oscuras, irregularmente circulares, poco elevadas, arrugadas, adherentes y ligeramente extendidas, presentando una periferia más clara y finamente granulosa.

Morfología: Bacilos medianos, aislados o en cortas cadenas, con los extremos redondeados; presentan esporas ovales o elipsoidales, centrales o subterminales, que se ponen de manifiesto por los métodos de Wirtz y Dorner.

Tinción al Gram: Positivos.

Gota pendiente: Móviles.

Agar inclinado: Abundante crecimiento, extendido, elevado, de borde ondulado y adherente, presentando consistencia membranosa.

Caldo glucosado. Apreciable turbidez con formación superficial de un grueso velo, arrugado y consistente que se adhiere a las paredes del tubo.

Patata: Crecimiento lujuriente.

Comportamiento frente al oxígeno del aire: Aerobios y anaerobios facultativos.

Pruebas bioquímicas.—Gelatina: No la fluidifica.

Almidón: Lo hidrolizan.

Leche tornasolada: Lenta peptonización, con suficiente alcalinidad.

Acetil-metil-carbinol: Positiva.

Caldo nitrado de Sagen: Nitritos positiva.

Citratos: Los utilizan como fuente de carbono para su desarrollo.

Acido, pero no gas: De arabinosa, glucosa, maltosa, sacarosa y xilosa.

Resultado.—Con arreglo a los caracteres anteriores identificamos a este microorganismo como *Bacillus subtilis*.

PURÉ DE TOMATE.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: Cincuenta y cinco días, a 37° C.

Examen exterior: Normal.

Clasificación: Plano.

Examen interior: Normal.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal. Producto semisólido, que fué concentrado al vacío.

Examen microscópico: Se observan cocos aislados, en parejas y en tetradas, así como bacilos medianos aislados y en cadenas cortas, junto a esporas y otros bacilos degenerados. Todos ellos Grampositivos.

pH determinado con electrodo de vidrio: 4.65.

Crecimiento en los medios de cultivo.

Aunque empleamos los mismos medios que en la experiencia anterior, en este caso sólo mencionaremos aquellos en que se observó crecimiento.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos aislados, en parejas y tetradas; pequeños bacilos y algunas esporas. Parece como si los bacilos tendiesen a la autoesterilización.
- M. 5: Ligerísimo ennegrecimiento alrededor de una pequeña colonia, apenas perceptible a los siete días.
- M. 8: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos aislados y en tetradas, muy pequeños, así como algunos bacilos de reducido tamaño.
- M. 11: *Positivo a las veinticuatro horas.* Abundantes cocos y bacilos medianos, aislados y en cadenas cortas.
- M. 13: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Algunos cocos aislados y bacilos en vías de degeneración.

De interés sanitario.

- M. 7: Negativo.
- M. 15: Negativo.

Aislamientos.

Resiembra del M. 11 en el M. 12 (Agar-Caldo glucosado-Jugo de tomate), incubándose las placas a 37° C. durante cuarenta y ocho horas.

Identificación.

a) *Microorganismo X.*

Colonias: Blanco-amarillentas, enteras, circulares, lisas, brillantes y butirosas.

Morfología: Cocos pequeños, aislados, en parejas y en tetradas. (Véase foto 5.)

Tinción al Gram: Positivos.

Gota pendiente: Inmóviles.

Agar inclinado: Crecimiento opaco, liso, húmedo y amarillento.

Caldo glucosado: Enturbiamiento y ligero sedimento.

Patata: Abundante crecimiento amarillento y brillante.

Comportamiento frente al oxígeno del aire: Aerobios y anaerobios facultativos.

Pruebas bioquímicas.—Gelatina: La fluidifica, formando una típica bolsa.

Almidón: No lo hidrolizan.

Leche tornasolada: Acidez y coagulación.

Indol: Negativa.

Caldo nitrado de Sagen: Nitritos positiva.

Acido: A partir de glucosa, lactosa y sacarosa.

No ácido: De rafinosa, salicina e inulina.

Resultado.—Con arreglo a los caracteres anteriores, identificamos a este microorganismo como *Micrococcus pyogenes*, var. *Aureus*.

b) *Microorganismo Y.*

Colonias: Pequeñas, enteras, ligeramente elevadas y no características.

Morfología: Bacilos medianos y algunos grandes, aislados y en cadenas cortas, con los extremos redondeados; presentan esporas elipsoidales o esféricas, terminales o subterminales, que se ponen de manifiesto por los métodos de Wirtz y Dorner. (Véase foto 6.)

Tinción al Gram: Positivos.

Gota pendiente: Móviles.

Agar inclinado: Escaso crecimiento, delgado y plano. En el medio M. 10, incubado a 55° C., se observa formación de colonias en su interior a las veinticuatro horas, si bien los bacilos con el tiempo tienden a la degeneración.

Caldo glucosado: Moderada turbidez, seguida de aclaramiento.

Patata: Escaso crecimiento.

Comportamiento frente al oxígeno del aire: Aerobios y anaerobios facultativos.

Pruebas bioquímicas.—Gelatina: No la fluidifica.

Almidón: Lo hidroliza.

Leche: Coagulación.

Acetil-metil-carbonil: Positiva.

Caldo nitrado de Sagen: Nitritos negativa.

Citratos: Negativa.

Acido: A partir de glucosa, maltosa y sacarosa.

No ácido: De xilosa y manitol.

Resultado.—Con arreglo a los caracteres anteriores, identificamos a este microorganismo como *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*).

TOMATE AL NATURAL.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: Cincuenta y cinco días, a 25° C.

Examen exterior: Normal.

Clasificación: Plano.

Examen interior: Normal.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal. Producto sólido.

Examen microscópico: Se observan cocos aislados y en cadenas cortas, muchos de ellos rodeados por masas mucilaginosas; bacilos medianos y otros degenerados, así como esporas. Todos estos microorganismos son Grampositivos y se encuentran en un número considerable por campo.

pH determinado con electrodo de vidrio: 3.95.

Crecimiento en los medios de cultivo.

De los medios empleados según la guía de trabajo, sólo mencionaremos aquellos en que se presentó crecimiento.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos sin masas mucilaginosas y medianos bacilos esporulados.
- M. 4: *Positivo a las cuarenta y ocho horas*: Temperatura de incubación, 37° C. Bacilos grandes y medianos con cápsula, observándose en el interior del medio considerables burbujas de gas. (Véase foto 7.)
- M. 8: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Bacilos medianos con los extremos redondeados y algunos cocos pequeños rodeados por masas mucilaginosas.
- M. 11: *Positivo a las veinticuatro horas*. Bacilos medianos y pequeños, así como cocos aislados, algunos de los cuales se encuentran rodeados por masas mucilaginosas.

M. 13: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Algunos cocos aislados, con y sin masas mucilaginosas.

De interés sanitario.

M. 7: Negativo.

M. 15: Negativo.

Aislamientos.

Resiembra del M. 11, empleando el mismo medio, temperatura y tiempo de incubación que en la experiencia anterior.

Identificación.

a) *Microorganismo X.*—(Véase foto 8.)

Tanto los caracteres diferenciales como las pruebas bioquímicas seguidas en su identificación coinciden en todo con el microorganismo X de la experiencia "Jugo de tomate".

Resultado.—Según lo expuesto, identificamos a este microorganismo como *Leuconostoc mesenteroides* (*Leuconostoc pleofructi* de Savage y Hunwicke).

b) *Microorganismo Y.*

Colonias: Blanco-cremosas, translúcidas, de borde continuo, poco elevadas y de superficie lisa y brillante, presentando consistencia butirosa y siendo fácilmente emulsionables.

Morfología: Bacilos grandes y medianos, rectos y otros ligeramente curvados, aislados y en parejas, con los extremos redondeados. En los medios con agar presentan cápsula. Sus esporas son ovales, terminales y subterminales, las cuales se ponen de manifiesto por los métodos de Wirtz y Dorner. (Véase foto 9.)

Tinción al Gram: Positivos.

Tinción con iodo: Amarilla, típica de glucógeno.

Gota pendiente: Móviles.

Agar inclinado: No se observa crecimiento.

Caldo glucosonado: Ligero enturbiamiento con escaso depósito granuloso.

Patata: No se observa crecimiento.

Comportamiento frente al oxígeno del aire: Anaerobio facultativo.

Pruebas bioquímicas.—Gelatina: No la fluidifica.

Almidón: No lo hidrolizan.

Leche tornasolada: Acidez y coagulación rápida, fragmentándose los grumos, pero sin que se presente digestión.

Indol: Negativa.

Caldo nitrado de Sagen: Nitritos negativa.

Acido y gas: Los producen a partir de la galactosa, glucosa y sacarosa.

Resultado.—Con arreglo a los caracteres anteriores, identificamos a este microorganismo como *Clostridium pasteurianum*.

SALSA DE TOMATE.

(CATSUP)

Envase.

Material: Vidrio.

Incubación: Sesenta y tres días, a 25° C.

Examen exterior: Normal.

Clasificación: Normal.

Examen interior: Normal.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal. Producto semisólido.

Examen microscópico: Se observan bacilos medianos con los extremos redondeados y otros degenerados. Abundantes esporas. Todos Gram-positivos.

pH determinado con electrodo de vidrio: 3.15.

Crecimiento en los medios de cultivo.

M. 8: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Algunos bacilos cortos y abundantes esporas.

M. 11: Positivo a las veinticuatro horas. Abundantes bacilos medianos y otros más cortos, así como numerosas esporas. (Véanse las fotos 10 y 11.)

M. 13. Positivo a las cuarenta y ocho horas. Bacilos medianos y cortos, acompañados de abundantes esporas. (Véase foto 12.)

De interés sanitario.

M. 7: Negativo.

M. 15: Negativo.

Aislamiento.

Resiembra del M. 11 en el medio Agar-Caldo glucosado-Jugo de tomate (M. 12), incubándose las placas a 37° C. durante cuarenta y ocho horas.

Identificación.

Microorganismo X.

Colonias: Blanco-grisáceas, grandes y medianas, planas, cremosas; unas con el borde entero y otras irregulares.

Morfología: Bacilos grandes y medianos, rectos o ligeramente curvados, aislados y en cadenas cortas y largas, presentando todos los extremos redondeados. Sus esporas esféricas o elipsoidales, centrales o subterminales, se ponen de manifiesto por los métodos de Wirtz y Dorner.

Tinción al Gram: Positivos. (Véase foto 13.)

Gota pendiente: Móviles.

Agar inclinado: Abundante crecimiento, extendido, denso, no adherente y de color grisáceo.

Caldo glucosado: Apreciable turbidez en la zona superior del medio, pero sin que se forme velo.

Patata: Abundante crecimiento en la parte superior del tubérculo, siendo aquél espeso, blando y blanco-cremoso.

Comportamiento frente al oxígeno del aire: Aerobios.

Pruebas bioquímicas.—Gelatina: Rápida fluidificación.

Almidón: Lo hidrolizan.

Leche tornasolada: Rápida peptonización, con ligera coagulación.

Acetil-metil-carbinol: Positiva.

Caldo nitrado de Sagen: Nitritos positivas.

Citratos: Los utilizan como fuente de carbono para su desarrollo.

Acido, pero no gas: A partir de glucosa y maltosa. No de arabinosa y xilosa.

Resultado.—Con arreglo a los caracteres expuestos, identificamos a este microorganismo como *Bacillus cereus*.

CONFITURA DE CIRUELA.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: Sesenta y cinco días, a 25° C.

Examen exterior: Una de las tapas se encuentra picada, lo que permite apreciar una lenta salida del contenido; además, las juntas se encuentran oxidadas.

Clasificación: Plano.

Examen interior: Normal, excepto la tapa picada, en que se presentan pequeñas fisuras rodeadas por óxidos.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal respecto a olor y color, pero se observa un abundante desprendimiento de burbujas en el interior del contenido. Producto viscoso.

Examen microscópico: Abundantes cocos aislados, en parejas y en tetradas, así como algunos bacilos pequeños y medianos, aislados y en cadenas cortas. Se aprecian igualmente algunas esporas y abundantes bacilos degenerados. Todos estos microorganismos son Grampositivos. (Véase foto 14.)

pH determinado con electrodo de vidrio: 3.40.

Crecimiento en los medios de cultivo.

M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos aislados, en parejas y tetradas, con algunos pequeños bacilos y esporas. Los bacilos tienden a la degeneración y las esporas son esféricas o elipsoidales.

- M. 4: Positivo a las cuarenta y ocho horas, presentándose sólo turbidez en la parte inferior del tubo. Temperatura de incubación, 37° C. Bacilos medianos, aislados y en cortas cadenas, con los extremos redondeados. Se observan algunos cocos.
- M. 8: *Positivo a las veinticuatro horas.* Cocos casi en cultivo puro, con algunos bacilos pequeños y aislados.
- M. 11. *Positivo a las veinticuatro horas.* Abundantes cocos y escasos bacilos medianos de extremos redondeados. Los cocos se presentan por parejas y tetradas, mientras que los bacilos aparecen aislados y en cadenas cortas.
- M. 13: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos casi en cultivo puro, con algunos pequeños bacilos, los cuales parece como si tendiesen a la autoesterilización.

De interés sanitario.

- M. 7: Negativo.
M. 15: Negativo.

Aislamientos.

Resiembras del M. 4 en Agar-Glucosa-Proteasa-Peptona-Ext.º de levadura (M. 10), y del M. 8 en Agar-Caldo glucosado (M. 9), incubándose estos últimos medios a 55 y 37° C., respectivamente, durante cuarenta y ocho horas.

Identificación.

a) *Microorganismo X.*

Todos los caracteres diferenciales seguidos para su identificación coinciden con los del microorganismo Y de la experiencia "Puré de tomate".

Resultado.—Según lo expuesto, identificamos a este microorganismo como *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*).

b) *Microorganismo Y.*

Todos los caracteres diferenciales coinciden en este caso con los del microorganismo X de la experiencia "Puré de tomate".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Micrococcus pyogenes*, var. *Aureus*.

CIRUELA AL NATURAL.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: Sesenta y ocho días, a 25° C.

Examen exterior: Normal, aunque una de las tapas se encuentra ligeramente oxidada.

Clasificación: Plano.

Examen interior: Normal.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal. Producto sólido.

Examen microscópico: Se observan abundantes esporas, así como algunos bacilos medianos y pequeños, la mayor parte de ellos degenerados. Estos microorganismos son Grampositivos. (Véase foto 15.)

pH determinado con electrodo de vidrio: 3.55.

Crecimiento de los medios de cultivo.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Numerosas esporas y escasos bacilos medianos y pequeños.
- M. 4: Positivo a las cuarenta y ocho horas, presentándose sólo crecimiento en la parte inferior del tubo. Temperatura de incubación, 37° C. Bacilos medianos y pequeños, aislados y en cadenas cortas, de extremos redondos, con esporas ovales, centrales o subterminales y esporas sueltas.
- M. 8: *Positivo a las veinticuatro horas.* Gran cantidad de bacilos medianos y pequeños, todos ellos esporulados, presentándose también esporas aisladas que se ponen de manifiesto por los métodos de Wirtz y Dorner.

M. 13: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Numerosas esporas y escasos bacilos medianos y pequeños.

De interés sanitario.

M. 7: Negativo.

M. 15: Negativo.

Aislamiento.

Resiembra del M. 8 en el medio Agar-Caldo glucosado (M. 9), incubándose las placas en estufa a 37° C. durante cuarenta y ocho horas.

Identificación.

Microorganismo X.

Todos los caracteres diferenciales de este germen coinciden con los descritos al tratar del microorganismo Y de la experiencia "Jugo de tomate".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Bacillus subtilis*.

CONFITURA DE ALBARICOQUE.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: Cuarenta y cinco días, a 25° C.

Examen exterior: Normal.

Clasificación: Plano.

Examen interior: Normal.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal. Producto semisólido.

Examen microscópico: Se observan bacilos pequeños y medianos, aislados y en cadenas cortas, con los extremos redondeados, así como abundantes esporas. Algunos bacilos presentan signos de degeneración. Todos estos microorganismos son Grampositivos.

pH determinado con electrodo de vidrio: 3.60.

Crecimiento en los medios de cultivo.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Escasos bacilos pequeños y medianos, así como numerosas esporas esféricas o elipsoidales. Los bacilos con el tiempo se degeneran por sufrir una autoesterilización.
- M. 8: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Los bacilos, de reducido tamaño, se presentan aislados y en cortas cadenas, con los extremos redondeados y muy esporulados. Sus esporas, elipsoidales o esféricas, aparecen sueltas y en la parte subterminal o terminal del bacilo.
- M. 11: Positivo a las cuarenta y ocho horas. El examen microscópico coincide con el del medio anterior.
- M. 13: *Positivo a las veinticuatro horas.* Abundantes bacilos medianos y pequeños, esporulados, aislados y en cadenas cortas, y cuyos extremos aparecen redondeados. También se presentan numerosas esporas sueltas.

De interés sanitario.

- M. 7: Negativo.
- M. 15: Negativo.

Aislamientos.

Resiembras de los medios M. 8 y M. 13 en Agar-Glucosa-Proteasa-Peptona-Ext.^o de levadura (M. 10), incubándose este medio en estufa a 55° C. durante cuarenta y ocho horas.

*Identificación.**Microorganismo X.*

Los caracteres diferenciales de este germen coinciden en todo con los ya descritos al tratar del microorganismo X en la experiencia "Confitura de ciruela".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*).

GUISANTE AL NATURAL.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: Cincuenta días, a 37° C.

Examen exterior: Normal.

Clasificación: Plano.

Examen interior: Normal.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal. Producto sólido.

Examen microscópico: Se observan cocos aislados y en parejas; bacilos medianos, aislados y en cadenas cortas, muchos de ellos degenerados, así como numerosas esporas. Todos estos microorganismos son Grampositivos. (Véase foto 16.)

pH determinado con electrodo de vidrio: 5.70.

Crecimiento en los medios de cultivo.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos sin masas mucilaginosas, aislados, por parejas y en cadenas cortas; bacilos medianos, rectos y ligeramente curvados, aislados y en cadenas más o menos cortas, así como algunas esporas.
- M. 8: *Positivo a las veinticuatro horas.* Gran cantidad de cocos rodeados por masas mucilaginosas, aislados y en pequeños grupos; algunos bacilos grandes y otros muy numerosos medianos, con los extremos redondeados, aislados y en cadenas cortas y largas, presentando esporas esféricas o elipsoidales en las zonas subterminales, las cuales se ponen de manifiesto por los métodos de Wirtz y Dorner.
- M. 11: *Positivo a las veinticuatro horas.* Gran cantidad de cocos y bacilos cuyas características coinciden con las que presentan al examen microscópico los gérmenes del medio anterior. (Véase foto 17.)

M. 13: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Abundantes cocos envueltos por masas mucilaginosas.

De interés sanitario.

M. 7: Negativo.

M. 15: Negativo.

Aislamientos.

Resiembra del M. 11 en Agar-Caldo glucosado-Jugo de tomate (M. 12), incubándose las placas en estufa a 37° C. durante cuarenta y ocho horas.

Identificación.

a) *Microorganismo X.*

Todos los caracteres diferenciales seguidos para su identificación coinciden con los descritos al tratar del microorganismo X de la experiencia "Salsa de tomate".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Bacillus cereus*.

b) *Microorganismo Y.*

Los caracteres diferenciales que presenta este germen coinciden en todo con los mencionados al tratar del microorganismo X de la experiencia "Tomate al natural".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Leuconostoc mesenteroides* (*Leuconostoc pleofructi* de Savage y Hunwicke).

TOMATE AL NATURAL ALTERADO.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: No se somete a esta operación por estar abombado.

Examen exterior: Las tapas se encuentran oxidadas, apreciándose un ligero escape del contenido por uno de los cierres.

Clasificación: De abombamiento suave.

Examen interior: Se aprecian corrosiones, descoloraciones y óxidos, así como una fina perforación en una de las tapas, muy próxima a uno de los cierres.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal, respecto a olor y color, pero se observa un abundante desprendimiento de burbujas en el interior del contenido. Producto sólido.

Examen microscópico: Cocos aislados, en parejas y en cadenas cortas, rodeados por masas mucilaginosas, así como bacilos pequeños, medianos y algunos grandes, con los extremos redondeados, aislados y en cortas cadenas, presentando estos últimos inclusiones intracelulares más o menos numerosas. Todos ellos en abundancia y Grampositivo.

pH determinado con electrodo de vidrio: 4.30.

Crecimiento en los medios de cultivo.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos sin masas mucilaginosas, junto a escasos bacilos pequeños y medianos.
- M. 8: *Positivo a las veinticuatro horas.* Gran cantidad de cocos rodeados por masas mucilaginosas así como de bacilos pequeños y medianos, acompañados de algunos grandes, los cuales presentan corpúsculos metacromáticos que se ponen de manifiesto por los métodos de Albert, Neisser y Loeffler.
- M. 11: *Positivo a las veinticuatro horas.* Gran cantidad de cocos y bacilos, cuyas características morfológicas coinciden con las que presentan los gérmenes del medio anterior.
- M. 13: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos y bacilos aislados y en cadenas cortas. Los cocos se encuentran rodeados por masas mucilaginosas y los bacilos presentan inclusiones intracelulares más o menos numerosas.

De interés sanitario.

M. 7: Negativo.

M. 15: Negativo.

Aislamientos.

Resiembras de los medios M. 8 y M. 11 en Agar-Caldo glucosado-Jugo de tomate (M. 12), incubándose las placas a 37° C. durante cuarenta y ocho horas.

*Identificación.*a) *Microorganismo X.*

Todos los caracteres diferenciales de este germen coinciden con los descritos al tratar del microorganismo Y en la experiencia "Guisantes al natural".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Leuconostoc mesenteroides* (*Leuconostoc pleofructi* de Savage y Hunwicke).

b) *Microorganismo Y.*

Para identificar a este germen partimos del medio Caldo glucosado-Jugo de tomate (M. 11), ya que no es fácil aislarlo del medio Agar-Caldo glucosado-Jugo de tomate (M. 12).

Morfología: Bacilos medianos y pequeños, pleomorfos, con los extremos redondeados, aislados y en cortas cadenas, presentando corpúsculos metacromáticos más o menos numerosos que se ponen de manifiesto por los métodos de Albert, Neisser y Loeffler.

Tinción al Gram: Positivos.

Gota pendiente: Inmóviles.

Agar inclinado: No se observa crecimiento.

Caldo glucosado: Apreciable turbidez en las primeras veinticuatro horas, seguida de aclaramiento con formación de un precipitado viscoso en el fondo del tubo.

Patata: No se observa crecimiento.

Comportamiento frente al oxígeno del aire: Anaerobios y aerobios facultativos.

Pruebas bioquímicas.—Gelatina: No la fluidifica.

Almidón: No lo hidrolizan.

Leche tornasolada: Acidez, pero no coagulación.

Caldo nitrado de Sagen: Nitritos negativa.

Acido y gas: A partir de glucosa y maltosa.

Acido, pero no gas: De arabinosa, galactosa y xilosa.

No ácido de sacarosa.

Resultado.—Con arreglo a los caracteres anteriormente expuestos, identificamos a este microorganismo como *Lactobacillus brevis* (*Lactobacillus lycopersici* de Mickle).

CONFITURA DE CIRUELA ALTERADA.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: No se somete a esta operación por estar abombado.

Examen exterior: Las tapas se encuentran oxidadas.

Clasificación: De abombamiento suave.

Examen interior: Se aprecian corrosiones y óxidos, así como una pequeña fisura en la tapa por donde se abrió el envase.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal, respecto a olor y color, pero se observa un abundante desprendimiento de burbujas en el interior del contenido. Producto viscoso.

Examen microscópico: Aparecen cocos aislados, en parejas y en cadenas cortas, algunos de los cuales se encuentran envueltos por una escasa masa mucilaginosa; bacilos medianos y grandes, rectos y otros ligeramente curvados, aislados y en cortas cadenas, presentando sus extremos redondeados, así como también algunas esporas esféricas y elipsoidales. Estos microorganismos son todos ellos Grampositivos.

pH determinado con electrodo de vidrio: 4.20.

Crecimiento en los medios de cultivo.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos sin masas mucilaginosas y bacilos medianos, largos y esporulados.
- M. 8: Positivo a las veinticuatro horas. Abundancia de pequeños cocos, aislados y en cadenas cortas, rodeados muchos de ellos por masas mucilaginosas, así como algunos bacilos medianos y gran-

des, aislados y en cortas cadenas, que presentan esporas esféricas o elipsoidales en las zonas subterminales, las cuales se ponen de manifiesto por los métodos de Wirtz y Dorner. (Véanse las fotos 18 y 19.)

- M. 11: *Positivo a las veinticuatro horas.* Gran abundancia de cocos y bacilos, cuyas características morfológicas coinciden con las que presentan los gérmenes del medio anterior. (Véase foto 20.)
- M. 13: *Positivo a las cuarenta y ocho horas.* Numerosos cocos envueltos en masas mucilaginosas, con algún bacilo esporulado de tamaño mediano. (Véase foto 21.)

De interés sanitario.

M. 7: Negativo.

M. 15: Negativo.

Aislamientos.

Resiembra del M. 11 en Agar-Caldo glucosado-Jugo de tomate (M. 12), incubándose las placas en estufa a 37° C. durante cuarenta y ocho horas.

Identificación.

a) *Microorganismo X.*

Todos los caracteres diferenciales de este germen coinciden con los ya expuestos al tratar del microorganismo X en la experiencia "Tomate al natural alterado".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Leuconostoc mesenteroides* (*Leuconostoc pleofructi* de Savage y Hunwicke).

b) *Microorganismo Y.*

Los caracteres diferenciales que presenta este germen coinciden en todo con los mencionados al tratar del microorganismo X en la experiencia "Guisantes al natural".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Bacillus cereus*.

CONFITURA DE ALBARICOQUE ALTERADA.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: No se somete a esta operación por estar abombado.

Examen exterior: Las tapas se encuentran oxidadas.

Clasificación: De abombamiento duro.

Examen interior: Se aprecian corrosiones, descoloraciones y óxidos.

Contenido.

Examen macroscópico: Normal respecto a olor y color, pero se observa un abundante desprendimiento de burbujas en el interior del contenido. Producto semisólido.

Examen microscópico: Numerosos cocos aislados, en parejas y en tetradas, así como escasos bacilos pequeños y medianos, aislados y en cadenas cortas, con los extremos redondeados, y algunas esporas esféricas o elipsoidales; junto a estos seres unicelulares aparecen abundantes bacilos medianos muy degenerados. Todos los microorganismos observados son Grampositivos.

pH determinado con electrodo de vidrio: 5.00.

Crecimiento en los medios de cultivo.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos aislados, en parejas y tetradas, casi en cultivo puro, con algún pequeño bacilo en vías de degeneración.
- M. 4: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Sólo se presenta turbidez en la parte inferior del tubo. Temperatura de incubación, 37° C. Bacilos medianos, aislados y en cortas cadenas, con los extremos redondeados, presentando esporas elipsoidales o esféricas, terminales o subterminales y escasos cocos por campo.
- M. 8: *Positivo a las veinticuatro horas.* Abundantes cocos, en parejas y tetradas, casi en cultivo puro, así como algunos bacilos pequeños, aislados y con tendencia a la autoesterilización. (Véase las fotos 22 y 23.)

- M. 11: Positivo a las veinticuatro horas. Cocos y escasos bacilos, cuyas características morfológicas coinciden con las que presentan los gérmenes del medio anterior.
- M. 13: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Sólo se aprecian cocos aislados, en parejas y tetradas.

De interés sanitario.

M. 7: Negativo.

M. 15: Negativo.

Aislamientos.

Resiembras del M. 4 en Agar-Glucosa-Proteasa-Peptonas-Ext.^o de levadura (M. 10) y del M. 8 en Agar-Caldo glucosado (M. 9), incubándose estos medios a 55 y 37° C., respectivamente, durante cuarenta y ocho horas.

Identificación.

a) *Microorganismo X.*

Todos los caracteres diferenciales de este germen coinciden con los descritos al tratar del microorganismo Y, en la experiencia "Confitura de Ciruela".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Micrococcus pyogenes*, var. *Aureus*.

b) *Microorganismo Y.*

Los caracteres diferenciales que presenta este germen coinciden en todo con los ya descritos al tratar del microorganismo X en la experiencia "Confitura de albaricoque".

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*).

GUISANTES AL NATURAL ALTERADOS.

Envase.

Material: Hoja de lata.

Incubación: No se somete a esta operación por estar abombado.

Examen exterior: Las tapas se encuentran ligeramente oxidadas.

Clasificación: De abombamiento suave.

Examen interior: Normal.

Contenido.

Examen macroscópico. Se observa un color oscuro, tendiendo a negro, y un abundantísimo desprendimiento de burbujas en el interior del contenido. El olor es pútrido y repugnante. Producto sólido.

Examen microscópico: Numerosos cocos aislados, en parejas y en tetradas, así como abundantes esporas ovales; bacilos pequeños y medianos, aislados y en cadenas cortas, con los extremos redondeados o hinchados los que presentan esporas en la zona subterminal, algunos de los cuales se encuentran degenerados. Todos estos microorganismos observados son Grampositivos.

pH determinado con electrodo de vidrio: 7.15.

Crecimiento en los medios de cultivo.

- M. 1: Positivo a las cuarenta y ocho horas. Cocos aislados, en parejas y en tetradas, casi en cultivo puro, con algunas esporas ovales.
- M. 4: *Positivo a las veinticuatro horas.* Se observa un abundante desprendimiento de gas y fluidificación total del Agar a las setenta y dos horas. Temperatura de incubación, 37° C. Numerosos bacilos medianos y pequeños, aislados y en cortas cadenas con los extremos redondeados, esporulados excéntricamente, hinchados, así como abundantes esporas y escasos cocos por campo.
- M. 6: *Positivo a las veinticuatro horas.* El comportamiento y las características morfológicas de los gérmenes que aparecen en este medio coinciden en todo con los del medio anterior.

- M. 8: *Positivo a las veinticuatro horas.* Se observa un ligero enturbiamiento más acentuado en la parte superior del medio, así como un abundante desprendimiento de gas. Numerosos cocos aislados, en parejas y tetradas, casi en cultivo puro, junto a bacilos pequeños y medianos, aislados y en cadenas cortas, con los extremos redondeados, y cuyas esporas subterminales y ova-les se ponen de manifiesto con los métodos de Wirtz y Dorner.
- M. 11: *Positivo a las veinticuatro horas.* Cocos y bacilos, cuyas caracte-rísticas morfológicas coinciden con las que presentan los gér-menes del medio anterior.
- M. 13: *Positivo a las cuarenta y ocho horas.* Cocos aislados, en parejas y tetradas, casi en cultivo puro, con algún bacilo pequeño y es-porulado por campo.

De interés sanitario.

- M. 7: Crecimiento a las veinticuatro horas. Prueba biológica: Ne-gativa.
- M. 15: Crecimiento negativo.

Aislamientos.

Resiembras del M. 6 en el mismo medio y del M. 8 en Agar-Caldo glucosado (M. 9), incubándose estos medios a 37° C. durante cuarenta y ocho horas.

Identificación.

a) *Microorganismo X.*

Colonias (en anaerobiosis): Blanco-amarillentas, pequeñas, algo trans-parentes e irregulares.

Morfología: Bacilos medianos, rectos, aislados, en parejas y cortas cadenas, presentando todos los extremos redondeados. Sus esporas ova-les, excéntricas o subterminales, deforman el cuerpo bacilar y se ponen de manifiesto con los métodos clásicos de Wirtz y Dorner.

Tinción al Gram: Positivos.

Gota pendiente: Móviles.

Agar inclinado (en anaerobiosis): Crecimiento grisáceo, opaco y es-parcido.

Caldo glucosado: Apreciable turbidez y formación de gas. Olor pútrido.

Patata: No hay crecimiento.

Comportamiento frente al oxígeno del aire: Anaerobios obligados.

Pruebas bioquímicas.— Gelatina: Fluidificación y ennegrecimiento.

Agar-sangre: Hemolisis.

Leche tornasolada: Lenta coagulación y reducción del tornasol; tardía peptonización con residuos oscuros y líquido ambarino.

Indol: Negativa.

Caldo nitrado de Sagen: Nitritos negativa.

Medios con carne: Enrojecimiento, ennegrecimiento, digestión y olor repugnante, con desprendimiento de gas.

Acido y gas: A partir del galactosa, glucosa y maltosa.

No fermenta a la lactosa, manitol y sacarosa.

Resultado.—Con arreglo a los caracteres expuestos, identificamos a este microorganismo como *Clostridium sporogenes*.

b) *Microorganismo Y.*

Todos los caracteres diferenciales seguidos en su identificación coinciden con los descritos al tratar del microorganismo X en la experiencia anterior.

Resultado.—Con arreglo a los caracteres a que hacemos referencia, identificamos a este microorganismo como *Micrococcus pyogenes*, var. *Aureus*.

DISCUSION

De los resultados de nuestras experiencias se deducen interesantes consideraciones sobre el estado microbiológico de las conservas vegetales españolas.

En nuestra primera experiencia sobre "Jugo de tomate" hemos aislado dos microorganismos, uno esporulado y otro no esporógeno, los cuales se encuentran en abundancia en el producto examinado. El hecho de haber obtenido cultivos positivos solo se puede explicar admitiendo un estado de latencia, condicionado por un bajo o insuficiente proceso de esterilización, pues si bien es cierto que el pH ácido favorece el desarrollo del *Leuconostoc mesenteroides*, bacteria acidúrica que contribuye

a la alteración de los zumos ácidos, especialmente en los productos del tomate, la presencia del *Bacillus subtilis* nos indica claramente el deficiente tratamiento térmico a que fue sometida la conserva, ya que no sólo las esporas sino incluso los mismos bacilos sobreviven al proceso de calentamiento.

Es indudable, a la vista de los resultados, que el *Leuconostoc mesenteroides* facilita la acidificación del producto ensayado, lo que explica el valor del pH que hemos determinado con el electrodo de vidrio.

El origen de estos gérmenes radica sin duda alguna en los vegetales con los que se elaboran los productos, pero además la presencia del *Leuconostoc mesenteroides* puede estar íntimamente ligada al empleo del azúcar en su preparación, que es precisamente lo que suponemos que ocurre en este caso.

El hecho de que las conservas presenten un aspecto normal se debe a que la baja tensión de oxígeno existente en el envase no permite el desarrollo del *Bacillus subtilis*, no pudiendo decirse lo mismo del *Leuconostoc mesenteroides*, el cual si bien acidifica no produce gas, que casi siempre es el responsable de los abombamientos.

En la experiencia "Puré de tomate" aislamos el *Micrococcus pyogenes* var. *Aureus* y el *Bacillus coagulans*. Estos microorganismos anaerobios facultativos han sobrevivido al tratamiento térmico, lo que nos indica el insuficiente y bajo proceso de esterilización a que fue sometida la conserva, puesto que no hay que olvidar que estos organismos son fácilmente destruidos por la acción del calor, incluyendo al *Bacillus coagulans*, que no deja de ser el menos resistente de las bacterias termofílicas formadoras de esporas. Ambos gérmenes contribuyen a la acidificación del alimento pero al no producir gas la lata no se abomba.

Nosotros no hemos registrado ningún caso de intoxicación alimenticia causada por el *Micrococcus pyogenes* var. *Aureus*, a pesar de haber realizado varios ensayos biológicos en este sentido en los que administramos vía *per os* cultivos puros e incluso el alimento mismo. Por tanto, de acuerdo con Segalove, Davison y Dak (40), estimamos que en las conservas ácidas como, por ejemplo, todas las derivadas del tomate, la enterotoxina estafilocócica o bien se inactiva durante el tratamiento térmico o no se produce en los alimentos de esta naturaleza, razón a la que atribuimos el que no se nos hayan presentado casos típicos de intoxicación por este microorganismo.

La presencia del *Bacillus coagulans*, al que Bergey considera sinónimo del *Bacillus thermoacidurans* de Berry y que se comporta como un organismo acidófilo y esporulado, con las características generales del grupo de "acidez plana", representa un peligro potencial de alteración ya que a determinadas temperaturas puede desarrollarse y originar deterioros considerables en las conservas, habiendo obtenido los mejores resultados de cultivo con aquellos medios en que el crecimiento se realizaba bajo condiciones de anaerobiosis, lo que corrobora su comportamiento como anaerobio facultativo.

En la experiencia "Tomate al natural", además de haber aislado el *Leuconostoc mesenteroides* al que nos referimos anteriormente, nos encontramos con el *Clostridium pasteurianum*, anaerobio sacarolítico como puede comprobarse por los resultados de nuestras investigaciones y cuya presencia se explica como un deficiente proceso de esterilización y lavado de los tomates en la fábrica, ya que tanto las esporas como algunos bacilos sobreviven al tratamiento calórico y proceden sin duda alguna del suelo.

Hemos observado que cuando el *Clostridium pasteurianum*, como en este caso, se desarrolla en medios que contienen agar, presenta cápsulas bien visibles, lo cual no ocurre si el crecimiento tiene lugar en otros medios, comprobándose asimismo la existencia de inclusiones intracelulares de glucógeno mediante la simple tinción con iodo.

Al examinar las conservas de "Salsa de tomate" (Cátsup), cuyo producto nos ha dado, por cierto, el pH más ácido de los determinados en este trabajo, nos hemos encontrado con el *Bacillus cereus*, aislado y caracterizado como tal, según exponemos en la experiencia correspondiente. La presencia de esta forma bacilar no solo nos indica un deficiente tratamiento térmico sino también un insuficiente vacío en el interior de la lata, ya que se trata de un organismo aerobio obligado, aunque hemos podido comprobar que se comporta, a veces, como anaerobio facultativo.

Con los resultados podemos asegurar que el producto no fue esterilizado, sino que aprovechando la gran acidez del mismo se envasó directamente, o tal vez el recipiente sería sometido a la ebullición antes de proceder a su llenado.

Todas las consideraciones expuestas las podemos aplicar a las demás conservas normales que hemos analizado, ya que los microorganismos aislados de ellas coinciden con los anteriormente citados y, por tanto,

las causas a que se debe su presencia pueden explicarse por las mismas razones.

De los productos normales examinados los "Guisantes al natural" son los que presentan el pH menos ácido, lo que influye en su más rápida alteración ante cualquier germen no muy exigente.

Las investigaciones microbiológicas en las conservas alteradas apenas si tienen valor, salvo desde el punto de vista del control industrial, ya que por su aspecto, tanto externo como interno, suelen ser rechazadas por los consumidores, pero no deja de ser interesante comprobar cuales son los microorganismos responsables del deterioro en estos productos alterados; por ello hemos elegido cuatro conservas vegetales alteradas del mismo tipo que las ya estudiadas, a las que sometimos a nuestra guía de trabajo.

Como era de suponer, los microorganismos que identificamos en nuestras experiencias anteriores aparecen de nuevo, aunque siempre en mayor número, en los mismos productos alterados.

Si comparamos los diversos pH determinados con electrodo de vidrio, observaremos grandes variaciones, las cuales reflejan precisamente el estado de alteración de las conservas al desplazarse dicho pH hacia la zona alcalina como consecuencia de su descomposición. Así, mientras el "Tomate al natural" presenta un pH de 3.95, en el alterado es de 4.30; la "Confitura de ciruela" tiene un pH de 3.40, mientras que en la alterada es de 4.20; en la "Confitura de albaricoque" el pH es de 3.60, pero en la alterada su valor llega a 5.00 y en los "Guisantes al natural" el pH de 5.70 llega a alcanzar el valor de 7.15 en los alterados.

De las conservas alteradas hemos aislado dos nuevos microorganismos: uno de ellos formado de gas, que identificamos como *Lactobacillus brevis*, al que Bergey considera como probable sinónimo del *Lactobacillus lycopersici* de Mickle, aunque sólo encontrado en esta clase de conservas de tomate al natural, y el otro eminentemente proteolítico, *Clostridium sporogenes*, cuya sola presencia se pone de manifiesto por el estado de putrefacción y olor repugnante que presentan los guisantes al natural estudiados.

La existencia de estos gérmenes en las conservas vegetales confirma una vez más la pésima elaboración de estos productos, ya que, considerando los resultados obtenidos, parece como si no se lavasen las materias primas y encima no se esterilisasen los envases una vez llenos y cerrados.

Es indudable que el origen de todos estos microorganismos radica en el suelo, de donde pasan a los vegetales, pero al no estar las conservas convenientemente elaboradas, estos organismos deteriorantes se encuentran en condiciones, más o menos favorables, para su desarrollo en el interior de los productos alimenticios.

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos, queda patente que son, aproximadamente, los mismos gérmenes los que originan alteraciones cuando varían las condiciones del envase y contenido, todas ellas íntimamente ligadas a perforaciones, fisuras, temperaturas, retención de aire, etc., etc.

En muchas conservas normales hemos apreciado sobre los frotis directos del contenido numerosos cristales de conservadores, lo que puede explicarnos también el porqué de su estado normal.

Nuestro trabajo, dada su limitación, no pretende aplicar sus conclusiones a toda la industria nacional de este tipo de conservas, pero resulta curioso el hecho de que ninguno de los productos estudiados presenta pruebas de cultivo negativas, lo que indica, en el mejor de los casos, un bajo e insuficiente proceso de esterilización.

Con arreglo a nuestros resultados, queda bien patente que hemos encontrado bacterias termofílicas esporógenas de "acidez plana"; bacterias mesofílicas esporógenas anaerobias y aerobias o facultativas y bacterias acidúricas, las cuales, si bien se desarrollan bajo una reducida tensión de oxígeno, es bastante frecuente el encontrarlas en estos productos alimenticios.

Es indudable que el pH de la mayor parte de las conservas examinadas restringe el número y variedad de los microorganismos presentes en ellas, pero en contra de lo que se podría suponer, la contaminación en estos productos de apariencia normal es considerablemente elevada, lo que se traduce en un peligro potencial de alteración para estas conservas de origen vegetal.

Conviene aclarar que no hemos encontrado en nuestras experiencias ninguna bacteria anaerobia termofílica de tipo sacarolítico o productor de sulfhídrico, así como tampoco levaduras y mohos a pesar del pH de los productos estudiados, ni siquiera en aquellos envases que presentaban perforaciones, fisuras o escapes, lo que se explica perfectamente si consideramos la baja resistencia térmica de estos últimos microorganismos.

Afortunadamente, tampoco nos hemos encontrado con ningún orga-

nismo causal de intoxicaciones alimenticias, ni en los ensayos bacteriológicos ni en las pruebas biológicas, pero el hecho de que se encuentren otros gérmenes saprófitos, en estado de latencia o desarrollo incipiente, indica claramente la posibilidad de que los microorganismos patógenos puedan encontrarse igualmente en esta clase de conservas.

La falta de un control microbiológico en las industrias de estos productos conservados lleva consigo este estado de cosas, que conviene corregir, lo antes posible, mediante una rigurosa vigilancia de materias primas, aguas, instalaciones, utensilios, personal, etc., etc., sobre todo si se pretende mantener una economía razonable en consonancia con un mercado de prestigio.

CONCLUSIONES

- 1.^a Consideramos de gran utilidad para el control microbiológico de las conservas vegetales la guía de trabajo que proponemos en esta Memoria.
- 2.^a En la conserva de jugo de tomate hemos aislado el *Leuconostoc mesenteroides* (o *Leuconostoc pleofructi* de Savage y Hunwicke) y el *Bacillus subtilis*.
- 3.^a De la conserva de puré de tomate aislamos el *Micrococcus pyogenes*, var. *Aureus*, y el *Bacillus coagulans* (o *Bacillus thermoacidurans* de Berry).
- 4.^a En tomate al natural nos encontramos con el *Leuconostoc mesenteroides* y con el *Clostridium pasteurianum*.
- 5.^a En la salsa de tomate o "catsup" hemos identificado al *Bacillus cereus*.
- 6.^a De la confitura de ciruela aislamos el *Bacillus coagulans* y el *Micrococcus pyogenes*, var. *aureus*.
- 7.^a Hemos identificado al *Bacillus subtilis* en la conserva de ciruela al natural.
- 8.^a En la confitura de albaricoque nos encontramos con el *Bacillus coagulans*.
- 9.^a En la conserva de guisantes al natural hemos aislado el *Bacillus cereus* y el *Leuconostoc mesenteroides*.

10. En tomate natural alterado, además del *Leuconostoc mesenteroides* hemos hallado el *Lactobacillus brevis* (o *Lactobacillus lycopersici* de Mickle).
11. En la confitura de ciruela alterada identificamos al *Leuconostoc mesenteroides* y al *Bacillus cereus*.
12. Hemos identificado en la confitura de albaricoque alterada al *Micrococcus pyogenes*, var. *aureus*, así como al *Bacillus coagulans*.
13. En los guisantes al natural alterados nos encontramos con el *Micrococcus pyogenes*, var. *aureus*, y con el *Clostridium sporogenes*.
14. En los medios azucarados, el *Leuconostoc mesenteroides* se desarrolla más activamente que en aquellos otros que no contienen glúcidos, rodeándose además de una masa mucilaginosa muy característica.
15. Los medios Caldo glucosado-Jugo de tomate (M. 11) y Agar-Caldo glucosado-Jugo de tomate (M. 12), son los más favorables para el aislamiento primario de los microorganismos aerobios existentes en las conservas vegetales derivadas del tomate.
16. Entre los medios de cultivo empleados para el aislamiento del *Bacillus coagulans*, bacteria termofílica esporulada del grupo de "acidez plana", ha resultado ser el más selectivo el constituido por Agar-Glucosa-Proteasa-Peptona-Extracto de levadura (M. 10).
17. En las conservas ácidas, de pH inferior a 4.5, la enterotoxina estafilocócica o bien se inactiva durante el tratamiento térmico o no se produce en los alimentos de esta naturaleza.
18. Los numerosos ensayos biológicos realizados para poner de manifiesto la presencia de la toxina botulínica, han resultado negativos en este tipo de conservas.
19. Todas las investigaciones encaminadas a descubrir la existencia del grupo *Coli-Salmonella* han sido negativas, lo que descarta la posibilidad de que las contaminaciones tengan un origen hídrico en estos productos analizados.
20. El *Clostridium pasteurianum*, cuando se desarrolla en medios con agar, presenta cápsulas perfectamente visibles, lo cual no ocurre si el crecimiento tiene lugar en otros medios desprovistos de este componente.
21. Si bien el *Bacillus cereus* es un germen aerobio obligado, en las conservas vegetales, a veces se comporta como anaerobio facultativo.

22. La alteración de las conservas vegetales se refleja perfectamente en el desplazamiento del pH hacia la zona alcalina, sobre todo si se le compara con el producto normal.
23. En las conservas examinadas no hemos encontrado bacterias anaerobias termofílicas de tipo sacarolítico o productor de sulfhídrico, así como tampoco levaduras o mohos.
24. El estado en que se encuentran las conservas examinadas es consecuencia de la deficiente elaboración y del bajo e insuficiente proceso de esterilización a que se someten los productos envasados.
25. El origen de los microorganismos aislados radica principalmente en el suelo, lo que indica un insuficiente lavado y tratamiento térmico de las materias primas.
26. Se hace imprescindible un eficiente control microbiológico de las materias primas, aguas, instalaciones, utensilios, aparatos, temperaturas, tiempos de esterilización, vacío practicado en el interior de los envases, personal, etc., etc., en aquellas industrias dedicadas a la fabricación de conservas vegetales.

RESUMEN

Después de hacer un estudio sobre los principales microorganismos responsables de las alteraciones en las conservas vegetales, y de aquellos otros que pueden originar intoxicaciones alimenticias, se propone una Guía de trabajo para el Laboratorio con el fin de controlar microbiológicamente el estado de estos alimentos conservados, proposición que se estima muy conveniente ante los resultados obtenidos en este trabajo.

Con la aplicación de los principios establecidos se llega a interesantes conclusiones para el control microbiológico de las conservas vegetales.

Se acompaña un anexo, relativo a la composición y preparación de los medios de cultivo recomendados en la marcha analítica y fotografías confirmativas de los resultados a que se hace referencia.

SUMMARY

After carrying out the study of the principal microorganisms responsible for the alterations in vegetable conserves and of those which can produce alimentary intoxications, we propose a Guide of laboratory work so as to control biologically the state of conserved food, a proposition we consider very convenient in view of the results obtained in this work.

With the application of the principles established we arrive to interesting results in the microbiological control of vegetable conserves.

We add one anexe related to the composition and preparation of culture mediums recommended for the analytical process, and photographs confirming the results referred to.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BIGELOW, W. D. and CATHCART, P. H. 1921. Relation of processing to the acidity of canned foods. Nat. Canners Res. Lab. Bull 17-L.
- (2) CAMERON, E. J. 1936. J. Ass. Off. Agric. Chem. 19:433.
- (3) CAMERON, E. J. 1936. Fruit Products. J. 15:207-210.
- (4) CAMERON, E. J. 1938. Food Res. 3:91.
- (5) CAMERON, E. J. 1938. J. Ass. Off. Agric. Chem. 21:452.
- (6) CAMERON, E. J. and ESTY, J. R. 1940. Comments on the microbiology of spoilage in canned foods. Food Res. 5:549-557.
- (7) BAUMGARTNER, J. G. and WALLACE, M. D. 1936. Food Manuf. 11:10.
- (8) BAUMGARTNER, J. G. 1937. Food Res. 2:321.
- (9) BIGELOW, W. D. and ESTY, J. R. 1930. J. Infect. Dis. 27:602-617.
- (10) DONK, P. J. 1920. J. Bact. 5:573.
- (11) WILLIAMS, C. C., MERRILL, C. M. and CAMERON, E. J. 1937. Food Res. 2:369.
- (12) HIRST, F. 1931-32. Ann. Rept. Fruit and Veg. Preserv. Res. Sta. Campden, p. 65.
- (13) NATIONAL CANNERS ASSOCIATION RESEARCH LABORATORIES. 1950. Canned Foods in Human Nutrition. National Canners Association. Washington.
- (14) BARTON, L. H. G. 1938. Food Manuf. 13:23-26.
- (15) McCLUNG, L. S. 1935. J. Bact. 29:189.
- (16) WERKMAN, C. H. and WILSON, P. W. 1951. Bacterial Physiology. Academic Press, New York.
- (17) TIDEL'SKAYA, I. L. 1939. Mikrobiol. Zh. Akad. Nauk. U. R. S. S. 6:175.
- (18) EMEL'YANCHIK, K. G. and BORISOVA, K. P. 1941. Microbiology U. R. S. S. 10:236.

- (19) TOWNSEND, C. T., ESTY, J. R. and BASELT, F. C. 1938. Food Res. 3:323.
- (20) CROSSLEY, E. L. 1941. J. Soc Chem. Ind. 60:131 T.
- (21) MICHAEL, V. M. and TANNER, F. W. 1936. Food Res. 1:99.
- (22) CAMERON, E. J., ESTY, J. R. and WILLIAMS, C. C. 1936. Food Res. 1:73.
- (23) TOWNSEND, C. T. 1939. Food Res. 4:231.
- (24) SPIEGELBURG, G. H. 1940. *Clostridium pasteurianum* associated with spoilage of an acid canned fruit. Food Research. 5:115.
- (25) SPIEGELBURG, C. H. 1940. Some Factors in the spoilage of and acid canned fruit, *ibid.* 5:439.
- (26) BERRY, R. N. 1933. J. Bact. 25:72.
- (27) PEARCE, W. E. and RUYLE, E. H. 1938. Glass Packer. 17:243.
- (28) WOERZ, J. A. and LENANE, D. J. 1943. Canner. 96:11.
- (29) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Sixth Edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- (30) SAVAGE, W. G. 1921. J. Hyg. 20:69.
- (31) SAVAGE, W. G. 1939. Lancet. 237:991.
- (32) PEDERSON, C. S. and BEAVENS, E. A. 1940. Food Ind. 12:61.
- (33) OLLIVER, M. and SMITH, G. 1933. J. Botany. 71:196.
- (34) HIRST, F. and McMASTER, N. B. 1932-33. Ann. Rept. Fruit and Veg. Preserv. Res. Sta. Campden. p. 53.
- (35) HULL, R. 1934-35. Ann. Rept. Fruit and Veg. Preserv. Res. Sta. Campden. p. 65.
- (36) WILLIAMS, C. C., CAMERON, E. J. and WILLIAMS, O. B. 1941. Food Res. 6:69.
- (37) TANNER, F. W. 1933. Food-Borne Infections and Intoxications. Twin City Printing Co. Illinois.
- (38) TANNER, F. W. 1944. The Microbiology of Foods. 2^a ed. The Garrard Press. Champaign. Illinois.
- (39) SALLE, A. J. 1948. Fundamental Principles of Bacteriology. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York.
- (40) SEGALOVE, M., DAVISON, E. and DACK, G. M. 1943. Food Res. 8:54.
- (41) HAYNES, W. C. and HUCKER, G. J. 1944. J. Bact. 48:262.
- (42) CHAPMAN, G. H. 1944. Food Res. 9:377.
- (43) EVANS, J. B., BUETTNER, L. G. and NIVEN, C. F. 1950. Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning. J. Bact. 60:481.
- (44) DACK, G. M. 1943. Food Poisoning. University of Chicago Press.
- (45) DIBLE, J. H. 1943. Practitioner. 151:103.
- (46) SCOTT, W. J. and STEWART, D. F. 1944. Can. J. Council. Sci. and Ind. Res. 17:16.
- (47) SLOCUM, G. G., WELCH, H. and HUNTER, A. C. 1941. Food Res. 6:179.
- (48) JORDÁN, E. O. and BURROWS, W. 1935. J. Infect. Dis. 57:121.
- (49) HUNTER, F. R. and DACK, G. M. 1938. J. Infect. Dis. 63:346.
- (50) WOODMAN, A. G. 1941. Food. Analysis. 4^a ed. McGraw-Hill Book Co. Inc.

- (51) SALLE, A. J. 1943. Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology. McGraw-Hill Book. Co. In. New York.
- (52) American can Company. 1943. The Canned Food Reference Manual. New York.
- (53) JACOBS, M. B. 1944. The Chemistry and Technology of Food and Food Products. Interscience Pub. Co. New York.
- (54) A. O. A. C. 1945. Methods of Analysis. 6th Ed.
- (55) Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 1945. 6th Ed. p. 753-755.
- (56) EMANUELE, F. 1946. Industria delle conserve. Ed. 2602 p. Milano.
- (57) GORESLINE, HARRY and Col. 1948-49. Methods for the microbial examination of foods. Am. J. Pub. Health. 39: 83.
- (58) CRUESS, W. V. 1950. Commercial Fruit & Vegetable Products. 3.^a ed. McGraw-Hill Book. Co. Inc. New York.
- (59) TANNER, F. W. 1950. Laboratory Manual and Work Book in the Microbiology of Foods. Garrard Press.
- (60) CHEFTEL, H. 1935. Food. 4: 301.

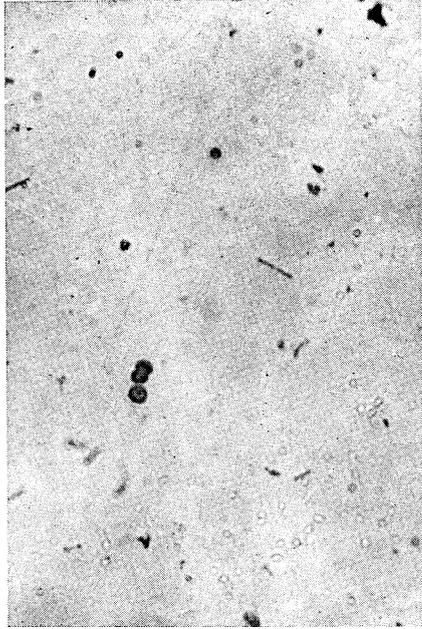


Foto 2.



Foto 4.



Foto 1.

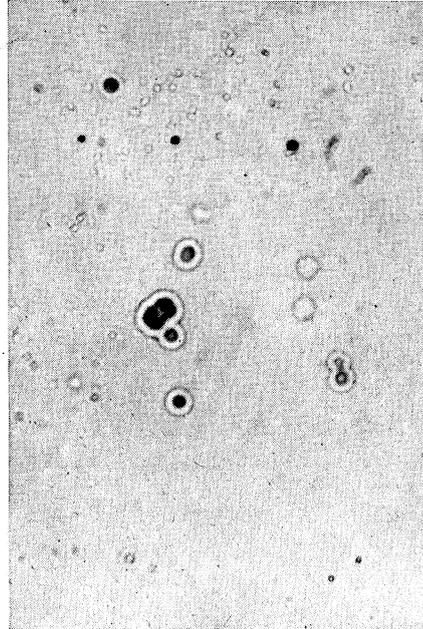
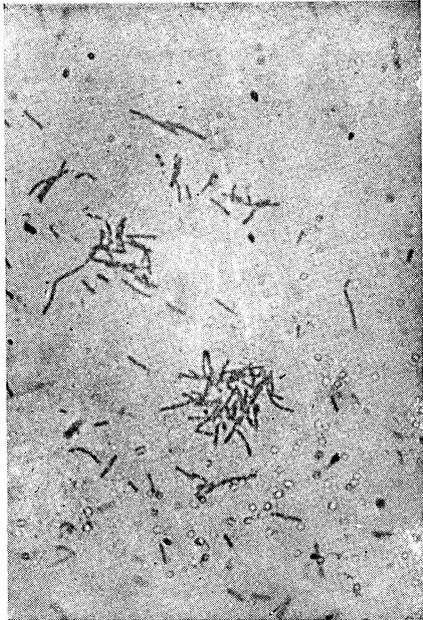


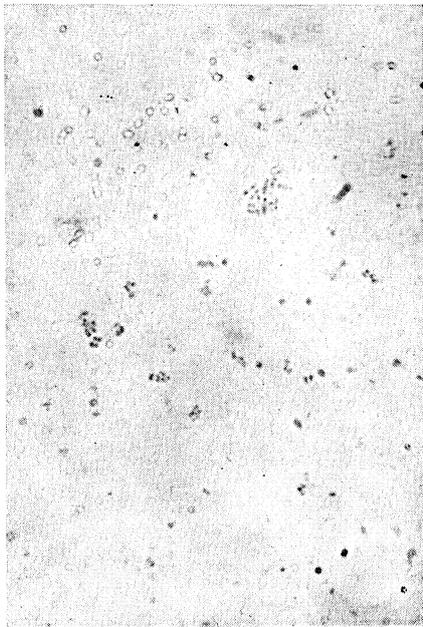
Foto 3.



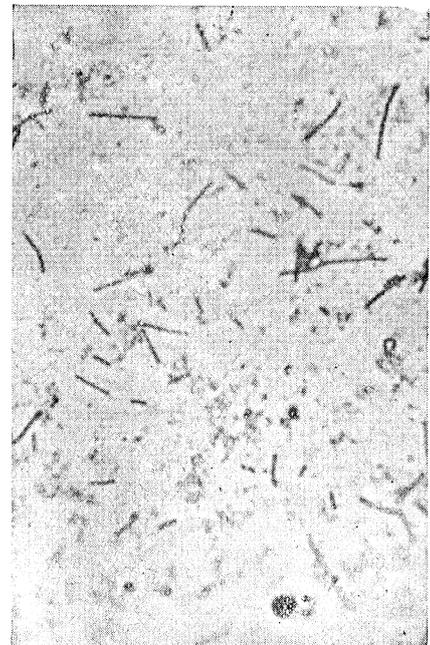
Foro 6.



Foro 8.



Foro 5.



Foro 7.



Foto 10.



Foto 12.

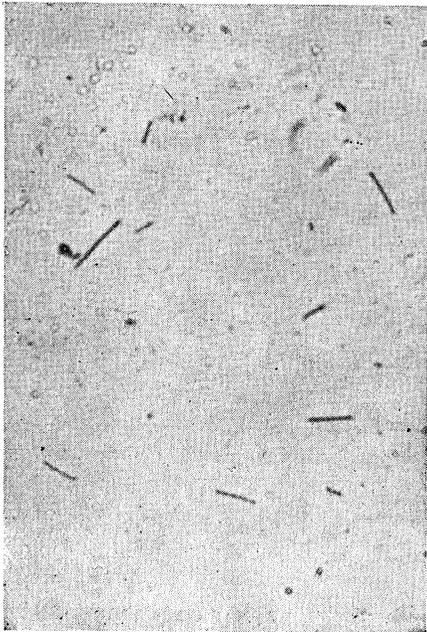


Foto 9.

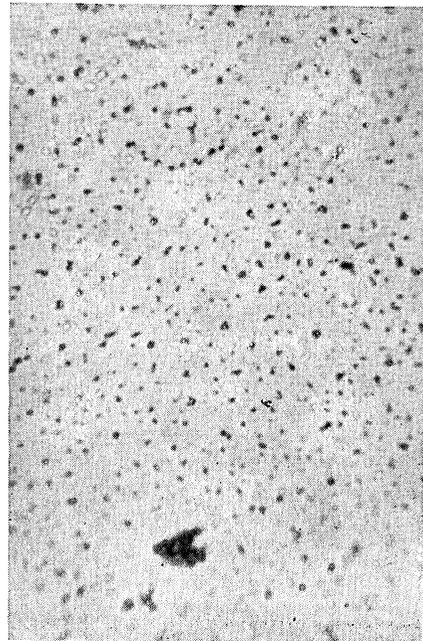


Foto 11.

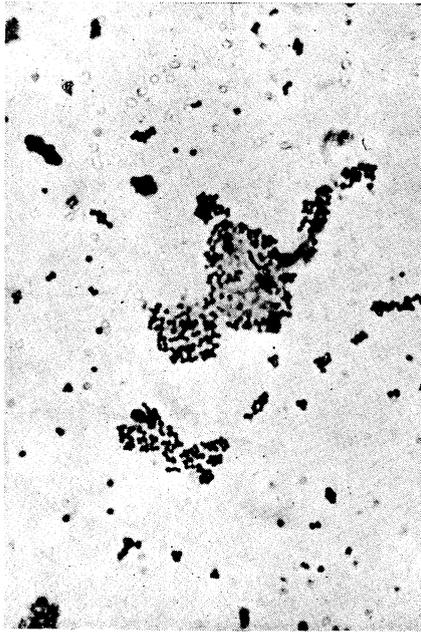


Foto 14.



Foto 16.

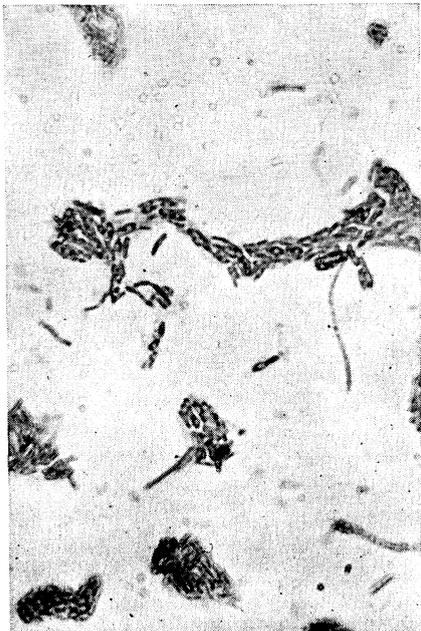


Foto 13.

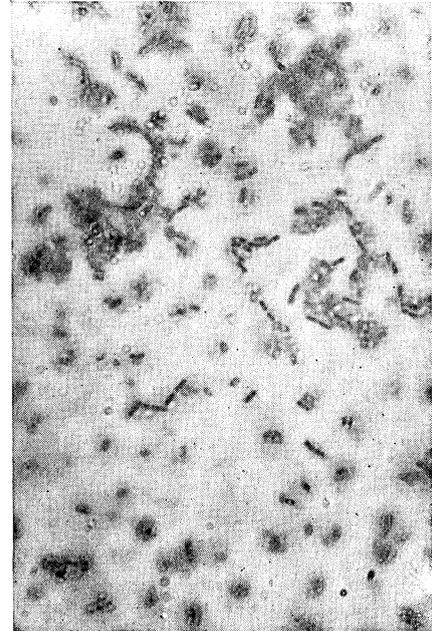
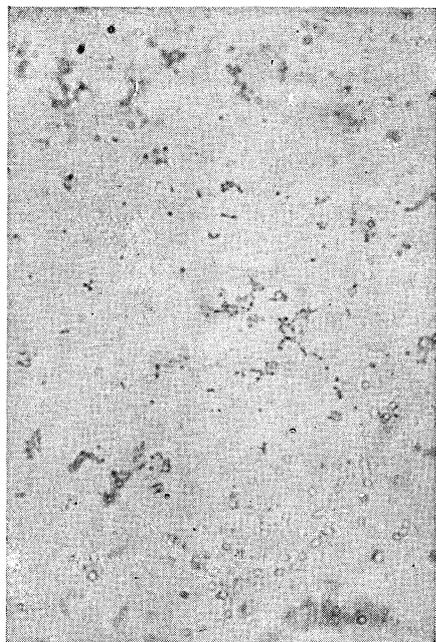


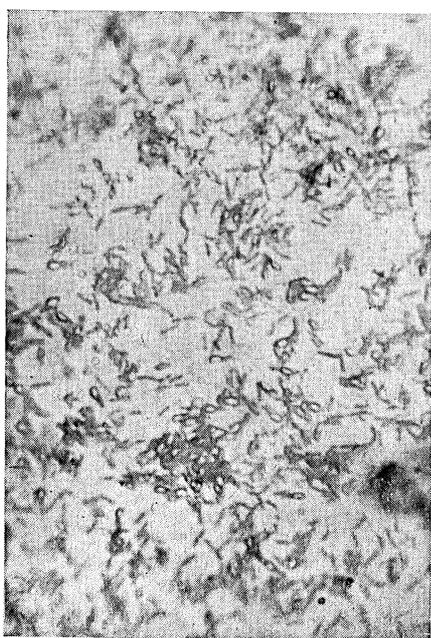
Foto 15.



Foro 18.



Foro 20.



Foro 17.



Foro 19.

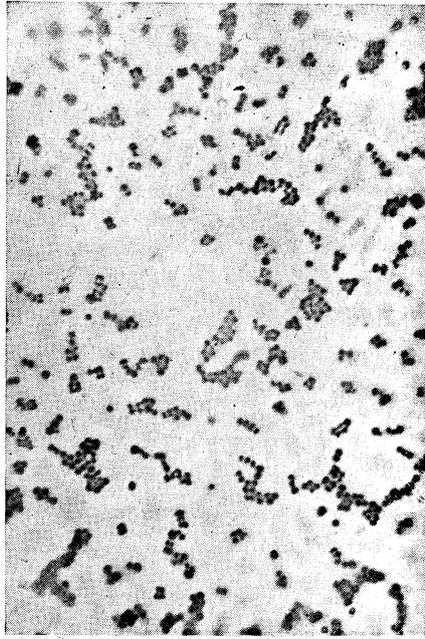


Foto 22.

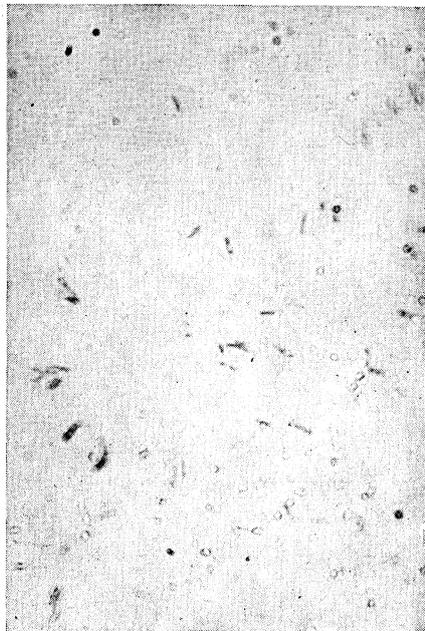


Foto 21.

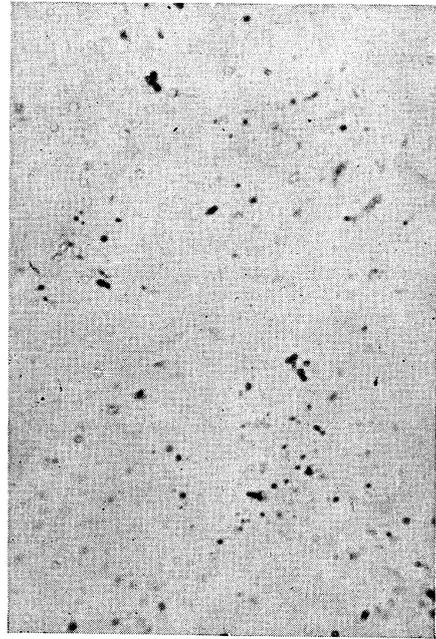


Foto 23.

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO.

I) Para conservas de pH superior a 4.5

Bacterias de acidez plana.

M. 1: Glucosa - Triptona.

Glucosa...	10 gr.
Triptona...	10 gr.
Agua destilada...	1.000 ml.

Ajustar el pH a 6.8-7.4 y esterilizar a 121° C. durante veinte minutos.

M. 2: Caldo glucosado-Púrpura de bromocresol.

Extracto de carne...	3 gr.
Peptona...	5 gr.
Glucosa...	10 gr.
Púrpura de bromocresol (0,2 %)	10 ml.
Agua destilada...	1.000 ml.

Ajustar el pH a 6.8-7.4 y esterilizar a 121° C. durante veinte minutos.

Preparación del indicador Púrpura de bromocresol al 0,2 %:

En un matraz aforado de 100 ml. colocar 0,2 gr. de PBC y añadir 20 ml. de alcohol etílico de 95°. Agitar para disolver y adicionar hidróxido sódico diluído, gota a gota, hasta color persistente de púrpura. Finalmente enrasar con agua destilada hasta los 100 ml.

M. 3: Agar-Glucosa-Triptona-PBC.

Agar...	15 gr.
Glucosa...	10 gr.
Triptona...	10 gr.
Púrpura de bromocresol (0,2 %)	20 ml.
Agua destilada...	1.000 ml.

Ajustar el pH a 6.8-7.4 y esterilizar a 121° C. durante veinte minutos.

*Bacterias anaerobias sacarolíticas.**M. 4: Maiz-Hígado.*

Hígado de vaca molido	20 gr.
Corn steep... ..	50 gr.
Agua destilada... ..	1.000 ml.

Calentar los ingredientes durante una hora. Ajustar el pH a 7.0-7,2 y calentar de nuevo diez minutos más el medio. Completar los 1.000 ml. con agua destilada y enfriar. Esterilizar durante dos horas a 121° C.

El hígado de vaca se prepara a partir de hígado fresco, el cual se deseca a 55-60° C. y pulveriza finalmente en un molinillo.

*Bacterias anaerobias productoras de SH₂.**M. 5: Agar-Sulfito-Triptona.*

Agar... ..	20 gr.
Triptona.	10 gr.
Sulfito sódico... ..	1 gr.
Cloruro férrico.	1 gr.
Agua destilada... ..	1.000 ml.

En este medio no es necesario ajustar el pH, debiéndose esterilizar a 121° C. durante veinte minutos.

El cloruro férrico se adiciona al medio para incrementar el color negro que producen en él los microorganismos anaerobios productores de SH₂.

*Bacterias anaerobias esporógenas.**M. 6: Caldo-Hígado.*

Calentar a ebullición 500 gr. de hígado de vaca picado, en 1.000 ml. de agua destilada, durante una hora. Ajustar el pH a 7.0-7.2 y hervir de nuevo durante diez minutos. Exprimir por un paño poco tupido y completar a 1.000 ml. con agua destilada. A continuación añadir 10 gr. de peptona y 1 gr. de fosfato dipotásico. Ajustar de nuevo el pH a 7.0-7,2.

Este medio se puede envasar directamente o bien colocar en cada tubo unos 3 ó 5 gr. de partículas de hígado, las cuales se cubren con el

caldo hasta una profundidad de 3 centímetros. Esterilizar a 121° C. durante veinte minutos.

M. 7: Caldo-Hígado en tubos Holl (para investigación de la toxina del *Cl. botulinum*).

Quinientos gramos de hígado picado se hierven en 1.000 ml. de agua destilada durante una hora. Ajustar la mezcla a pH 7.0 y hervir nuevamente unos diez minutos. Filtrar y reponer el volumen primitivo. Añadir 10 gramos de fosfato dipotásico y ajustar de nuevo el pH a 7.0, en el caso de que no lo estuviere. Cuando el medio va a ser repartido, se coloca en el fondo del tubo 0.5 ó 1 gr. de polvo de hígado estéril y se añaden encima unos 10 ó 12 ml. de caldo, previamente esterilizado a 115° C. durante veinte minutos. Si se desea medio sólido, agregar un 3 % de agar.

Bacterias aerobias esporógenas o facultativas.

M. 8: Caldo glucosado.

Extracto de carne... ..	3 gr.
Peptona... ..	5 gr.
Glucosa... ..	10 gr.
Agua destilada... ..	1.000 ml.

Ajustar el pH a 7.2-7.4. Envasar en tubos con campanas Durham y esterilizar a 121° C. durante veinte minutos.

M. 9: Agar-Caldo glucosado.

Medio idéntico al anterior, pero al que se le adicionan 15 gr. de agar.

II) Para conservas de pH inferior a 4.5.

Bacterias esporógenas de acidez plana.

M. 10: Agar-Glucosa-Proteasa-Peptona-Ext.º levadura.

Glucosa... ..	5 gr.
Proteasa-Peptona	5 gr.
Extracto de levadura... ..	5 gr.
Fosfato dipotásico.	4 gr.
Agua destilada... ..	500 ml.

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada y se ajusta el pH a 5.0 con ácido clorhídrico diluído.

En otro matraz se disuelven 20 gr. de agar en 500 ml. de agua destilada, esterilizándose entonces ambas soluciones a 121° C. durante treinta minutos.

Ambos medios se envasan aparte, a razón de 5 ml. de medio por tubo.

Cuando el medio está preparado y dispuesto para ser usado, se mezcla el agar fundido con los nutrientes esterilizados a 45° ó 55° C.

Bacterias acidúricas no esporógenas.

M. 11: Caldo glucosado-Jugo de tomate.

Caldo glucosado nutritivo.	1.000 ml.
Jugo de tomate Difco... ..	1.000 ml.

Este medio, debido a su acidez, puede esterilizarse a vapor durante treinta minutos.

M. 12: Agar-Caldo glucosado-Jugo de tomate.

El medio se prepara como el anterior, pero se le adiciona un 3 % de agar, esterilizando a vapor durante una hora.

Levaduras y mohos.

M. 13: Extracto de malta.

Extracto de malta	100 gr.
Agua destilada... ..	1.000 ml.

Disolver a vapor el extracto de malta en polvo. Ajustar el pH a 4.7 con ácido clorhídrico diluído y enfriar a 50° C. Añadir lentamente 100 ml. de una suspensión al 5 % de Bentonita y mezclar vigorosamente. Mantener la mezcla a 50-75° C. durante treinta minutos y filtrar por papel hasta claridad.

Calentar a 121° C. durante diez minutos y filtrar de nuevo para eliminar cualquier precipitado. Esterilizar a 121° C. durante quince minutos y enfriar después el medio, rápidamente, al chorro del grifo.

M. 14: Agar-Extracto de malta.

Este medio se prepara como el anterior, pero se le añade un 2 % de agar.

Investigación del grupo Coli-Salmonella.

M. 15: Caldo lacto-biliado con rojo neutro.

Extracto de carne... ..	3 gr.
Peptona.	10 gr.
Lactosa.	5 gr.
Bilis seca... ..	1 gr.
Sol. de rojo neutro al 5 %	2 ml.
Agua destilada... ..	1.000 ml.

Ajustar el pH a 7.6 y esterilizar a vapor durante veinte minutos.

M. 16: Agar-lactosado y tornasolado.

Extracto de carne... ..	3 gr.
Peptona	10 gr.
Lactosa... ..	10 gr.
Agar	20 gr.
Tintura de tornasol	c. s.
Agua destilada... ..	1.000 ml.

Ajustar el pH a 7.2 y esterilizar a vapor durante veinte minutos.

Agar simple para estratificar tubos de hígado.

Agar.	15 gr.
Peptona... ..	5 gr.
Extracto de carne... ..	3 gr.
Agua destilada	1.000 ml.

Ajustar el pH a 7.2-7.4 y esterilizar a 121° C. durante veinte minutos.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

ESTACION DE VITICULTURA Y ENOLOGIA DE JEREZ DE LA FRONTERA

COMUNICACION PREVIA SOBRE LA CLASIFICACION Y ESTUDIO ENOLOGICO DE LAS LEVADURAS ENCONTRADAS EN LOS VINOS DE JEREZ

POR

JUAN ZÁJARA JIMÉNEZ

Para el estudio de las levaduras de la zona de Jerez hemos recurrido a la recogida de muestras procedentes de uvas frescas o después de cuarenta y ocho horas de soleo, mostos, vinos jóvenes y añejos; velos, lías e incluso maderas de botas que habían contenido vinos durante mucho tiempo, y de cuyos poros obtuvimos las muestras necesarias para el aislamiento correspondiente, recurriendo a estos diversos orígenes como única forma verdadera de dar con la genuína representación de la variada flora responsable, en sus diversas etapas, de la consecución del vino de Jerez.

La clasificación fué efectuada en el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Ilorado Prof. Dr. D. Arnaldo Socías Amorós y la colaboración del Dr. D. Carlos Ramírez, efectuando la parte enológica en Jerez de la Frontera, en la Estación de Viticultura y Enología, a las órdenes del Ingeniero Agrónomo D. Gonzalo Fernández de Bobadilla, sin el concurso de los cuales, unido a la colaboración espontánea de las Bodegas jerezanas, que me suministraron la materia prima necesaria, no hubiera sido posible el presente trabajo.

Para la clasificación hemos aislado y clasificado 100 levaduras, siguiendo la escuela de Delft, de las cuales 81 pertenecen a la familia *Endomycetácea* y 19 a las *Cryptococcaceae*.

De las 81 primeras, 71 pertenecen al género *Saccharomyces*, y las 10 restantes, al género *Hansenula*.

De las 19 *Cryptococcaceae*, 18 pertenecen al género *Cándida* y una al género *Kloeckera*.

Entre los *Saccharomyces* hemos encontrado 11 especies distintas, en dos de las cuales hallamos sendas variedades jerezanas, y en una sólo la variedad local, reseñadas por primera vez, de acuerdo con sus nuevas características.

Entre las *Hansénula* hay dos especies diferentes, en una de las cuales hemos dado con una variedad jerezana.

De las *Cándida*, se reseñan en el trabajo original, pues éste es sólo un resumen previo, cuatro especies, y del género *Kloeckera*, sólo un ejemplar.

La lista de las especies encontradas, en cuanto a su número y colocadas en orden decreciente, respecto a la proporción en que se encuentran, es la siguiente:

	Por 100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
<i>Saccharomyces rosei</i>	16
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	9
<i>Cándida krusei</i>	8
<i>Cándida pulcherrima</i>	7
<i>Saccharomyces rouxii</i> , var. <i>jerezana</i>	5
<i>Hansénula anómala</i>	5
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	4
<i>Saccharomyces exiguus</i>	4
<i>Hansénula subpelliculosa</i>	4
<i>Saccharomyces fructuum</i>	2
<i>Saccharomyces rouxii</i>	2
<i>Saccharomyces fermentati</i>	2
<i>Cándida catenulata</i>	2
<i>Saccharomyces pastorianus</i> , var. <i>jerezana</i>	1
<i>Saccharomyces italicus</i> , var. <i>jerezana</i>	1
<i>Saccharomyces lactis</i>	1
<i>Saccharomyces mellis</i>	1
<i>Hansénula subpelliculosa</i> , var. <i>jerezana</i>	1
<i>Cándida zeylanoides</i>	1
<i>Kloeckera apiculata</i>	1

Entre las propiedades enológicas, reseñamos aquí las más importantes, tales como el grado alcohólico hallado, el rendimiento, las materias reductoras no aprovechadas y la cantidad de azúcar necesaria para la producción de un grado de alcohol, por cada cepa.

Para la determinación del grado alcohólico, utilizamos matraces de unos 300 c. c. de capacidad, donde se hace fermentar la levadura que se ensaya, sobre 200 c. c. de mosto estéril de 12° Be (212 grs. de azúcar por litro) y lo dejamos a temperatura ambiente, en locales similares a los empleados para bodegas, donde la temperatura oscila entre 15 y 22°, esperando para analizar el producto obtenido un mes exacto, fecha en que están terminadas, en las condiciones experimentales con las que trabajamos, las fermentaciones básicas, desechando las secundarias o lentas, que se completan con la acción del tiempo.

Empleamos un mes exacto para el estudio de las 100 levaduras, a fin de someterlas, por igual, al mismo tiempo de fermentación, pues lo que deseamos es, más que el valor absoluto que pueda representar la cifra de alcohol obtenida, el estudio comparativo entre las distintas cepas, con objeto de hacer la selección más adecuada, después de terminado el estudio.

El método empleado es el de destilación, oficial para efectos de exportación. Nosotros no podemos pasar de 12,47°, pues la concentración en azúcar del mosto empleado, no nos permite pasar de ese rendimiento, obteniéndose en las bodegas cifras superiores, en primer lugar, como consecuencia de las fermentaciones lentas y secundarias de que hablamos más arriba, y segundo, por la evaporación que la acción del tiempo provoca en las vasijas, que hacen, como consecuencia de ello, enriquecerse en alcohol; así como los fenómenos provocados en las paredes de las botas, cuyos poros retienen el agua y no el alcohol (madera de roble), particularidad que, al igual que la de la evaporación, ayuda a enriquecer el vino joven, en grados alcohólicos.

La evaporación de las botas jerezanas se calcula en un 5 % anual, favoreciéndola el bodeguero al montar su industria en los sitios más aireados posibles de su localidad.

La distribución del grado alcohólico obtenida es la siguiente:

Producen entre 11° y 12°, el 20 % de las cepas estudiadas.			
— 10° y 11°, el 33 %	—	—	
— 9° y 10°, el 8 %	—	—	
— 7° y 9°, el 7 %	—	—	
Producen menos de 7°, el 32 %	—	—	
	—		
	100		

Consideramos a las levaduras que han producido alcohol, entre los once y doce grados, a los treinta días de fermentación, como excelentes, desde este punto de vista de la producción.

Buenas, a las comprendidas entre diez y once grados; aceptables, a las comprendidas entre nueve y diez grados, si es que conservan azúcar y, por tanto, posibilidades para proseguir la transformación y mejorar. El resto son de producción baja y, por tanto, no seleccionables.

Las rechazables como no alcoholígenas, pueden ser tan necesarias como las demás en el concierto de las levaduras que intervienen en la fermentación alcohólica, dándose el caso de encontrarnos con levaduras de baja producción alcohólica en botas de excelentes vinos, dedicadas incluso a soleras, de donde deducimos que cumplen una misión especial, que hoy achacamos al aroma u otras cualidades, aún no sometidas a control.

Con el rendimiento queremos expresar el trabajo efectuado por la levadura, durante la fermentación, referente a la cantidad de azúcar consumida y los grados de alcohol producidos a cambio, siendo las levaduras tanto más selectivas cuanto con un mínimo de azúcar metabolizada, produzca un máximo de alcohol.

Para obtener este dato partimos de la base de que por cada 17 gramos de azúcar se obtiene un grado de alcohol, cuando la fermentación se ha llevado a cabo con toda normalidad y plenamente, obteniéndose en ese caso un rendimiento del 100 %.

Como nuestras fermentaciones quedan limitadas a un mes, nunca llegamos, por muy buenas que sean, al cien por cien de rendimiento, ya que renunciamos a las fermentaciones secundarias y a la acción del tiempo.

La distribución del rendimiento fué la siguiente:

	Por 100
Rendimiento superior al 90 %	12
— comprendido entre el 80 y el 90 %... ..	41
— — 70 y el 80 %... ..	9
— — 50 y el 70 %... ..	9
— — 30 y el 50 %... ..	7
— menor del 30 %	22
	100

Anotamos como muy buenas, las que rinden más del 90 %; buenas, las comprendidas entre 80 y 90; con posibilidades de mejorar, aunque remotamente, a las que se encuentran entre el 70 y el 80, y de bajo rendimiento, el resto. Para enfocar bien este punto, hemos de tener en cuenta la cantidad de azúcar que quedó sin transformar y que constituye reserva aún aprovechable; esto siempre que el azúcar no utilizada esté por debajo de los 10 gramos por litro, pues en los casos en que la cifra sea superior, la experiencia nos dice que difícilmente transformará esos restos.

La distribución de las materias reductoras no aprovechadas fueron:

	Por 100
Dejaron entre 0 y 2 gramos de azúcar sin fermentar, el	45
— 2 y 5 — — — el	24
— 5 y 10 — — — el	0
— 10 y 30 — — — el	2
— 30 y 50 — — — el	5
— 50 y 80 — — — el	8
— 80 y 100 — — — el	3
— 100 y 150 — — — el	10
— 150 y 200 — — — el	3
	100

Es el grado alcohólico, alto o bajo, según las cepas, una de las barreras con que las levaduras se encuentran en su metabolismo, dada su mayor o menor resistencia al medio alcohólico que la rodea.

Como ejemplo, diremos que el *Saccharomyces cerevisiae*, conserva

toda su vitalidad en altas dosis de etanol, mientras que la *Kloeckera apiculata* es difícil de encontrar después de unos días de fermentación, rendida ante el grado alcohólico formado en esos días y que generalmente está por debajo de 4°.

Esta última especie, por mucha azúcar que tenga disponible para proseguir su camino, no la utilizará, perdida como tiene su capacidad, como consecuencia de un medio ambiente que para ella es hostil.

Dato muy interesante es el saber la cantidad de azúcar que necesita una levadura para producir un grado de alcohol.

A este respecto, la relación encontrada por nosotros es la siguiente:

	Por 100
Necesitan de 15 a 17 grados de azúcar para producir un grado de alcohol el	3
De 17 a 18 gramos... ..	3
De 18 a 20 —	38
De 20 a 25 —	27
De 25 a 50 —	14
De 50 a 70 —	7
De 70 a 100 —	0
De 100 a 150 —	5
De 150 a 200 —	1
Más de 200 —	2
	100

Consideramos como muy económicas, a las que consumen entre 17 y 18 gramos de azúcar; buenas, las comprendidas entre 18 y 20 gramos; regulares, las que gastan menos de 25 gramos, si tienen posibilidades de mejorar, y poco rentables, las que necesitan de 25 gramos en adelante.

Las que necesitan menos de 17 gramos para obtener un grado de alcohol serían extraordinarias, si no fuera por que se trata de una modalidad de levaduras de poca vida productiva y, por tanto, de bajo nivel de producción.

Por todo lo anteriormente expuesto, somos partidarios del trabajo en equipo, en donde más que las características particulares de cada cepa, se estudien los resultados de un grupo determinado, de acuerdo

con los datos encontrados, y en donde sus cualidades sean complementarias.

A continuación, damos una relación sintetizada de las levaduras clasificadas, incluído, con la especie a que pertenecen, el grado alcohólico formado a los treinta días de fermentación; la materia reductora que dejaron sin fermentar; el rendimiento, y la cantidad de azúcar que necesitaron para formar un grado de alcohol en ese tiempo.

Número	Especie	Grados	Gramos	Por 100	Gramos
1.	<i>S. cerevisiae</i> ...	11,60	1,32	93,01	18,16
2.	<i>S. chevalieri</i> ...	10,20	1,54	81,79	20,63
3.	<i>S. rosei</i> ...	10,60	1,45	85,00	19,86
4.	<i>S. chevalieri</i> ...	10,61	1,45	85,08	19,82
5.	<i>S. cerevisiae</i> ...	11,40	1,49	91,41	18,46
6.	<i>S. pastorianus</i> ...	9,80	1,45	70,56	21,48
7.	<i>H. subpelliculosa</i> ...	3,40	108,57	27,27	30,42
8.	<i>S. cerevisiae</i> ...	10,22	1,47	81,95	20,59
9.	<i>S. cerevisiae</i> ...	10,00	1,62	80,19	21,03
10.	<i>C. krusei</i> ...	0,10	132,41	0,80	795,90
11.	<i>S. chevalieri</i> ...	11,60	1,42	93,02	18,15
12.	<i>S. cerevisiae</i> ...	11,20	1,38	89,81	18,80
13.	<i>S. cerevisiae</i> ...	10,60	1,60	85,00	19,84
14.	<i>S. rosei</i> ...	5,60	83,47	44,89	22,95
15.	<i>S. chevalieri</i> ...	10,60	1,46	85,00	19,86
16.	<i>S. cerevisiae</i> ...	11,40	1,48	91,41	18,46
17.	<i>H. subpelliculosa</i> ...	3,00	106,66	24,05	35,11
18.	<i>S. exiguus</i> ...	11,20	2,46	89,81	18,70
19.	<i>S. pastorianus</i> ...	11,80	1,67	94,46	17,82
20.	<i>C. pulcherrima</i> ...	3,40	109,71	27,26	30,08
21.	<i>S. cerevisiae</i> ...	10,80	1,43	86,60	19,47
22.	<i>C. krusei</i> ...	0,90	61,93	7,21	166,84
23.	<i>S. exiguus</i> ...	12,00	2,29	96,23	17,47
24.	<i>S. cerevisiae</i> ...	11,40	1,51	91,41	18,46
25.	<i>C. krusei</i> ...	0,37	3,87	2,80	594,65
26.	<i>S. exiguus</i> ...	11,20	1,93	89,00	18,75
27.	<i>C. krusei</i> ...	0,90	105,20	7,21	118,55
28.	<i>S. chevalieri</i> ...	10,80	1,82	86,60	19,45

Número	Especie	Grados	Gramos	Por 100	Gramos
29.	<i>S. cerevisiae</i>	10,80	2,27	86,60	19,41
30.	<i>C. pulcherrima</i>	4,60	77,60	36,88	29,21
31.	<i>S. fructuum</i>	10,80	2,23	86,60	19,41
32.	<i>S. cerevisiae</i>	10,80	1,43	86,60	19,47
33.	<i>S. chevalieri</i>	10,81	2,29	87,24	19,40
34.	<i>S. rouxii</i> , var.	9,00	1,47	72,17	22,28
35.	<i>H. subpellic</i>	3,40	34,90	27,26	52,08
36.	<i>S. cerevisiae</i>	11,20	2,42	89,81	18,71
37.	<i>S. fructuum</i>	10,80	1,89	86,60	18,95
38.	<i>S. cerevisiae</i>	10,60	1,90	85,00	19,81
39.	<i>H. anomala</i>	1,60	101,00	12,83	69,37
40.	<i>S. chevalieri</i>	10,40	2,31	83,40	20,16
41.	<i>H. anomala</i>	1,40	44,13	11,22	119,90
42.	<i>S. cerevisiae</i>	11,60	2,14	93,02	18,08
43.	<i>S. rouxii</i> , var.	10,20	1,68	81,79	20,65
44.	<i>S. rosei</i>	10,20	1,87	81,79	20,60
45.	<i>H. subpelliculosa</i>	0,80	170,66	66,41	51,67
46.	<i>S. rosei</i>	10,00	2,00	80,19	21,00
47.	<i>S. exiguus</i>	6,60	1,72	52,92	31,86
48.	<i>C. pulcherrima</i>	3,40	76,80	27,26	39,76
49.	<i>S. cerevisiae</i>	10,40	2,00	83,39	20,19
50.	<i>S. rosei</i>	10,60	3,20	85,00	18,16
51.	<i>S. rouxii</i> , var.	11,60	2,08	93,58	18,09
52.	<i>S. italicus</i> , var.... ..	8,80	1,95	70,56	23,49
53.	<i>S. rosei</i>	9,80	1,09	78,58	21,52
54.	<i>S. fermentati</i>	6,84	2,21	54,85	30,67
55.	<i>C. krusei</i>	3,20	192,00	25,65	6,25
56.	<i>S. rouxii</i>	9,56	1,68	76,66	22,08
57.	<i>S. lactis</i>	11,20	1,72	89,81	18,76
58.	<i>S. rosei</i>	6,12	2,12	49,07	34,29
59.	<i>S. cerevisiae</i>	10,20	1,72	81,79	20,61
60.	<i>H. anomala</i>	6,40	60,47	51,31	23,67
61.	<i>S. rosei</i>	10,20	2,15	81,79	20,57
62.	<i>S. mellis</i>	0,40	170,66	3,20	105,85
63.	<i>S. rosei</i>	8,00	45,44	64,15	20,82
64.	<i>S. cerevisiae</i>	10,20	1,72	81,79	20,81

Número	Especie	Grados	Gramos	Por 100	Gramos
65.	<i>S. rouxii</i> , var.	11,20	1,60	89,81	18,78
66.	<i>S. cerevisiae</i>	11,60	1,54	93,02	18,14
67.	<i>S. rosei</i>	9,00	1,86	72,17	22,23
68.	<i>C. pulcherrima</i>	6,00	2,05	48,11	33,49
69.	<i>S. rosei</i>	10,40	2,10	83,40	20,18
70.	<i>H. anomala</i>	2,60	30,72	20,85	69,72
71.	<i>S. rosei</i>	8,60	45,17	68,96	19,39
72.	<i>C. pulcherrima</i>	7,20	2,10	57,73	29,16
73.	<i>S. rosei</i>	8,20	57,31	65,75	18,86
74.	<i>S. rosei</i>	7,80	80,00	62,55	16,92
75.	<i>C. pulcherrima</i>	4,60	79,19	36,08	28,87
76.	<i>S. cerevisiae</i>	10,80	1,69	86,60	19,46
77.	<i>S. pastorianus</i>	9,60	2,12	76,97	21,85
78.	<i>C. pulcherrima</i>	4,20	82,58	33,68	30,81
79.	<i>C. catenulata</i>	1,40	128,80	11,22	59,42
80.	<i>H. anomala</i>	3,40	75,29	27,26	40,20
81.	<i>S. chevalieri</i>	11,60	1,06	93,02	18,18
82.	<i>C. zeylanoides</i>	0,10	200,00	0,80	120,00
83.	<i>S. chevalieri</i>	11,60	1,04	93,02	18,18
84.	<i>S. cerevisiae</i>	10,80	1,48	86,60	19,57
85.	<i>C. krusei</i>	3,40	23,10	27,26	55,55
86.	<i>S. pastorianus</i>	11,00	1,60	88,21	19,12
87.	<i>H. subpelliculosa</i>	1,00	76,80	8,01	135,20
88.	<i>S. cerevisiae</i>	10,20	1,52	81,79	20,62
89.	<i>C. krusei</i>	4,20	25,34	33,68	44,44
90.	<i>S. cerevisiae</i>	9,60	1,61	76,98	21,91
91.	<i>S. rouxii</i>	10,80	1,86	86,60	19,44
92.	<i>C. krusei</i>	10,80	2,03	86,60	19,43
93.	<i>S. fermentati</i>	10,20	1,56	81,79	20,63
94.	<i>C. catenulata</i>	2,20	101,05	17,64	50,43
95.	<i>S. pastorianus</i>	11,20	2,12	89,81	18,73
96.	<i>K. apiculata</i>	0,40	187,31	3,20	7,80
97.	<i>S. rouxii</i> , var.	11,00	2,23	88,21	18,88
98.	<i>S. cerevisiae</i>	10,20	1,87	81,79	20,00
99.	<i>S. rosei</i>	8,60	1,70	68,96	24,45
100.	<i>S. rosei</i>	9,80	2,18	78,58	21,41

SUMMARY

A previous work on the taxonomy and enological study of the yeasts founded in Jerez wines is presented.

« REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA »

Con este título acaba de llegar a nuestras manos una nueva revista dedicada a las investigaciones microbiológicas. Sólo por tal motivo su aparición constituye un grato acontecimiento para los microbiólogos de todo el mundo, pero más aún debemos celebrarlo los españoles, por cuanto la nueva revista ha nacido en Méjico, demostrando una vez más la pujanza del núcleo de investigadores de aquel país hermano, dedicados a esta clase de trabajos.

Se dejaba sentir, ciertamente, la falta de una revista que recogiese la ya abundante producción que, tanto en el campo de la Microbiología general como en el de sus ramas especializadas (Veterinaria, Agrícola, Industrial, etc.), y muy singularmente en el de la Microbiología médica (Virología, Micología, Bacteriología y Protozoología), se hallaba dispersa en múltiples y un tanto heterogéneas publicaciones de los países hispanoamericanos y aun de otros varios. Llenar este vacío es uno de los propósitos de los editores —quizá el más inmediato—, pero también el de continuar la brillante tradición heredada de los trabajadores que, como Finlay, en Cuba; Cruz, en Brasil; Mazza, en Argentina; Izquieta Pérez, en Ecuador; Ochoterena, en Méjico, y tantos más, abrieron las rutas de la investigación en este campo de la Microbiología, marcando los hitos indispensables al desarrollo de las organizaciones sanitarias y, por tanto, al mejoramiento de la salud pública en aquel hemisferio.

Estamos seguros de que tan importantes objetivos serán alcanzados bajo la dirección del Dr. Bojalil y el nutrido grupo de sus colaboradores inmediatos, entre los que figuran algunos de los más destacados microbiólogos de Hispanoamérica. El sumario de su primer número (algunos de cuyos trabajos serán objeto de referencias en ésta y otras revistas españolas afines, por su especial interés) es ya garantía suficiente

del éxito que espera a la nueva revista. En prueba de ello, transcribimos a continuación dicho sumario:

Estudios sobre flora vaginal.—II. Relaciones bioquímicas e inmunológicas entre el bacilo de Döderlein y otros *Lactobacilli*.—*Edmundo Azcárate S. y Adolfo Pérez-Miravete.*

Acción de algunos antibióticos sobre *Haemobartonella muris*.—*Luis Isita.*

Bacilos ácido-resistentes de crecimiento rápido.—I. Caracteres morfológicos y de cultivo.—*L. F. Bojalil y Fernando Bastarrechea.*

Galato de etilo, un antagonista del ácido shikímico en la mutante de *Escherichia coli* 83-1.—*G. Carvajal.*

Algunas características de la biosíntesis inducida de histidasa en *Serratia marcescens*.—*Emiliano Cabrera-Juárez.*

Demonstração de capsula em leveduras do genero *Rhodotorula*, pelo método de Moeller.—*Cecilia Mattos Ulson.*

Valor de una intradermo-reacción y una reacción de precipitación en el diagnóstico de la fasciolosis humana.—*Francisco Biagi F., Jorge Tay y Jaime Portilla.*

Estudios helmintológicos de la Región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda, 11.^a parte. Filarioidea.—V. Hallazgo de un nódulo oncocercoso en un mono araña, *Ateles geoffroyi-vellerosus* Gray, del Estado de Chiapas.—*Eduardo Caballero y C. y Alfredo Barrera.*

La influencia de la resiembra en la prueba de la licuación de la gelatina, por *Staphylococcus aureus*.—*E. R. Pujol y A. Pérez-Miravete.*

Preparación de autovacunas libres de proteínas.—*Salomón Calderón M.*

En cuanto a la presentación tipográfica y demás aspectos de orden editorial, bastará decir que hace honor a las prensas mejicanas, que, como es bien sabido, se hallan a la altura de las mejores del mundo.

MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA se felicita de la aparición de esta revista hermana y hace votos por su prosperidad futura.—L. N.

RENOVACION DE DIRECTIVA

En la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 27 del pasado mes de junio, se efectuó el escrutinio de los votos recibidos para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva.

En consecuencia, la Junta ha quedado constituida de la manera siguiente:

- Presidente:* D. Gerardo Clavero del Campo.
- Secretario:* D. Lorenzo Vilas López.
- Tesorero:* D. Miguel Benloch Martínez.
- Bibliotecario:* D. Ricardo Salaya León.
- Vocales:* D. Genaro Alas Cores.
D. Gabriel Colomo de la Villa.
D. Eduardo Gallardo Martínez.
D. José García Bengoa.
D. Emilio Luengo Arroyo.
D. Juan Manuel Martínez-Arroyo Núñez.
D. Florencio Moreno de Vega y Soler.
D. Miguel Rubio Huertos.

Depósito legal, M. 702. 1958

Artes Gráficas REYES - Jerónima Llorente, 15. - MADRID