VOLUMEN 14. 1961 JULIO - SEPTIEMBRE. NUMERO 3

Microbiología Española

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

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUIN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 160 PTA; extranjero, 200 PTA

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA» DEL C. S. I. C.

ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 PTA; extranjero, 240 PTA. Número: España, 20 PTA; extranjero, 30 PTA.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI» (Estación Experimental de «Aula Dei». Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 40 PTA.; extranjero, 50 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 PTA; extranjero, 220 PTA. Número: España, 200 PTA; extranjero, 230 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España: 150 PTA; extranjero, 175 PTA. Número: España, 160 PTA; extranjero, 185 PTA.

ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 PTA; extranjero, 100 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.

ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 165 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 60 PTA.

CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 45 PTA.

COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 125 PTA. Número: España, 110 PTA; extranjero, 135 PTA.

CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO «LUCAS MALLADA» (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 PTA; extranjero, 80 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 70 PTA.

ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.

FARMACOGNOSIA (Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 35 PTA; extranjero, 45 PTA.

GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 80 PTA; países restantes, 120 PTA. Número: España y Portugal, 25 PTA; países restantes, 35 PTA.

PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero 150 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.

DEPÓSITO LEGAL: M. 702.-1958

REYES - Jerónima Llorente, 15 - Madrid

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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. Eduardo Gallardo Martínez, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

INDICE

Página

Un nuevo método de tinción para el género *Azotobacter,* por *V. Callao y E. Hernández* 129

Análisis del micelio del *Aspergillus terreus,* por *R. Lahoz* y *D. Rodríguez* 135

Estudio *in vitro* de la acción de la kanamicina sobre bacterias patógenas para los peces, por *D. A. Conroy* 147

Organic nitro compounds reduced by *Nocardia* V., by *J. R. Villanueva* 157

Estudios sobre germinación de esporas de *Cephalothecium roseum,* por *Isabel García-Acha* 163

Efecto morfogenético observado en los extractos hormonales de los tumores del olivo por *R. Beltrá* 177

Estudios sobre los organismos del grupo de la pleuroneumonía, por *R. Moreno.* 189

La acción *in vitro* de la kanamicina sobre *Aeromonas punctata,* por *D. A. Conroy* 203

Nuevos Servicio y Secciones 207

C. S. I. C.
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN. GRANADA
SECCION DE MICROBIOLOGIA

UN NUEVO METODO DE TINCION PARA EL GENERO *AZOTOBACTER*

POR
V. CALLAO y E. HERNANDEZ

Los métodos generales de tinción de bacterias no producen resultados satisfactorios cuando se aplican a colorear los microbios pertenecientes al género *Azotobacter,* debido a la abundancia de sustancias mucilaginosas sintetizadas por los mismos y al abundante depósito salino que se produce en sus medios de cultivo. Por ello, el fondo de estas preparaciones no queda transparente y se produce una acumulación de colorante sobre la célula bacteriana, que impide la observación de su estructura de un modo bien definido.

Es generalmente utilizada para teñir este tipo bacteriano, la técnica de Winogradsky (1), que colorea a las células vegetativas y que está basada en la actuación con violamina y violeta de genciana, ambas en soluciones débiles. Para la coloración de los quistes se utiliza por el mismo autor una coloración triple: violamina calentada hasta emisión de vapores, vesubina y violeta de genciana.

Con los métodos empleados por Winogradsky suelen obtenerse, por lo general, coloraciones excesivamente intensas, que impiden observar de una manera clara la forma y estructura de las células, y no se aprecia en los quistes la clara diferenciación entre el cuerpo central y las dos membranas. Para evitar estos inconvenientes, hemos ensayado cierto número de colorantes, empleándolos a diferentes concentraciones y a tiempos variables de actuación, hasta conseguir el método que aquí presentamos, con el que hemos obtenido resultados satisfactorios y que constituye el objeto de esta comunicación.

MATERIAL Y METODOS

Los gérmenes del género *Azotobacter* utilizados para este trabajo han sido obtenidos de la colección de la Estación Experimental del Zaidín y aislados en suelos de la vega granadina.

Se han utilizado los colorantes siguientes: rosa de Bengala (Geigy) y violeta de genciana (Geigy).

Se emplean dos disoluciones: *a*) disolución de rosa de Bengala en agua fenicada al 5 por ciento y a concentración del colorante del 1 por ciento (p/v); *b*) disolución de violeta de genciana en agua destilada al 1 por cinco mil (p/v).

Ambos colorantes deben estar recién filtrados en el momento de su utilización, si se quiere conseguir un fondo completamente nítido.

La técnica de la tinción utilizada es la siguiente:

1) Extensión y fijación por el calor.
2) Teñir con la disolución de rosa de Bengala durante treinta segundos.
3) Lavar con agua destilada.
4) Diferenciar con la disolución de violeta de genciana durante quince-veinte segundos.
5) Lavar y dejar secar en el aire.

RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a las débiles concentraciones de los colorantes que utilizamos y como consecuencia de su poco tiempo de actuación, se evitan con el uso de esta técnica las molestas acumulaciones de los mismos, que interfieren la observación clara de las células, apareciendo el fondo de las preparaciones totalmente transparente.

También se han logrado con el uso de este método de tinción excelentes resultados para la tinción de los quistes, con la ventaja de usar un mismo procedimiento para su observación conjuntamente con la de las células vegetativas. En ellos se distinguen perfectamente sus dos cubiertas externas, que aparecen claramente diferenciadas del núcleo central (*figura 1*).

Otra ventaja que posee nuestra técnica de tinción reside en la diferente coloración con que aparecen teñidas las formas jóvenes y las adultas.

Las células jóvenes se colorean más intensamente que los elementos adultos (*figuras 2-3*), mientras que las células en estado prequístico aparecen teñidas irregularmente, en forma de gránulos, semejando un mosaico (*figura 4*).

RESUMEN

Se da a conocer un nuevo método de coloración diferencial para todos los estados celulares del género *Azotobacter*.

El procedimiento consiste en teñir primeramente con disolución de rosa de Bengala al 1 por ciento (p/v) en agua fenicada al 5 por ciento durante treinta segundos, y después de lavar, diferenciar con violeta de genciana en solución acuosa al 1 por cinco mil, durante quince-veinte segundos.

SUMMARY

A new method is presented to differential stain for every cellular stages of the bacteria belonging to the genus *Azotobacter*. The method is based in the action of 1 per cent (w/v) Rose Bengal solution in 5 per cent carbolic acid on the head fixed smear during thirty seconds, and successively. after washing with water, it is used to difference, a 1/5,000 (w/v) Gentian Violet solution during fifteen-twenty seconds.

REFERENCIAS

1. WINOGRADSKY, K. Microbiologie du soil. Problemes et methodes. Masson Cie. París.

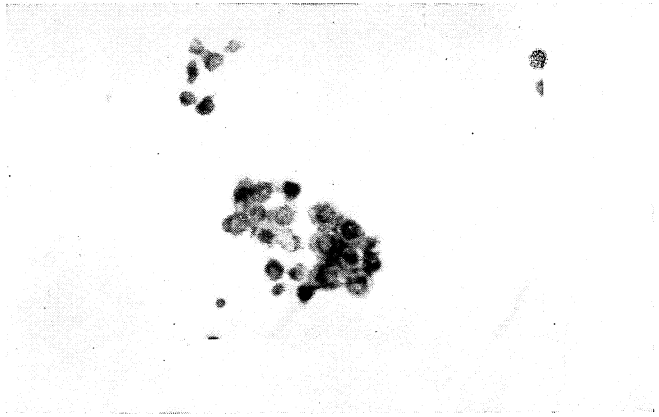


Figura 1. Quistes de A. chroococcum

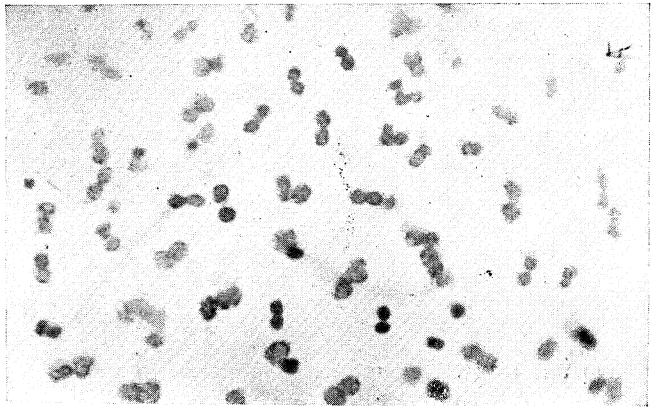


Figura 2. Formas celulares jóvenes y adultas de A. vinelandii

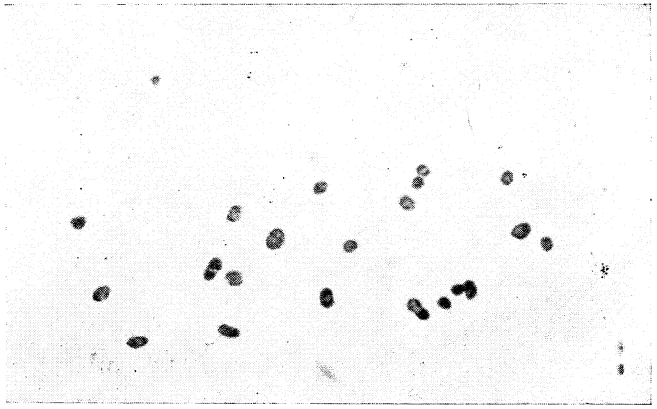


Figura 3. Formas celulares jóvenes y adultas de A. chroococcum

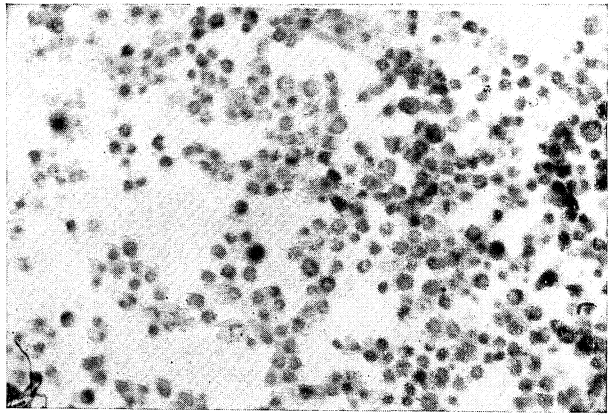


Figura 4. Células en estado prequístico de Azotobacter *sp.*

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

ANALISIS DEL MICELIO DEL *ASPERGILLUS TERREUS*

POR
R. LAHOZ y D. RODRIGUEZ

INTRODUCCION

En nuestros experimentos preliminares con el *Aspergillus terreus* nos llamó la atención la cantidad comparativamente grande de masa miceliar que se obtenía durante la fermentación de este organismo en los medios sintéticos de Raulin y Czapek-Dox, especialmente en este último, en el que la glucosa constituye la única fuente carbonada. En estos experimentos, extracciones con disolventes orgánicos de pequeñas muestras de micelio desecado, proporcionaban extractos aparentemente abundantes, lo que nos movió a estudiar sistemáticamente los diferentes materiales obtenidos en cada una de las fracciones resultantes en las extracciones.

La primera fracción obtenida (con éter de petróleo), ascendía al 25 por ciento del peso de micelio seco. La segunda resultó en el tratamiento del micelio con éter ordinario y suponía el 17 por ciento del peso de micelio. Finalmente, la extracción del micelio con acetona proporcionaba un extracto de color fuertemente amarillo y que una vez destilado el disolvente, contenía el 3 por ciento del peso del micelio.

Múltiples han sido los productos descritos como resultantes de las actividades químicas del *Aspergillus terreus* cultivado en medios sintéticos; sin embargo, nada existe en la bibliografía referente a la producción de grasa por el microorganismo que nos ocupa y que en el caso de la cepa objeto de este trabajo el rendimiento en grasa llega a ser del 25 por ciento. Raistrick y Smith (8) logran aislar la terreína y citrinina, así como cantidades variables de los ácidos oxálico y succínico. Un año

más tarde, los mismos autores (9) detectan en la solución metabólica del *A. terreus,* y separan en estado de pureza, dos metabolitos conteniendo cloro en la molécula, que designan con los nombres de geodina y erdina.

Calam (2) encuentra los ácidos itacónico y fumárico, mientras Kent y Heatley (4) denuncian la presencia de patulina en los líquidos donde se había desarrollado el *A. terreus.* Los ácidos itartárico y terreico fueron ambos aislados del *A. terreus* por Stodola y cols. (10) y por Pausacker y cols. (6). Los investigadores japoneses Iwata y Yosioka (3) aislaron la terreína y Raistrick y Rudman (7) separaron la flavipina en estado de pureza, del líquido metabólico del *A. terreus.*

En la presente investigación se hace un estudio de la composición química de la Fracción I (fracción grasa) y de la Fracción III (extracto acetónico). La Fracción II (extracto etéreo) se halla todavía en estudio

PARTE EXPERIMENTAL

La cepa de *A. terreus,* cuyo micelio es objeto del presente estudio, fue aislada de una muestra de tierra de labor procedente de Villafranca de los Barros (Badajoz), que nos fue facilitada por el Instituto de Edafología. El moho se halla catalogado en la colección del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, con el número A-350.

Periódicamente se sembraron diversos lotes de matraces de 1 l de capacidad, conteniendo cada uno 300 ml del medio estéril de Czapek-Dox de la siguiente composición: Glucosa, 50 g; NO_3Na, 2 g; PO_4H_2K, 1 g; ClK, 0,5 g; SO_4Mg7H_2O, 0,5 g; SO_4Fe7H_2O, 0,01 g; agua destilada, 1.000 ml. La siembra se hacía con una suspensión de esporas en agua destilada, procedente de cultivos del microorganismo en malta-agar. La incubación se hacía en superficie a 24 °C y en la oscuridad.

Cuando el contenido de glucosa residual (determinada polarimétricamente) era de 1,0 - 0,4 por ciento, lo que tiene lugar entre los veinticuatro y veintiocho días de incubación, se retiraban los matraces de la incubadora y se separaba el micelio de los líquidos metabólicos por filtración. La masa de micelio resultante se lavó con agua destilada, se prensó ligeramente entre papel de filtro, se secó parcialmente a la temperatura del laboratorio y totalmente manteniéndola durante varios días en una estufa de cultivo a 37 °C. Una vez seco el micelio se pulverizó

finamente usando una máquina de moler. En las diversas etapas de trabajo, cantidades variables, pero conocidas, de micelio eran colocadas en un aparato de extracción de tipo Soxhlet y extraidas con éter de petróleo (p. e. 50°-70 °C) durante un período variable de tiempo, generalmente de doce-quince días. A continuación se separaba el disolvente por destilación a presión ordinaria y a la temperatura de 80 °C y las últimas porciones en vacío, con lo que se obtenía una grasa líquida (aceite) de color rojizo (Fracción I), y cuyo rendimiento es del 25 por ciento del micelio seco.

El micelio extraido con éter de petróleo, como se acaba de describir, se secaba en el aire a la temperatura ambiente y volvía a extraerse de nuevo, empleando esta vez éter sulfúrico. El extracto etéreo obtenido se desecaba sobre SO_4Na_2 anhidro y se destilaba el disolvente, resultando una masa sólida gelatinosa de color marrón rojizo que constituía el 17 por ciento del peso del micelio (Fracción II). Se repitió el proceso de extracción, usando ahora acetona como disolvente. Evaporado el disolvente, se obtenía un sólido blanco cristalizado en agujas (*d*-manita) y que alcanza hasta un 3 por ciento del peso del micelio (Fracción III).

Fracción I

Características fisicoquímicas

Punto de solidificación	1-3
Indice de yodo (Hanus)	88
Indice de saponificación	191
Indice de acidez	4,6
Densidad (a 25 °C)	0,955
Indice de Reichert-Meissl	0,3

Saponificación

5,58 g de grasa se saponificaron empleando 3 g de KOH y 5 ml de alcohol de 95°. Terminada la saponificación, se calentó suavemente a fin de evaporar el alcohol, y se dejó enfriar. Entonces se añadió agua destilada (40 ml) y se calentó a continuación hasta completar la disolución de los jabones. Una vez fría la solución jabonosa se extrajo dos veces con 100 ml (50 ml cada vez) de éter de petróleo (p. e. 50°-70 °C). Se separó la disolución de los jabones, de la capa etérea, y se acidificó aquélla con ClH concentrado hasta coloración roja del naranja de metilo. El

precipitado blancogrisáceo que se forma fue extraido con éter sulfúrico (50 ml) lavándolo a continuación con agua destilada. Después de seco sobre SO_4Na_2 anhidro se desalojó el disolvente por evaporación en corriente de CO_2 y las últimas porciones a presión reducida a 80 °C durante media hora. Secado el residuo sobre P_2O_5 dio un líquido siruposo de color marrón oscuro que pesaba 3,44 g, lo que corresponde a un 61,46 por ciento de ácidos grasos totales.

Separación de los ácidos grasos saturados de los no saturados líquidos

Se tomaron 25 g de aceite y se saponificaron de la manera usual, empleando para ello 15 g de KOH que se disolvieron en la menor cantidad posible de agua. A la mezcla anterior se añadieron 25 ml de alcohol de 95°. Una vez completada la saponificación, se evaporó el alcohol casi totalmente, añadiéndole luego 200 ml de agua destilada. Se completó la disolución de los jabones calentando la masa en baño María y se separó a continuación la materia insaponificable. La disolución de los jabones se acidificó con ClH concentrado y se extrajo con éter ordinario (150 ml) el precipitado de los ácidos grasos separados. Se lavó el extracto etéreo con agua, filtrándolo luego a través de papel de filtro ordinario. Se secó este extracto con SO_4Na_2 anhidro, se filtró de nuevo y se evaporó el disolvente en corriente de CO_2. La masa siruposa obtenida se secó sobre P_2O_5 en el vacío. El material obtenido pesaba 15 g.

Una muestra (5 g) de los ácidos grasos anteriormente obtenidos, se disolvió en 50 ml de alcohol de 95°. Por otro lado, se preparó una disolución de acetato de plomo (1,5 g) en 50 ml de alcohol de 95°. Se llevaron a ebullición ambas disoluciones y se mezclaron agitando continuamente. Se dejó enfriar la disolución a la temperatura del laboratorio y, una vez alcanzada ésta, se mantuvo a 15 °C durante dos horas. Se separó el precipitado de jabones de plomo formado mediante filtración, lavándolo a continuación con 200 ml de alcohol de 95° a 15 °C. Se disolvieron de nuevo los jabones de plomo en 100 ml de alcohol de 95° caliente, añadiendo a esta disolución 0,5 ml de ácido acético glacial. Se calentó de nuevo hasta la ebullición y se volvió a enfriar a la temperatura ambiente y finalmente durante dos horas. El precipitado de las sales de plomo se lavó como anteriormente y se suspendió en 100 ml de éter sulfúrico contenido en una ampolla de separación, y a esta mezcla se añadieron 25 ml

de NO_3H (1:3) agitando suavemente el conjunto durante unos minutos. Separadas las dos capas, se retiró la etérea, la que se lavó a continuación con igual volumen de agua destilada. Una vez seco sobre SO_4Na_2 se desalojó el éter en corriente de CO_2. El residuo así obtenido se sometió a un secado ulterior en la estufa a 100 °C durante una hora. Al enfriarse (desecador) resultó una masa sólida casi blanca, parcialmente cristalizada, cuyo peso fue de 1,3 g, lo que constituye el 26 por ciento de ácidos grasos saturados.

Identificación de los ácidos grasos saturados

Identificación. Se partió de 15 g de ácidos grasos saturados obtenidos a partir de la grasa procedente del lote de 452 g de micelio y que fueron obtenidos del aceite siguiendo el método de las sales de plomo anteriormente descrito. Se disolvió la mezcla de ácidos grasos saturados en 150 ml de alcohol metílico absoluto caliente y a esta solución se pasó corriente de ClH seco hasta saturación. A los pocos instantes de comenzar el paso de ClH se observó la formación de gotas aceitosas de los ésteres, la cual aumentó continuamente a medida que progresaba la operación. Siete horas fueron necesarias para alcanzar la saturación con ClH. Transcurrido este tiempo, se calentó a reflujo durante quince horas y se separó la capa aceitosa que sobrenadaba por medio de una ampolla de decantación. Esta masa aceitosa se disolvió en éter ordinario (100 ml) y se lavó la solución etérea de los ésteres, primero, con agua y, finalmente, con solución diluida de CO_3HNa. Separada la capa etérea, se secó sobre SO_4Na_2 anhidro y se desalojó el éter por destilación. La mezcla de ésteres metílicos pesó 18 g.

A continuación se destilaron fraccionadamente a presión reducida, según el *cuadro 1.*

Cuadro 1

Fracciones	Temperaturas °C	Presiones mm Hg	Pesos g
1ª	160-170	9	1,60
2ª	170-180	7	5,18
3ª	181-190	7	2,45
4ª	191-197	8	6,65

Se saponificó cada una de estas fracciones a fin de liberar los ácidos grasos y proceder a su separación e identificación.

Separación por cristalización fraccionada. Los ácidos componentes de cada una de las fracciones se disolvieron en alcohol absoluto, en cantidad tal que nada de sólido precipitase a 15 °C. Entonces las disoluciones alcohólicas de las diferentes fracciones se llevaron a la temperatura de 0 °C durante un período de tiempo de doce horas. Transcurrido este tiempo, se separaron por filtración los cristales formados en cada una de las fracciones, concentrando a continuación las aguas madres y enfriando de nuevo a la temperatura de 0 °C hasta que se obtuvieron más cristales. Se determinaron los puntos de fusión de cada una de las diversas fracciones obtenidas, mezclando las de propiedades análogas. Se repitió este proceso hasta llegar a obtener fracciones de composición uniforme con las que se consiguieron dos fracciones finales: una, cuyo punto de fusión era 67°-69,5 °C, y otra, que fundía a 61°-62 °C.

Ambas se recristalizaron de alcohol absoluto. Para la primera se obtuvo el punto de fusión de 69,5 °C.

Identificación de los ácidos grasos líquidos no saturados

El filtrado procedente de la precipitación de las sales de plomo de los ácidos saturados, contiene en solución los jabones de plomo de los ácidos no saturados. Para liberarlos se diluyó la solución alcohólica de las sales de plomo hasta un volumen aproximado de 500 ml, acidificando luego con ClH concentrado. Se filtró a fin de separar el precipitado de Cl_2Pb formado, y el líquido claro que filtró se extrajo con éter sulfúrico (100 ml) en ampolla de decantación. Separada la capa etérea y lavada con agua previamente, se desecó sobre SO_4Na_2 anhidro. Desalojado el éter en corriente de nitrógeno y las últimas porciones a presión reducida, quedó un líquido de aspecto oleoso cuyo peso era de 2,2 g, o sea, el 44 por ciento de ácidos grasos no saturados.

Bromación. A 5 g de la mezcla de ácidos no saturados, contenidos en un matraz, se añadieron 50 ml de ácido acético glacial. A esta disolución se agregaron 10 ml de éter ordinario y se colocó el matraz conteniendo la mezcla en un baño de hielo. Sobre la mezcla, así enfriada, se hizo gotear lentamente una disolución (50 por ciento) de bromo en ácido acético

glacial, hasta que el líquido adquiría una coloración rojiza, y entonces se colocó el matraz a la temperatura de 5 °C durante doce horas. Transcurrido este tiempo, no se observó la producción de precipitado alguno, lo que probaba la ausencia de ácido linolénico. Al líquido contenido en el matraz se le añadió agua destilada en exceso (500 ml), con lo que tuvo lugar la formación de una abundante turbidez. Transcurridos unos minutos, se observó la existencia de una ligera capa de material sólido en el fondo del matraz. Separado el precipitado por filtración, se disolvió en éter ordinario y se desecó la disolución etérea con SO_4Na_2 anhidro. La masa sólida que se obtuvo por filtración y evaporación del éter sulfúrico, se disolvió en éter de petróleo (p. e. 50°-70 °C) y se dejó a la temperatura de 0 °C. El sólido blanco cristalino resultante, una vez desecado, fundía a 99°-101 °C. Recristalizado el éter de petróleo (p. e. 50°-70 °C), se obtuvieron agujas blancas que fundieron a 111°-112 °C. El ácido tetrabromolinoleico funde a 114°-115 °C (5).

Oxidación. 5 g de la mezcla de los ácidos grasos no saturados se añadió sobre una disolución formada por 5 g de NaOH en 500 ml de agua destilada y se calentó ligeramente el conjunto en baño María. Cuando la solución jabonosa era casi transparente, se dejó enfriar, y a continuación se vertió sobre 4 l de agua previamente enfriada a la temperatura de 8 °C, agitando continuamente la masa líquida total. Al conjunto se añadieron lentamente y con agitación 400 ml de MnO_4K al 1 por ciento, que había sido enfriado previamente a 6°-8 °C. Transcurridos cinco minutos, se hizo llegar SO_2 a la vasija en que tiene lugar la reacción, hasta decoloración completa del líquido. Después de unos minutos se filtró el precipitado blanco formado y se desecó éste con P_2O_5. Se extrajo el precipitado con cloroformo hirviente y a continuación se filtró. El sólido insoluble se disolvió en una mezcla caliente de alcohol-benceno 1 : 1. Al enfriarse se obtuvieron cristales blancos en forma de agujas, cuyo punto de fusión era 171°-172 °C.

El cloroformo de la extracción anterior se evaporó a sequedad y el material sólido resultante se extrajo con éter de petróleo (p. e. 50°-70 °C), calentando a reflujo durante unos minutos. Se filtró la mezcla a fin de separar el sólido blanco insoluble y se cristalizó éste de alcohol-benceno 1 : 1. El punto de fusión de producto cristalizado de alcohol-benceno era 128 °C.

Materia insaponificable

La solución etérea conteniendo el material insaponificable se sometió a destilación a fin de separar el disolvente (éter de petróleo, p. e. 50°-70 °C) lo que proporcionó una masa sólida de color amarillento, parcialmente cristalizada, que una xez seca fundía a 142°-154 °C. Este material, antes de ser sometido a purificación ulterior, daba las reacciones que se indican a continuación.

Una pequeña muestra de este material se disolvió en cloroformo, y a esta solución se le añadieron 20 gotas de anhídrico acético. Sobre el conjunto se vertieron unas gotas de SO_4H_2 concentrado. Inmediatamente se formó una intensa coloración roja, la cual rápidamente pasa a violeta-azulado y finalmente a verde.

Sobre una pequeña cantidad del material problema disuelto en cloroformo, se vertieron varias gotas de SO_4H_2 concentrado. La capa de ácido se colorea de rojo intenso, mientras la capa clorofórmica queda incolora.

Una disolución de la substancia o substancias en cloroformo mezclada con otra de cloruro de antimonio en el mismo disolvente, producía una débil coloración roja al cabo de un corto tiempo.

Se observó la gran solubilidad de este material en los disolventes orgánicos. En alcohol metílico absoluto se disolvía fácilmente al calentar, de donde cristalizaba al enfriarse. Resultaron cristales blancos en forma de hoja de helecho. Desecados sobre P_2O_5 y determinado su punto de fusión, se obtuvo 148°-153 °C. Recristalizado en alcohol metílico absoluto dio 155°-158 °C.

Teniendo en cuenta las reacciones coloreadas anteriormente descritas y las solubilidade sde la substancia, se pensó en la posibilidad de que el material descrito en el presente apartado fuese ergosterol. A fin de obtener el hidrato de ergosterol (1), se tomaron 0,40 g del material antes descrito de punto de fusión 155°-158 °C y se disolvieron en 20 ml de una disolución caliente de KOH en alcohol al 3 por ciento y se mantuvo en ebullición durante unos minutos. Se añadieron unos pocos mililitros de agua destilada, resultando al enfriarse una masa de cristales blancos en forma de agujas finas que, desecados, fundieron a 159°-161 °C.

Fracción III

El micelio secado al aire (después de haber sido extraido con éter ordinario) fue extraido con acetona en un extractor tipo Soxhlet, hasta que tomada una muestra (2 ml) y evaporada en un vidrio de reloj no dejaba residuo alguno. Destilado el disolvente a la presión ordinaria, y las últimas porciones en vacío, se obtuvo un sólido blanco cristalizado en agujas. El punto de fusión de este material era de 155°-158 °C y su peso, 2,8 g.

Sobre el producto crudo así obtenido se añadieron 50 ml de agua destilada y se calentó a continuación ligeramente. Se filtró la disolución, con el fin de separar una pequeña masa de un material amorfo de color amarillento que acompañaba al producto cristalizado, y se destiló a sequedad en el vacío a 80 °C. Al sólido blanco que quedaba en el matraz de destilación se le añadió alcohol absoluto (100 ml) y se calentó a ebullición. Al enfriarse se obtuvo una substancia blanca cristalizada en agujas, que fundía a 165,5 °C. Recristalizada de etanol, p. f., 166 °C.

Una pequeña cantidad de la substancia así purificada (p. f., 166 °C). disuelta en agua no dio coloración o precipitado alguno al ser tratada con solución acuosa de Cl_3Fe.

Una determinación del nitrógeno en la molécula de la substancia dio negativo.

El producto era soluble en agua fría. En etanol, así como en butanol, era soluble en caliente, de donde precipitaba en forma de agujas blancas al enfriar la solución.

Se pensó que la substancia que nos ocupa podía ser *d*-manita, tan frecuente en los líquidos metabólicos de mohos, así como en el micelio.

Una pequeña cantidad de la substancia problema se mezcló íntimamente con una muestra de manitol auténtico y se determinó el punto de fusión de la mezcla, no observándose depresión alguna (166 °C).

Acetilación. Una muestra de la substancia supuesta *d*-manita (0,22 g) se mezcló en un mortero con 0,5 g de acetato sódico anhidro. A esta mezcla colocada en un matraz se le añadieron 2 ml de anhídrico acético. Se calentó lentamente a reflujo hasta alcanzar la temperatura de 140°-150 °C y luego se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Se añadieron 40 ml de agua destilada, mientras se agitaba continuamente el matraz

sumergido en agua fría. Se filtró la disolución formada y al líquido filtrado se le añadieron unos pocos mililitros de ClH diluido y se extrajo el líquido con éter ordinario. Separado el éter en el vacío, quedaba una pequeña cantidad de un líquido siruposo, casi transparente. Vertiendo agua en exceso sobre aquél, se obtenía casi inmediatamente una masa de sólido blanco cristalizado en tablas rectangulares o rombos. Punto de fusión del material crudo, 117°-120 °C. Recristalizado en agua, 119°-120 °C.

Paralelamente a esta acetilación se efectúa otra, esta vez empleando una muestra de 0,5 g de manitol auténtico. La operación se realizó en las mismas condiciones que la anterior, con lo que se obtuvo un producto de punto de fusión de 119,5 °C.

Se hizo una mezcla íntima con dos muestras de los productos procedentes de cada una de las acetilaciones descritas anteriormente y se determinó el punto de fusión de esta mezcla, obteniéndose el valor de 119°-120 °C.

DISCUSION Y RESULTADOS

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis de la grasa extraida del micelio del *A. terreus,* se observa que este material no parece diferir notablemente en su composición de otras grasas procedentes de mohos. Los valores de algunas de sus constantes químicas recuerdan a las obtenidas por Ward y Jamieson (11), para la grasa del *Penicillium javanicum* van Beijma, como se indica en el *cuadro 2.*

Cuadro 2

	P. javanicum	*A. terreus*
Indice de saponificación	191,0	191,0
Indice de yodo	84,0	88,0
Indice de Reichert-Meissl	0,3	0,3

Sin embargo, cualquiera de estos índices tiene escaso valor comparativo. La exacta coincidencia entre ambos índices de Reichert-Meissl carece de significación, dado que la mayoría de los aceites contiene indicios solamente de ácidos volátiles y, por tanto, los valores obtenidos en esta

determinación son siempre menores de 1 y bastantes próximos entre sí. Los índices de saponificación, en general, no difieren ampliamente para muchas grasas de origen vegetal; no obstante, en el caso presente, el índice de saponificación obtenido (191) puede ser considerado como comparativamente bajo. Esto vendría a confirmar la no existencia en el problema de ácidos volátiles o solubles, al menos en cantidades apreciables, lo cual está en concordancia con el valor obtenido para el índice de Reichert-Meissl y su significado anteriormente expuesto. Además, la falta de uniformidad en los métodos analíticos dificulta los estudios de tipo comparativo.

La presencia de los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico en mayor o menor proporción, presentes también en el aceite objeto de esta investigación, es común a todas las grasas procedentes de mohos y, en general, se puede extender esta afirmación a casi todas las grasas de origen vegetal. Como anteriormente se dice, el aceite objeto de esta investigación no difiere fundamentalmente en su composición de otros lípidos originados por mohos.

En lo que respecta al alcohol que esterifica a los ácidos, no puede decirse lo mismo, ya que todos los ensayos efectuados para caracterizar la glicerina dieron resultados negativos, por lo que en este aspecto, la grasa del *A. terreus* aquí estudiada difiere notoriamente de la producida por mohos, en la cual el alcohol esterificante es invariablemente la glicerina. Este alcohol está siendo estudiado en la actualidad.

Finalmente, el rendimiento en grasa obtenido (25 por ciento del micelio seco) nos parece realmente alto y, por tanto, no desprovisto de interés, ya que si bien ciertas cepas de algunos otros mohos alcanzan rendimientos en grasa mayores, lo hacen, en casi todos los casos, creciendo sobre medios de cultivo ricos en hidratos de carbono. En el presente trabajo, como al principio se expuso, el contenido inicial en hidrato de carbono (glucosa) no es nunca superior al 5 por ciento, es decir, el contenido en el medio ordinario de Czapek-Dox.

Como es sabido, la capacidad de un organismo para sintetizar grasas es una función de la concentración inicial de hidrato de carbono.

Asimismo, una razón C/N alta deberá favorecer la síntesis de grasa por el *A. terreus,* como se sabe sucede en otros microorganismos productores de grasa.

Teniendo en cuenta lo que antecede, no parece difícil, en principio, conseguir un considerable aumento en el rendimiento de grasa del *A. terreus*, con solo variar los factores que antes se mencionan hacia un óptimo en las condiciones favorables a este objeto.

RESUMEN

En este trabajo se describe, por vez primera, la producción de grasa por el *Aspergillus terreus*.

Este organismo cultivado en un medio sintético y en cultivo estacionario produce un 25 por ciento del peso de micelio seco, de una grasa líquida (aceite) a la temperatura ordinaria, cuya naturaleza química se estudia en la presente publicación.

SUMMARY

The production of fat by *Aspergillus terreus* has been studied. When growing this organism on a synthetic medium it yields 25 per cent (on dried micelium basis) of an oil.

The chemical nature of this oil has been investigated.

BIBLIOGRAFIA

1. Birkinshaw, J. H.; Callow, R. K., y Fischmann, C. F. 1931. Biochem. J., 25, 1.977-80.
2. Calam, C.; Towers, A.; Oxford, E., y Raistrick, H. 1939. Biochem, J., 33, 1.488-95.
3. Iwata, K., y Yosioka, I. 1950. Antibiotics, 3, 192-97.
4. Kent, J., y Heatley, N. G. 1945. Nature, 156, 295-96.
5. Leathes, J. B., y Raper, H. S. 1925. The Fats. Longmans, Green and Co, Londres.
6. Pausacker, B. F.; Philpot, F. J.; Jennings, M. A., y Florey, H. W. *En*: Florey, H. W.; Chain, E.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A.; Sanders, A. G.; Abraham, E. P., y Florey, M. E. 1949. Antibiotics, I, 337. Oxford University Press, Londres.
7. Raistrick, H., y Rudman, P. 1956. Biochem. J., 63, 395.
8. Raistrick, H., y Smith, G. 1935. Biochem. J., 29, 606-11.
9. Raistrick, H., y Smith, G. 1936. Biochem. J., 30, 1.303-14 y 1.315-22.
10. Stodola, F. H.; Friedkin, M.; Moyer, J., y Coghill, R. D. 1945. J. Biol. Chem., 161, 739-42.
11. Ward, G. E., y Jamieson, G. S. 1934. J. Am. Chem. Soc., 56, 973.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA, INMUNOLOGIA Y SEROLOGIA

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACCION DE LA KANAMICINA SOBRE BACTERIAS PATOGENAS PARA LOS PECES

POR
D. A. CONROY

INTRODUCCION

El autor está realizando una serie de estudios de las enfermedades de los peces, con interés particular en aquellas enfermedades provocadas por *Pseudomonas*. Entre las investigaciones aún no terminadas, se incluye el estudio de la acción de un gran número de antibióticos comúnmente obtenibles, sobre este tipo de microorganismo. Estudios preliminares de esta naturaleza han demostrado que la kanamicina ejerce un marcado poder inhibitorio sobre las especies de *Aeromonas* patógenas para los peces; el estudio aquí relatado describe otras indagaciones de la acción de este antibiótico, y evalúa su acción sobre otras *Pseudomonas* patógenas para los peces. Como hasta el presente la información obtenida sobre el empleo de la kanamicina en la prevención y tratamiento de las enfermedades bacterianas de los peces es muy escasa, se espera que esta pequeña contribución pueda resultar interesante a otros investigadores del tema.

La gran mayoría de las enfermedades bacterianas de peces descritas hasta la fecha parecen ser provocadas por los miembros o las especies de dos géneros: *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Para demostrar claramente la amplia clasificación de los géneros y especies de peces de los cuales se aislaron tales bacterias, se codificaron los datos recogidos en el *cuadro 1*.

Cuadro 1. Breve lista de los géneros y especies de peces de los cuales han sido aisladas bacterias pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae (*No se incluye* Aeromonas salmonicida)

Bacteria	Pez	Autor de la cita
Aeromonas liquefaciens (A. hydrophila)	Carpa *(Cyprinus carpio)*	Snieszko (19)
	Lucio *(Esox lucius)*	Reed y Toner (11-12)
	Pez solar *(Lepomis sp.)*	Curran (7)
	Trucha arco iris *(Salmo iridaeus)*	Wagner y Perkins (22)
	Trucha *(Salvelinus fontinalis)*	Snieszko (18)
A. (Pseudomonas) punctata	Carpa *(Cyprinus carpio)*	Schaperclaus (14-15)
	Carpas vivíparas *(Poeciliidae)*	Van Duijn (21)
	Barba rosada *(Barba conchonius)*	Van Duijn (21)
	"Pez Paraíso" *(Macropodus opercularis)*	Van Duijn (21)
	Albur *(Leuciscus leuciscus)*	Van Duijn (21)
	Danio gigante *(Danio malabaricus)*	Innes (9)
	Danio *(Branchydanio rerio)*	Innes (9)
	Anguila *(Anguilla vulgaris)*	Van Duijn (21)
Ps. putida	Carpa *(Cyprinus carpio)*	Van Duijn (21)
	Tenca *(Tinca vulgaris)*	Van Duijn (21)
Ps. fluorescens	Peces laberintos *(Anabantidae)*	Van Duijn (20)
	Gourami "3-puntos" *(Trichogaster trichopterus)*	Van Duijn (21)
	"Pez Paraíso" *(Macropodus opercularis)*	Van Duijn (21)
	Todos gouramis del género *Colisa*	Van Duijn (21)
	Anguila *(Anguilla vulgaris)*	Van Duijn (21)
Ps. granulata	?	Brunner y Striegel (4)
Ps. Plehniae (considerada como cepa de *Ps. punctata* por Schäperclaus (1942)	Varios géneros de *Cyprinidae*	Van Duijn (21)
Ps. intiby	?	Brissou, Tysset y Vacher (3)
Pseudomonas sp. (identidad específica aún no determinada)	Salmón dorso azul *(Oncorhynchus nerka)*	Rucker (13)
	"Peces de aguas dulces"	Jacobs (10)
	Trucha arco iris *(Salmo iridaeus)*	Seaman (17)
	Carpa dorada *(Carassius auratus)*	Conroy (5)

De ellas se deduce que tanto los peces de aguas dulces tropicales como los de agua fría pueden ser afectados. Además, puede ser de interés mencionar que han sido descritas en la literatura científica más enfermedades de peces marinos de importancia económica, causadas por *Pseudomonas* (8, 24). A esta altura no se ha hecho ningún intento incluyendo las bacterias patógenas de peces marinos en estos estudios, y se espera que futuras investigaciones incluirán miembros de ese grupo.

De los microorganismos arriba mencionados, se seleccionaron cinco como representantes de las especies típicas del grupo. Las cepas fueron enviadas amablemente por el Dr. S. T. Cowan, Director de la Colección Nacional de Cultivos Tipo, de Londres y por el Director de la Colección Americana de Cultivos Tipo, de Washington. El origen de las cinco cepas se dan en el *cuadro 2*. Todas las cepas fueron aisladas de peces enfermos, y es lamentable que no pudiera obtenerse una cepa de *Pseudomonas* (*Aeromonas*) *punctata* para este trabajo. Sin embargo, y teniendo en cuenta que para Snieszko (19) la *Aeromonas hydrophila* y la *Pseudomonas* (*Aeromonas*) *punctata* son cepas de *A. liquefaciens*, uno puede guiarse por los resultados obtenidos en el caso de la *A. liquefaciens*.

Cuadro 2. Origen de las cepas utilizadas en el trabajo

Microorganismo	Cepa utilizada
A. liquefaciens	NTCC 9.744
A. hydrophila	NTCC 7.812
Ps. putida	ATCC 4.359
Ps. fluorescens	ATCC 11.520
Pseudomonas sp.	Gf. Berk. 1

Parece que las cinco cepas usadas son representantes típicos de una amplia selección de organismos de tal grupo de patógenos, y además, los resultados obtenidos de los mismos dan una indicación general del tipo de reacción *in vitro* que puede ocurrir con la kanamicina.

METODOS EXPERIMENTALES

Los organismos de prueba, o las bacterias en estudio, fueron mantenidos en agar inclinado, sembradas cada siete días luego de haberlas pasado por agua peptonada. Para estudiar la acción del antibiótico se empleó un método de dilución en tubos con caldo, cuya composición se describe más adelante. El medio básico fue preparado de acuerdo con la siguiente fórmula:

Extracto de carne "Anglo"	10,0 g
Peptona bacteriológica "Ocefa"	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Agua destilada c. s. p.	1.000,0 ml

El todo fue calentado suavemente para disolver los constituyentes de la fórmula, y posteriormente filtrado para eliminar restos insolubles remanentes. El pH se ajustó a 7,2 para lograr un pH neutro luego de la esterilización (se ha calculado que el valor del pH de un medio baja 0,2 unidades durante la esterilización). Realizado el ajuste del pH, se dispensó el medio en tubos "pyrex" (8,0 ml/tubo) y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante veinte minutos. Para comprobar la esterilidad se incubaron a 37 °C durante una noche.

Se preparó una solución de sulfato de kanamicina, disolviendo 0,5 g de dicha droga en 2,0 ml de agua destilada estéril. De allí se preparó una dilución 1 : 500, y de esta solución diluciones crecientes hasta llegar a un valor de 1 : 1.024.000; tomándose todas las precauciones asépticas del caso.

En una serie de tubos conteniendo el medio básico, se agregaron 2,0 ml de cada dilución, dando así una dilución 1 : 5 de la dilución del antibiótico en el medio básico.

Los cultivos testigos se desarrollaron en agua peptonada, e incubados durante dieciocho horas. Las temperaturas óptimas fueron de 37 °C para las dos *Aeromonas* y 25 °C para las tres *Pseudomonas*. Se incubaron los tubos y los resultados se leyeron a las veinticuatro, ciento veinte y doscientas cuarenta horas. En cada caso se compararon con un testigo positivo y otro negativo, puestos en iguales condiciones de temperatura, etc.

En la interpretación de los resultados, los tubos se clasificaron como positivos o negativos, de acuerdo con la turbiedad indicadora de desarrollo o ausencia de él. Como se deseaba obtener lecturas de los niveles bacteriostáticos y bactericidas del antibiótico para cada microorganismo, los cultivos se hicieron de aquellos tubos que no mostraban desarrollo luego de doscientas cuarenta horas; el procedimiento seguido fue sembrar un asa del medio sobre la superficie de una placa de agar, y observar la presencia de colonias luego de incubación.

RESULTADOS

Los mismos, figuran en los *cuadros 3-4.*

Cuadro 3. Kanamicina. Efectos in vitro. *Tiempo de incubación: veinticuatro horas a la temperatura óptima. pH 7,0*

Tubo	Gramos de antibiótico/mililitros de agua destilada	Concentración final (γ/ml)	NTCC 9.744	NTCC 7.812	ATCC 4.359	ATCC 11.520	Gf. Berk. 1
1	1:500	400,0	—	—	—	—	—
2	1:1.000	200,0	—	—	—	—	—
3	1:2.000	100,0	—	—	—	—	—
4	1:4.000	50,0	—	—	—	—	—
5	1:8.000	25,0	—	—	—	—	—
6	1:16.000	12,5	—	—	—	—	—
7	1:32.000	6,3	—	—	—	—	—
8	1:64.000	3,1	—	—	—	—	—
9	1:128.000	1,6	—	+	—	+	+
10	1:256.000	0,8	+	+	+	+	+
11	1:512.000	0,4	+	+	+	+	+
12	1:1.024.000	0,2	+	+	+	+	+

+= desarrollo.

Cuadro 4. Kanamicina. Efectos in vitro. *Tiempo de incubación: doscientas cuarenta horas a la temperatura óptima. pH 7,0*

Tubo	Gramos de antibiótico/mililitros de agua destilada	Concentración final (γ/ml)	NTCC 9.744	NTCC 7.812	ATCC 4.359	ATCC 11.520	Gf. Berk. 1
1	1:500	400,0	—	—	—	—	—
2	1:1.000	200,0	—	—	—	—	—
3	1:2.000	100,0	—	—	—	—	—
4	1:4.000	50,0	—	—	—	—	—
5	1:8.000	25,0	—	—	—	—	—
6	1:16.000	12,5	—	—	—	—	—
7	1:32.000	6,3	—	—	—	—	+
8	1:64.000	3,1	—	+	+	—	+
9	1:128.000	1,6	+	+	+	+	+
10	1:256.000	0,8	+	+	+	+	+
11	1:512.000	0,4	+	+	+	+	+
12	1:1.024.000	0,2	+	+	+	+	+

Cuadro 5. Niveles bacteriostáticos de la kanamicina, mg/l

NTCC 9.744	NTCC 7.812	ATCC 4.359	ATCC 11.520	Gf. Berk. 1
1,6	3,1	1,6	3,1	3,1

Cuadro 6. Niveles bactericidas de la kanamicina, mg/l

NTCC 9.744	NTCC 7.812	ATCC 4.359	ATCC 11.520	Gf. Berk. 1
3,1	6,3	6,3	3,1	12,5

De los resultados expuestos es posible calcular los niveles bacteriostáticos y bactericidas mínimos. Dichos valores están expresados en mg/l, figurando los mismos en los *cuadros 5-6.*

La ausencia de desarrollo en los tubos con caldo-agar y que fueron incubados durante doscientas cuarenta horas, se consideran como negativos.

DISCUSION

El método de diluciones descrito en este trabajo demuestra ser adecuado al tipo de tarea que se ha realizado, y la concentración del medio básico, suficiente como para permitir la adición de las soluciones de antibióticos. Los resultados obtenidos confirman el punto de vista ya expresado por Conroy (6) de que la kanamicina sería prometedoramente efectiva *in vitro* contra las bacterias patógenas de los peces. Se ha demostrado que esta sustancia es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de las cepas de unas cinco especies de tales microorganismos. Empero es necesario puntualizar que tal inhibición puede no ocurrir *in vitro,* o igualar *in vitro* contra otras cepas de los organismos probados, ya que es conocido el hecho de la gran variación de la susceptibilidad de las *Pseudomonas* a los antibióticos, y la referencia especial a *Ps. aeruginosa* es un ejemplo de ello. Snieszko (18) ha demostrado la acción de la aureomicina *in vitro,* pero ha demostrado además que no ocurre *in vivo* en el caso de las infecciones mixtas causadas por *Aeromonas liquefaciens* y *Haemophilus piscium.*

Con referencia a los valores de pH en los cuales la kanamicina es efectiva, se ha dicho (1) que el antibiótico es igualmente efectivo entre pH 2,0 y 11,0. El pH del agua de acuarios en condiciones normales en las cuales se mantienen los peces, nunca llega a esos extremos, y por esta razón en este trabajo se escogió el calor de pH neutro. El autor ha mostrado (no publicado) que un efecto similar puede obtenerse contra la *A. liquefaciens* y la *A. hydrophila* a pH 6,0 y 8,0, y se espera aumentar este trabajo en el futuro o más adelante.

De acuerdo con las informaciones obtenidas, la kanamicina es excretada por vía renal. Esto podría representar una gran ventaja para su aplicación en el tratamiento de las enfemedades de peces, aunque la toxicidad de la kanamicina no ha sido todavía determinada para las especies

de peces. El antibiótico puede ser administrado por vía intraperitoneal, como en el caso de la estreptomicina y la cloromicetina (16), o bien por vía bucal, como la aureomicina (2, 23).

Los resultados *in vitro* expresados tienden a afianzar posteriores estudios *in vivo* bajo condiciones experimentales controladas de laboratorio, y se espera iniciar las mismas en un futuro inmediato.

AGRADECIMIENTOS

El autor quiere expresar su plena gratitud al Prof. Dr. Luis C. Verna, de esta Cátedra, por el interés demostrado en el presente estudio; como asimismo a la Dra. C. Rosario Ordóñez, por las sugestiones útiles presentadas.

Igualmente, agradece al Dr. Leo H. Dickison, Director de "Bristol Laboratories Inc.", Síracusa, Nueva York, la provisión de amplios detalles técnicos sobre la kanamicina y su interés por este trabajo.

RESUMEN

El estudio llevado a cabo acerca de la acción de la kanamicina sobre *Aeromonas punctata* demuestra que el antibiótico posee un excelente efecto bacteriostático y bactericida *in vitro*.

SUMMARY

A study of the action of kanamycin on *Aeromonas punctata* showed that the antibiotic possesses an excellent bacteriostatic and bactericidal effect *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

1. Anónimo. 1958. Kanamycin stops *Staph.* Chem. Eng. News, 36 (30), 24.
2. Axelrod, H. R. 1952. Further observations on the use of aureomycin. Water Life, 7, 242.
3. Brissou, J.; Tysset, C., y Vacher, B. 1959. Etude de *Pseudomonas* isolés de poissons d'eau douce. Bull. Assoc. Diplômés Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 74, 39-42.

4. BRUNNER, G., y STRIEGEL, R. 1953. *Pseudomonas granulata* (nov. spec.). Münch-Beitr. Abwasser, Fischerei und Flussbiologie, 1, 109-19.
5. CONROY, D. A. 1961. Study of the bacterium associated with an outbreak of oedema amongst goldfish. Microbiol. Españ., 14., 73-105.
6. CONROY, D. A. 1961. Sundry studies on the bacterial diseases of fish. II. Laboratory studies on the use of antibiotics in the control and treatment of bacterial fish diseases (sin publicar).
7. CURRAN, H. W. 1947. A biological survey of Lake Opinicon. Progress Report, Queen's University Biological Station, Ontario, 47-48.
8. HODGKISS, W., y SHEWAN, J. M. 1950. *Pseudomonas* infection in a plaice. J. Pathol. Bacteriol, 62, 655-57.
9. INNES, W. 1957. Exotic aquarium fishes. Innes Publishing Co., Philadelphia. 8.ª ed.
10. JACOBS, D. L. 1955. An introduction to diseases of aquarium fishes. Southeastern Vet., 6, 16-21.
11. REED, G. B., y TONER, G. C. 1941. Red sore disease of pike. Can. J. Research D, 19, 139-43.
12. REED, G. B., y TONER, G. C. 1942. *Proteus hydrophilus* infections of pike, trout, and frogs. Can. J. Research, D, 20, 161-66.
13. RUCKER, R. R. 1949. A streptomycete pathogenic to fish. J. Bacteriol, 58, 659-64.
14. SCHAPERCLAUS, W. W. 1930. *Pseudomonas punctata* als Krankheit serreger bei Fischen. Z. Fischerei, 28, 289-370.
15. SCHAPERCLAUS, W. W. 1942. Beitrag zur Kenntnis der Punctata-Formen und Typen und zur Theorie der Entstehung der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens. Zentr. Bakteriol., Parasitenk. II., 105-49.
16. SCHAPERCLAUS, W. W. 1956. Bekämphfung der infektiösen Bauchwassersucht der Karpfens durch Antibiotika. Z. Fischerei, 5, 3-59.
17. SEAMAN, W. R. 1951. Notes on a bacterial disease of rainbow trout in a Colorado hatchery. Progressive Fish Culturist, 13, 139-41.
18. SNIESZKO, S. F. 1953. Therapy of bacterial fish diseases Trans. Am. Fisheries Soc., 83, 313-30.
19. SNIESZKO, S. F. 1958. Freshwater fish diseases caused by bacteria belonging to the genera *Aeromonas* and *Pseudomonas*. U. S., Fish Wildlife Serv., Fishery Leaflet, 459.
20. VAN DUIJN, D. 1938. A contagious disease of Labyrinth fishes caused by *Pseudomonas fluorescens*. Microscope, 2, 122-23.
21. VAN DUIJN, D. 1956. Diseases of fishes. Water Life Ltd., Londres.
22. WAGNER, E. D., y PERKINS, C. L. 1952. *Pseudomonas hydrophila*, the cause of "red mouth" disease in rainbow trout. Progressive Fish Culturist, 14, 127-28.
23. WOLD, A. 1952. Effects and use of aureomycin. Aquarium., 23, 232-35
24. ZoBELL, C. E. 1946. Marine microbiology. Chronica Botanica Co., Mass.

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

ORGANIC NITRO COMPOUNDS REDUCED BY *NOCARDIA* V.

BY
J. R. VILLANUEVA

It has been shown that various organic nitro compounds can be reduced by microorganisms (and enzyme systems isolated therefrom) to the corresponding hydroxylamino or amino-derivatives (Zucker and Nason (9); Villanueva (6). However, the rate and degree of reduction of nitro compounds varies very much from organism to organism.

It was felt desirable to perform a preliminary experiment in which the rate of reduction of a series of nitro compounds was followed so that, from the results obtained, it might be possible to select a suitable compound which could be used as a standard for further investigations. Further information which might be obtained from such a study would be the possible relationship, if any, between the structure of the nitro compounds and their resistance to reduction.

MATERIAL AND METHODS

Organism

The organism used throughout the work described in this paper is a newly isolated strain of *Nocardia* (Villanueva (8) and has been named *Nocardia* V.

Growth media

The media used for growing the organism utilised in this work have been already described (Villanueva, (8).

Growth Conditions

The organism was grown on "Glutamic acid medium" using 1l flask, containing 500 ml of medium and shaken in a water bath at 30 °C. The cells were harvested on the centrifuge and washed with 0.85 percent saline solution. The sedimented organism were then resuspended in 0.067 M phosphate buffer pH 7.6.

Determination of the growth curve and dry weight

The methods used have been described Villanueva (8).

Estimation of nitro-reductase activity

The activity of the nitro-reductase was assayed in terms of the reduction of the nitro compound by the measurement of the arylamine formed.

The complete reaction mixture contained: 1.8×10^{-4} M p-dinitrobenzene, 5×10^{-4} M *l*-cysteine, 1.08×10^{-3} M DPNH, enzyme preparation, and 0.067 M phosphate buffer pH 7.6 up to 2.5 ml. The reaction was usually started by the adition of DPNH after equilibration at 37 °C. At the end of the incubation period (1 hr), 0,05 ml of 40 per cent TCA (w/v) was added to each tube, the precipitate removed by centrifugation and an aliquot of the supernatant analysed for arylamine by the standard procedure. Conditions were chosen in which the rate of formation of arylamine was proportional to the amount of enzyme present.

Estimation of arylamine formed

The modified method of Bratton and Marshall (1) as described by Glazco, Wolf and Dill (3) was used for all arylamine estimations. Substantially the procedure adopted was as follows: an aliquot of the supernatant from the standard nitro-reductase assay system, after TCA precipitatión, was made up to 2 ml with water and the following reagents added: 0.5 ml N-HCl and 0.25 ml aqueous $NaNO_2$ (0.1 per cent w/v). After 5 min 0.25 ml ammonium sulphamate (0.5 per cent w/v) was added and throuhgly mixed. 3 min later 0.25 ml N-*l*-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride (0.1 per cent w/v) was added. After 30 min at

room temperature the optical density of the solution was estimated at 540 mμ, using the Beckman Model DU spectrophotometer, and converted to of arylamine/ml by means of a calibration curve.

Protein determination.

Protein was determined routinely by the colorimetric method of Lowry (Lowry et. al. (4), with the Folin Ciocalteau reagent and with crystalline serum albumin as the standard.

RESULTS

Reduction by washed cell suspensions.

Nitro compounds were added at a final concentration of 30 γ/ml to a system consisting of *l*-cysteine (1×10^{-4}M), *l*-malic acid (1×10^{-2}M), in 0.067 M phosphate buffer pH 7.6. The total volume was 2.5 ml. A washed suspension of early stationary phase organisms grown on "Glutamic acid medium" was added at a final concentration of 5 mg/ml. After 1 hr incubation at 37 °C, 0.1 ml of 40 per cent TCA was added and the mixture centrifuged. Aliquots from the supernatant were tested for arylamine by the standard procedure described above.

Table I shows that *Nocardia* V. celles are able to reduce a variety of nitro compounds. The extent of reduction was determined using, as standard, authentic samples of the corresponding arylamines when these are available. It can be seen that only a few of the large number of nitro compounds tested were reduced.

The following nitro compounds were not reduced when tested under the above conditions: m- and p-nitrophenol, p-nitrotoluene, p-nitrosalycilic acid, p-nitroxylene, 2:4-dinitrotoluene, chloramphenicol. 2:4-Dinitrophenol and picric acid showed extensive reduction when incubated under special conditions (Villanueva (7).

The aliphatic nitro compounds 2-nitro-2-ethyl-1:3-propanediol, 2-nitro-2-methyl-1-propanol and nitroethane, when tested by the above procedure, do not give rise to reduction products with liberation of inorganic nitrite.

Inorganic nitrogen compounds are not able to serve as substrates for the purified nitro-reductase system.

Table I. Reduction of various aromatic nitro compounds by a nitro-reductase system of Nocardia *V.*

Substrate	Relative amounts of arylamine formed after 1 hr at 37 °C when incubating with (*)	
	Whole organism	Cell-free extract
o-Nitrobenzoic acid	43	—
m-Nitrobenzoic acid	38	—
p-Nitrobenzoic acid	79	—
2:5-Dinitrobenzoic acid	59	41
3:5-Dinitrobenzoic acid	61	43
2:4:6-Trinitrobenzoic acid	57	38
o-Dinitrobenzene	72	75
m-Dinitrobenzene	58	56
p-Dinitrobencene	100	100
1:3:5-Trinitrobenzene	69	73
o-Nitrophenol	12	—

(*) Referred to p-dinitrobenzene reduction as 100.

Reduction by cell-free extracts

Nitro compounds were added at the same concentration as above to the standard assay system described above with the p-dinitrobenzene omitted, and 0,5 ml of a crude nitro-reductase preparation (containing 1,8 mg protein/ml) added per tube. After 1 hr incubation at 37 °C the incubation mixture was treated with TCA and aliquot tested for arylamine by the standard assay system. In some cases, when nitro compounds were not reduced, the experiment was repeated under the same conditions but with longer incubation for 6-8 hr. Essentially no difference was found in the results.

Some attempts were made to identify some of the metabolic products of nitro compounds reduction and a summary of the results obtained will be described elsewhere.

DISCUSSION

From the broad range of compounds reduced it is evident that the nitro-reductase enzyme of *Nocardia* V. shows no marked structural requirements for its substrate. It was assumed a lack of specificity of the nitro-reductase system. Fouts and Brodie (2) have discussed wheter the nitro-reductase activity in various organisms can be attributed to a single enzyme or to a mixture. Nason (5) also reported doubt whether organic nitro-reductase can be regarded as a specific enzyme system. From the results quoted in this section it can be only be said that the whole problem is complex and requires further investigation.

Inorganic nitrate was not reduced by the purified nitro-reductase enzyme from *Nocardia* V. (Villanueva (7). From this it has been assumed that the reduction of organic nitro compounds is due to a different enzyme system.

SUMMARY

An organism capable of reducing various aromatic nitro compounds to their amino-derivatives has been isolated.

The *Nocardia* nitro-reductase will effect reduction of a number of aromatic nitro compounds; of these p-dinitrobenzene is the most effective electron acceptor and has been selected as substrate.

The possible significance of the broad range of compounds reduced by the nitro-reductase system has been discussed. The *Nocardia* enzyme shows a marked lack of specificity.

From the results described it has been assumed that the inorganic nitrato-reductase and the organic nitro-reductase are two different enzyme systems.

RESUMEN

Se ha aislado un nuevo organismo capaz de reducir varios nitrocompuestos a sus aminoderivados.

La enzima nitrorreductasa procedente de *Nocardia* V. reduce un nú-

mero de nitroderivados: el p-dinitrobenceno es el más efectivo aceptor de electrones, por lo que se le ha seleccionado como substrato.

Se discute el significado de la amplia variedad de nitrocompuestos reducidos. La enzima nitrorreductasa de *Nocardia* V. muestra una marcada falta de especificidad hacia sus substratos.

Los resultados descritos sugieren que la nitratorreductasa inorgánica y la nitrorreductasa orgánica son dos sistemas enzimáticos diferentes.

BIBLIOGRAFIA

1. BRATTON, A. C., and MARSHALL, E. K. 1939. J. Biol. Chem., 128, 537.
2. FOUTS, J. R., and BRODIE, B. P. 1957. J. Pharmacol. Exp. Therap., 119, 197.
3. GLAZCO A. J.; WOLF, L. M., and DILL, W. A. 1949 J. Pharmacol. Exp. Therap., 96, 445.
4. LOWRY. O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., and RANDALL, R. J. 1951. J. Biol. Chem., 193, 265.
5. NASON. A. 1956. *In* MCELROY, W. D., and GLASS, B., Eds. Inorganic Nitrogen Metabolism. Baltimore.
6. VILLANUEVA, J. R. 1959. Biochem. J., 72, 36P.
7. VILLANUEVA, J. R. 1959. Ph. D. Thesis. Cambridge University.
8. VILLANUEVA, J. R. 1960. Microbiol. Españ., 13, 169.
9. ZUCKER. M., and NASON, A. 1955. *In* Methods in Enzymology. II. Academic Press. N. Y.

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

ESTUDIOS SOBRE GERMINACION DE ESPORAS DE *CEPHALOTHECIUM ROSEUM*

POR
ISABEL GARCIA - ACHA

En un gran número de esporas de hongos, la germinación no se produce, a menos que sean aportados al medio determinados activadores externos (1).

Estas sustancias son normalmente originadas en la naturaleza por tejidos activamente metabolizantes, y aunque son conocidas muchas de estas relaciones, sobre todo con hongos parásitos, la composición en sí de tales sustancias permanece casi por completo ignorada.

Numerosos trabajos han sido enfocados hacia la solución de estos problemas, y los resultados son interesantes. Aunque no precisada la composición de aquellas sustancias estimulantes, ha sido posible realizar su sustitución por otras que ejercían la misma función en alto grado. Se ha llegado a poder hablar con cierta propiedad de sustancias estimulantes e inhibidoras de la germinación, de composición conocida. Muchas de ellas difieren de las sustancias naturales por actuar más lentamente y a concentración mucho más elevada. No obstante, en relación con el posible estado biológico de los compuestos naturales, las características de estos sustitutos son de algún significado. Tales sustancias específicas podrían ser consideradas más eficientemente como rodeadas de un señalado carácter estimulante, en lugar de simples nutrientes. Una vez iniciada la germinación, su papel podría ser muy diferente.

Los resultados obtenidos en los estudios realizados con *Cephalothecium roseum* sobre sus conidios en germinación son conclusión de una serie de ensayos preliminares.

ESTUDIO MORFOLOGICO DE LOS CONIDIOS DE *C. ROSEUM* EN GERMINACION

La formación de los típicos conidios se origina en el extremo de los conidióforos erectos, poco o no septados y raramente hinchados en el extremo. Pueden aparecer aislados o bien ir apareciendo sucesivamente, quedando conectados con el extremo del conidióforo, formando una cabezuela muy típica.

El tamaño de los conidios varía entre 12-18 μ de longitud por 8-10 μ de ancho. En muy elevada proporción, tales esporas están constituidas por dos células de diferente forma y tamaño: una cónica y la otra tendiendo a ser esférica, si bien alguna vez, al microscopio, es posible observar alguna unicelular y de más reducido tamaño, lo que hace pensar sean formas en evolución, sin alcanzar la madurez, ya que en ningún caso las hemos podido apreciar en germinación. Observándolas aisladamente, el débil color rosado de los conidios no se hace perceptible al microscopio, si bien en conjunto su aparición en los cultivos, en gran cantidad, hace que éstos tomen un tinte característico, que ha contribuido a la denominación de *C. roseum.*

Después de la inoculación en el medio, sucesivas muestras observadas al microscopio, de tiempo en tiempo, van mostrando las características que se ven en la *figura 1.*

Al cabo de unas dos horas en las condiciones más favorables para la germinación, la espora se va hinchando, como consecuencia de la intensa absorción en el medio, y las dobles membranas, fácilmente observables al principio, van perdiendo su definición hasta el punto de que posiblemente por compresión interna, momentos antes de iniciarse la germinación, sólo es posible apreciar una, en numerosos casos.

El protoplasma de las dos células, al comienzo, denso y opalescente va adquiriendo mayor refringencia y transparencia máxima en el momento de iniciarse la germinación. Esta, la mayoría de las veces, se inicia por la célula cónica, esto es, se inicia por la célula que ha estado unida al conidióforo, hasta desprenderse. No obstante, no faltan casos en que esa germinación se efectúa al mismo tiempo en la de forma esférica, si bien lo más frecuente es que ésta, de germinar, lo haga después de haberlo

realizado la anterior e incluso haber alcanzado alguna extensión su tubo germinativo.

Este tubo germinativo, en un principio único, prolifera rápidamente y se ramifica en dos, verificándose esto cuando aquél ha alcanzado apenas más de 2-3 μ de longitud. Una vez iniciada la germinación, la proli-

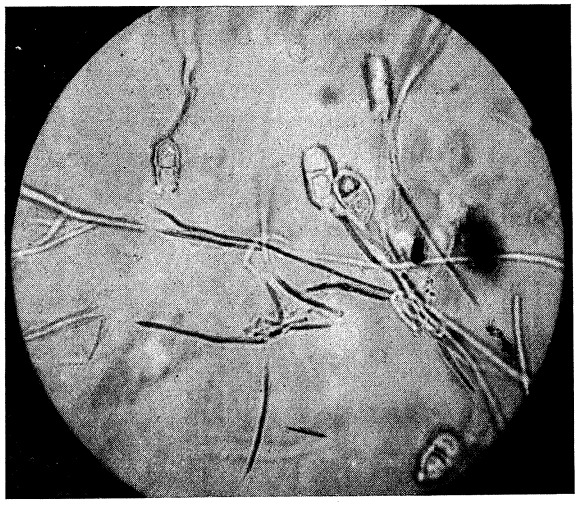


Figura 1. Conidios de C. roseum *en germinación*

feración del micelio es rápida, tendiendo a formar una complicada red, iniciándose después de algún tiempo, días en general, aun con los medios más favorables, la formación de conidióforos en los extremos de algunas hifas.

MATERIAL Y METODOS

Se ha utilizado uniformemente a lo largo de todos nuestros estudios de germinación una modificación del método de Ryan (4). Las suspensiones de conidios se preparan en agua destilada estéril, separando las esporas del micelio por filtración a través de un embudo de placa filtrante Büchner. Luego se lava la suspensión centrifugando por dos veces, y después de un recuento en cámara de Thomas se diluye la suspensión

a la concentración aproximada de 2×10^6 conidios/cm^3, siempre que otra clase de concentración no sea necesaria.

Con esa suspensión de concentración conocida, se efectúan siempre todos los ensayos, adicionando a 3 cm^3 de medio, 0,5 cm^3 de inóculo. Desde este momento y después de colocados los tubos a 28 °C, generalmente, en reposo o en aireación, se comienza a contar para la germinación. De tiempo en tiempo, normalmente cada hora, después de agitar, se sacan por medio de una pipeta muestras de cada tubo en estudio y se depositan sobre un portaobjetos, para ser observadas al microscopio. Cuando era necesario, la posible germinación se paraba por la adición a los tubos de unas gotas de solución de formalina al 10 por ciento. En general, más de 300 conidios eran contados en total, sacando luego el porcentaje de conidios germinados, dato que teníamos en cuenta para la construcción de las gráficas.

Aunque, sin duda, el carácter de estas curvas puede ser afectado por no pocos factores, convenïamos con Ryan (4) en que cuando eran regulados, pod'an ser obtenidos resultados reproducibles.

Antes de proceder al estudio de la influencia de algunos factores químicos, compuestos normalmente empleados en los medios, se ha ensayado, con el fin de precisar las condiciones de estudio, una serie de los llamados factores físicos, como son: la concentración de esporas, el tiempo de incubación; la temperatura, con apreciación incluso de la letal; la influencia de la edad en las esporas, etc.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como consecuencia de los ensayos que a continuación se exponen, los siguientes datos, considerados como más apropiados u óptimos, eran precisados para los sucesivos estudios del efecto de las sustancias químicas sobre la germinación de *C. roseum*.

Tiempo: siete horas, a contar desde la inoculación.
Concentración: 2×10^6 conidios/cm^3.
Temperatura: $28° \pm 1$ °C.
Edad de las esporas: treinta días (formadas en el desarrollo sobre el medio básico indicado) (2).
Condiciones de cultivo más favorables: aireación.

La composición del medio completo que utilizamos para la germinación es: PO_4H_2K, 0,5 g; ClK, 0,5 g; SO_4Mg, 0,5 g; NO_3K, 3 g; dextrosa, 15 g; ácido glutámico, 0,1 g, y agua destilada, 1.000 cm^3.

Influencia del tiempo de incubación

En este estudio realizábamos dos ensayos paralelos, poniendo una serie de tubos en reposo y otra en aireación. Los resultados aparecen expuestos en la *figura 2*. Aunque a las tres horas después de la inoculación algunos conidios germinados ya empiezan a ser perceptibles, sólo a las cuatro horas comienzan a ser estos resultados significativos. Una diferen-

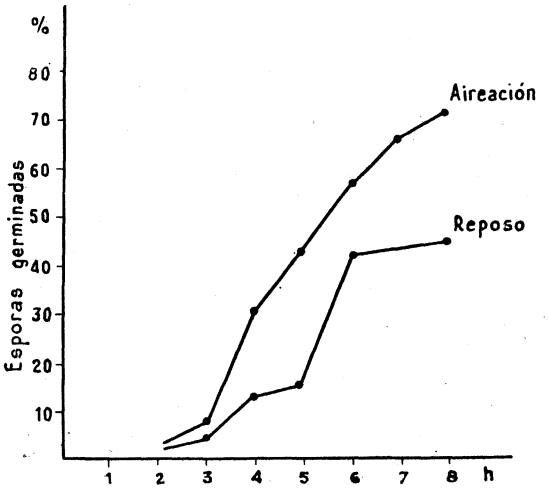


Figura 2. Influencia del tiempo de incubación

cia señalada se establece entre los dos cultivos, apareciendo debido a las exigencias del oxígeno de las esporas.

La germinación en condiciones de aireación, parece seguir un sentido lineal semejante a la fase de crecimiento logarítmico de muchos microorganismos. Al cabo de siete horas se rebasaba el 66 por ciento de germinación, por lo que le considerábamos ya aceptable. La diferencia

con la gráfica escalonada e irregular, sin aireación, es notable. El 45 por ciento alcanzado a las ocho horas, parece estacionarse, debido quizá al agotamiento del oxígeno disuelto en el medio y a la dificultad para alcanzar el de la superficie, ya que casi la totalidad de las esporas se halla formando un sedimento sobre los tubos.

Influencia de la concentración de esporas

El número total de conidios en el medio era, como podíamos apreciar, un factor de extraordinaria importancia, contra lo que a primera vista pudiera parecer. En la *figura 3* aparece expresado claramente. Partíamos

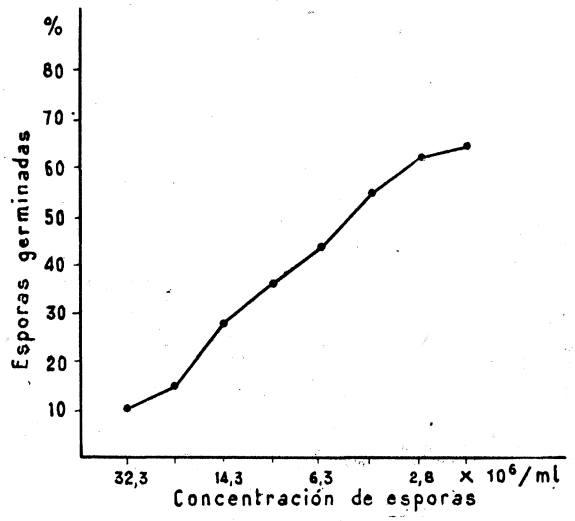


Figura 3. Influencia de la concentración de esporas (en condiciones de reposo)

de una suspensión con 32,3 × 10^6 conidios/cm^3 y la razón de dilución para las siguientes concentraciones era siempre de 2/3 de la anterior. Las lecturas, realizadas después de siete horas de incubación.

La germinación era más rápida y en un porcentaje más elevado en las suspensiones más diluidas. A medida que el tiempo transcurría, podemos señalar que la germinación proseguía en las más concentradas, pero alcanzando sólo un 36 por ciento con la concentración de 32,3 × 10^6 co-

nidios/cm³ después de veinticuatro horas, cuando en los que contenían alrededor de 2×10^6 giraba en torno del 96 por ciento. Esta última concentración era la escogida para los sucesivos ensayos, al considerarla como aceptable en cuanto al porcentaje de germinación y al grado de dilución

Influencia de la temperatura

De las temperaturas ensayadas, la de 28 °C (*figura 4*), parecía ofrecer los mejores resultados, como se desprende de la gráfica. El escalonamiento e irregularidad de las curvas se mantiene, como en otros casos ya explicados. Esta temperatura óptima parece coincidir con la obtenida también para los cultivos del hongo en medio sólido.

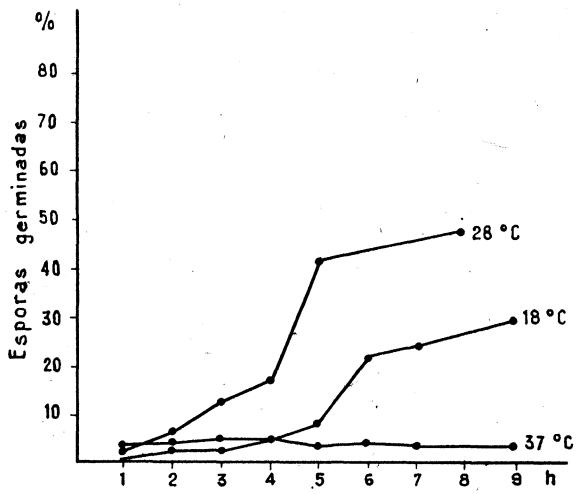


Figura 4. Influencia de la temperatura

Los resultados a 37 °C son por completo carentes de significado, explicando únicamente su acción adversa.

Temperatura letal

Después de conocidos los resultados anteriores, de temperatura, estableciamos otro experimento con el fin de obtener la que podíamos llamar letal para los conidios.

Una serie de tubos con las suspensiones, se colocaban en baños de agua a diferentes temperaturas, durante diez minutos. Transcurrido este tiempo, eran sacados y dispuestos para la observación, como en los ensayos anteriores y en aireación. Después de siete horas, se realizaban las lecturas.

Quizá el dato más significativo es el obtenido con los tubos sometidos a 40 °C. La proporción de conidios germinados es superior a la que se obtenía en el estudio precedente con los tubos abandonados a 37 °C. La diferencia puede estribar, en primer lugar, en la influencia de la aireación, que ya habíamos apuntado antes; pero posiblemente también en algún efecto estimulante de la germinación, como sucede en muchos casos con otros hongos y bacterias.

Alrededor de los 50 °C, parecía hallarse este efecto letal con exposición de diez minutos. En un ensayo con temperaturas ligeramente superiores, el máximo de germinación estaba en 52 °C con el 1 por ciento; a 54 °C ya no germinaba ninguna espora.

Influencia de la edad de las esporas

Otro factor que influye en la razón de la germinación, de forma evidente, es la edad de los cultivos a partir de los cuales se prepara la suspensión de conidios. Dentro de límites bastante precisos parecía poder apreciarse un óptimo. Una máxima razón de germinación se obtenía con esporas de cultivos jóvenes, recién comenzados a esporular, de unos doce días.

Con esporas de veinte días, el número y la razón de germinación es más elevado, alcanzando un máximo al estudiarse en conidios de treinta días.

En cultivos de más tiempo, con cincuenta y noventa días, no sólo el número total de germinación era notablemente afectado, sino también la razón (*figura 5*). Despues de veinticuatro horas, la germinación con un 11 por ciento, demostraba una elevada proporción de esporas incapaces de germinación y la razón, en las que lo hacían, era muy baja.

Tales alteraciones de la germinación parecían estribar en causas internas de los conidios, por ejemplo, dificultad para la absorción, o bien

cierta dificultad para disolver o romper las capas protectoras externas, ya que una vez que los tubos germinativos de los que lo hacían eran lanzados fuera, la proliferación era abundante y sin diferencia alguna con la de las esporas más jóvenes.

Una vez establecidas las condiciones más apropiadas para esta clase de estudios, de germinación, con las conclusiones ya señaladas, era ini-

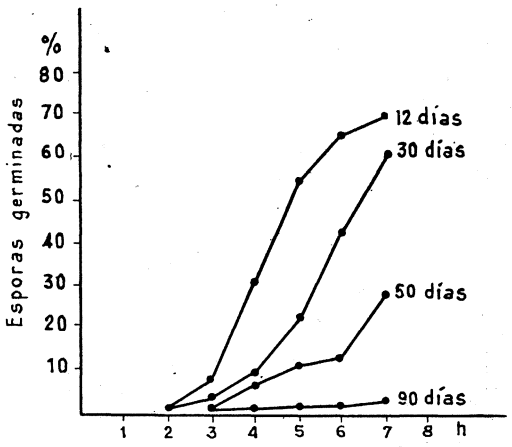


Figura 5. Influencia de la edad de las esporas

ciada una serie de nuevos estudios sobre el efecto de los componentes del medio.

Influencia de la concentración de PO_4H_2K

La adición de fosfato en crecientes concentraciones al medio básico tiene un marcado efecto inhibidor sobre la germinación de las esporas. Como muestra la *figura 6,* la adición de 0,5 — 1 g/l de medio hace descender la gráfica construida después de lecturas realizadas a las siete horas. Esta sal sólo parece ser necesaria para los procesos de glicólisis o fosforilación, en bajas concentraciones. Aunque no contamos con datos suficientes para dar base a esta afirmación, suponemos que este efec-

to, aparecido aquí, es general con otros hongos, por ejemplo, algunos *Aspergillus* (5).

Influencia de la concentración de NO_3K

La adición de esta sal estimula la razón de germinación hasta una concentración de 6 g/l de medio. Más elevadas cantidades originan una

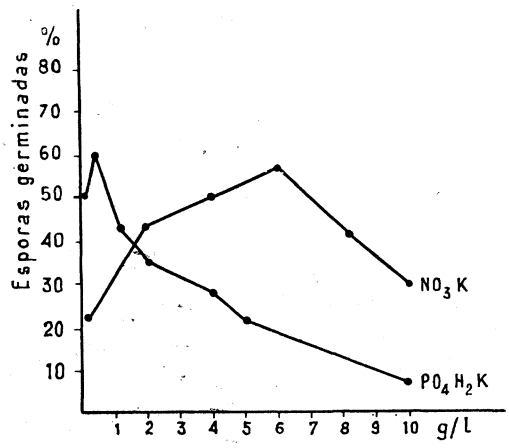


Figura 6. Influencia de las concentraciones de PO_4H_2K y NO_3K

disminución. A concentraciones de 10 g/l, el óptimo de germinación alcanzado con los 6 g se reduce en más de un 60 por ciento (*figura 6*).

Influencia de la concentración de glucosa

El aumento de la concentración de un azúcar como la glucosa, capaz de aportar energía para los procesos de pregerminación y germinación en sí, parece ser un factor estimulante de este fenómeno. En condiciones de reposo, sin abundante cantidad de oxígeno para la activa oxidación del azúcar, el aumento de concentración de éste no parece ejercer efecto significativo alguno, en contraste con lo que sucede en intensa aerobiosis

de la suspensión de esporas. La *figura 7* muestra con suficiente evidencia estas diferencias.

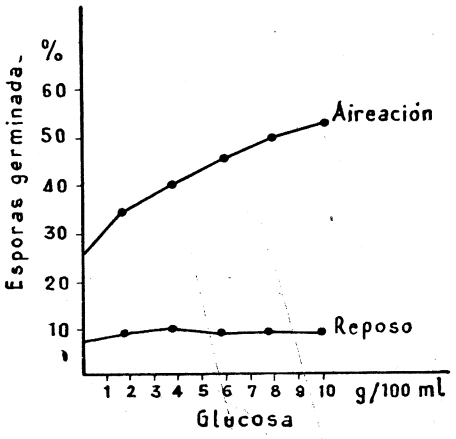


Figura 7. Influencia de la concentración de glucosa

Influencia del extracto de levadura

Como hasta ahora se ha expuesto, la germinación de conidios de *C. roseum* ocurre en ausencia de factores de crecimiento. No obstante, tal proceso parece ser notablemente influido por su presencia.

La razón de germinación, así, es función de la concentración de tales factores en el extracto de levadura, junto con su contenido de elementos nitrogenados, de alto valor en la nutrición de este hongo, como podíamos comprobar en otros estudios. El estímulo mencionado es posiblemente similar a la respuesta de otras esporas de hongos altamente estimulables por sustancias orgánicas (3).

La adición del extracto se efectuaba al medio completo, a la concentración de 1 g/l.

Las diferencias entre el estudio en reposo y aireación eran señaladas, como expresa la *figura 8*. La germinación era afectada, no sólo en su valor total, sino en la razón con que se originaba. Entre cuatro-cinco

horas, los valores habían rebasado los obtenidos en cualquiera de los ensayos anteriores. A las seis horas se aproximaba al 100 por ciento. Las lecturas, después de cuatro horas, eran altamente dificultadas por la

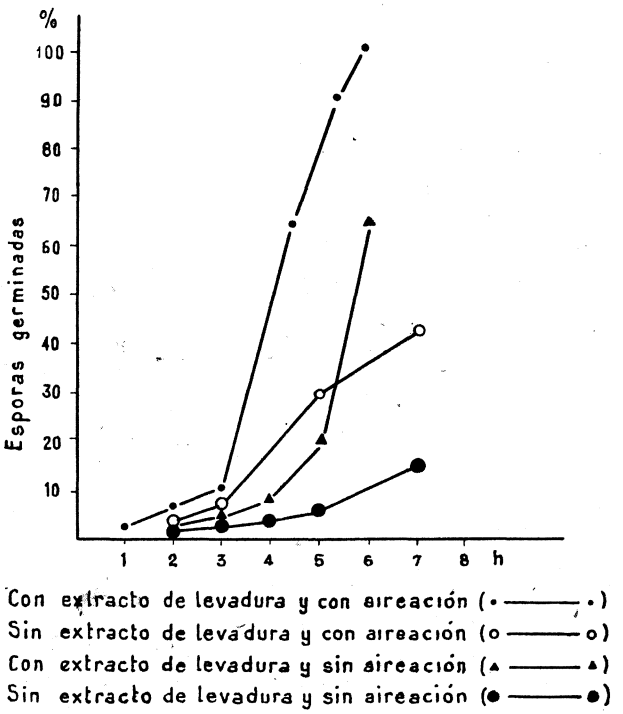


Figura 8. Influencia del extracto de levadura

abundante proliferación de micelio. En general, habían germinado las dos células que forman los conidios de *C. roseum.*

RESUMEN

Se estudian las condiciones óptimas para la germinación de las esporas del hongo *Cephalothecium roseum,* indicándose las características morfológicas durante el fenómeno. Usando el método de Ryan, se han considerado los factores siguientes: tiempo de germinación, concentra-

ción de esporas en la suspensión, temperatura, edad del cultivo, aireación, concentración de sales minerales y de glucosa en el medio y efecto de los factores de crecimiento.

SUMMARY

Optimal conditions for spore germination in *Cephalothecium roseum* have been studied and morphological characteristics pointed out. Using the Ryan's method the following factors have been considered: germination time, concentration of spores in the suspension, temperature, age of the culture, aeration, mineral salts and glucose concentration and effect of growth factors.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, R. 1946. Nature, 157, 64.
2. Oliveira, M. L., y Moura, M. A. 1953. Broteria, 22, 138.
3. Ryan, F. J. 1946. Federation Proc., 5, 336.
4. Ryan, F. J. 1948. Am. J. Botany, 35, 497.
5. Shepherd, C. J. 1956. Comunicación personal.

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

EFECTO MORFOGENETICO OBSERVADO EN LOS EXTRACTOS HORMONALES DE LOS TUMORES DEL OLIVO

POR
R. BELTRA

INTRODUCCION

En este trabajo hemos estudiado la relación que pudiera existir entre los tumores del olivo y una anomalía observada en algunas hojas de los olivos atacados por la bacteria *Pseudomonas savastanoi;* esta anomalía consiste en la presencia de hojas bifurcadas, generalmente una o, a lo más, dos hojas y no en todos los olivos, sino en los que poseen tumores producidos por dicha bacteria tumorígena. Esta bifurcación afecta no solamente al limbo de la hoja, sino también al nervio medio (*figura 1*).

Este fenómeno lo hemos encontrado repetidas veces al tomar las muestras tumorales para nuestras experiencias; se han visto olivos con tumores y con hojas normales solamente, pero lo que no hemos encontrado nunca es un olivo sano y que presentara alguna hoja bifurcada, apoyando esta observación nuestra idea de que debe existir alguna relación, corroborada después por los resultados experimentales, entre la presencia del tumor y la hoja bifurcada. Es de hacer notar el hecho de que el tumor y la hoja bifurcada se han encontrado siempre muy próximos en la misma rama y no distantes uno de otra; entre la extensa bibliografía consultada no se ha encontrado cita de sustancia alguna con dicha acción, que se haya obtenido o tenga relación con tumores vegetales bacterianos.

Para nuestras experiencias hemos estudiado la acción morfogenética de las diferentes fracciones tumorales sobre hojas de plantas de experimenta-

ción, hallando que en la fracción hormonal etérea se encuentra la sustancia o sustancias que reproducen experimentalmente el fenómeno observado naturalmente.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de la fracción hormonal. Preparación de extractos en bruto para inoculaciones

Hemos preparado extractos etéreos, acuosos, clorofórmicos y alcohólicos.

Para la preparación de los extractos etéreos la técnica que hemos seguido se puede considerar un compendio de las de Koegl (2), Van Overbeek (4) y Thimann y Skoog (6), en las que hemos introducido algunas modificaciones.

Se partió de 50 g de tumores jóvenes que se trituraron en turmix con 300 ml de éter bidestilado (en tres veces de 100 ml cada una); se dejó el macerado en el frigorífico durante quince horas y pasado este tiempo fue filtrada la mezcla por una muselina; el líquido extractivo se evaporó al vacío. Los extractos así obtenidos se trataron a continuación con agua bidestilada; como no eran miscibles se trituraron previamente con polvo de vidrio en cantidad suficiente. Con la mezcla polvo de vidrio + extracto, se llenó una columna de vidrio pirex de aproximadamente 1 cm de diámetro. La capa de polvo de vidrio impregnado era aproximadamente de unos 5 cm de altura. La percolación se aceleró por medio de vacío. La cantidad de agua añadida para cada extracción fue de unos 10 ml, y estos extractos se concentraron al vacío en desecador.

Las primeras fracciones de esta percolación acuosa del extracto etéreo presentaba una coloración rojo-vinosa, bastante intensa. No daba reacción neta de fenoles; el color y la circunstancia de que la sustancia colorante era soluble en agua y en éter, nos hace pensar que se trata de antocianos.

Como el residuo de polvo de vidrio obtenido en la columna no era todavía blanco, después de la percolación con el agua, se sometió a una nueva percolación con alcohol absoluto. Este extracto también se concentró al vacío en desecador.

Los extractos obtenidos anteriormente se mezclaron convenientemente y unieron con lanolina para su inoculación en las plantas de experimentación.

Se han preparado también extractos con cloroformo según la técnica de Thimann (5), acuosos, según Gorter (1), y alcohólicos, según Linser (3), y se han seguido las técnicas dadas por los autores, sin ninguna modificación; los residuos obtenidos se disolvieron en una cantidad conveniente de lanolina.

RESULTADOS

Al inocular 0,5 ml de los extractos etéreo, clorofórmico, acuoso y alcohólico sobre los tallos de las plantas de experimentación, olivo var. arbequina, jazmín amarillo y aligustre, se obtuvieron los resultados que se recogen en el *cuadro 1*.

Cuadro 1

Inoculaciones con 0,5 ml de	Resultados		
	Aligustre	Jazmín	Olivo
Extracto etéreo	Se encuentran hojas con el nervio principal bifurcado	Negativo	Hojas con nervio principal y superficie foliar bifurcadas
Extracto clorofórmico	Negativo	Negativo	Negativo
Extracto acuoso	Negativo	Negativo	Negativo
Extracto alcohólico	Negativo	Negativo	Negativo

La breve exposición de estos resultados demuestra que al inocular con un concentrado de un extracto etéreo tumoral, ha tenido lugar la formación de hojas bifurcadas, afectando esta bifurcación no solamente al limbo, sino también al nervio medio; asímismo se ha observado un gran aumento de la superficie foliar (de 300-400 por ciento). Este fenómeno

se ha reproducido reiteradamente en posteriores experiencias y se ha podido comprobar que en muchos de los casos la hendidura afectaba a más de las tres cuartas partes de la longitud total (*figuras 2-9*). En el aligustre, la única hoja que hemos encontrado con esta anomalía presentaba bifurcado el nervio principal solamente y no la superficie foliar (*figura 10*).

En lo que se refiere a la sensibilidad de las plantas de experimentación, hemos encontrado que las hojas de olivo son más sensibles que las de las otras plantas tratadas, ya que por la acción de los extractos etéreos se bifurcan en mayor número que las de aligustre.

De estos resultados, podemos afirmar que en los tumores se encuentra una sustancia etereosoluble, que tiene capacidad de inducir efectos morfogenéticos sobre las hojas normales, influyendo sobre la nerviación y produciendo también la división del limbo foliar; suponemos que esta sustancia actúa sobre los haces conductores de la planta, y por tanto sobre el xilema y floema, no habiendo logrado su identificación.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. Silió Gómez-Carcedo la ayuda prestada para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Se ha encontrado que la fracción etérea de los tumores producidos en el olivo por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* tiene acción morfogenética sobre las hojas del olivo y aligustre, produciendo la bifurcación del nervio medio, hendidura y aumento de la superficie foliar.

SUMMARY

We have found that the ethereal fraction of the tumors produced by *Pseudomonas savastanoi* on the olive trees has a morphogenetic action on the leaves of the olive tree and the privet. It produces the bifurcation of the midrib and increases the surface of the leaf.

BIBLIOGRAFIA

1. GORTER, C. J. 1932. Diss. Utrecht.
2. KOEGL, F.; ERXLEBEN, H., y HAAGEN-SMIT, A. J. 1934. Ueber die Isolierung der auxine a und báaus pflanzliechen Materialen. Z. physiol. Chem., *225*, 215.
3. LINSER, H. 1939. Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. Die Extraktion von Pflanzenmaterial. Planta, *29*.
4. OVERBEEK, J. U. 1938. A simplified method for auxin extraction. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., *24*.
5. THIMANN, K. V. 1934. Studies on the growth hormone of plants. VI. The distribution of the growth substance in plánt tissues. J. Gen. Physiol., 18, *23*.
6. THIMANN, K. V., y SKOOG, F. 1940. The extraction of auxin from plant tissues. Am. J. Botany, *27*, 951.

Figura 2

Figuras 2-9. Hojas de olivo bifurcadas obtenidas por inoculación en olivos sanos, del extracto etéreo tumoral. Obsérvese la bifurcación del nervio medio, así como el aumento de la superficie foliar

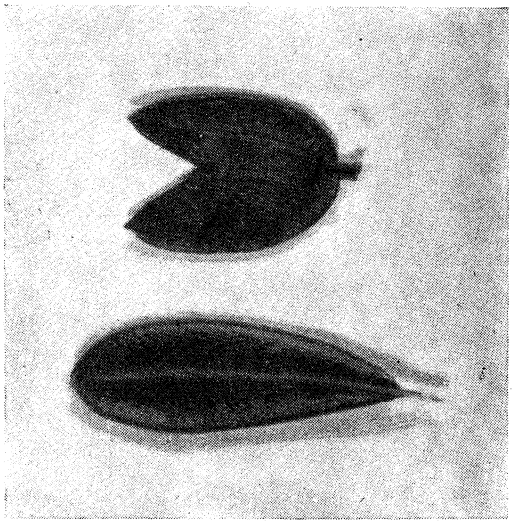


Figura 1. Hojas de olivo normal y bifurcada, de un olivo infectado por el Ps. savastanoi

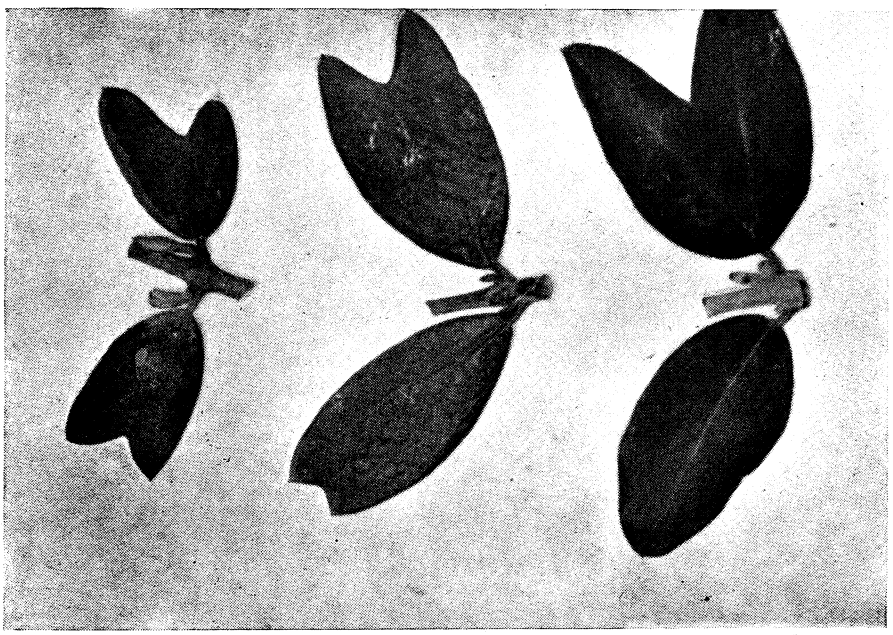


Figura 4

Figura 3

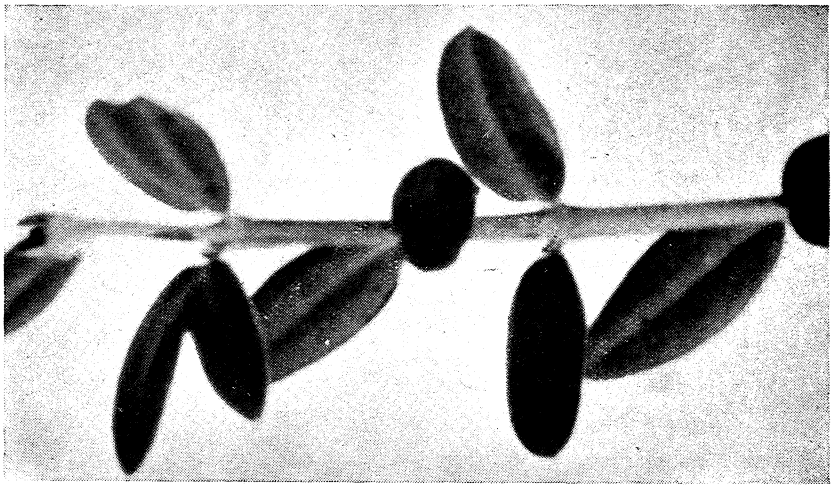


Figura 6

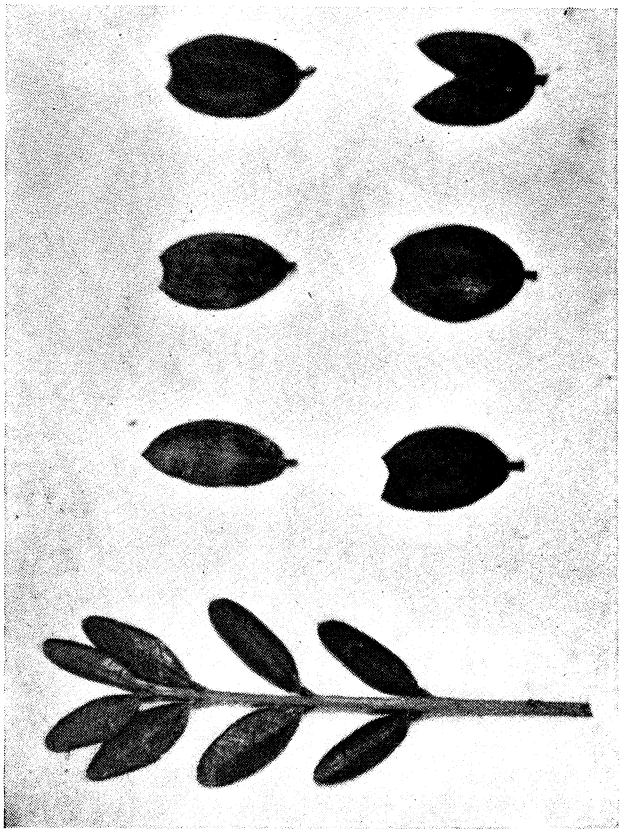


Figura 5

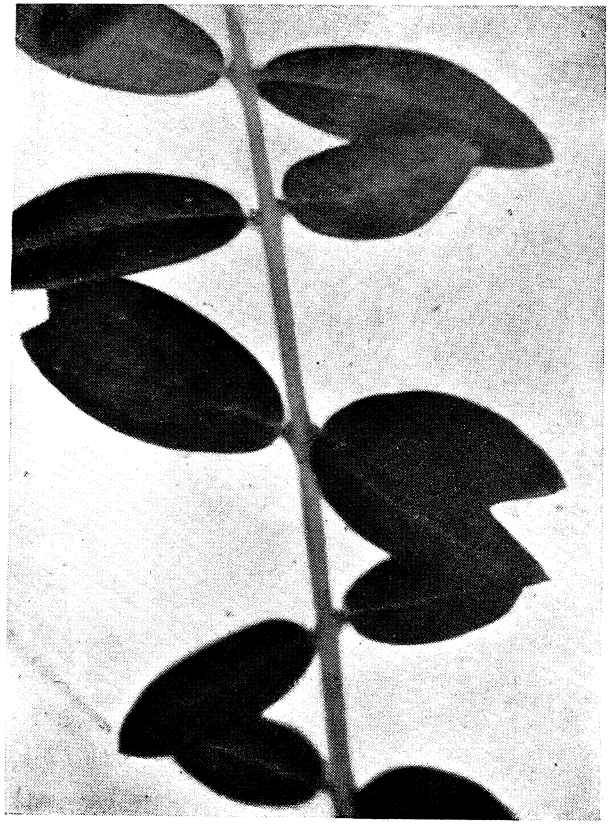


Figura 7

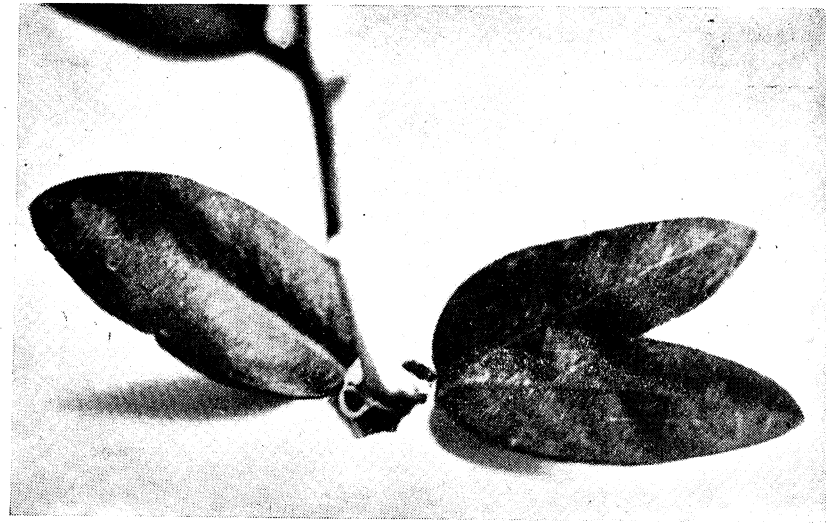


Figura 8

Figura 9

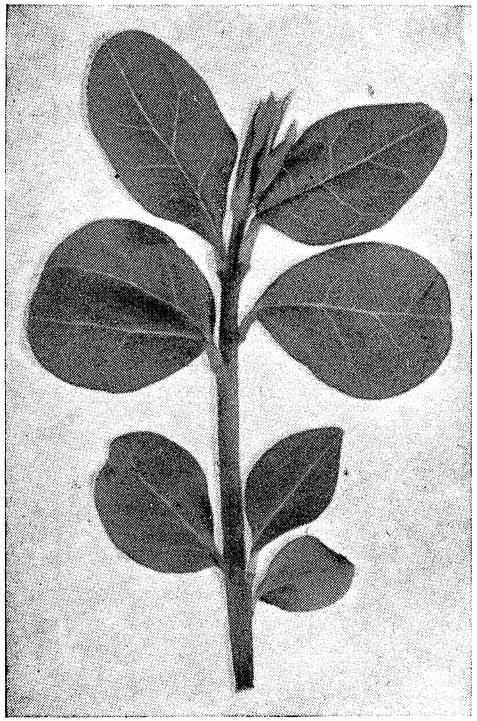


Figura 10. Hoja de aligustre con el nervio principal bifurcado y que se ha obtenido por igual técnica que las anteriores

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

ESTUDIOS SOBRE LOS ORGANISMOS DEL GRUPO DE LA PLEURONEUMONIA

POR
R. MORENO

INTRODUCCION

Los organismos de la pleuroneumonía bovina y los restantes de su grupo (*) no están incluidos como esquizomicetos típicos, sino que se agrupan independientemente, de una manera análoga a los órdenes *Rickettsiales* y *Virales*.

El organismo de la pleuroneumonía bovina es el primeramente conocido y constituye el organismo tipo de este grupo. Este organismo tiene algunas semejanzas con los virus filtrables; así, los pequeños elementos que presenta son capaces de atravesar los filtros que retienen la bacteria; en cambio, son diferentes de los virus, principalmente en que son capaces de vivir en medios apropiados sin necesidad de células huéspedes vivientes.

Recientemente, Edward y Freundt (9) han publicado la siguiente clasificación para los organismos pertenecientes a este grupo:

Orden: Alternativa 1.ª) *Mycoplasmatales*, Freundt, 1955.
Alternativa 2.ª) *Mollicutales*, Edward, 1955.

Familia: *Mycoplasmataceae*. Género: *Mycoplasma*, Nowak, 1929.

Especie tipo: *Mycoplasma mycoides* (Borrel y cols.), Freundt.

El género primeramente conocido de estos organismos es el *Mycoplasma mycoides*, Freundt, causante de la pleuroneumonía bovina contagiosa.

(*) Pleuropneumonía-like organisms (P. P. L. O.).

Se diferencian dos subespecies: primera, *Mycoplasma mucoides,* var. *mycoides,* organismo causante de la pleuroneumonía contagiosa bovina; segunda, *Mycoplasma mycoides,* var. *capri* (Edward, 1954) Freundt, organismo causante de la agalaxia contagiosa en cabras y ovejas.

El agente causante de la pleuroneumonía bovina fue estudiado por Bordet y cols. (1) ya en 1910; el productor de la agalaxia contagiosa en cabras y ovejas fue aislado en 1925 por Bridé y Donation (2).

Otros organismos semejantes en su descripción a los de la pleuroneumonía bovina, pero aislados relativamente hace poco tiempo, de otras fuentes diferentes de la bovina, han sido designados como organismos del grupo de la pleuroneumonía. Su forma peculiar de colonia es frecuentemente designada como colonia tipo "L". Se presentan en diferentes huéspedes, clasificándose según la fuente de obtención.

En perros. Asterococcus canis, Shoetensack, 1936, tipos I y II, obtenido por Shoetensack (22) a partir de un cultivo de "virus filtrable" de secreciones nasales, en enfermedades de tipo respiratorio típicas de perros. Se han descrito tres especies: *Mycoplasma spumans,* Edward; *Mycoplasma canis,* Edward; *Mycoplasma maculosum,* Edward.

En ratas. En la clasificación de Edward y Freundt se describen dos especies: *Mycoplasma pulmonis,* Freundt y *Mycoplasma arthriditis,* Freundt.

En ratón. Se han aislado cinco razas en este tipo de huésped, distintas serológica y patológicamente. Estos tipos son: "A", "B", "C", "D" y "E" (19, 20). El tipo "A" (*Musculomyces neurolyticus,* Sabin), en la clasificación de Edward y Freundt, figura como *Mycoplasma neurolyticum,* Freundt. El tipo "B", es el *Musculomyces arthrotrópicus,* Sabin. Los tipos "C", "D" y "E" (*Musculomyces histotropicus,* Sabin) eran serológicamente distintos del tipo "B" (21).

En aves. Mycoplasma gallinarum, Freundt, 1955. No ha sido establecida, sin embargo, su identidad con las razas aisladas en pollos y pavos por investigadores americanos.

En seres humanos. Los organismos del grupo de la pleuroneumonía se encuentran en el hombre y mujer, ya normalmente o asociados con con-

diciones patológicas. Han sido aislados principalmente en enfermedades genitales, en uretritis no gonocócicas y en enfermedades inflamatorias (vaginitis, cervititis, endometritis, salpingitis y metrocistitis). También se les encuentra asociados al microorganismo productor de la enfermedad de Reiter.

Estos organismos se clasifican como sigue: *Mycoplasma hominis* Edward, 1955, tipos I y II; *Mycoplasma fermentans,* Edward, 1955; *Mycoplasma salivarium,* Edward, 1955.

Otros organismos descritos como del grupo de la pleuroneumonia son las razas saprofíticas, de albañales y suelos, aisladas por Laidlaw y Seiffert, siguiendo a Orskow (14). También se incluyen los cuerpos cocobacilares de Nelson (17), aislados por éste como pequeños organismos bacilares, en corizas e infecciones catarrales, de los conductos nasales de aves y de las fosas nasales y oído medio de ratas y ratones.

Morfología y forma de reproducción

Los organismos del grupo de la pleuroneumonía se presentan como elementos pleomórficos formando parte de un ciclo reproductivo diferente de la escisión binaria. Las formas existentes son: grandes y pequeños cuerpos esféricos, filamentos ramosos que se hinchan en el extremo con formas redondas. También frecuentemente, pequeños bacilos con tinción bipolar. Los pequeños cuerpos esféricos pasan a través de los filtros que retienen las bacterias.

Las colonias son semejantes a las "L", son colonias de 0,1-0,6 mm.

En cuanto al mecanismo de reproducción se han descrito como posibles en estos organismos tres formas diferentes. Una consiste en la formación en los filamentos de pequeños corpúsculos endomicelianos liberados subsecuentemente como cuerpos libres, elementales (10).

Otro método de reproducción por simple escisión binaria, ha sido descrito por Butler y Knight (3) y Keller y Morton (12).

El otro método diferente de multiplicación es semejante al de las formas "L", es decir, por producción de pequeños gránulos dentro de grandes células redondas que se desarrollan después de la ruptura de la membrana circundante (6, 13).

Factores de crecimiento

Una característica de estos organismos es el requerimiento de flúido ascítico o suero para su crecimiento *in vitro*.

Smith y Morton (24) han efectuado investigaciones sobre el aislamiento y caracterización del factor de crecimiento en suero y flúido ascítico. Este factor de crecimiento está contenido en dos fracciones, "A" y "B", del suero. La obtención de estas fracciones se realiza por fraccionamiento del suero con sulfato amónico, por el método de Cohn (4).

Los análisis de estas fracciones llevan al convencimiento de que el factor de crecimiento es una proteína de bajo peso molecular o algún gran polipéptido derivado.

Por otra parte, Edward (7) y Edward y Fitzgerald (8) han cultivado estos organismos en un medio conteniendo colesterol, albúmina bovina y fracción lipídica insoluble en acetona, derivada de la yema de huevo.

En algunos sueros (bovino, humano), en concentraciones superiores al 10 por ciento, existe un inhibidor que parece residir principalmente en la fracción globulínica. El inhibidor de crecimiento no es dializable y tiene una naturaleza semejante a un anticuerpo. Es separado al obtener las fracciones "A" y "B".

Por otra parte, los organismos del grupo de la pleuroneumonía pueden ser inhibidos en su crecimiento por la acción de anticuerpos, sin la presencia de complemento, lo cual sugiere una semejanza con los virus.

Cultivo en tejidos

Los organismos del grupo de la pleuroneumonía han sido cultivados principalmente en embrión de pollo (12). También se pueden cultivar en fibroblastos de pollo y en células de flúido sinovial humano (11), así como también sobre células HeLa (24).

De lo expuesto hasta aquí, se desprende la gran importancia de estos organismos y su estrecha relación con las formas "L" de las bacterias, que hemos estudiado en trabajos anteriores (16, 18). Por ello, y tratando de aclarar algunos puntos oscuros de la morfología y fisiología de estos organismos, hemos realizado el estudio que constituye el trabajo que exponemos a continuación.

MATERIAL Y METODOS

Medios de cultivo

Como medio básico hemos empleado generalmente el propuesto por Dienes (5).

Este medio básico, cuando va a ser utilizado, es fundido y enfriado por debajo de los 60 °C y entonces se añade suero de sangre de caballo en un 10 por ciento o flúido ascítico en un 25 por ciento. También pueden ser añadidas las fracciones "A" y "B" de suero bovino.

Organismos

Hemos empleado una raza de organismos del grupo de la pleuroneumonía del pollo, *Mycoplasma gallinarum,* Freundt, 1955, nombrada como raza PG 16; otra, *Mycoplasma hominis,* tipo humano 1 (Nicol y Edward), señalada como raza PG 21, según la clasificación de Edward.

Los cultivos de los organismos del grupo de la pleuroneumonía fueron realizados en el medio descrito, en tubos inclinados incubados a 37 °C. Las colonias se producen de cuarenta y ocho-setenta y dos horas y son muy pequeñas, transparentes y difícilmente visibles a simple vista. Los organismos de raza aviar y humana estudiados son idénticos en su forma de crecimiento y en el aspecto de las colonias, a los descritos en la literatura.

Microscopía electrónica

El microscopio usado ha sido el RCA, 50 KV, modelo 1947, del Instituto "Daza de Valdés", de Optica, en la Sección dirigida por el Dr. F. Catalina. La manera de realizar las preparaciones se describe en cada caso particular en el capítulo de resultados, así como los medios que empleamos en los estudios de metabolismo.

RESULTADOS

Los organismos del grupo de la pleuroneumonía son bastante lábiles cuando se les somete a la acción del agua, por lo que se recomienda hacer

las suspensiones empleando fijadores; nosotros hemos empleado ácido ósmico al 1 por ciento y alcohol metílico-formaldehído (fijador de Murray).

Las preparaciones se hicieron a partir de medio sólido, separadas las colonias y resuspendidas en la solución fijadora de ácido ósmico o formaldehído. Depositada una gota de esta suspensión sobre la rejilla, se lava varias veces con agua destilada para eliminar el fijador. Las rejillas usadas son las corrientes con película de "formvar". Las preparaciones, dado el pequeño relieve de estos organismos, son sombreadas con paladio.

En los organismos de raza aviar hemos observado formas redondas y elipsoidales, planas, con algún material más compacto en el centro. En una fotografía puede observarse una forma filamentosa, con un pequeño cuerpo germinante al final del vástago (*figura 1*).

Estos organismos presentan claramente una membrana. También se puede observar la existencia de escaso material celular (*figuras 2-3*). Su aspecto es regular, existiendo formas muy iguales, sugiriéndonos la existencia de escisión binaria. En otra fotografía se observa la existencia de un gran cuerpo rodeado de otros más pequeños (*figura 4*).

En los organismos de origen humano, las preparaciones se hicieron sin fijar previamente el material, por suspensión en agua destilada y en suero fisiológico. También realizamos otras, fijando previamente en ácido ósmico y metanol-formaldehído.

En estas preparaciones encontramos formas generalmente esferoidales, no bien delimitadas, de material denso (*figuras 5-6*). Su aspecto no está tan bien definido como en las razas aviares y la membrana no está claramente delimitada. Los organismos son pequeños y se presentan reunidos en grupos. No nos ha sido posible observar la reproducción por filamentos germinantes.

Estudios metabólicos

Los organismos del grupo de la pleuroneumonía muestran algunas características metabólicas comunes. Por ejemplo, son resistentes a la penicilina y acetato de talio. Tampoco son afectados por cantidades de cristal violeta y telurito potásico que no permiten crecer a las bacterias.

En estos organismos existen dos mecanismos para la producción de la energía que necesitan, dada su carencia de los usuales sistemas liberadores de energía. El primer mecanismo se refiere a la actividad catabólica para los aminoácidos de los organismos del grupo de la pleuroneumonía,

que solamente se produce frente a la arginina y glutamina, que son degradadas rápidamente (23).

La otra reacción de suministro de energía es la que es proporcionada por la oxidación de alcoholes monohídricos, demostrada por Lecce y Morton (15).

Para la medida de la conducta enzimática de estos organismos han sido empleados los compuestos de tetrazolio, que ponen de manifiesto su metabolismo oxidante a través de la reducción de los tetrazoles incorporados al medio de cultivo.

La reducción de tetrazoles también se produce en presencia de ácido láctico, lo cual parece indicar que hay enzimas que pueden deshidrogenar el láctico y transportar electrones por medio de flavinas para reducir el tetrazol. Warren (25) ha señalado la presencia de deshidrogenasa láctica para la reducción del azul de metileno en organismos del grupo de la pleuroneumonía.

También pueden ser utilizados otros substratos como donadores de electrones, por ejemplo: etanol, propanol, butanol, isobutanol y alcohol amílico, puesto que estos organismos, como hemos dicho, poseen sorprendente capacidad reductora para los alcoholes monohídricos.

Nuestras investigaciones han sido dirigidas a medir la actividad oxidante frente a los substratos mencionados anteriormente, puesta de manifiesto con cloruro de trifeniltetrazolio.

Los substratos que hemos utilizado son fructosa, láctico, alcohol etílico y alcohol butílico. También se empleó glucosa como testigo. En medio líquido son añadidos los substratos mencionados en cantidad de 0,1 M, y cloruro de trifeniltetrazolio en cantidad de 10 mg/100 cm^3. Este medio es distribuido en tubos en cantidad de 9 cm^3 y esterilizado al vapor durante tres días consecutivos. Después es añadido 1 cm^3 de suero de caballo.

Los medios así preparados son inoculados con los organismos del grupo de la pleuroneumonía e incubados a 37 °C. Son preparadas varias series de tubos y observados periódicamente.

Para investigar la fermentación de azúcares empleamos medios para medir la producción de gas y posible cambio de pH con bromocresol como indicador.

También fueron preparados medios con los mismos substratos mencionados y cristal violeta, que habíamos encontrado se decoloraba por estos organismos de una manera acusada.

Las observaciones realizadas por estos métodos siguiendo las técnicas descritas, no nos han proporcionado ninguna indicación de actividad de deshidrogenasas. En todos los tubos ensayados hay crecimiento, pero solamente encontramos de una manera esporádica ligero cambio de color. En definitiva, al menos con las razas empleadas, no encontramos actividad frente a trifeniltetrazolio.

No obstante, sí encontramos la decoloración de cristal violeta que hemos señalado, sin que ésta sea incrementada con la adición de azúcares. Sobre el mecanismo de esta decoloración, no hemos encontrado indicación alguna.

RESUMEN

En este trabajo hemos comenzado una serie de estudios sobre los organismos del grupo de la pleuroneumonía, a los cuales se dedica en el extranjero una creciente atención, teniendo en cuenta su posible papel patológico en diversas enfermedades. Empleando el microscopio electrónico, se ha realizado un estudio morfológico de una raza aviar y otra humana de estos organismos, siendo descritas diferentes estructuras e interpretadas conforme a su peculiar modo de reproducción.

Por otra parte, hemos realizado un estudio complementario sobre la actividad metabólica de estos organismos. Comprobamos su débil porcentaje de crecimiento y reducida capacidad de empleo de azúcares, no obteniendo pruebas de la producción de deshidrogenasas con los substratos e indicador empleados; en cambio, sí encontramos que se produce una decoloración del cristal violeta añadido al medio, aunque el mecanismo de este proceso no esté aclarado.

SUMMARY

The morphology of two strains of P.P.L.O. has been studied by electron microscopy. Spherical forms of different sizes, some with a tubular filament attached to them have been observed. Metabolic studies of both P.P.L.O. strains showed very low metabolic activities.

BIBLIOGRAFIA

1. BORFI, DUJARDIN-BEAUMETZ, JEANTET y JOUAN. 1910. Le microbe de la périneumoniae. Ann. Inst. Pasteur, 24, 168.
2. BRIDE, J., y DONATION, A. 1925. Le microbe de la agalaxie contagieuse du mouton et de la chèvre. Ann. Inst. Pasteur, 39, 925-51.
3. BUTLER, M., y KNIGHT, B. C. J. G. 1956. Growth curves of strains of pleuropneumonia-like organisms. J. Gen. Microbiol., 14, VI.
4. COHN, E. J.; MCMAEKING, T. L.; OUCLEY, J. L.; NOWELL, J. M., y HUGHES, W. L. 1940. Preparation and properties of serum and plasma proteins. I. Size and charge of proteins separating upon equilibrium across membranes with ammonium sulfate solutions of controlled pH, ionic strength and temperature. J. Am. Chem. Soc., 62, 3.386-93.
5. DIENES, L. 1939. "L" organisms of Klienerberger and *Streptobacillus moniliformis*. J. Infections Diseases, 24-42.
6. DIENES. L., y WEINBERGER, H. J. 1951, The "L" forms of bacteria. Bacteriol. Rev., 15, 245.
7. EDWARD, D. G. ff. 1953. A difference in growth requirements between bacteria in the "L"-phase and organisms of the pleuropneumonia group. J. Gen. Microbiol., 8, 256-62.
8. EDWARD, D. G. ff., y FITZGERALD, W. A. 1951. The insolation of organisme of pleuropneumonia group. J. Gen. Microbiol., 5, 576.
9. EDWARD, D. G. ff., y FREUNDT, E. A. 1956. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. J. Gen. Microbiol., 14, 197-207.
10. FREUNDT, E. A. 1952. Morphological studies of the peripneumonia organisms (*Micromyces peripneumonia bovis*). Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 31, 508.
11. HAYFLICK, L.; STINEBRING, W. R.; BRECKENRIDGE, F. C., y POMERAT, C. M. 1956. Some effects of human pleuropneumonia-like organisms on tissue cultures of human synovial cells. Bacteriol. Proc., M61.
12. KELLER R., y MORTON, R. V. 1954 The growth of pleuropneumonia-like organisms of human origin: cultivation in the developing chick embryo and an *in vitro* growth cycle. J. Bacteriol., 67, 129.
13. KLIENERBERGER-NOBEL, E. 1954. Microorganisms of the pleuropneumonia group. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 29, 154.
14. LAIDLAW, P. P., y ELDFORD, W. J. 1936. A new group of filterable organisms. Proc. Roy. Soc. (London), B, 120, 292.
15. LECCE, J. G., y MORTON, H. E. 1954. Metabolic studies on three strains of pleuropneumonia-like organisms isolated from man. J. Bacteriol., 67, 62-68.
16. MORENO, R., y RUBIO-HUERTOS, M. 1958. Obtención y estudio de un crecimiento de tipo "L" en *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Españ., 11, 327-42
17. NELSON, J. B. 1935. Coco-bacilliform bodies associated with an infectious fowl coryza. Science, 82, 43-44.

18. Rubio-Huertos, M., y Moreno, R. 1953. Obtención y estudio de las formas filtrables de *Proteus vulgaris,* Microbiol. Espan., 6, 195-203.
19. Sabin, A. B. 1938. Identification of the filterable, transmissible neurolytic agent isolated from toxoplasma-infected tissue as a new pleuropneumonia-like microbe. Ecience, 88, 575-76.
20. Sabin, A. B. 1939. Experimental proliferative arthritis in mice produced by filterable, pleuropneumonia-like microorganisms. Science, 89, 228-29.
21. Sabin, A. B. 1939. Mice as carriers of pathogenic pleuropneumonia-like microorganisms. Science, 90, 18-19.
22. Shoetensack, M. 1934. Pure cultivation of the filterable virus isolated from canine distemper. Kitasato, Arch. Exp. Med., 277-90.
23. Smith, P. F. 1955. Aminoacid metabolism by pleuropneumonia-like organisms I. General catabolism. J. Bacteriol., 70, 552-56.
24. Smith, P. F., y Morton, H. E. 1952. Further characterization of the protein factor required by certain pleuropneumonia-like organisms for growth *in vitro*. Arch. Biochem. Biophys., 38, 23-38.
25. Warren, J. 1942. Observations on some biological characteristics of organisms of the pleuropneumonia group. J. Bacteriol., 43, 211-28.
26. Witler, R. G.; Cary, S. G., y Lindberg, R. B. 1956. Reversion of a pleuropneumonia-like organisms to a *Corynebacterium* during tissue culture passage. J. Gen. Microbiol., 14, 763-74.

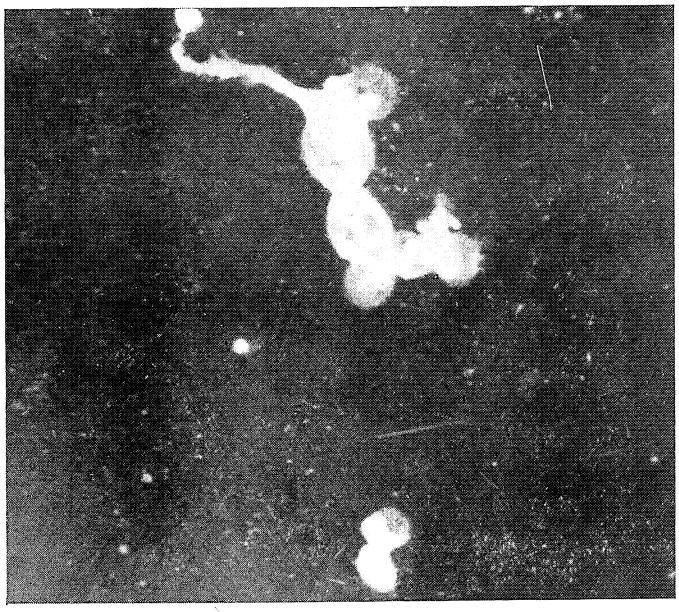


Figura 1. Un grupo de organismos del grupo de la pleuroneumonía, de origen aviar, mostrando un vástago con un pequeño cuerpo germinante. × 15.000

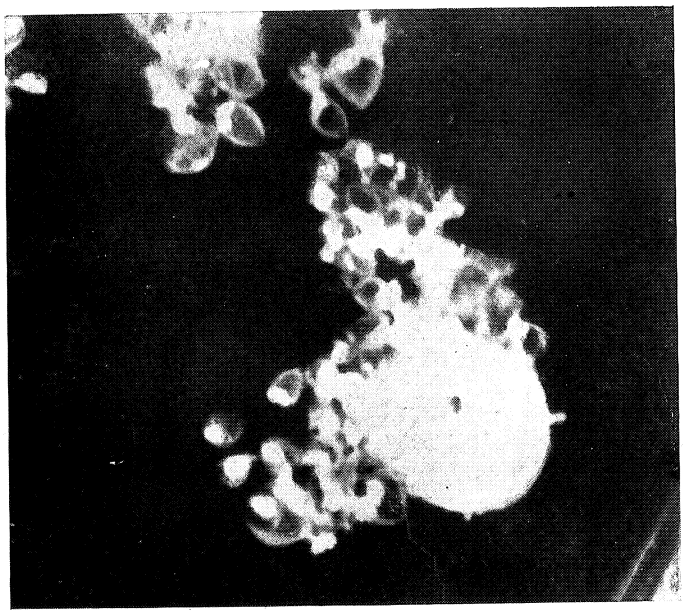
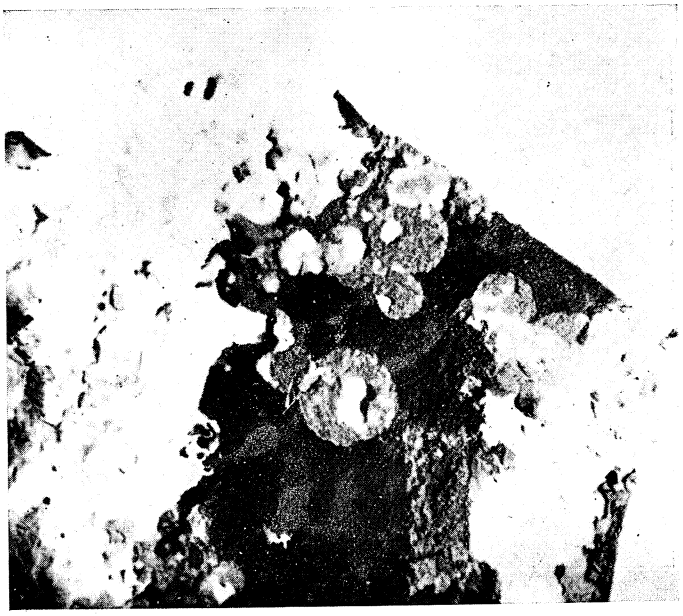
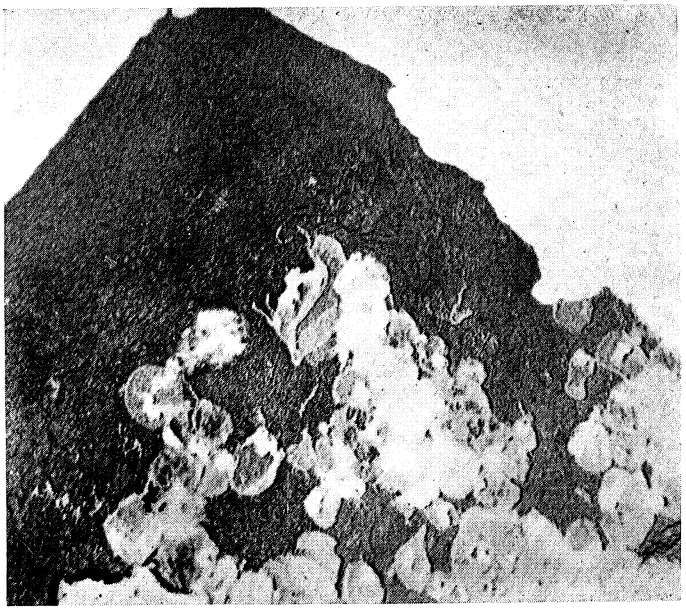
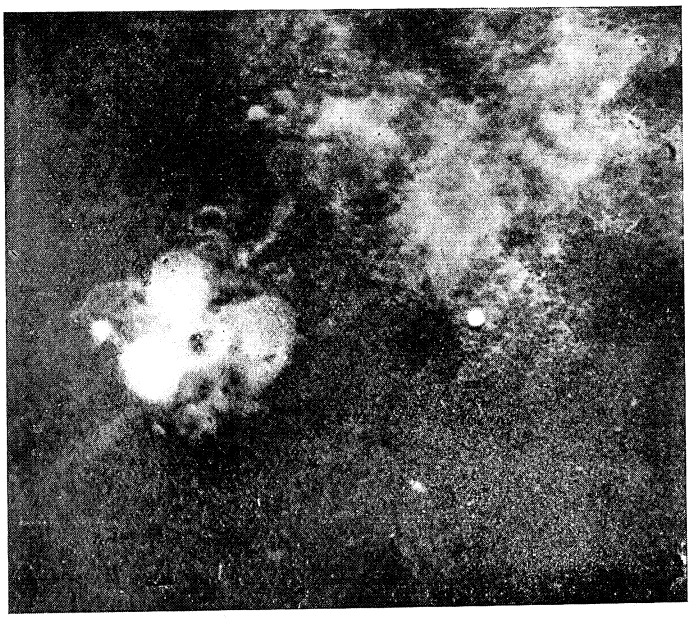


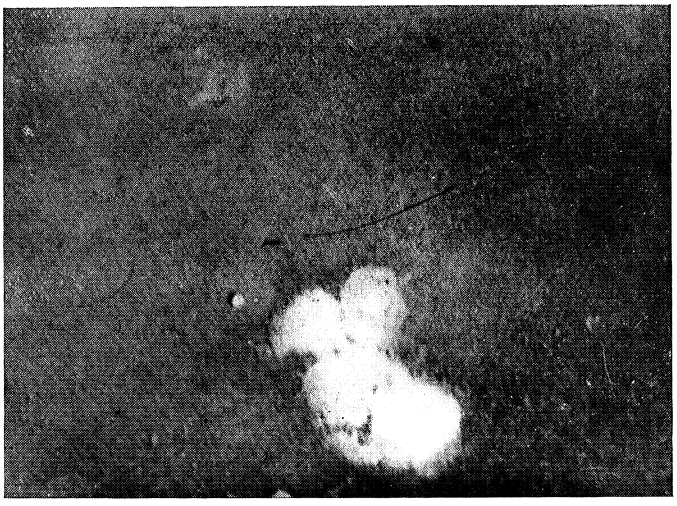
Figura 4. Un gran cuerpo rodeado de pequeños organismos del grupo citado, también de origen aviar. × 15.000





Figuras 2-3. Organismos del grupo de la pleuroneumonía, de origen aviar. × *12.000*





Figuras 5-6. Organismos del grupo de la pleuroneumonía, de origen humano. × *15.000*

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA, INMUNOLOGIA Y SEROLOGIA

LA ACCION *IN VITRO* DE LA KANAMICINA SOBRE *AEROMONAS PUNCTATA*

POR
D. A. CONROY

Introducción

Ha sido descrita por Conroy (1) la acción *in vitro* de la kanamicina sobre un cierto número de bacterias patógenas para los peces de agua dulce. Después de haber sido escrito dicho artículo, el autor pudo obtener una cepa auténtica de *Aeromonas (Pseudomonas) punctata,* la cual fue aislada de peces enfermos. Esta nota trata de presentar los resultados de los ensayos *in vitro* acerca del efecto de la kanamicina sobre aquel microorganismo *(cuadro 1)*.

Métodos experimentales

Los métodos experimentales usados en este trabajo fueron exactamente los descritos en el trabajo citado. Los cultivos se incubaron a 25 °C.

Resultados

Las concentraciones bacteriostáticas y bactericidas figuran en el *cuadro 2*.

Discusión

El trabajo realizado parece indicar que la kanamicina es efectiva contra *A. punctata,* como *A. liquefaciens, A. hydrophila, Ps. putida, Ps. fluorescens* y *Pseudomonas sp*. Hay poca duda de que los estudios *in vivo* serían de interés, y el autor empezó hace poco con tales estudios en esta Cátedra. Sus conclusiones y los resultados de dicho estudio se publicarán posteriormente.

Cuadro 1. Kanamicina. Efectos in vitro. *Tiempo de incubación: veinticuatro y doscientas cuarenta horas a la temperatura óptima. pH 7,0*

Tubo	Gramos de antibiótico/mililitros de agua destilada	Concentración final γ/ml	Incubación	
			24 h	240 h
1	1:500	400,0	—	—
2	1:1.000	200,0	—	—
3	1:2.000	100,0	—	—
4	1:4.000	50,0	—	—
5	1:8.000	25,0	—	—
6	1:16.000	12,5	—	—
7	1:32.000	6,3	—	—
8	1:64.000	3,1	—	—
9	1:128.000	1,6	—	+
10	1:256.000	0,8	—	+
11	1:512.000	0,4	+	+
12	1:1.024.000	0,2	+	+

+= desarrollo.

Cuadro 2. Niveles bacteriostático y bactericida mg/l

Resultados	
Bacteriostático	Bactericida
0,8	3,1

RESUMEN

Se describe una serie de estudios *in vitro* acerca de la acción de la kanamicina sobre las bacterias patógenas para los peces. Se observa que el antibiótico posee un marcado efecto, tanto bacteriostático como bacte-

ricida, sobre un gran número de dichas bacterias, y se discuten los resultados obtenidos.

SUMMARY

A series of *in vitro* studies on the action of kanamycin upon bacterial fish pathogens is described. It is shown that the antibiotic possesses well marked bacteriostatic and bactericidal effects against a variety of test organisms and the results obtained are discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. Conroy, D. A. 1961. Estudio *in vitro* de la acción de la kanamicina sobre bacterias patógenas para los peces. Microbiol. Españ., 14, 147-55.

NUEVOS SERVICIO Y SECCIONES

En la División de Ciencias Matemáticas, Médicas y de la Naturaleza, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, se ha creado un Servicio de Microscopía Electrónica, del que ha sido designado Jefe el Dr. D. Miguel Rubio Huertos. Asimismo, el Dr Rubio Huertos ha sido nombrado Jefe de la nueva Sección de Microorganismos Parásitos de las Plantas, vinculada a los Institutos de Edafología y Fisiología Vegetal y "Jaime Ferrán", de Microbiología, de la División citada.

A un tiempo y con la misma vinculación, se ha creado una Sección de Bioquímica y Microbiología del Suelo, para cuya Jefatura ha sido designado el Dr. D. Julio Rodríguez Villanueva.