VOLUMEN 14. 1961 OCTUBRE - DICIEMBRE. NUMERO 4

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.

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

Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. V. Influencia de algunos factores en medio de fermentación de melazas y tratamiento de éstas en fermentación superficial, por *A. Puente* y *B. Regueiro* 209

La producción de la putrefacción de la aleta caudal en los peces por la acción de *Aeromonas punctata,* por *D. A. Conroy* ... 233

Las causas de un brote de putrefacción de la aleta caudal en los peces y su tratamiento con kanamicina, por *D. A. Conroy* ... 239

Diferenciación de especies del género *Azotobacter* por la concentración de colorantes en sus colonias, por *V. Callao* y *E. Hernández* 247

Extracción de enzimas de microorganismos, por *J. R. Villanueva* e *Isabel García-Acha* 255

Semana de estudio en la Academia Pontificia 269

Concurso científico de la Academia de Farmacia... 269

VOLUMEN 14 1961

Microbiología Española

publicada por
el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

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.

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

INDICE

Página

Aznar, Pilar.—Véase *Cabezas de Herrera*, Eulalia.

Beltrá, R.—Efecto morfogenético en los extractos hormonales de los tumores del olivo 177

Cabezas de Herrera, Eulalia.—Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. I. Alteraciones del comportamiento fisiológico de la *Escherichia coli* 7

Cabezas de Herrera, Eulalia.—Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. II. Alteraciones del comportamiento fisiológico del *Bacillus cereus* 53

Cabezas de Herrera, Eulalia.—Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. III. Alteraciones del comportamiento fisiológico del *Mycobacterium phlei* ... 107

Cabezas de Herrera, Eulalia.—Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. IV. Alteraciones del comportamiento fisiológico del *Staphylococcus aureus*. 113

Cabezas de Herrera, Eulalia, y *Aznar*, Pilar.—Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. V. Alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos del *Mycobacterium phlei* 119

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

Callao, V., y *Hernández*, E.—Diferenciación de especies del género *Azotobacter* por la concentración de colorantes en sus colonias 247

Concurso científico de la Academia de Farmacia 269

Conroy, D. A.—A study of the bacterium associated with an outbreak of oedema amongst goldfish (*Carassius carassius* var. *auratus*) 73

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

Página

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

Conroy, D. A.—La producción de la putrefacción de la aleta caudal en los peces por la acción de *Aeromonas punctata.* 233

Conroy, D. A.—Las causas de un brote de putrefacción de la aleta caudal en los peces y su tratamiento con kanamicina. 239

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

García-Acha, Isabel.—Véase *Rodríguez-Villanueva*, J.

Hernández, E.—Véase *Callao*, V.

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

Montoya, E.—Actividad catalásica de mutantes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con deficiencia respiratoria... 65

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

Nuevos Servicio y Secciones 207

Portolés, A.—Técnicas microbiológicas para estudiar el comportamiento de asociaciones antibióticas 17

Puente, A., y *Regueiro*, B.—Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. V. Influencia de algunos factores en medio de fermentación de melazas y tratamiento de éstas en fermentación superficial 209

Regueiro, B.—Véase *Puente*, A.

Rodríguez, D.—Véase *Lahoz*, R.

Rodríguez-Villanueva, J.—The biological activity of p-dinitrobenzene 1

Rodríguez-Villanueva, J.—Organic nitro compounds reduced by *Nocardia* V. 157

Rodríguez-Villanueva, J., y *García-Acha*, Isabel. — Investigación del modo de acción de las sustancias antimicrobianas. 59

Rodríguez-Villanueva, J., y *García-Acha*, Isabel.—Extracción de enzimas de microorganismos 255

Semana de estudio en la Academia Pontificia 269

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

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR FERMENTACION

V. Influencia de algunos factores en medio de fermentación de melazas y tratamiento de éstas en fermentación superficial

POR
A. PUENTE y B. REGUEIRO

INTRODUCCION

En trabajos anteriores sobre la producción de ácido cítrico por fermentación, Malo y Regueiro (12-15) trabajaban sobre un medio de fermentación sintético, compuesto de: azúcar, sales inorgánicas e iones metálicos. Afirmaban entonces que en los procesos de tipo industrial se empleaban medios más complejos, del tipo de subproductos agrícolas o industriales, por su mayor economía. Por esta razón, en la producción de ácido cítrico se sustituye el uso de sacarosa por melazas de azúcar (remolacha o caña), que al contener una gran cantidad de impurezas a las que el *Aspergillus niger* es muy susceptible, crea una nueva serie de problemas, que es preciso resolver para lograr un buen rendimiento.

Las melazas de azúcar son el residuo siruposo que permanece después de separar el azúcar, durante la fabricación de sacarosa. Aunque existen muchas variedades de melazas, puede decirse que, en general, todas contienen un 45-50 por ciento de azúcar. Por las diferencias que existen entre las melazas, su fermentación debe permitir cierta flexibilidad.

Datos analíticos de melazas de remolacha y caña son dados por Steel, y cols. (27) y Gerhardt (6). En nuestro país, Díaz (5), da como promedio en varias fábricas y durante los años 1932-1945 (melazas de remolacha), un 46,8-49,4 por ciento de azúcar y 1,39-1,95 por ciento de nitrógeno total. Alonso y cols. (1), para el bienio 1953-1954, dan las cifras que se recogen en el *cuadro 1*.

Cuadro 1

	Remolacha Porcentaje	Caña Porcentaje
Sacarosa	44,20-50,00	43,40
Azúcar invertido	0,14- 0,65	3,36
Nitrógeno total	1,32- 2,00	0,90
Nitrógeno amínico	0,05- 0,17	0,12
pH	6,50- 8,40	5,80

Puede observarse en los análisis del cuadro anterior, que las melazas de remolacha contienen suficiente nitrógeno para compensar las necesidades del hongo; en cambio, a las melazas de caña hay que añadir nitrato amónico por la misma razón.

En relación con el suministro de fósforo, se recomienda el añadir hasta un nivel de 0,3 g de fosfato/1 l de medio, aunque también conviene recordar que los resultados de algunos autores (9, 17, 20, 23, 27) no están muy de acuerdo en cuanto a la influencia de la adición de fósforo al medio de fermentación.

Tratamiento de las melazas

Como hemos dicho anteriormente, las melazas contienen muchas impurezas en cantidades variables, que interfieren, en general, con la producción de ácido cítrico; por ejemplo, la adición de cenizas de melazas a un medio de fermentación sintético disminuye la cantidad de ácido cítrico producido. Por esta razón, conviene reducir el contenido en metales de las melazas, aunque el ideal sería el utilizar razas de hongos no sensibles a los metales.

De todos los tratamientos utilizados en fermentación industrial de ácido cítrico, el más empleado es el de la adición de ferrocianuro potásico al medio de fermentación. Para esta adición, se dan diversas técnicas (3, 7, 12, 19, 22, 27); la de Steel y cols. (27) es la que observamos da mejores resultados y es la que fundamentalmente empleamos en el presente trabajo.

Numerosos autores han estudiado el efecto del ferrocianuro en las melazas de azúcar. Lewis y Johar (11) afirman que el rendimiento en ácido cítrico es inversamente proporcional al contenido en hierro de las melazas. El trabajo más completo sobre esta cuestión es el de Martín (16), que

afirma que el ferrocianuro separa metales tóxicos aunque él puede ser directamente tóxico para el hongo por producir cianuro o por reaccionar con los componentes celulares del hongo. Ramakrishnan y cols. (24) afirman que el efecto del ferrocianuro puede ser el de inhibir la isocítricodeshidrogenasa del hongo.

Se han probado otros métodos de separar impurezas de melazas, como las resinas de intercambio iónico, con las cuales, Perlman y cols. (22) reducen las cenizas de 1,68 a 0,24 por ciento; a su vez, Perlman y cols. (21) aumentan el rendimiento en ácido cítrico del 20 al 65 por ciento, y Woodward y cols. (28) llegan a rendimientos del 75 por ciento. Kavats y Lewicka (10), utilizan carbón activo, y Shiga (26) emplea un método de coprecipitación con ácido fosfórico e hidróxido cálcico.

Las melazas de caña contienen mayor número de impurezas y, por lo tanto, necesitan tratamiento más intensivo, como hacen Bromstein (4) y Karow y Waksman (8), probando diversas técnicas, como: diálisis, filtración por tierra de infusorios, carbón animal, bauxita, resinas, etc.

Nosotros, en el presente trabajo, hemos probado la acción de las complexonas en varias experiencias, con resultados bastante prometedores.

METODOS

Las técnicas o métodos generales son los descritos por Malo y Regueiro (12), utilizando la raza de *Aspergillus niger* 72-4 Wiss., mutante, obtenida por nosotros. En el presente trabajo se utilizan nuevos medios de esporulación con melazas en vez de azúcar, y fórmulas:

	Porcentaje		Porcentaje
Melazas de caña	4,000	Melazas de remolacha II	2,947
Fosfato monopotásico	0,100	Fosfato monopotásico	0,050
Sulfato magnésico	0,025	Agar	2,000
Nitrato amónico	0,250		
Agar	2,000		

En los dos medios, pH 5,0 (con ácido clorhídrico). Los medios de fermentación se dan en las diversas experiencias. Se estudia la esterilización y se demuestra la conveniencia de hacerla a vapor fluente durante cuarenta y cinco minutos.

La determinación de metales pesados en las melazas se hace por métodos complexométricos dados por Rey y cols. (25), a quienes agradecemos su colaboración. En todas las experiencias se emplean melazas, cuyo análisis da los resultados expuestos en el *cuadro 2,* entendiéndose que pertenecen a melazas facilitadas por las azucareras: "Santa Elvira", de la Sociedad Industrial Castellana; "Veguellina", de la Sociedad General Azucarera, y "Larios", de Málaga, a las que expresamos nuestro agradecimiento.

Cuadro 2

	I Remolacha Porcentaje	II Remolacha Porcentaje	III Caña Porcentaje
Glucosa	0,58	0,83	2,87
Sacarosa	50,02	46,67	43,38
Azúcar total	50,60	47,50	50,25
Nitrógeno total	1,26	1,80	0,71
Metales pesado (ADCT)	1,81	1,80	4,64
Metales pesados (AEGT)	1,39	1,59	2,96

Estos últimos resultados se expresan en plomo.

Las determinaciones de pH, azúcar y ácido cítrico se hacen por métodos dados en el primer trabajo. En las fermentaciones en superficie, el 94-96 por ciento de acidez en melazas de remolacha se debe al cítrico y en melazas de caña, el 89-92 por ciento; el resto de acidez se debe al ácido oxálico, que se determina por el método de Bergerman y Elliot (2).

RESULTADOS

A) Factores relacionados con el medio de fermentación

En todas las experiencias realizadas se comparan resultados de medios preparados con melazas de remolacha y con melazas de caña. Los factores estudiados y los resultados obtenidos fueron los siguientes.

1) Concentración óptima de melazas.

El primer punto a estudiar en la producción de ácido cítrico por fermentación de melazas será el de ver la concentración óptima de éstas a añadir al medio. Se prepara medio, diluyendo melazas a diferentes con-

centraciones hasta 20 por ciento de azúcar, a pH 5,0, y se inoculan después de esterilizar, con 1 ml de suspensión de esporas de un cultivo de siete días en medio de esporulación, e incuban a 28 °C durante diez días.

Al aumentar la concentración de melazas, hay un aumento ligero de pH, pero el consumo de azúcar sigue siendo similar. En general, se produce más micelio en melazas de remolacha que de caña. El crecimiento y la esporulación bajan a medida que aumenta la cantidad de melazas.

En cuanto a la conversión de azúcar en ácido cítrico, es óptima a una concentración de azúcar del 10 por ciento en las dos melazas, aun cuando la producción de ácido cítrico es mayor en las melazas de remolacha (30,4 por ciento) que en las de caña (10,3 por ciento).

Las diferencias morfológicas, según el tipo de melazas y la cantidad de las mismas, es como se ve en el *cuadro 3*.

Cuadro 3

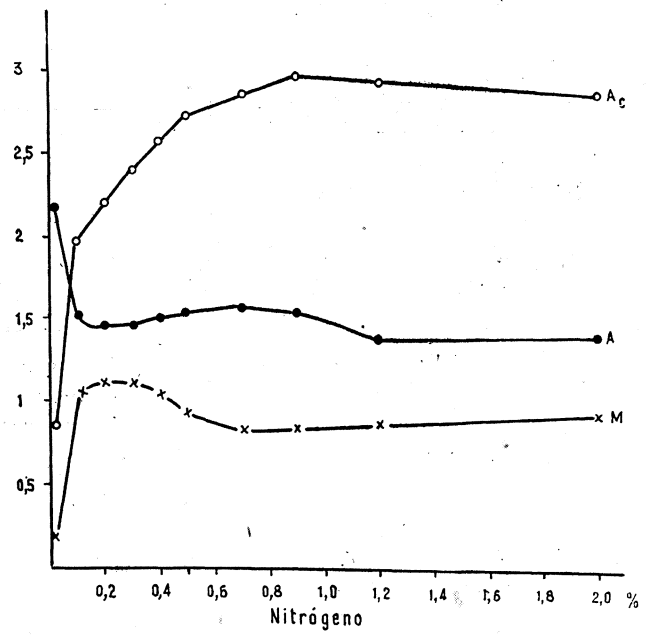
Días	Porcentaje	Melazas de remolacha	Porcentaje	Melazas de caña
3	6	Micelio consistente, esporulación pardo oscura		
	10	Micelio muy rugoso, consistente, empieza a esporular	10	Micelio tenue, pardo oscuro, abundantes cabezas esporígenas
	15	Micelio parcial tenue	15	Micelio con zonas blancas y pardas, con cabezas esporígenas
	18	No hay crecimiento	25	Colonias aisladas, con cabezas esporígenas blancas
6	18	Micelio blanco, tenue, desarrollo en zonas	10	Aumenta la consistencia
			15	Micelio completo, blanco pardo
	20	No hay crecimiento	25	No completo, cabezas esporígenas pardas
10	18	Micelio consistente, esporulado, pardo oscuro	Lo mismo que los anteriores	
	20	No hay crecimiento		

2) Influencia del pH en melazas.

Los medios contienen melazas a una concentración de azúcar del 12 por ciento (remolacha) y del 10 por ciento (caña). Se estudia la influencia del pH, entre 3-7, alcanzándose el óptimo de producción de ácido cítrico a pH 5,0 en medio de melazas de remolacha (35,6 por ciento), y a pH 7,0 en medio de melazas de caña (24,5 por ciento).

3) Influencia de la concentración de nitrógeno

Como puede observarse en las anteriores experiencias, los rendimientos en ácido cítrico en medios de melazas de caña, son más bajos que en melazas de remolacha. Esto puede ser debido a un menor contenido en



A = Azúcar, porcentaje. A_c = Acido cítrico, porcentaje.
M = Micelio, gramos

Figura 1

A, × (*) 3 . A_c, × 10

(*) En cada caso, la cifra exacta se obtiene multiplicando la de la escala por el número que va detrás de este signo.

nitrógeno y por esta razón interesa saber la influencia de este elemento en la producción de ácido cítrico.

Se prepara medio de fermentación con melazas de caña (10 por ciento de azúcar) y se añaden diferentes concentraciones de nitrato amónico. Observamos que a medida que aumenta la cantidad de nitrógeno, se retrasa la esporulación y el crecimiento.

Los resultados de la *figura 1* demuestran que a medida que aumenta la cantidad de nitrógeno, aumenta el consumo de azúcar y la producción de ácido cítrico, ésta hasta un óptimo de 29,5 por ciento, con un 0,9 por ciento de nitrógeno.

En pruebas adicionales, no se observan diferencias en medios preparados con agua destilada o agua corriente.

4) Influencia de la concentración de fósforo

Se estudia la influencia de la adición de fósforo en un medio de melazas de remolacha. Los resultados se expresan en la *figura 2*. Cuanto

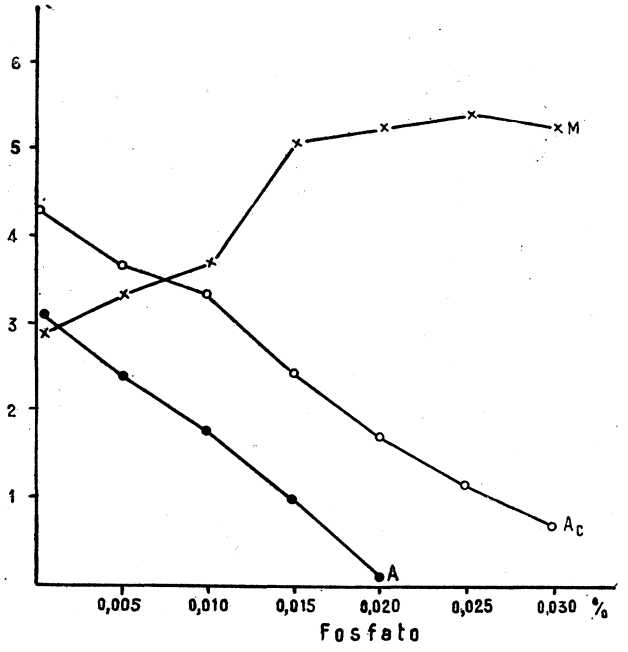


Figura 2

A_c. × *10*

más fosfato, mayor consumo de azúcar y aumento de micelio, pero al mismo tiempo baja la producción de ácido cítrico.

También la adición de fósforo produce diferencias morfológicas. El medio sin fosfato, da un micelio blanco, ligeramente rugoso, no esporulado; con 0,005-0,015 por ciento de fosfato, el micelio es blanco amarillento, algo más consistente y no esporulado; con 0,020-0,030 por ciento, el micelio es amarillo, rugoso y no esporulado. A los cuatro días, esporulan todos los matraces, pero con color tanto más claro, cuanto más fosfato.

5) Influencia de la adición de sacarosa

Se preparan medios con diferentes concentraciones de melazas de remolacha y se completa el 10 por ciento de azúcar con sacarosa. Los resultados se expresan en la *figura 3*. Se observa la disminución del micelio y del ácido cítrico, así como la baja del consumo de azúcar. Asimismo, hay disminución de crecimiento y esporulación.

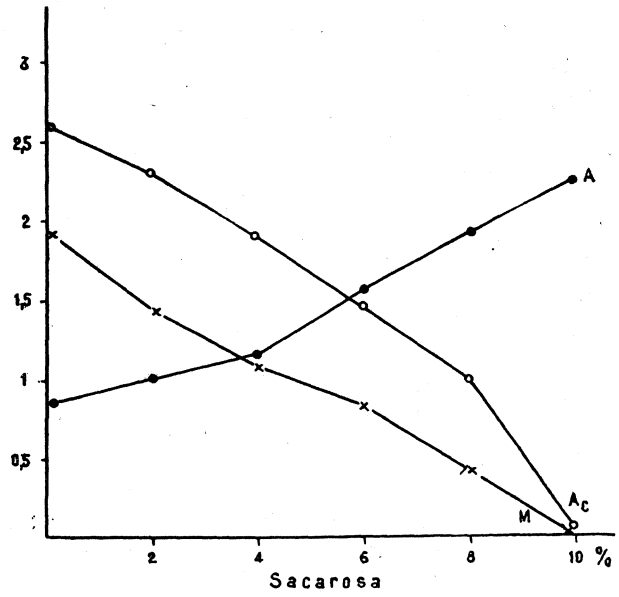


Figura 3

A, × 4 . A_C, × 20

En una experiencia complementaria, se mezclan diferentes concentraciones de melazas de remolacha y de caña, todas a un total de 10 por

Cuadro 4

	Número	Cenizas Porcentaje	Melazas de remolacha					Melazas de caña				
			pH	Micelio Gramos	Gramos de azúcar/100 ml de medio	Gramos de á. cítrico/100 ml de medio	Conversión Porcentaje	pH	Micelio Gramos	Gramos de azúcar/100 ml de medio	Gramos de á. cítrico/100 ml de medio	Conversión Porcentaje
	1	Testigo, sin cenizas	3,0	1,001	2,90	4,676	46,7	2,4	0,788	3,95	3,091	30,9
Remolacha	2	Solubles 0,157	2,9	0,955	2,85	4,676	46,7	2,5	0,842	3,70	3,091	30,9
Remolacha	3	Solubles 0,134	2,8	1,066	2,85	4,518	45,2	2,5	0,941	3,50	3,249	32,5
Remolacha	4	Totales 0,160	2,9	1,022	3,15	4,280	42,8	2,6	0,856	3,70	3,091	30,9
Remolacha	5	Totales 0,320	3,0	1,233	2,95	3,963	39,6	2,7	1,012	3,20	2,774	27,7
Caña	6	Solubles 0,149	2,9	1,097	2,30	4,518	45,2	2,5	0,950	3,50	3,091	30,9
Caña	7	Solubles 0,298	2,9	1,197	2,50	4,360	43,6	2,5	1,107	3,30	3,249	32,5
Caña	8	Totales 0,160	3,0	1,379	2,85	3,804	38,0	2,6	0,908	3,20	2,852	28,5
Caña	9	Totales 0,320	3,2	1,221	3,60	3,408	34,1	2,9	1,032	2,70	1,425	14,2

ciento de azúcar. Hay poca variación en caracteres morfológicos; en cambio, cuanta mayor concentración de melazas de remolacha, más aumenta la cantidad de ácido cítrico, llegando a una cantidad del 55,7 por ciento, con 9 partes de melazas de remolacha y una de melazas de caña.

6) Influencias de las cenizas de melazas

Las cenizas de melazas se obtienen por incineración a 1.000 °C, probándose las cenizas solubles y las totales en medios con melazas de remolacha y caña. Los resultados se expresan en el *cuadro 4.*

Observamos que las acciones de las cenizas de melazas de remolacha o de caña, son parecidas. Las cenizas solubles ejercen poca influencia cuantitativa en el consumo de azúcar, producción de micelio y de ácido cítrico. Por otra parte, las cenizas totales hacen bajar el ácido cítrico proporcionalmente; esta disminución es mayor en el caso de las melazas de caña.

En cuanto a las diferencias morfológicas, a los seis días de fermentación, se notan los caracteres siguientes:

a) Melazas de remolacha con cenizas solubles o totales de remolacha dan un micelio parcialmente esporulado, pardo grisáceo.

b) Melazas de remolacha con cenizas solubles de caña producen un micelio totalmente esporulado, pardo grisáceo. Con cenizas totales de caña dan micelio consistente, ligeramente rugoso y parcialmente esporulado.

c) Melazas de caña con cenizas solubles y totales de caña y remolacha (0,160 por ciento), dan micelio totalmente esporulado, pardo oscuro.

d) Melazas de caña con cenizas solubles y totales de caña y remolacha (0,320 por ciento), dan micelio consistente, ligeramente rugoso y totalmente esporulado, pardo grisáceo.

B) Tratamiento de melazas por ferrocianuro

Se estudian varios factores en relación con la adición de ferrocianuro a los medios con melazas de remolacha y caña. Los resultados obtenidos en cada caso se dan en los apartados siguientes.

1) Adición antes de la esterilización del medio

Se preparan los medios con melazas de remolacha y caña (a un 10 por ciento de azúcar). Al último se adiciona un 0,9 por ciento de nitrógeno (en forma de nitrato amónico). Se añaden diferentes cantidades de ferrocianu-

ro potásico y se esterilizan los matraces a vapor fluente durante cuarenta y cinco minutos.

En los medios con melazas de remolacha, el consumo de azúcar, el micelio y la producción de ácido cítrico disminuyen a medida que aumenta la cantidad de ferrocianuro adicionado ; la esporulación apenas se afecta.

En los medios con melazas de caña, el consumo de azúcar varía poco; la cantidad de micelio baja proporcionalmente a la cantidad de ferrocianuro añadido y la producción de ácido cítrico sube a 28,3 por ciento cuando se añade un 0,02 por ciento de ferrocianuro. El crecimiento disminuye a medida que aumenta la proporción de ferrocianuro.

Los caracteres morfológicos también varían según la proporción de ferrocianuro, pues al aumentar ésta, el micelio se hace menos consistente, y poco esporulado y blanco en melazas de remolacha, y esporulado pardo a blanco no esporulado en las melazas de caña.

2) Adición después de la esterilización del medio

Se hace como las experiencias anteriores, pero el ferrocianuro se añade después de esterilizar los medios a vapor fluente durante cuarenta

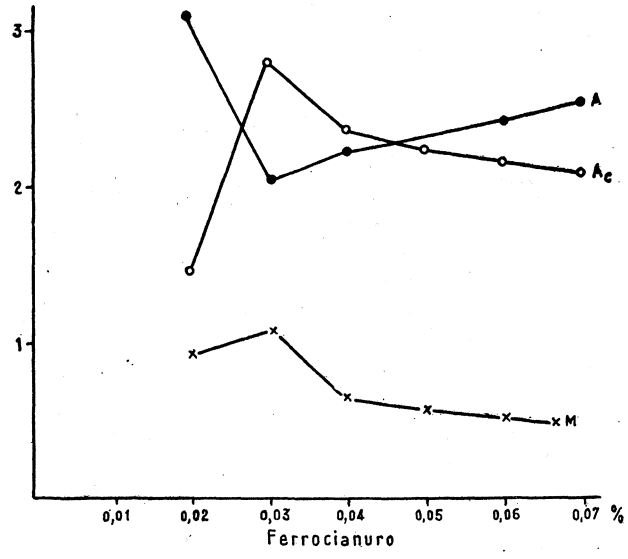


Figura 4

A, × 2 . A_c, × 20

y cinco minutos. Si esta adición se hace una vez completamente frío el medio, no se observan variaciones apreciables en la producción de ácido cítrico, aunque sí un aumento en el consumo de azúcar; el crecimiento es más lento a medida que aumenta el ferrocianuro.

Cuando el ferrocianuro se añade estando el medio aún caliente, los resultados son los que se expresan en las *figuras 4-5*, para melazas de remolacha y caña, respectivamente.

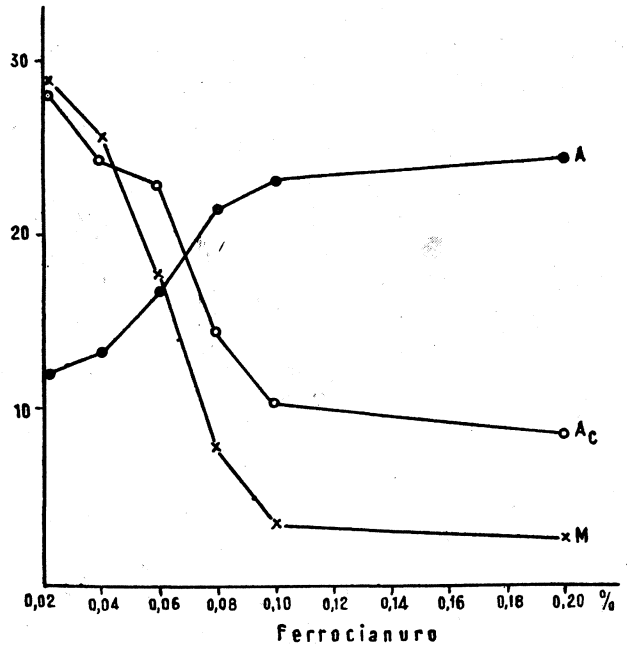


Figura 5

A, × 1/3 . M, × 1/30

En el primer caso, existe un óptimo de producción de ácido cítrico (55,6 por ciento); cuando se añade un 0,03 por ciento de ferrocianuro, a su vez, también hay una mayor producción de micelio y de consumo de azúcar. En el caso de medio con melazas de caña, disminuye la producción de ácido cítrico, micelio y consumo de azúcar, proporcionalmente a la cantidad de ferrocianuro añadida.

En cuanto a la influencia sobre los caracteres morfológicos, a los diez días de fermentación, en los medios de melazas de remolacha, con

0,02 por ciento de ferrocianuro, el micelio es blanco sucio, rugoso, no esporulado; a medida que aumenta la cantidad de ferrocianuro, el micelio se hace algo más consistente y se pigmenta en gris. En los medios con melazas de caña, se produce esporulación pardo oscura que se hace más tenue y con menos esporulación a medida que aumenta la cantidad de ferrocianuro.

3) Influencia de tiempo/temperatura de esterilización

Se hace como en experiencias anteriores, con 0,03 por ciento de ferrocianuro. Se prueban diferentes temperaturas y tiempos de esterilización, observándose que las variaciones son ligeras en todos los casos de temperaturas de 100°-200 °C y durante cuarenta y cinco-noventa minutos. De todos modos, se encuentra que la mejor esterilización en relación con la producción de ácido cítrico es la de vapor fluente (100 °C) durante cuarenta y cinco minutos. Los caracteres morfológicos son también parecidos en todos los casos.

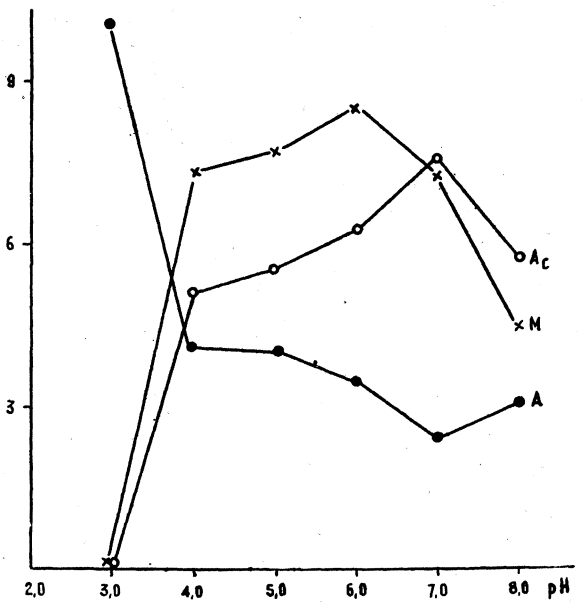


Figura 6

A_c, × 10 . *M*, × 1/4

4) Influencia del pH en medios tratados

Se preparan las experiencias como en el caso anterior, en medios de melazas de remolacha. La adición de un 0,03 por ciento de ferrocianuro se realiza antes y después de la esterilización y los resultados en ambos casos se expresan en las *figuras 6-7*.

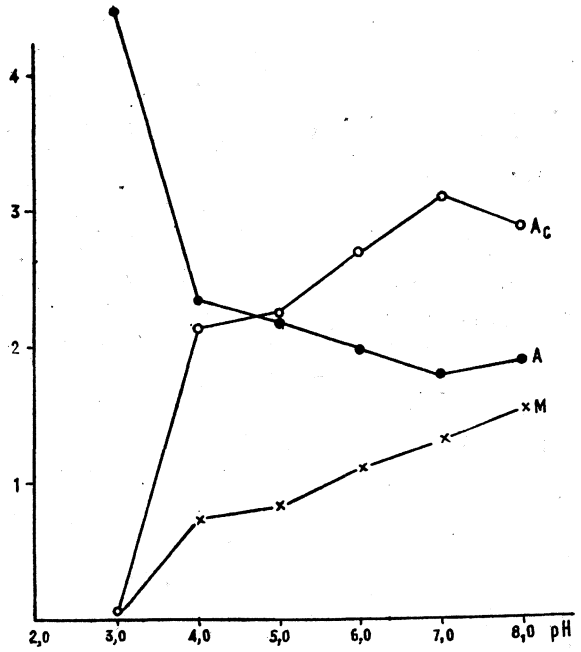


Figura 7

A, × 2 . A_C, × 20

En general, se observa que el óptimo de producción se logra a un pH 7,0, habiendo diferencias entre realizar la esterilización antes (76,4 por ciento) o después (63,1 por ciento) de la adición del ferrocianuro. A pH 3,0 no se forma ya micelio.

5) Influencia del fosfato en medios tratados

Se preparan las experiencias como en el caso anterior, en medio de remolacha, al que se añaden diferentes cantidades de fosfato. Los resul-

tados se expresan en la *figura 8*. En general, el fosfato tiende a aumentar la cantidad de micelio y a aumentar el consumo de azúcar. El óptimo de ácido cítrico se produce con un 0,01 por ciento de fosfato. Los caracteres morfológicos también sufren alguna variación: el micelio se hace más

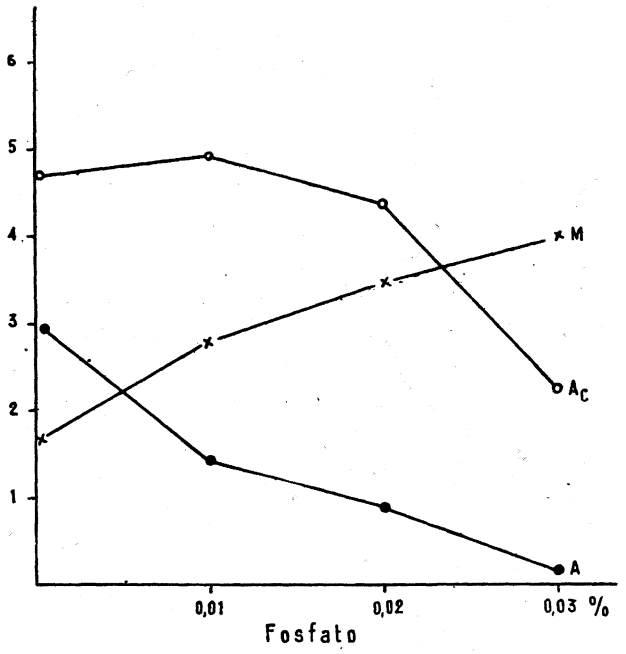


Figura 8

A_C, × 10 . M, × 1/2

rugoso, totalmente esporulado, y aparece un pigmento verdoso al aumentar la cantidad de fosfato.

Al repetir estas pruebas en medios con melazas de caña, los resultados son muy similares, tendiendo a favorecerse la producción de ácido cítrico y dando menos micelio.

6) Influencia del hierro en medios tratados

Se estudia la influencia del hierro en medios con melazas de remolacha y caña, tratados con 0,03 por ciento de ferrocianuro. Añadimos cantidades de 0-10.000 γ/100 ml de medio, sin notar apenas influencia en la fermentación.

7) Influencia del tratamiento después de la inoculación

Se preparan medios como en casos anteriores, se esterilizan e inoculan con 2 ml de suspensión de esporas. A continuación y a tiempos diferentes, se añade un 0,03 por ciento de ferrocianuro y se estudian los resultados que se expresan en la *figura 9*.

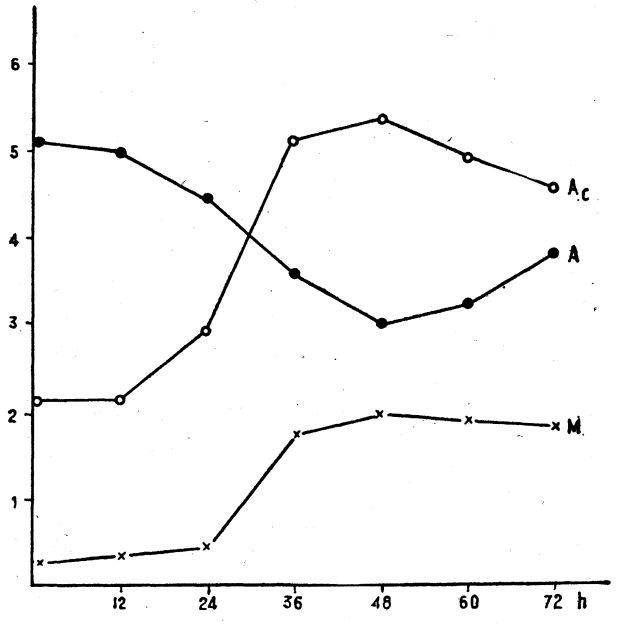


Figura 9

Ac, × 10

De ella se deduce la conveniencia de la adición entre las treinta y seis-sesenta horas después de la inoculación. En cuanto a los caracteres morfológicos, a los dos días se forma un micelio blanco, tenue, no esporulado, en todos los matraces, y a los diez días, el micelio es blanco, sucio, no esporulado (adición entre cero-veinticuatro horas) a esporulado en pardo ceniza (adición entre treinta y seis-setenta y dos horas).

C) Tratamiento de melazas por complexonas

Sabiendo que las complexonas complejan metales y evitan su acción, era natural que probáramos su actividad en la producción de ácido cítrico

por fermentación de melazas de remolacha y de caña. Estudiamos las complexonas IV (ADCT) y V (AEGT).

1) Tratamiento con complexona IV

Se emplean los métodos generales de las experiencias anteriores. Antes de ajustar el medio a pH 5,0, se trata el mismo con solución alcalina de complexona IV. En general, para la complejación total, se necesita el doble para melazas de caña que de remolacha. Los resultados de diferen-

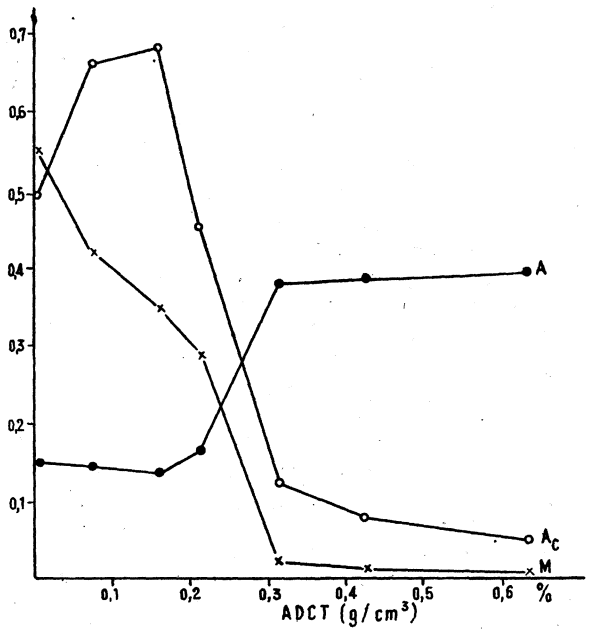


Figura 10

A, × 20 . A_C, × 100

tes cantidades de complexona, se expresan en las *figuras 10-11*, para melazas de remolacha y caña, respectivamente.

En el caso del medio preparado con melazas de remolacha, se observa una disminución progresiva de la cantidad de micelio y consumo de azúcar; la producción de ácido cítrico tiene un óptimo (68,3 por ciento), a un nivel de 0,10-0,15 por ciento de complexona IV. Con relación a los caracteres morfológicos, el crecimiento disminuye al aumentar la complexona y

el micelio se hace cada vez más escaso, blanco, sumergido en parte y con escasa o ninguna esporulación.

En el caso del medio preparado con melazas de caña, se observan resultados similares, pero el rendimiento óptimo sólo alcanza un 43,4 por ciento de ácido cítrico. Con relación a los caracteres morfológicos, con 1,2-0,8 por ciento de complexona, el micelio es esaso y sumergido; con

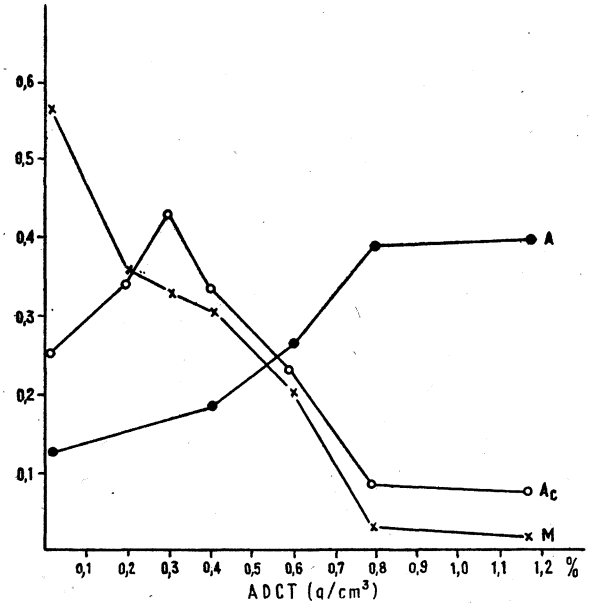


Figura 11

A, × 20 . A_c, × 100

0,6 por ciento es blanco, rugoso, poco consistente y sin esporular; con 0,4 por ciento es blanco, con manchas de color ocre, esporulación parcial, pardo clara; y con 0,2 por ciento es rugoso, con bordes, totalmente esporulado en pardo.

2) Tratamiento con complexona V.

Los métodos son como en el caso anterior. Para la complejación total de melazas de remolacha se necesita un 0,69435 por ciento de complexona V, y 1,2360 por ciento para el caso de melazas de caña.

Los resultados obtenidos aquí demuestran poca influencia, pues las variaciones son muy ligeras en relación con las diversas cantidades de complexona añadida. Sin embargo, con 0,17-0,34 por ciento de complexona, en medio de melazas de remolacha, se produce un 56,6 por ciento de ácido cítrico y 37,5 por ciento en el caso de las melazas de caña. No se encuentran variaciones en otros caracteres.

DISCUSION

La producción de ácido cítrico por fermentación tiene una gran importancia comercial, por cuya razón son numerosos los estudios realizados para mejorarla o para comprenderla mejor, pues el gran número de factores que intervienen hace difícil su regulación y reproducibilidad, aparte de que las patentes guardan muchos estudios en el secreto.

Trabajos anteriores realizados por Malo y Regueiro (12-15), se concretaban a medios sintéticos, pero estos medios, en escala industrial, son por el momento, antieconómicos. Por esto hay que recurrir a otras materias primas, que en este caso son las melazas de azúcar (remolacha y caña). Esto introduce nuevos factores que hay que estudiar en cada caso. Aquí nos concretamos a alguno de estos factores y, sobre todo, al tratamiento de las melazas para mejorar su fermentación.

En primer lugar, estudiamos algunos factores relacionados con el medio de fermentación superficial. Estudiando la concentración óptima de melaza a añadir al medio, se encuentra que a un 10 por ciento de azúcar se obtienen los mejores resultados. Dichos resultados, en todos los casos son más elevados que en el caso de medios sintéticos, lo cual significa que la raza que nosotros utilizamos está más adaptada a los medios de melazas. Si se aumenta mucho la cantidad de melazas, se paraliza el crecimiento y la esporulación del hongo.

Un factor que puede tener influencia es el del pH inicial del medio de fermentación. En melazas de remolacha, se encuentra la producción óptima de ácido cítrico a pH 5,0, mientras que en las melazas de caña, el óptimo está a pH 7,0.

En los trabajos anteriores se observan diferencias de resultados entre las melazas, según sean de remolacha o de caña. Observando los análisis se notan diferencias en el contenido en nitrógeno total, del que hay menos

en las melazas de caña. Se estudia esta cuestión, observándose que se produce máxima cantidad de ácido cítrico, cuando se añade al medio de melazas de caña un 0,9 por ciento de nitrógeno.

Algunos autores afirman que la adición de fosfato favorece la producción de ácido cítrico, aunque por otro lado, otros opinan lo contrario. Suponemos que esto depende, sobre todo, de la raza de hongo empleada. Nosotros encontramos que la adición de melazas de remolacha al medio es perjudicial.

Para ver la acción específica del azúcar de las melazas, se sustituye parte de éstas por sacarosa, viéndose una disminución en los rendimientos a medida que aumenta la sustitución. Quizá se deba esto a ir bajando el nitrógeno u otros elementos contenidos en las melazas. Lo mismo ocurre si la sustitución es por melazas de caña, en lo que está de acuerdo con los resultados de Perlman y cols. (22).

Una parte de interés en el presente trabajo es la que estudia la influencia de las cenizas de melazas (cualitativa o cuantitativa). En general, en la fermentación superficial no se observa influencia notable por adición de cenizas solubles; pero con cenizas totales se disminuye la producción de ácido cítrico, siendo esta disminución mayor en el caso de que las cenizas sean de melazas de caña.

Tratamiento de melazas con ferrocianuro

Ya se dijo al comienzo del trabajo que este tratamiento era el más empleado en escala industrial. La adición de ferrocianuro parece que disminuye la cantidad de hierro.

Estudiamos diversas formas de adición de ferrocianuro al medio, con objeto de elegir la más efectiva. Cuando se añade antes de esterilizar el medio, se observa que mejora el rendimiento en el caso de las melazas de caña (con 0,02 por ciento); en cambio, en las de remolacha hay disminución en la producción de ácido cítrico y micelio.

Cuando la adición se hace después de esterilizar y todavía en caliente, existe un óptimo de producción (52,8 por ciento), cuando se añade un 0,03 por ciento de ferrocianuro en melazas de remolacha; en cambio, en las de caña disminuye la producción.

Algunos autores encuentran que la acción del ferrocianuro se favorece si el medio es deficiente en fosfato; al estudiar este punto, vemos que

al contrario, una adición de 0,01 por ciento de fosfato, es óptima en un medio de melazas de remolacha y, en cambio, causa efecto contrario en un medio de melazas de caña.

También algunos autores afirman que la acción principal del ferrocianuro es la de disminuir el hierro, pero nosotros observamos que añadido éste hasta cantidades de 10 mg/100 ml de medio, no produce efecto en la fermentación.

Otra cuestión interesante es la de ver qué acción posee el ferrocianuro añadido a diferentes edades, como hace Martín (16). Observamos que lo más conveniente es la adición entre las treinta y seis-sesenta horas después de la inoculación.

Tratamiento de melazas con complexonas

Decidimos probar este tratamiento, en vista de la acción que tienen estas sustancias y de no existir bibliografía sobre este tema. Encontramos que en el caso de la fermentación superficial y con un medio de melazas de remolacha, la adición de complexona IV (ADCT), en cantidad de 0,10-0,15 por ciento, sube la producción de ácido cítrico a un 65,5 por ciento; en el caso de medios con melazas de caña, el óptimo de 39,8 por ciento se obtiene con 0,19-0,29 por ciento; en ambos casos hay tendencia a disminuir el crecimiento.

De la misma manera, la adición de 0,17-0,34 por ciento de complexona V (AEGT), produce una máxima cantidad de ácido cítrico (54,3 por ciento) en un medio de melazas de remolacha, y en cantidad de 0,20-0,30 por ciento en el caso de un medio de melazas de caña (34,5 por ciento). En este caso no hay variaciones en el crecimiento.

RESUMEN

En la serie de trabajos sobre la producción de ácido cítrico por fermentación, se inicia en éste el estudio de la fermentación de melazas de azúcar por un mutante del *Aspergillus niger* 72-4 Wiss, obtenido por los autores.

En este trabajo se estudia la influencia de algunos factores sobre la fermentación de melazas de remolacha y de caña, en superficie.

Observamos que la cantidad óptima de melazas es la de un 10 por ciento de azúcar, y que en el caso de las melazas de caña conviene añadir un 0,9 por ciento de nitrógeno. El aumento de las cenizas de melazas parece ser la causa de la disminución del rendimiento en ácido cítrico.

Para mejorar dicho rendimiento se añade ferrocianuro potásico al medio de melazas; conviene hacerlo después de esterilizar a vapor fluente durante cuarenta y cinco minutos y en cantidad de 0,03 por ciento. Parece conveniente añadir al medio un 0,01 por ciento de fosfato.

Probamos mejorar el rendimiento por adición de complexonas, encontrándose favorable la adición de 0,10 - 0,15 por ciento de complexona IV (ADCT), que da un 68,3 por ciento de ácido cítrico en el medio de melazas de remolacha y de 43,4 por ciento en el de melazas de caña.

SUMMARY

The authors study the production of citric acid by fermentation of molasses by a mutant of *Aspergillus niger* 72-4 Wiss specially several factors to increase the production of citric acid and also factors in relation with the treatment of molasses with ferrocyanide and complexones.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso, D.; Bolívar, I., y Alía, J. 1954. X Congr. Intern. Ind. Agr. y Aliment
2. Bergerman, J., y Elliot, J. S. 1955. Anal. Chem., 27, 1.014.
3. Bernhauer, K.; Rauch, H., y Gros, G. 1949. Biochem., Z., 319, 499.
4. Bromstein, R. A. 1949. Agr. Bacteriol., 231.
5. Díaz, F. 1954. X Congr. Intern. Ind. Agr. y Aliment.
6. Gerhardt, P. 1954 J. Fermentation Assoc
7. Gerhardt, P.; Dorrell, W. W., y Baldwin, I. L. 1946. J. Bacteriol., 52, 552.
8. Karow, E. O., y Waksman, S. A. 1947. Ind. Eng. Chem., 39, 821.
9. Kavats, J. 1947. Gas Cukrownicza, 87, 142.
10. Kavats, J., y Lewicka, M. 1945. Przemysl Rolny i Spozywczy, 3, 343.
11. Lewis, Y. S., y Johar, S. S. 1953. Current Sci. (India), 21, 311.
12. Malo, J. L., y Regueiro, B. 1957. Microbiol. Espań., 10, 425.
13. Malo, J. L., y Regueiro, B. 1959. Microbiol. Espań. 12, 65.
14. Malo, J. L., y Regueiro, B. 1959 Microbiol. Espań., 12, 139.
15. Malo, J. L., y Regueiro, B. 1959. Microbiol. Espań., 12, 243.

16. MARTÍN, S. M. 1955. Can. J. Microbiol., 1.645.
17. MARTÍN, S. M. 1957. Ind. Eng. Chem., 49, 1.231.
18. MARTÍN, S. M., y WATERS, W. R. 1952. Ind. Eng. Chem., 44, 2.229.
19. MOYER, A. 1953. J. Appl. Microbiol., 1, 7.
20. PERLMAN, D. 1943. Factors affecting the production of citric acid by *A niger*.
21. PERLMAN, D.; DORRELL, W. W., y JONHSON, M. J. 1946. Arch. Biochem., 10, 131.
22. PERLMAN, D.; KITA, D. A., y PETERSON, W. H. 1946. Arch. Biochem., 11, 123.
23. QUILICO, A., y DI CAPUA, A. 1934. Ann. Chim. Appl., 24, 355.
24. RAMAKRISHNAN, C. V.; STEEL, R., y LENTZ, C. P. 1955. Arch. Biochem. Biophys., 55, 270.
25. REY, R.: PAZ, D. M., y BERMEJO, F. 1949. Comunicación personal.
26. SHIGA, T. 1953. Agr. Chem. Soc. Japan, 27, 118.
27. STEEL, R.; LENTZ, C. P., y MARTÍN, S. M. 1954. Can. J. Microbiol. 1, 299.
28. WOODWARD, J. C.; SNELL, R. L., y NICHOLLS, R. S. 1949. U. S. Patent, 2.492.673.

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

LA PRODUCCION DE LA PUTREFACCION DE LA ALETA CAUDAL EN LOS PECES POR LA ACCION DE *AEROMONAS PUNCTATA*

POR

D. A. CONROY

INTRODUCCION

La condición conocida como putrefacción de la aleta caudal ("tail rot") es una enfermedad grave para los peces. En esos animales produce una putrefacción progresiva de la aleta caudal u otras aletas.

Aunque han sido realizados muchos estudios sobre el tratamiento de dicha putrefacción, el organismo que produce la enfermedad no es conocido con mucha certeza. Se sabe que la enfermedad se produce como resultado de acción bacteriana y, además, que puede ser complicada por una infección micótica secundaria.

Snieszko (3), citando el trabajo de Davis, dice que la importancia de bacterias en la putrefacción de la aleta caudal no ha sido completamente establecida, aunque se han visto unas bacterias no determinadas en los tejidos afectados, y que dichas bacterias han sido aisladas en algunos casos.

De truchas con putrefacción de las aletas ("fin rot"), Snieszko aisló *Haemophilus piscium, Aeromonas liquefaciens* y otras especies no bien determinadas.

Igualmente, van Duijn (5) considera que la enfermedad es provocada por bacterias, pero dice que todavía no se sabe cuáles son las especies causales. Haciendo referencia al trabajo de Rankin, el mismo

autor dice que organismos Gram-negativos y móviles han sido aislados por la toma de cultivos de aletas enfermas.

Wolf (6) opina que la falta de alimentación puede provocar los síntomas de putrefacción de las aletas en truchas.

En el presente artículo, el autor describe los resultados de unos experimentos en los cuales fueron inoculadas unas carpas con *Aeromonas punctata.* Este trabajo se inició con el objeto de determinar el efecto patógeno de la bacteria sobre peces, con referencia especial a su acción como causa del edema de ciprinos. Como los resultados son interesantes, se detallan en este trabajo, pensando que puedan aumentar nuestro conocimiento de las enfermedades bacterianas de los peces.

MATERIALES Y METODOS DE EXPERIMENTACION

La cepa de prueba de *A. punctata* fue recibida de la Colección Americana de Cultivos Tipo, y había sido previamente aislada de peces enfermos. Fue sembrada en caldo nutritivo, y se practicaron transferencias regulares en este mismo medio de cultivo.

Se instaló en el laboratorio un acuario de 25 l de capacidad. Después de haber recibido un lavado cuidadoso, fue puesta en el acuario arena muy fina hasta una profundidad de 2 cm. Plantas acuáticas (*Elodea sp., Myriophyllum sp.*) y caracoles (*Planorbis sp., Limnea sp.*) fueron lavados rigurosamente y puestos en el acuario, que se dejó a la temperatura ambiente durante un período de diez días. Provisto de aireación continua, se practicó diariamente una lectura del pH y de temperatura. Por haber dejado así el acuario, se calculó que en ausencia de peces, cualquier parásito presente hubiera muerto.

Una cantidad de nueve carpas doradas *(Carassius auratus)* fue comprada en la Veterinaria "Paúl", de esta ciudad, de las cuales tres eran plateadas.

En el laboratorio, las carpas fueron lavadas cuidadosamente con una corriente suave de agua, y puestas directamente en el acuario. De una vez, se añadió una pequeña cantidad de permanganato potásico, suficiente para dar al agua un color rosado. Este mismo tratamiento se realizó también cuarenta y ocho horas antes del experimento, para destruir

cualquier organismo patógeno que hubiera podido introducirse, no obstante las previas precauciones tomadas.

Fueron alimentadas diariamente las carpas con un producto comercial conteniendo *Daphnia, Cyclops* y plantas en polvo. Por medio de un sifón de vidrio, se efectuó una limpieza diaria del acuario, sacando así todo el residuo orgánico formado. Además, se practicó una observación bien cuidadosa de las carpas durante unos siete días, para notar cualquier síntoma de enfermedad o malestar.

Para la prueba, las seis carpas doradas fueron usadas como animales experimentales, recibiendo cada una un inóculo de 0,1 ml/g de peso de un cultivo de *A. punctata* de treinta y seis horas. El peso de cada carpa había sido calculado previamente al ser introducida en una cantidad de agua de peso conocido, y tomando lectura de la diferencia. Fue aplicada una inyección intraperitonal, según la técnica descrita por Conroy y Hughes (1).

Las carpas plateadas fueron usadas como testigos negativos.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados de la temperatura y los valores del pH son expresados en el *cuadro 1*.

Cuadro 1

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura	18,0	19,5	20,0	19,5	19,0	18,0	18,5	19,0	20,5	20,0	19,0
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0

Se notó que desde el segundo hasta el cuarto día después de la inoculación, pequeñas hemorragias fueron visibles sobre las aletas caudales de cuatro de las seis carpas inyectadas. Esa condición se demuestra en la *figura 1*.

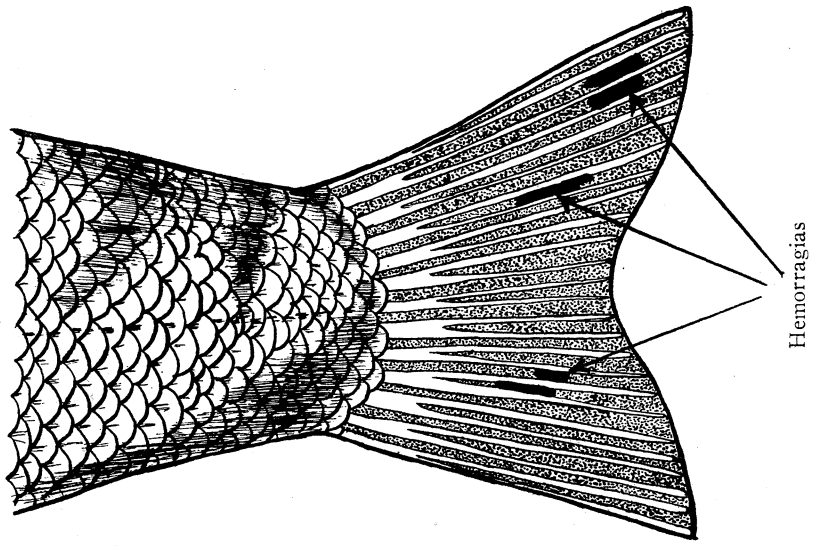


Figura 1

Hacia el quinto día empezó una putrefacción progresiva de la aleta caudal, la cual fue acompañada por una decoloración del órgano. Dicho síntoma aparece en la *figura 2.*

La condición se empeoró gradualmente y resultó la pérdida completa de la aleta caudal en las carpas afectadas, degenerando los radios al final.

Junto con los otros síntomas provocados, los cuales no se considerarán en este trabajo, la muerte de las carpas fue causada por el organismo. No se notó desarrollo de hongos sobre las aletas caudales enfermas, y los testigos negativos permanecieron libres de infección durante el curso del experimento.

De los resultados arriba expuestos, parece que los síntomas típicos de la putrefacción de la aleta caudal fueron provocados por *A. punctata.* Antes de ser inoculadas con la bacteria, las carpas estaban en condición perfecta, y sus aletas completamente libres de daño.

Es de interés notar que para Snieszko (4), *A. punctata* es nada más que una cepa de *A. liquefaciens.* La misma conclusión es sostenida por Eddy (2). Por eso, se ve la posibilidad de una semejanza entre la pu-

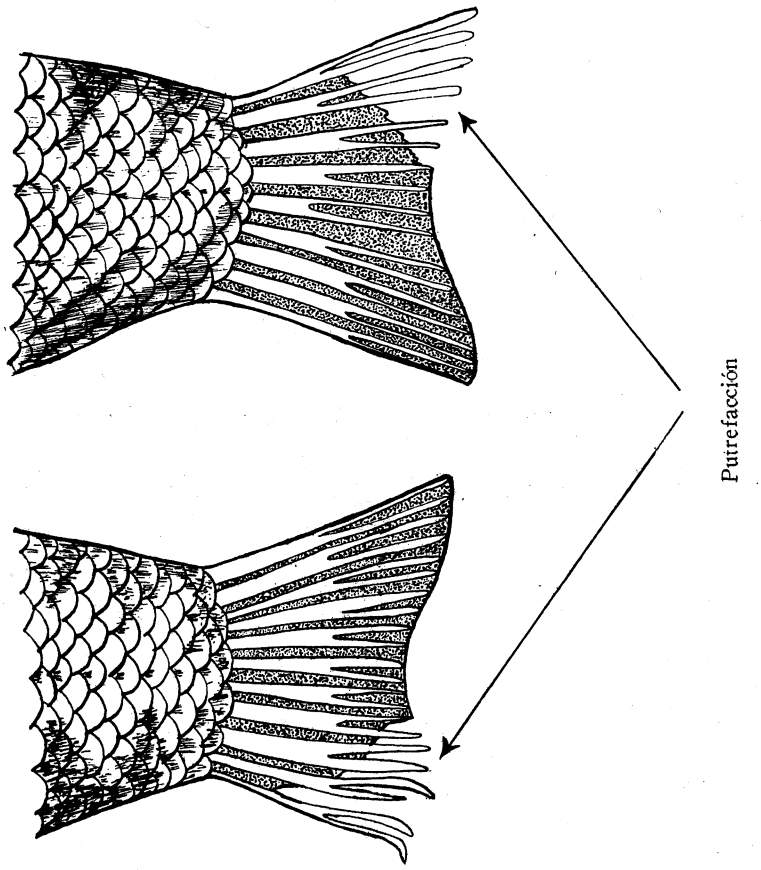


Figura 2

trefacción de las aletas descrita por Snieszko (3) y el aislamiento de *A. liquefaciens* de la enfermedad, y la condición provocada experimentalmente en carpas doradas por *A. punctata.* Es de esperar que en el estudio de brotes naturales de la putrefacción de la aleta caudal en peces, se podrá demostrar también la presencia de *A. punctata,* para comprobar su papel como agente causal.

RESUMEN

Se describe la producción de síntomas típicos de putrefacción de la aleta caudal en carpas doradas después de la inyección de *Aeromonas punctata*. Se produjo la pérdida de la aleta caudal en cuatro de un total de seis peces inyectados. Se considera que *A. punctata* puede ser el organismo causal de esta enfermedad.

SUMMARY

The development of typical symptoms of tail rot in goldfish following injection with *Aeromonas punctata* is described. This condition resulted in the loss of the tail in four out of six fish injected, and it is considered that *A. punctata* may well prove to be the causal organism of the disease.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Prof. Dr. Luis C. Verna el interés demostrado en el desarrollo de este trabajo.

También quiere expresar su gratitud a su esposa por la ayuda técnica prestada y por las ilustraciones que figuran en el texto.

BIBLIOGRAFIA

1. Conroy, D. A., y Hughes, M. C. 1960. Notes on the handling of fish for injection. J. Animal Technicians Assoc., 11, 3-4 .
2. Eddy, B. P. 1960. Cephalotrichous, fermentative gram negative bacteria: The genus *Aeromonas*. J. Appl. Bacteriol., 23, 216-49.
3. Snieszko, S. F. 1953. Therapy of bacterial fish diseases. Trans. Am. Fisheries Soc, 83, 313-30.
4. Snieszko, S. F. 1958. Freshwater fish diseases caused by bacteria belonging to the genera *Aeromonas* and *Pseudomonas*. U. S. Fish and Wildlife Service, Fisheries Ser., 459.
5. Van Duijn, C. 1956. Diseases of fishes, 95-97, Water Life Ltd., Londres.
6. Wolf, L. E. 1938. Effect of amount of food on fin condition of fingerling trout. Progressive Fish Culturist, 39, 16-18.

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

LAS CAUSAS DE UN BROTE DE PUTREFACCION DE LA ALETA CAUDAL EN LOS PECES Y SU TRATAMIENTO CON KANAMICINA *

POR

D. A. CONROY

INTRODUCCION

Una de las enfermedades más comunes en los peces es la putrefacción de la aleta caudal ("tail rot"). Hoy se tiene la firme sospecha de que la enfermedad se produce como consecuencia de la acción bacteriana, ya que en muchos casos se aislaron bacterias de los tejidos afectados. Con todo, su origen y el agente causal no han sido aún concretamente establecidos.

Snieszko (5) aisló de truchas que presentaban putrefacción de las aletas, *Haemophilus piscium, Aeromonas liquefaciens* y otras bacterias no bien determinadas. Sin embargo, el trabajo de Snieszko y cols. (7) sobre la patogenicidad de *H. piscium* no mencionó los síntomas de putrefacción de la aleta caudal, por cuyo motivo es posible suponer que *A. liquefaciens* fue el organismo que causó el brote descrito.

Van Duijn (8), refiriéndose al trabajo de Rankin (4), estableció que se pueden aislar del tejido afectado por la enfermedad unas bacterias móviles Gram-negativas, pero desgraciadamente no da detalles sobre su identidad o acción patógena.

Fue demostrado por el autor (1) que la bacteria conocida como *A. punctata* puede provocar experimentalmente los síntomas de la putre-

(*) Trabajo presentado en la reunión celebrada por la Asociación Argentina de Microbiología, en Buenos Aires. Noviembre de 1961.

facción de la aleta caudal. Después de terminado este trabajo, una coincidencia afortunada permitió al autor investigar un brote natural de dicha putrefacción en carpas doradas y al considerarlo de gran interés con relación al trabajo citado, se intentó determinar el agente microbiano causal y tratarle con kanamicina. En la presente comunicación se recogen los resultados obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

Por la amabilidad de un colega, el autor pudo obtener tres carpas doradas con putrefacción de la aleta caudal. Las carpas habían sido mantenidas en un acuario junto con otras, y el brote llamó la atención del dueño dos o tres días antes de su envío a la Cátedra. Al recibirlas, fueron examinadas con toda minuciosidad. Se notó que las aletas caudales tenían numerosas manchas rojas de aspecto hemorrágico y que los bordes tenían en todos los casos una coloración blanca. Esta característica se puede ver en las *figuras 1-2*. Se observa la marcada semejanza con la condición provocada experimentalmente por *A. punctata* (1).

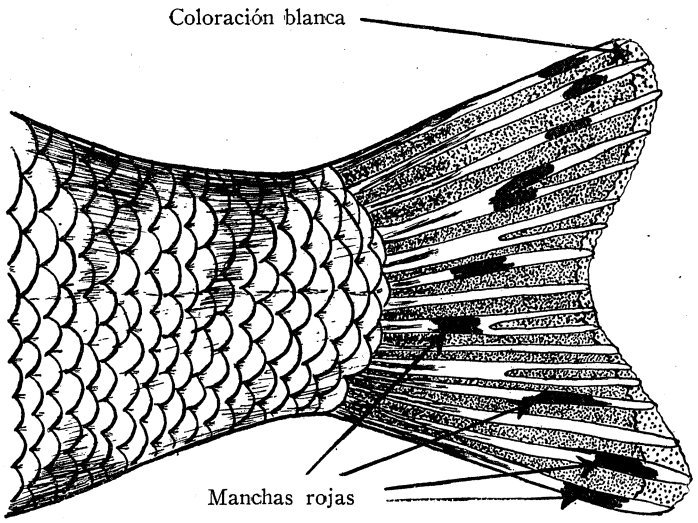


Figura 1

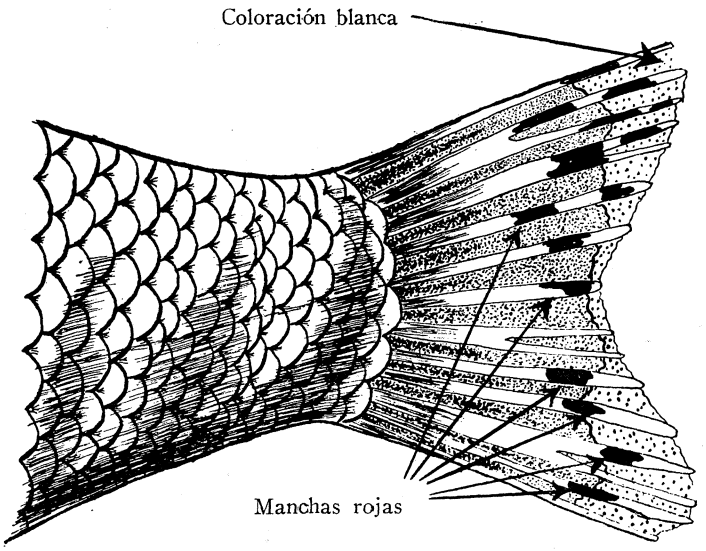


Figura 2

En una carpa se limpió la aleta caudal con un pedazo de algodón mojado en lugol yodado y se cortó una pequeña porción del tejido afectado, empleando tijeras y pinzas esterilizadas con la llama del alcohol. El tejido afectado se introdujo asépticamente en un tubo de caldo glucosado conteniendo perlas de vidrio; se agitó el tubo para producir la desintegración del tejido y con un asa se estrió una gota en dos placas con agar-caldo. Estas placas fueron incubadas: una, a la temperatura del ambiente, y otra, a 37 °C.

Después de su incubación, fueron examinadas las placas, verificando la presencia de colonias, que fueron aisladas en cultivos puros. No se observó desarrollo a 37 °C. En la placa incubada a temperatura ambiente, se observaron tres tipos distintos de colonias, que se denominaron "organismo A", "organismo B" y "organismo C", respectivamente. Un estudio de los microorganismos dio los resultados siguientes:

Organismo A. Colonia elevada, bordes enteros, color rosado. Se comprueba por examen microscópico la presencia de células levaduriformes. Este organismo fue identificado luego como *Rhodotorula glutinis* por los Dres. R. C. Artagaveytia Allende y Olga Maguregui.

Organismo B. Se encontraron dos colonias solamente, observándose una evidente coloración amarilla; a la observación microscópica, los organismos presentaban formas en paquetes de cocos Gram-positivos, por cuyo motivo se clasificó el organismo como una especie de *Sarcina,* posiblemente *S. lutea.*

Organismo C. Estas colonias, sin color, se hallaron en gran número, constituidas por bacterias móviles y Gram-negativas. Se preparó un subcultivo en agua peptonada, inoculando una serie de azúcares, medio de Koser y gelatina. Además, fueron preparados dos antibiogramas con discos conteniendo 30 γ de kanamicina cada uno.

El organismo produjo ácido y un poco de gas en glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa levulosa y manitol. No hubo cambio en lactosa, xilosa, rhamnosa, rafinosa y dulcitol; licuó rápidamente la gelatina, y el medio de Koser dio un resultado negativo después de cinco días de incubación a la temperatura ambiente. La reacción de indol fue positiva en agua peptonada.

Los antibiogramas, después de veinticuatro horas de incubación, dieron una zona de inhibición de 20-21 mm de diámetro.

Se inyectó inmediatamente a las tres carpas doradas una sola inyección de kanamicina por vía intraperitoneal, en una concentración de 20 γ/g de peso. Se realizaron cuidadosas observaciones para determinar si la inyección evitó el desarrollo de la enfermedad.

Nos pareció sumamente interesante determinar precisamente la acción patógena del "organismo C" y verificar si se pueden producir experimentalmente los síntomas de la putrefacción de la aleta caudal en carpas sanas. Con este motivo fueron inoculadas cuatro carpas doradas por vía intraperitoneal, utilizando la técnica descrita por Conroy y Hughes (2), inyectando 0,2 ml de un cultivo de veinticuatro horas del organismo en agua peptonada a cada carpa. Se practicaron observaciones diarias para determinar la presencia de síntomas de la enfermedad.

RESULTADOS

Durante los ensayos de patogenicidad, y después de inoculadas, se observó la muerte de las cuatro carpas, una al tercer día, una al cuarto día, una al quinto día y la última al sexto día. Todas las carpas mostraron

la presencia de manchas rojas en la aleta caudal y empezó rápidamente la putrefacción de este órgano *(figura 3)*. En algunos casos se produjeron pequeñas petequias en el tejido cerca de la aleta caudal (*figura 4*). Es de gran interés el hecho de que en dos carpas se vieran síntomas de

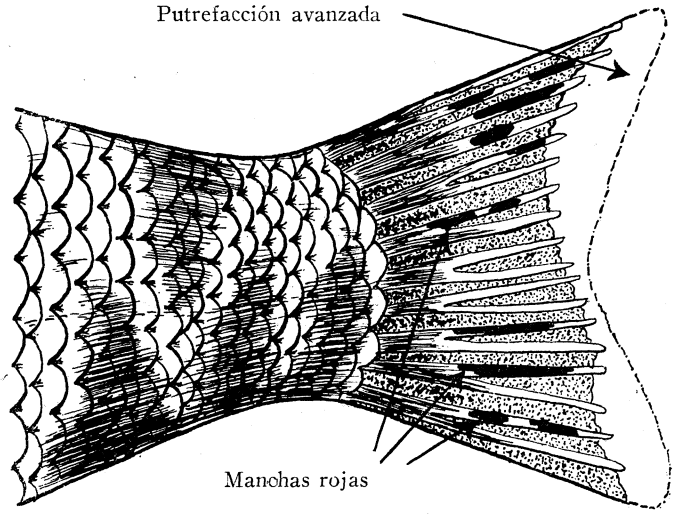


Figura 3

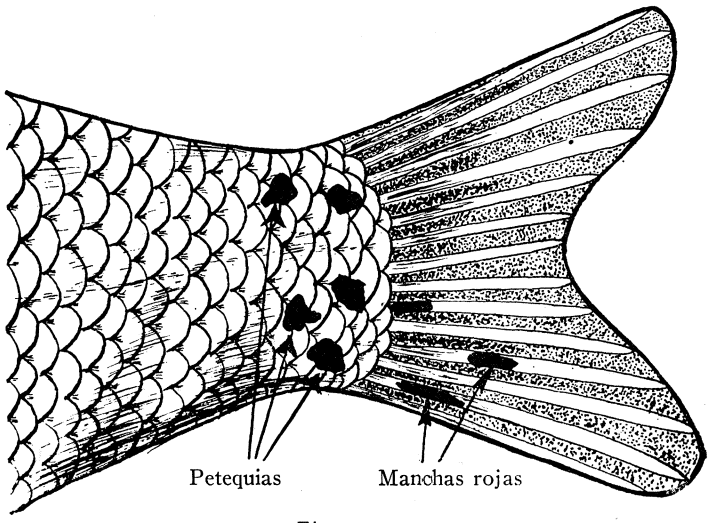


Figura 4

putrefacción de la boca ("mouth rot") como se observa en la *figura 5*. Esta condición se manifiesta por la producción de hemorragias en el tejido cartilaginoso, que queda al final destruido.

Asimismo, existe poca duda de que el "organismo C" es el mismo organismo que causó el brote descrito y posee una marcada acción patógena para las carpas doradas.

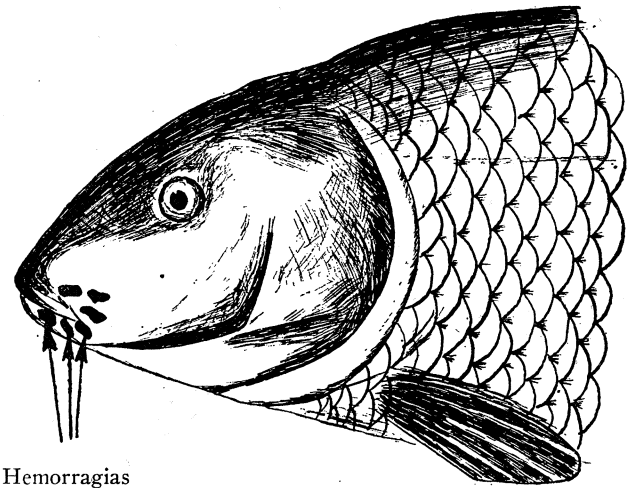


Figura 5

Al cabo de veinticuatro horas después de la inyección de kanamicina, las carpas enfermas mejoraron en forma notable, habiendo desaparecido completamente todas las manchas rojas de la aleta caudal; no se desarrolló más la infección. No se observaron otros síntomas durante el curso de diez días, y al fin de este período se cortó el tejido afectado de las aletas caudales.

DISCUSION

La acción sobre varios azúcares, la producción de indol, la licuación de gelatina, la movilidad y coloración Gram-negativa, son todos caracteres típicos de las especies de *Aeromonas* patógenas para los peces y no hay mucha dificultad en clasificar el "organismo C" dentro de este gé-

nero. Una revisión completa del mismo género ha sido propuesta por Eddy (3), por la cual la mayoría de las especies patógenas para los peces son incluidas en el conjunto de *A. liquefaciens*. Aunque los síntomas provocados en este caso tiene una gran semejanza con los producidos por *A. punctata,* el organismo se clasifica provisionalmente como *A. liquefaciens*. Es de recordar que esta misma especie incluye el organismo conocido anteriormente como *Aeromonas* o *Pseudomonas punctata*. Actualmente no hay una descripción del agente que produce la putrefacción de la aleta caudal y se sugiere por los resultados expuestos aquí y en el trabajo anterior, que la enfermedad puede ser provocada por *A. liquefaciens* (*A. punctata*).

Los resultados de este trabajo son de interés, ya que demuestran la posibilidad de brotes de putrefacción de la aleta caudal en peces de la Argentina, motivados por especies de *Aeromonas*. Por otro lado, se ha demostrado por los resultados obtenidos que una sola inyección de kanamicina en una concentración de 20 γ/g de peso y por vía intraperitoneal, es un método terapéutico muy efectivo contra esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Tengo sumo gusto en expresar mi mayor gratitud al Prof. Dr. Luis C. Verna por su constante interés en el desarrollo de este trabajo y por haberme ofrecido la oportunidad de realizarlo en su Cátedra.

Asimismo, quiero agradecer a los Dres. R. C. Artagaveytia Allende, de la Universidad de Montevideo, y Olga Maguregui, de esta Cátedra, la identificación de *Rhodotorula glutinis*.

Además, quiero dar las gracias a mi esposa por la ayuda técnica prestada y por las ilustraciones que figuran en el texto.

RESUMEN

Se describe un brote natural de putrefacción de la aleta caudal en carpas doradas. De los tejidos afectados, se aisló en grandes cantidades un organismo semejante al *Aeromonas liquefaciens (A. punctata)*, y se comprobó su patogenicidad por inoculación en peces sanos, en los cuales se desarrollaron síntomas típicos. Una sola inyección de kanamicina bastó para dominar la enfermedad.

SUMMARY

The investigation of a natural outbreak of tail rot among goldfish is described. An organism having characteristics resembling those of *Aeromonas liquefaciens* (*A. punctata*) was isolated from the diseased tissues in large numbers, and shwn to be pathogenic on inoculation into healthy fish, in which typical symptoms of the condition were reproduced. Rapid control of the disease was obtained by means of a single injection of kanamycin, by the action of which further spread of the condition was prevented.

BIBLIOGRAFIA

1. Conroy, D. A. 1961. La producción de la putrefacción de la aleta caudal en los peces por la acción de *Aeromonas punctata*. Microbiol. Espań., 14, 233.
2. Conroy, D. A., y Hughes, M. C. 1960. Notes on the handling of fish for injection. J. Animal Technicians Assoc., 11, 3-4.
3. Eddy, B. P. 1960. Cephalotrichous, fermentative gram negative bacteria: The genus *Aeromonas*. J. Appl. Bacteriol., 23, 216-49.
4. Rankin, I. M. 1953. New cure for fin rot. Water Life, 8, 251-52. Cit. van Duijn.
5. Snieszko, S. F., 1953. Therapy of bacterial fish diseases. Trans. Am. Fisheries Soc., 83, 313-30.
6. Sniesko, S. F. 1958. Freshwater fish diseases caused by bacteria belonging to the genera *Aeromonas* and *Pseudomonas*. U. S. Fish Wildlife Serv., Fisheries leaflet, 459.
7. Snieszko, S. F.; Griffin, P. J., y Friddle, S. B. 1950. A new bacterium (*Haemophilus piscium* n. sp.) from ulcer disease of traut. J. Bacteriol., 59, 699-710.
8. Van Duijn, C. 1956. Diseases of fishes, 95-97. Water Life Ltd., Londres.

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

DIFERENCIACION DE ESPECIES DEL GENERO *AZOTOBACTER* POR LA CONCENTRACION DE COLORANTES EN SUS COLONIAS

POR
V. CALLAO y E. HERNANDEZ

En publicaciones anteriores de Callao y Montoya (2-3) y de Callao, Montoya y Hernández (4) se ha puesto de manifiesto la actuación de ciertos colorantes que son capaces de inhibir selectivamente el desarrollo, en medios sólidos, de las bacterias pertenecientes a las diferentes especies del género *Azotobacter,* los efectos producidos por el telurito potásico sobre el crecimiento de los mismos microbios y la preparación de discos de papel, impregnados con aquellas sustancias, cuya aplicación proporciona un método rápido para identificar a estos gérmenes.

Al mismo tiempo, estudiando la producción de ácidos por las diferentes especies del género y la utilización de distintos glúcidos por las mismas bacterias, como factores de desarrollo en medios sólidos a los que se añadía, con la fuente hidrocarbonada, un indicador de acidez (5), se observó que ciertos indicadores aparecían concentrados en el interior de las colonias, y esa concentración adquiría una forma determinada, según los diferentes tipos de *Azotobacter* que se utilizaban. Observando entonces el desarrollo de los *Azotobacter* en medios cuya concentración en colorantes no indicadores de acidez, no inhibiera su crecimiento, se vio cómo también en el interior de las colonias existía mayor intensidad de color que en el medio de cultivo, y que esa concentración adquiría una morfología diferente según la especie microbiana ensayada. La observación de este fenómeno nos ha llevado a comprobar cómo el

modo de concentración de alguna de estas sustancias colorantes puede constituir un método de gran valor taxonómico para la identificación de las especies de este importante género.

MATERIALES Y METODOS

Organismos

Se han utilizado 6 razas de *Azotobacter chroococcum* (razas 0-1, procedente del Instituto Pasteur de París, y 17, 55, 103, 331 y 567, de nuestra colección, aisladas en nuestros laboratorios, de los suelos de la Vega granadina), 4 razas de *A. vinelandii* (0-2 y 621, 688, 704 y 705), 4 razas de *A. agilis* (0-3 y 44, 573 y 701), y 6 razas de *A. beijerinckii* (0-4 y 11, 546, 586, 592 y 597). Todos estos gérmenes fueron previamente clasificados, de acuerdo con las técnicas de Jensen y Petersen (6) y el esquema de Callao y Montoya (2).

Medios

En todas las experiencias se utilizó el agar, medio básico 77 de Allen (1), pero con objeto de facilitar el crecimiento de las razas de *A. agilis* fue sustituida la manita por una mezcla de maltosa y glucosa, ambas a concentraciones respectivas de 0,5 por ciento (p/v).

Colorantes

Se ensayaron los siguientes colorantes: azul de metileno (Geigy), azul alcalino B (Grubler), azul nilo (Geigy), verde brillante (Sandoz), verde de metilo (Merck), verde malaquita (Merck), rojo neutro (Geigy), rojo fenol (Grubler), rojo congo (Merck), pironina (Geigy), safranina T (Merck), tionina (Geigy), cristal violeta (Merck), fucsina diamante (Merck), fucsina ácida (B. D. H.), sudan III (Geigy) y pardo de Bismark (Geigy).

Los colorantes fucsina diamante, sudan III y cristal violeta se prepararon en solución alcohólica y a concentración de 0,2 por ciento (p/v)

y los restantes en solución acuosa y a la misma concentración. Cada disolución del colorante se distribuyó en ampollas de 5 ml y se esterilizó a 100 °C durante una hora.

Técnica

A matraces con 50 ml del medio básico de Allen, con glucosa y maltosa, previamente fundido y mantenido a la temperatura de 45 °C se añadieron cantidades medidas de la disolución del colorante respectivo, para conseguir la concentración deseada del mismo. La operación se realiza estérilmente. La concentración en el medio, para que el fenómeno se observe en las condiciones óptimas, varía según los colorantes, estando comprendida entre el 1/25.000 y 1/200.000 (p/v).

Después de la adición de la cantidad precisa de la disolución del colorante, se agita para repartirlo uniformemente y se reparte en placas petri, que se dejan solidificar. La siembra se efectuó por diseminación en la superficie de las placas con suspensiones de *Azotobacter* procedentes de cultivos de cuarenta y ocho horas. Las placas así sembradas se incubaron en la estufa a 28 °C y el desarrollo de los gérmenes se observa a las cuarenta y ocho, setenta y dos y noventa y seis horas después de la inoculación.

RESULTADOS Y DISCUSION

No todos los colorantes que fueron ensayados aparecen concentrados en el interior de las colonias de *Azotobacter* desarrolladas en medio sólido. Solamente ocurrió de modo positivo el fenómeno en los que reseñamos a continuación y a las concentraciones que indicamos: azul de metileno, entre el 1/25.000 y 1/50.000 (p/v); verde de metilo, 1/50.000-1/100.000; rojo neutro, 1/25.000-1/50.000; rojo congo, 1/50.000-1/100.000, y safranina, 1/100.000-1/200.000. El *A. agilis* solamente concentra al rojo neutro. Los otros colorantes probados no aparecieron concentrados a las diluciones que permitían el crecimiento de los gérmenes. A las cuarenta y ocho horas de incubación, puede observarse ya la iniciación del fenómeno, aunque debido al pequeño tamaño que presentan entonces las colonias no puede apreciarse perfectamente la forma de hacerlo. A

las setenta y dos y noventa y seis horas de incubación, las diferencias se observan ya muy marcadamente.

Entre los colorantes positivos, se consiguen los mejores resultados con azul de de metileno, rojo neutro y verde de metilo, a la concentración de 1/50.000 (p/v) para cada uno de ellos.

Las colonias de *A. chroococcum* aparecen a la cuarenta y ocho horas de cultivo, en medio con rojo neutro al 1/50.000; pequeñas, circulares y presentan su borde incoloro, una zona ancha intensamente coloreada y un pequeño punto central también incoloro. Esto puede observarse perfectamente en la microfotografía correspondiente a la *figura 1*, en la que se ha aumentado el tamaño de la imagen con el fin de permitir apreciar el pequeño punto central incoloro. A las noventa y seis horas, las colonias presentan un tamaño mucho mayor y están casi uniformemente coloreadas, presentando solamente en su parte central, una coloración más débil y habiendo desaparecido aquel punto central incoloro (*figura 2*).

Las colonias de *A. beijerinckii*, a las cuarenta y ocho horas de su desarrollo, en medio con rojo neutro al 1/50.000, muestran un botón central intensamente coloreado, presentando el resto una coloración mucho más débil, como puede apreciarse en la *figura 3*. A las noventa y seis horas, las colonias son de gran tamaño, siendo su coloración igual que a las cuarenta y ocho horas (*figura 4*).

En las colonias de *A. vinelandii*, a las noventa y seis horas de desarrollo, en presencia de rojo neutro, se diferencian cuatro zonas desigualmente coloreadas y perfectamente delimitadas. La más exterior es incolora, después aparece una franja estrecha que está intensamente coloreada, sigue otra muy ancha y débilmente coloreada, siendo el centro puntiforme e intensamente coloreado (*figura 5*). Esta delimitación de zonas empieza ya a notarse a las cuarenta y ocho horas de desarrollo, aunque la diferenciación clara no se presenta hasta los cuatro días, en que la colonia ha aumentado de tamaño. La *figura 6* corresponde a colonias de *A. vinelandii*, de seis días de desarrollo, en medio con rojo neutro. En ella se aprecia cómo se ha perdido ya la clara diferenciación entre las zonas que existe en los cultivos más recientes.

El *A. agilis* solamente concentra al rojo neutro y lo hace en forma de un botón central intensamente coloreado, que se difumina lentamente

desde el centro hasta la periferia, que aparece incolora. Las *figuras 7-8* corresponden a colonias de cuarenta y ocho y noventa y seis horas de crecimiento, respectivamente.

Como podemos, pues, observar, cada especie tipo de *Azotobacter* presenta colonias cuya morfología es totalmente diferente, siendo igual para cada una de las razas pertenecientes a la misma especie. Ello nos hace suponer que aplicando la técnica que aquí exponemos, sería posible diferenciar en poco tiempo y de manera muy clara las cepas desconocidas de bacterias aisladas del género *Azotobacter*.

RESUMEN

Las especies del género *Azotobacter*: *A. chroococcum, A. beijerinckii* y *A. vinelandii,* concentran en sus colonias a los colorantes azul de metileno, rojo neutro y verde de metilo a la concentración, en el medio de cultivo, de 1/50.000. El *A. agilis* solamente concentra al rojo neutro. Este método puede servir para la rápida y clara diferenciación entre las especies del género *Azotobacter*.

SUMMARY

It is possible to difference between species of the genus *Azotobacter,* when they are developed in presence of some dyes at concentratión of 1/50.000 (w/v). *A. chroococcum, A. beijerinckii* and *A. vinelandii* are able to concentrate in their colonies the dyes neutral red, methylene blue and methyl green, in a different way for every species. *A. agilis* only fixes the neutral red, in these experimental conditions.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, O. N. 1951. Experiments in soil bacteriology. Burgess Pub. Co., Minnesota.
2. CALLAO, V.. y MONTOYA, E. 1960. The use of dyes to distinguish between species of the genus *Azotobacter*. J. Gen. Microbiol., *22*, 657.

3. CALLAO, V., y MONTOYA, E. 1960. Efectos producidos por el telurito potásico sobre el desarrollo de los *Azotobacter* en medios de cultivo sólidos. Microbiol. Españ., 13, 351.
4. CALLAO, V.; MONTOYA, E., y HERNÁNDEZ, E. 1960. Diferenciación rápida de especies de *Azotobacter*. Comunicación al III Congreso Internacional de Agroquímica. Sevilla.
5. HERNÁNDEZ, E. 1959. Estudio bacteriológico y diferencial de las distintas especies del género *Azotobacter*. Tesis Doctoral en Farmacia. Granada.
6. JENSEN, V., y PETERSEN, E. J. 1955. Taxonomic studies on *Azotobacter chroococcum* Beij. and *Azotobacter beijerinckii* Lipman. Roy. Vet. and Agr. Coll. Yearb. Copenhagen, Den, Yearbook, 107.

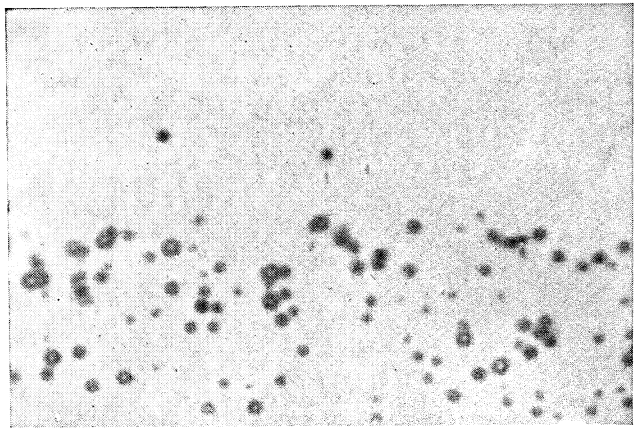


Figura 1. Concentración del rojo neutro por el A. chroococcum, *a las cuarenta y ocho horas*

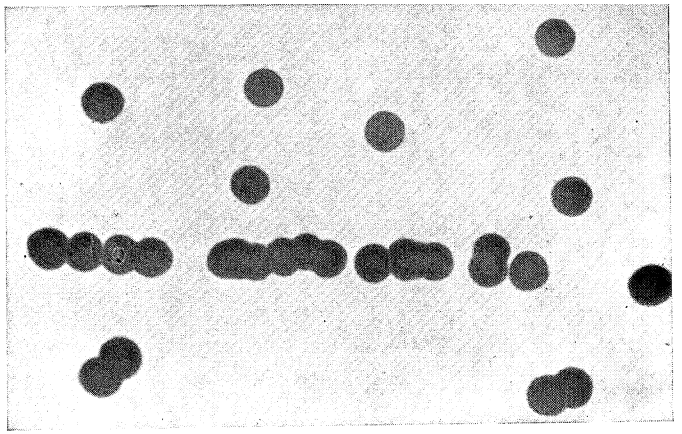


Figura 2. Concentración del rojo neutro por el A. chroococcum, *a las noventa y seis horas*

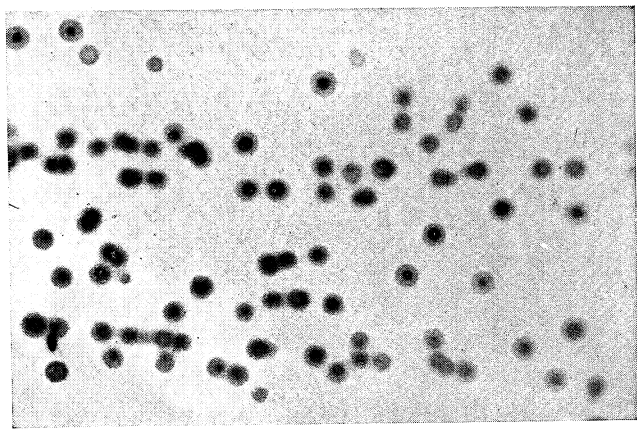


Figura 3. Concentración del rojo neutro por el A. beijerinckii, *a las cuarenta y ocho horas*

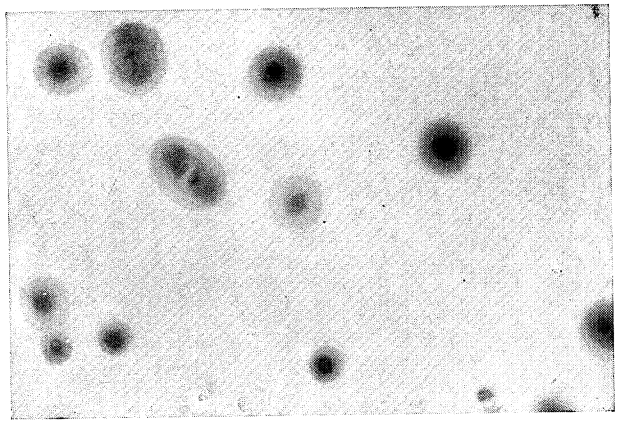


Figura 4. Concentración del rojo neutro por el A. beijerinckii, *a las noventa y seis horas*

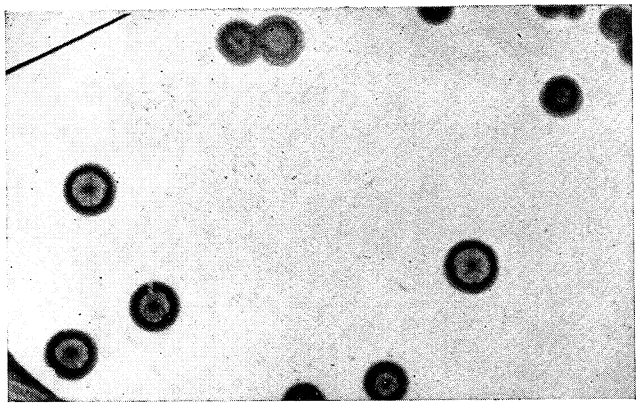


Figura 5. Concentración del rojo neutro por el A. vinelandii, *a las noventa y seis horas*

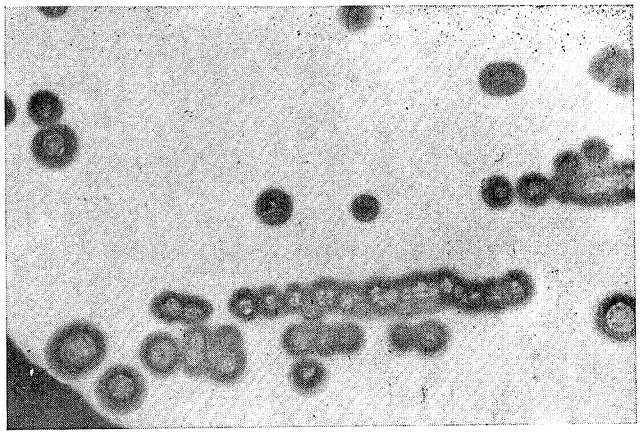


Figura 6. Concentración del rojo neutro por el A. vinelandii, *a los seis días*

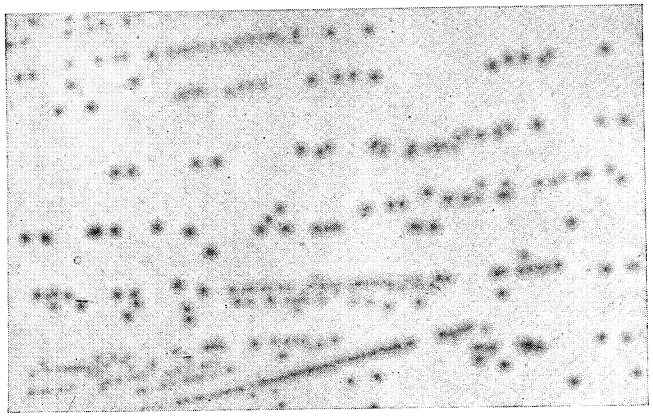


Figura 7. Concentración del rojo neutro por el A. agilis, *a las cuarenta y ocho horas*

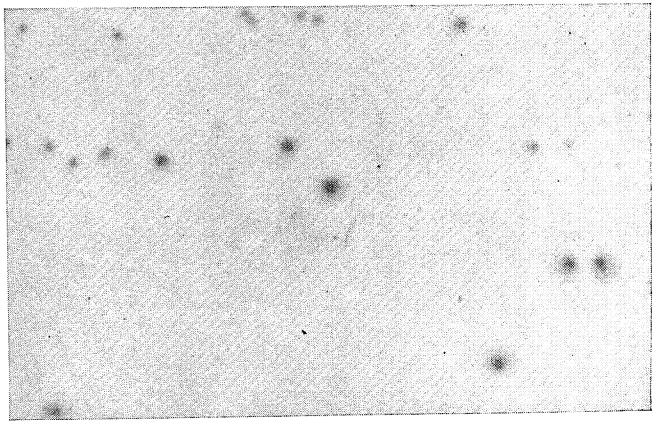


Figura 8. Concentración del rojo neutro por el A. agilis, *a las noventa y seis horas*

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DEL SUELO

EXTRACCION DE ENZIMAS DE MICRO-ORGANISMOS

POR
J. R. VILLANUEVA e ISABEL GARCIA-ACHA

El estudio de las enzimas intracelulares en microorganismos lleva implícita su liberación mediante la ruptura o alteración de la pared celular. Las paredes rígidas celulares de los organismos son muy resistentes, por lo cual se han ideado métodos especiales para desintegrarlas, de tal forma que las enzimas intracelulares se liberen en un estado activo. Los diferentes métodos que se pueden utilizar dependen en cierto grado de la resistencia de la enzima a una posible desnaturalización y de la dificultad que presente la pared celular a la desintegración. En general, conviene adelantar que la desintegración de las celulas bacterianas, de levaduras o de hongos para la liberación de las enzimas u otros componentes celulares, es un problema que presenta no pocas dificultades prácticas. Las condiciones para extraer ciertas enzimas pueden ser bastantes críticas y requieren la investigación de muchas variables.

Los métodos que han demostrado ser más efectivos en la liberación de enzimas de las células microbianas son los de cáracter mecánico de ruptura de la pared celular, con fragmentación al mismo tiempo de la membrana citoplasmática. En algunos casos más específicos, se ha recurrido a la ayuda de ciertas enzimas líticas o a un tratamiento con determinados disolventes orgánicos, no siempre útiles en la práctica, debido al poder desnaturalizante que implica su uso.

En general, la aplicación de uno u otro procedimiento depende de la especie de organismo, de la mayor o menor resistencia que presente a su

ruptura, de la proporción de enzima requerida y del tipo de preparación de que se parte para obtener el extracto. En última instancia, la selección del método puede depender de la sensibilidad de la enzima y su localización en la célula.

Para la obtención de una preparación enzimática nueva, en estado libre de células, se deberán realizar estudios previos con células intactas separadas del medio de cultivo, lavadas por sucesivas centrifugaciones y resuspendidas en agua destilada o en solución salina. Las investigaciones de la actividad enzimática se efectúan generalmente con suspensiones de células lavadas. Estas actividades enzimáticas tienden a disminuir con el tiempo, por lo que en muchos casos los organismos no se pueden conservar, aun a bajas temperaturas, en estado activo.

Para estudiar actividades enzimáticas de estas suspensiones de microorganismos, se van variando factores, tales como la composición y el pH del medio de cultivo, la temperatura de incubación, la fase de crecimiento o el momento de la toma de muestra, el grado de aerobiosis y en algunos casos la naturaleza y estirpe del organismo que se estudia.

Como consecuencia de estos ensayos preliminares, se seleccionan organismos que presenten actividades metabólicas elevadas y que puedan servir de material de origen de extractos enzimáticos para investigaciones posteriores.

METODOS PARA EL CRECIMIENTO DE CELULAS PARA ESTUDIOS ENZIMATICOS

Con frecuencia se requiere gran cantidad de células para la preparación de enzimas de microorganismos. En algunos casos se pueden obtener en el comercio grandes masas de células, como ocurre con las levaduras de panificación o de cerveza, pero, en general, el investigador necesita hacer crecer esas células en el laboratorio, utilizando dispositivos especiales.

Se han descrito una gran variedad de métodos para la producción de células para la preparación de enzimas (1, 9). Cuando el organismo se desarrolla en medio líquido, se utilizan técnicas especiales, según la cantidad del medio utilizado. Para microorganismos marcadamente aero-

bios, Peel (18) ha descrito un aparato con movimiento rotatorio, en el que se coloca un matraz esférico de 5-10 l. En otros casos, matraces conteniendo una elevada cantidad del medio de cultivo inoculado, se someten a un movimiento de vaivén, con sacudidas bruscas, en el interior de una estufa graduada a la temperatura óptima de crecimiento del organismo o de producción de la enzima en estudio. Este es el método utilizado más frecuentemente para el cultivo de muchas bacterias y, en especial, para los hongos. A veces puede ser necesaria la aplicación de una corriente de aire estéril, que fluye a presión a través del medio, si bien este método puede conducir a frecuentes interferencias, debido a contaminaciones. Para evitar riesgos como los expuestos, se puede hacer uso de una modificación descrita por Mitchel (16), mediante una técnica de vacío.

El cultivo de microorganismos anaerobios debe hacerse en atmósfera de un gas inerte apropiado. Además, es conveniente la adición de alguna substancia de carácter reductor, que no ejerza efecto señalado sobre la constitución enzimática de los organismos. La obtención de gran cantidad de células en estos casos es más difícil. La recogida de las células, una vez crecidas y comprobada su actividad, se puede hacer por centrifugación. En aquellos casos en que se utilizan varios litros de medio, es aconsejable una centrífuga de tipo continuo, como la "Sharples".

Actualmente y debido al desarrollo tan extraordinario que han alcanzado las técnicas de cultivo continuo de microorganismos, este método puede constituir un buen origen de células mantenidas en condiciones fijas, con características totalmente reproducibles y en concentraciones muy elevadas, si se compara con los cultivos ordinarios de carácter discontinuo.

A veces, los organismos pueden crecer sobre un medio sólido en grandes bandejas o en botellas de tipo Roux, de donde las células se recogen por arrastre y lavado, usando un líquido suspensor apropiado, agua destilada o solución salina, y luego se separan por centrifugación, como anteriormente hemos indicado.

Como además de las técnicas de cultivos de microorganismos, consideramos que la constitución del medio es de gran importancia en cuanto a factores que afectan a la formación y constitución enzimática de los microorganismos, sugerimos la consulta de los trabajos de Gale sobre estos aspectos (4, 5).

METODOS DE PREPARACION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS DE MICROORGANISMOS

Se describen los métodos de preparación de extractos enzimáticos de microorganismos más frecuentemente utilizados, tratando de destacar aquellos de un mayor interés práctico.

Congelado y descongelado

Especialmente con bacterias, ha tenido éxito la simple técnica de congelación a 15 °C y posterior descongelado, repitiendo la operación tres o cuatro veces. Se utiliza una suspensión concentrada de células lavadas. Después del tratamiento se diluye con solución tampón y la suspensión se centrifuga. El sobrenadante contiene el posible extracto enzimático. El rendimiento a veces es bajo, debido a la desnaturalización que sufren las enzimas si son lábiles y, además, el método no es eficaz para cualquier microorganismo.

Desecación por el aire

Este método ha tenido sólo aplicación con levaduras, facilitando su autólisis. Las células, una vez recogidas del medio de cultivo y lavadas, se extienden sobre la superficie de un papel de filtro y se dejan secar al aire. Las levaduras así desecadas, se resuspenden en agua o en un tampón apropiado y se agitan suavemente durante algún tiempo (10-30 min). Se centrifuga luego para separar el sobrenadante que contiene las posibles enzimas extraídas de las células.

Desecación lenta por vacío

El procedimiento es parecido al anterior, con la única diferencia de que la desecación se efectúa gradualmente haciendo el vacío, por ejemplo, en un desecador sobre una substancia deshidratante, hasta convertirse la masa de células en un polvo fino. Con determinados microorganismos ya autolizados, se facilita así la extracción de las enzimas, una vez suspendido el polvo en agua o en solución salina.

Liofilización

Este método ha sido particularmente útil para facilitar la extracción de enzimas lábiles. El fundamento es el conocido de la congelación y sublimación simultánea de la masa húmeda de células liofilizadas, las que pueden permanecer constantes durante varios años si se conservan a —20 °C y protegidas de la humedad.

Preparación de "polvos acetónicos"

Este método, uno de los más generalizados, posee la ventaja de su sencillez y de no requerir aparatos especiales para la obtención de los extractos enzimáticos.

Las células se separan del medio de cultivo por centrifugación, se lavan dos veces con agua destilada o solución salina y se suspenden de nuevo a concentración de 10 mg de células (secas)/cm^3. Esta suspensión de células se va añadiendo gota a gota sobre un volumen veinte veces mayor de acetona muy fría, y se agita vigorosamente hasta que tiene lugar la coagulación. Se dejan sedimentar las células coaguladas y se separa el sobrenadante por decantación. El sedimento se filtra a través de papel sobre un embudo Büchner, con succión moderada. El precipitado se lava con 100 ml de acetona fría y luego con otros 100 ml de éter frío. Se mantiene la débil succión durante unos minutos para favorecer el secado de la preparación, la cual se coloca en un desecador, sobre cloruro cálcico y al vacío. Cuando sea preciso, estas manipulaciones deben hacerse a temperatura baja (4 °C).

Los polvos preparados por este método pueden conservar su actividad durante varios meses.

Desintegración mecánica

Se han utilizado varios métodos para la liberación de las enzimas intracelulares de microorganismos. Todos ellos ocasionan la desintegración de las membranas y paredes celulares, facilitando la salida de las enzimas libres del citoplasma, pero no aquellas particuladas o unidas a determinados fragmentos celulares.

Por partículas abrasivas

Estos métodos consisten substancialmente en la destrucción de las paredes celulares de los microorganismos por rozamiento con partículas finas de cuarzo (11) o de alúmina (13).

Las células lavadas se congelan y esta masa se coloca en un mortero de ágata que contiene el polvo de vidrio o alúmina (*) y que se ha mantenido durante varias horas a temperatura inferior a 0 °C. Suele utilizarse una cantidad de material disgregante equivalente a dos o tres veces el peso de las células húmedas. Utilizando el pistilo del mortero, se procede a moler durante unos diez minutos, hasta lograr una pasta. Esta se mezcla luego con una solución tampón refrigerada. La suspensión obtenida se coloca en un tubo de centrífuga, y se centrifuga primeramente a unas 1.000 g. Así, se sedimenta la alúmina o el vidrio, junto con algunas células que hayan quedado intactas. El sobrenadante se recoge y se centrifuga de nuevo, pero a 5.000 g en una centrífuga tipo "Servall". Se depositan los restos celulares y el sobrenadante obtenido contiene el extracto enzimático. Si la estabilidad de la enzima lo requiere, todas estas centrifugaciones deben efectuarse a baja temperatura.

Por partículas de vidrio

El método más utilizado es el de la técnica descrita por Mickle (15), que se funda en la agitación rápida de los microorganismos con diminutas partículas de vidrio (Ballotini núm. 12) (**). Los extractos enzimáticos se preparan en el aparato de Mickle (*figura* 1), como sigue: las células lavadas se resuspenden en una solución tamponada o en agua destilada, a una concentración de 10-20 mg (en seco)/cm^3. Es conveniente precisar que una concentración de células mucho mayor puede ser un factor limitante para la ruptura. 10 cm^3 de esta suspensión se ponen en una de las vasijas de vidrio del aparato y a continuación se añaden otros 10 cm^3 del polvo de vidrio. Estas vasijas se tapan bien y se ponen, si se considera necesario, en un baño con hielo para refrigerar la suspensión.

(*) Alúmina lavada se puede obtener de Buchler, Ltd.; Metalurgical Apparatus Evanston, Illinois (Estados Unidos de América del Norte).

(**) El polvo de vidrio Ballotini núm. 12 se puede obtener de English Glass Co, Ltd., Leicester (Inglaterra).

Seguidamente se coloca en el aparato, graduándolo de forma que la agitación sea la más efectiva. Cada cinco minutos se va siguiendo la desintegración de las células, observando muestras al microscopio.

Después de la desintegración, el contenido de cada vasija se decanta en tubos que se someten a centrifugación, primero a 1.000 g para separar las células intactas y las partículas de vidrio, y después a 5.000 g para obtener un sobrenadante con el extracto enzimático.

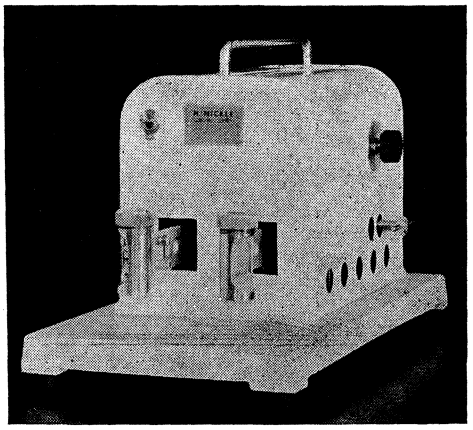


Figura 1

Otros investigadores han tratado de obtener extractos enzimáticos sometiendo los organismos a un proceso de agitación mecánica en una especie de "turmix" homogenizador (*), en presencia de partículas de vidrio (10). Este método puede presentar los inconvenientes expuestos para el de Mickle en cuanto a destrucción de las enzimas. La eficiencia del método depende mucho del organismo en estudio. Sin embargo, conviene decir que con este tratamiento muchas enzimas sufren una desnaturalización rápida, debida al calentamiento producido por el rozamiento de las partículas, lo que se traduce en una desaparición de la actividad enzimática que va paralela a su liberación en el medio (22).

(*) Tipo "Waring blendor".

Por ondas sónicas o ultrasónicas

Los efectos mecánicos producidos por las ondas sónicas o ultrasónicas al pasar a través de un líquido, se han utilizado para desintegrar microorganismos debido a las grandes presiones que se originan en el medio. Los efectos biológicos de las vibraciones sónicas y ultrasónicas han sido discutidas respectivamente, por Wood y Loonis (24), Loiseleur (12) y por Shropshire (21). Una interesante aportación en este campo es la más reciente de Davis (2), en donde se ofrece, además de un cuidadoso estudio de los factores que afectan a la eficiencia del método, un buen número de ejemplos a través de los que se puede apreciar la gran variabilidad existente en tiempo y facilidad de desintegración, con varios grupos de microorganismos. Este investigador facilita las siguientes conclusiones: el grado de desintegración de las células es una función inversa

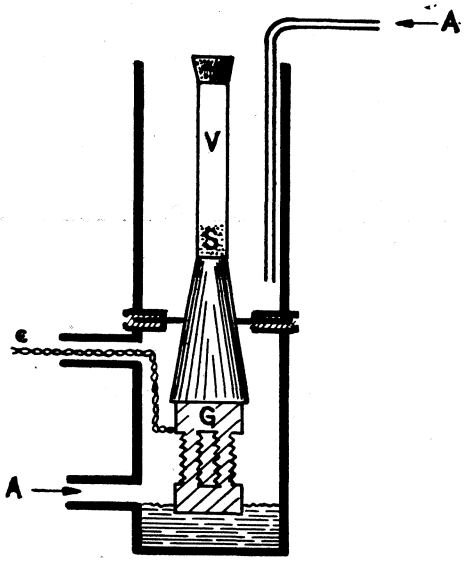


Figura 2. A: entradas de agua fría para refrigerar el sistema. V: vasija de acero inoxidable en donde se coloca la suspensión del organismo. S: suspensión celular microbiana. G: sistema de ultrasonido. C: cable que enlaza con el generador ultrasónico

del volumen de la suspensión que se expone al tratamiento ultrasónico, una función exponencial negativa del tiempo de exposición y relativamente independiente de la concentración de células.

La técnica consiste en colocar un pequeño volumen de la suspensión del microorganismo a una concentración variable, generalmente de 10-50 mg (en seco)/cm^3, en el tubo central situado en el interior de una vasija cilíndrica, en la que se provoca una refrigeración por medio de una corriente de agua fría o añadiendo pequeños trozos de hielo (*figura 2*). Una vez refrigerado el contenido del tubo, se somete a vibración ultrasónica durante breves períodos de tiempo, generalmente minutos o fracciones de minuto, y se van tomando muestras para ser observadas al microscopio, indicándonos el grado de desintegración alcanzado. Cuando se considere oportuno, se toma la suspensión del material celular con una pipeta y se deposita en un tubo, se centrifuga y se separan los extractos celulares del resto de las células intactas o parcialmente desintegradas.

En la actualidad, este método es uno de los más eficientes de todos los utilizados para la obtención de extractos enzimáticos, dada la sencillez de las manipulaciones y el corto tiempo necesario para la desintegración de los microorganismos. Un importante detalle a tener en cuenta es el elevado costo de los aparatos.

Por presión mecánica

Un método que combina bajas temperaturas con un corto tiempo de tratamiento mecánico ha sido descrito por Hughes (8). El conjunto del aparato diseñado por este investigador consta de dos partes (*figura 3*): una prensa propiamente dicha y un molde rectangular de acero inoxidable con canales, que se abre por la mitad, además de un pistón del mismo material, que presionará a la masa de células al colocarlo en la prensa. La masa de microorganismos, junto con un abrasivo apropiado, si es necesario, se coloca en un hueco cilíndrico del bloque de acero que previamente se ha enfriado a —15 °C ó —20 °C, haciéndola pasar a través de una ranura muy fina, de un canal a otro, con lo que se desintegran la mayoría de las células.

El mismo Hughes (8) facilita una relación de las enzimas extraídas por este método, demostrando también que es muy efectivo para la des-

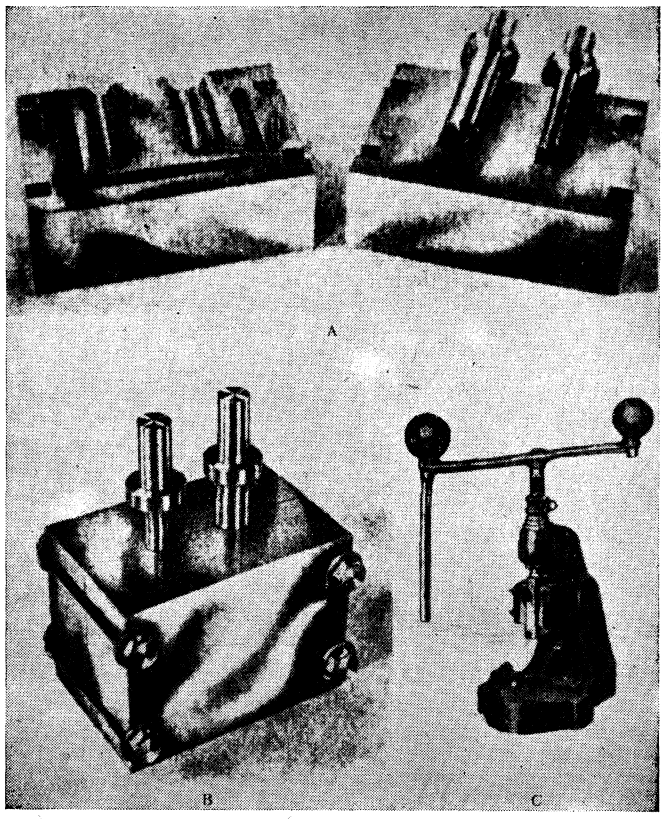


Figura 3

integración de esporas bacterianas y del micelio de hongos. El aparato es muy utilizado y de extraordinaria eficiencia, y en general, debido a la baja temperatura a la que se desintegran los organismos, no hay destrucción de las enzimas.

Recientemente, Edebo (3) ha descrito la prensa X, modificación de la de Hughes, que parece ser más efectiva.

Agentes enzimáticos

Estas técnicas se han utilizado solo en contados casos debido a la variedad tan limitada de microorganismos que pueden ser desintegrados

mediante el uso de enzimas capaces de digerir las paredes celulares, como por ejemplo, la lisozima. Otras enzimas de las consideradas proteolíticas han tenido menor difusión, debido a que pueden digerir las propias enzimas en estudio.

Para ver si el organismo es sensible a la acción de la lisozima, ésta se ha utilizado a concentración de 10-1.000 γ/cm^3. La enzima se añade a una suspensión de bacterias, de alrededor de 0,5 de densidad óptica, preparada en tampón de fosfato 0,067 M a pH 6,8 y conteniendo ClNa 0,01 M. Después de 15-30 min de incubación, las células se separan por centrifugación y el sobrenadante se utiliza como extracto enzimático.

Para la obtención de enzimas se ha utilizado también con resultado satisfactorio (14), la autólisis de los microorganismos en presencia de un tampón y de un agente conservador, como tolueno, éter o cloroformo.

En algunos casos ha resultado de interés práctico el tratamiento de células bacterianas con bacteriófagos, con el fin de producir la lisis para la obtención de extractos enzimáticos (20).

Agentes químicos

Se han descrito varios casos en la literatura, en los que la adición de una substancia química a la suspensión de células provoca rápidamente la liberación de extractos enzimáticos muy activos. El principal agente utilizado es la glicocola, que puede dar lugar a la liberación de más del 80 por ciento de la proteína total de la célula (7).

Gale y Taylor (6) y Salton (19), entre otros investigadores, han descrito la liberación de materiales celulares tratando ciertas especies de bacterias con los llamados "agentes tensiactivos". Sin embargo, muchos de estos compuestos son conocidos por la propiedad de producir una inactivación elevada de varios sistemas enzimáticos. Los agentes más usados son la polimixina (17), el CTAB, Aerosol-OT y el Twen 80, entre otros.

Combinación de dos o más métodos

Se ha utilizado la combinación de algunos de los métodos anteriores para la obtención de extractos enzimáticos. Por ejemplo, se ha preparado una enzima proteolítica a partir de una especie de *Bacillus,* repitiendo la técnica de congelación y descongelación, seguida de una molienda con

polvo de cuarzo en presencia de tolueno, a pH 7 y sucesiva extracción con agua durante tres o cuatro horas.

En otros casos se ha combinado el uso de un agente tensiactivo, la polimixina, con la técnica de preparación de polvos acetónicos (23) o bien el uso de este último método con un tratamiento ultrasónico (22).

LAS ENZIMAS EXTRACELULARES

Las enzimas extracelulares aparecen en el medio de cultivo donde se desarrolla el microorganismo que las produce. Para su obtención se centrifuga el cultivo y se separan las células, quedando la actividad enzimática en el sobrenadante. Tal es el caso de algunas enzimas hidrolíticas, amilasas y celulasas, que catalizan la descomposición del almidón y la celulosa; las proteolíticas, como la gelatinasa, o las del tipo de la lisozima producida por algunas especies de *Bacillus*.

RESUMEN

Se ha descrito un conjunto de métodos utiizados en la desintegración de microorganismos. Es importante destacar que los microorganismos varían extraordinariamente en la resistencia que ofrecen a la desintegración. La proporción de material extraido de los organismos tratados dependerá en gran parte del grado de desintegración obtenido. En general, se puede decir que a pesar del gran número de métodos descritos, es difícil encontrar uno totalmente satisfactorio. La desintegración a bajas temperaturas, especialmente cuando se trata de enzimas, es siempre conveniente.

SUMMARY

Disintegration of microorganisms is an important step in releasing many substances for biochemical study or practical use. These substances are often of great biological interest, but since they are labile, the techniques used for breaking up the cells are of great importance. This is ilustrated by the great number of methods that have been proposed, a

variety of which in itself suggests that a completely satisfactory technique is difficult to develop. For obvious reasons disintegration at low temperature is of particular interest.

Methods to disrupt bacterial and yeast cells and mold mycelium to give the so-called cell-free enzymes and other soluble cell constituents have been described. It should be noted that organisms vary considerably in their resistance to disruption. Once the cell wall has been disrupted, the debris can be treated to yield active cell-free enzymes. The amount of cell material obtained after disintegration and extraction will be dependent on the degree of disintegration produced.

BIBLIOGRAFIA

1. ALEXANDER, M., y WILSON, P. W. 1954. J. Appl. Microbiol., 2, 135.
2. DAVIS, R. 1959. Biochim. et Biophys. Acta, 33, 481.
3. EDEBO, L. 1961. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 52, 372.
4. GALE, E. F. 1943. Bacteriol. Rev., 7, 139.
5. GALE, E. F. 1946. Advances in Enzymol., 6, 1.
6. GALE, E. F., y TAYLOR, E. S. 1947. J. Gen. Microbiol., 1, 77.
7. GORDON, J.; HALL, R. A., y STICKLAND, L. H. 1951. J. Hyg., 49, 169.
8. HUGHES, D. E. 1951. Brit. J. Exp. Pathol. 32, 97.
9. HUGO, W. B. 1954. Bacteriol. Rev., 18, 87.
10. LAMANNA, C, y MALLETTE, M. F. 1954. J. Bacteriol., 67, 503.
11. LEE, S. B.; BURRIS, R. H., y WILSON, P. W. 1942, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 50, 96.
12. LOISELEUR, J. 1945. Ann. Inst. Pasteur, 71, 378.
13. Mc. ILWAIN, H. 1948. J. Gen. Microbiol. 2, 186.
14. Mc. ILWAIN, H. 1948. J. Gen. Microbiol. 2, 288.
15. MICKLE, H. 1948. J. Roy. Microscop. Soc., 68, 10.
16. MITCHEL, P. 1949. Nature, 164, 846.
17. NEWTON, B. 1956. Bacteriol. Rev., 20, 14.
18. PEEL, J, L, 1959, Tesis Doctoral, 68. Universidad de Cambridge.
19. SALTON, M. R. J. 1951. J. Gen. Microbiol., 5, 391.
20. SHER, I. H., y MALLETTE, M. F. 1953. J. Biol. Chem., 200, 257.
21. SHROPSHIRE, P. 1947. J. Bacteriol., 53, 685.
22. VILLANUEVA, J. R. 1959. Tesis Doctoral, 66. Universidad de Cambridge.
23. VILLANUEVA, J. R. 1959. Nature, 184, 1.565.
24. WOOD, R. W., y LOONIS, A. L. 1927. Phil. Mag., 4, 417.

SEMANA DE ESTUDIO EN LA ACADEMIA PONTIFICIA

La Academia Pontificia de Ciencias, además de sus sesiones normales de trabajo, celebra "Semanas de estudio" sobre temas determinados. En cada caso, la Academia invita a científicos del máximo relieve para que, junto con los académicos especialistas, se reúnan en Roma y procedan al examen y discusión del tema correspondiente. En el marco de estas "Semanas", se ha celebrado una, del 23 al 31 de octubre último, que se ha ocupado de las macromoléculas de interés biológico y, especialmente, de los nucleoproteidos.

Asistieron científicos de diferentes países, cada uno de los cuales presentó una comunicación. Entre ellos se encontraban los Premios "Nobel" Dres. Debey, De Hevesy, Theorell y Tiselius (Presidente). Nuestro país estuvo representado por el Dr. Rubio Huertos, cuya comunicación versó sobre la estructura de las inclusiones cristalinas producidas por dos virus de plantas, incluyendo una discusión acerca de la cristalización como propiedad de la materia viva.

Los trabajos presentados y los coloquios que siguieron se publicarán en un volumen especial de *Scripta Varia* de la Academia.

CONCURSO CIENTIFICO DE LA ACADEMIA DE FARMACIA

La Real Academia de Farmacia ha anunciado los premios correspondientes a 1962, para Farmacéuticos y cultivadores de ciencias afines a la Farmacia, de España, Portugal, América y Filipinas. Los trabajos, originales e inéditos y escritos en español o en portugués, podrán enviarse hasta el 30 de septiembre.

Todas las personas interesadas en este concurso pueden dirigirse, para solicitar las bases del mismo, a la Secretaría de la Academia, Campoamor, número 18, Madrid, 6.

SEMANA DE ESTUDIO EN LA ACADEMIA PONTIFICIA

La Academia Pontificia de Ciencias, además de sus sesiones normales de trabajo, celebra "Semanas de estudio" sobre temas determinados. En cada caso, la Academia invita a científicos del máximo relieve para que, junto con los académicos especialistas, se reúnan en Roma y procedan al examen y discusión del tema correspondiente. En el marco de estas "Semanas", se ha celebrado una, del 23 al 31 de octubre último, que se ha ocupado de las macromoléculas de interés biológico y, especialmente, de los nucleoproteidos.

Asistieron científicos de diferentes países, cada uno de los cuales presentó una comunicación. Entre ellos se encontraban los Premios "Nobel" Dres. Debey, De Hevesy, Theorell y Tiselius (Presidente). Nuestro país estuvo representado por el Dr. Rubio Huertos, cuya comunicación versó sobre la estructura de las inclusiones cristalinas producidas por dos virus de plantas, incluyendo una discusión acerca de la cristalización como propiedad de la materia viva.

Los trabajos presentados y los coloquios que siguieron se publicarán en un volumen especial de *Scripta Varia* de la Academia.

CONCURSO CIENTIFICO DE LA ACADEMIA DE FARMACIA

La Real Academia de Farmacia ha anunciado los premios correspondientes a 1962, para Farmacéuticos y cultivadores de ciencias afines a la Farmacia, de España, Portugal, América y Filipinas. Los trabajos, originales e inéditos y escritos en español o en portugués, podrán enviarse hasta el 30 de septiembre.

Todas las personas interesadas en este concurso pueden dirigirse, para solicitar las bases del mismo, a la Secretaría de la Academia, Campoamor, número 18, Madrid, 6.

DEPÓSITO LEGAL: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15 - Madrid