

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 MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN 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 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
Recombinación genética entre esferoplastos de <i>Escherichia coli</i> F ⁺ × F ⁻ , por M. Rubio-Huertos y F. Quevedo	151
Utilización del ácido p-nitrobenzoico por <i>Nocardia</i> V. como única fuente de carbono y nitrógeno, por Isabel García-Acha y J. R. Villanueva	165
Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación.—VIII. Influencia del tratamiento por alcoholes en la fermentación sumergida de melazas de azúcar, por A. Puente y B. Regueiro	171
Algunas observaciones sobre el aparato bucal de <i>Frontonia</i> (ciliados, holotricos), por J. Pérez-Silva y Rosario Gil	187
Production of pectic enzymes by pathogenic and non-pathogenic species of <i>Verticillium</i> , by J. A. Leal and J. R. Villanueva	199
La resistencia de algunas cepas bacterianas al calor como consecuencia de su anticorresistencia, por A. Portolés y M. ^a Teresa Pérez-Ureña	207
El Dr. Rubio, Consejero del C. S. I. C.	217

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISILOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

RECOMBINACION GENETICA ENTRE ESFEROPLASTOS DE *ESCHERICHIA COLI* $F^+ \times F^-$

POR

M. RUBIO-HUERTOS y F. QUEVEDO

INTRODUCCION

La conjugación sexual entre estirpes bacterianas compatibles fue claramente demostrada por Lederberg (3), viéndose que se realiza la transferencia de material nuclear directamente de célula a célula, a través de un puente de citoplasma.

En 1958, Lederberg y St. Clair (4), pensando en averiguar el papel que pudiera jugar la pared celular en la formación de dicho puente, como, por ejemplo, si existen en dicha pared zonas específicas de atracción o de conjugación, como teóricamente sería de esperar, acudieron a las técnicas de formación de protoplastos por medio de penicilina, aunque realmente de esta manera no se forman verdaderos protoplastos, sino esferoplastos, según la definición dada por Brenner y cols. (1), y empleando estirpes de *Escherichia coli* F^+ y F^- consiguieron su recombinación.

La penicilina, se sabe que actúa interfiriendo la síntesis de la pared celular de las bacterias sensibles a ella (5), y se ha utilizado esta propiedad para la inducción del ciclo L en diversas especies bacterianas, especialmente en Gram-negativas, constituyendo uno de los medios más eficaces para la inducción de dicho ciclo. El empleo de glicocola para la formación del ciclo L en bacterias Gram-negativas ha sido también empleado por diversos investigadores, especialmente por uno de los autores del presente trabajo y sus colaboradores (7, 9),

comprobando que, aunque en líneas generales el proceso del ciclo L obtenido con este aminoácido sea sensiblemente igual que el obtenido con penicilina, existen diferencias apreciables en la estabilidad al choque osmótico de los esferoplastos obtenidos con una y otra, velocidad de reversión a formas normales en las formas L no fijas, etcétera (6, 10), y aunque se ve claramente que la acción de la glicocola se ejerce también impidiendo una formación normal de la pared celular, se desconoce completamente el mecanismo de esta acción, es decir, sobre qué puntos de la pared celular actúa la glicocola, qué sustancias inhibe y si se trata de una acción directa o indirecta.

El presente trabajo, por lo tanto, está encaminado a investigar las posibles diferencias de comportamiento en su aspecto de conjugación genética de los esferoplastos inducidos por la glicocola y los resultados obtenidos por Lederberg con esferoplastos obtenidos con penicilina, como medio indirecto que nos permita conocer algo más sobre el mecanismo de acción de la glicocola.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos utilizados

Hemos empleado *Escherichia coli*, estirpes K12, PA678 y HFrH, que nos han sido amablemente suministradas por el Prof. François Jacob, Jefe de Laboratorio del Servicio de Fisiología Microbiana del Instituto «Pasteur», de París, a quien nos complacemos en dar aquí las gracias.

Las características de estas estirpes son:

PA678 (F⁻) T⁻ L⁻ B₁⁻ Kac⁻ Galb⁻ Mal⁻ Xyl⁻ Mtl⁻ Sm^r

HFr H B₁⁻ T⁺ L⁺ Lac⁺ Galb⁺ Hist⁺ Sm^s Mal⁺ Xyl⁺ Mtl⁺ Meth⁺

Estos gérmenes también se diferencian por su morfología.

Las estirpes eran sembradas quincenalmente sobre agar nutritivo y conservadas en frigorífico, previa incubación a 37 °C durante veinte horas.

Observación microscópica

Para la observación de los gérmenes, tanto normales como transformados en esferoplastos, hemos empleado un microscopio óptico Zeiss y un microscopio de contraste de fases Zeiss-Winkel; las fotografías las hemos obtenido con una cámara Leika, con su correspondiente aparato de adaptación al microscopio.

La observación, generalmente, la hemos hecho sin previa coloración. Suspendíamos los esferoplastos en agua destilada, ya que, a diferencia de los esferoplastos obtenidos con penicilina, éstos son estables, entre portaobjetos y cubreobjetos, y procedíamos a su estudio microscópico en contraste de fases. En algunos casos realizábamos directamente la observación sobre una colonia aislada de esferoplastos, colocando, entre porta y cubreobjetos, una delgadísima capa de agar, cortada muy cuidadosamente.

Cuando había necesidad de emplear coloraciones, usábamos la de Gram y la simple con fucsina.

Para las microfotografías electrónicas nos hemos valido del microscopio electrónico Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias del C. S. I. C.

Obtención de esferoplastos

Hemos empleado el medio de Köser-Simmons, modificado por nosotros de la siguiente forma:

Fosfato sódico amónico...	1,5 g
Fosfato monopotásico ...	1 g
Sulfato magnésico...	2 g
Citrato amónico ...	1 g
Cloruro sódico...	1,5 g
Agar ...	15 g
Agua bidestilada, c. s. p. ...	1.000 ml

pH, 7,0

En el momento del uso agregábamos:

Suero estéril de caballo	10 %
Sacarosa (solución acuosa esterilizada)	15 %
Glicocola (ídem íd.)	6 %

y distribuíamos en placas de Petri.

A partir de un cultivo joven de las cepas, sembrábamos en estrías, valiéndonos del asa de Kolle; luego incubábamos durante veinticuatro horas, a 37 °C, y durante cuarenta y ocho o setenta y dos horas adicionales (sin invertir las placas), a temperatura ambiente.

Recombinación genética

Medios de cultivo

El medio sintético que hemos empleado es el GS, que está constituido por:

Fosfato monopotásico	6,8	g
Sulfato magnésico	0,1	g
Sulfato amónico	1	g
Nitrato cálcico	0,001	g
Sulfato ferroso	0,0005	g
Agar... ..	15	g
Agua bidestilada, c. s. p.	1.000	ml
pH, 7,2		

A este medio le agregábamos tiamina, 1 γ /ml, y estreptomicina, 150 γ /ml, y, según el caso, treonina o leucina, 80 γ /ml.

El medio de Levine lo hemos utilizado adicionado de estreptomicina, 150 γ /ml, y con lactosa o galactosa, 5 g/l. La fórmula es:

Peptona	10	g
Fosfato dipotásico	2	g
Sacarosa	5	g
Eosina amarilla al 2 %	2	ml
Azul de metileno al 0,5 %	2	ml
Agar	20	g
Agua bidestilada, c. s. p.	1.000	ml
pH, 7,2		

Para efectuar los cruzamientos usamos caldo nutritivo + glicocola al 6 por ciento, que ha sido la concentración óptima de glicocola encontrada para la formación de esferoplastos en las dos estirpes de *Escherichia coli* empleadas. La comprobación de la utilización de glúcidos la llevamos a cabo con medios líquidos, con tubo de Durham, de fermentación, e indicador de pH. El azúcar, correspondiente a 10 g/l.

Las diluciones las hicimos en el medio sintético, sin el agar, diluido al 1/20. A este medio lo denominamos «disolución base».

Cruzamientos

Las colonias puras de esferoplastos eran extraídas de las placas cortando una delgada capa de agar; estas colonias de ambos recombinantes eran mezcladas en un tubo de caldo-glicocola y se procedía a agitar suavemente para lograr la difusión de los esferoplastos en el medio. Se incubaba luego por períodos variables de dos-seis horas, a 37 °C. Al cabo de este tiempo diluíamos en disolución base y sembrábamos en los medios GS + (B₁, Sm): a) solo; b) con treonina, y c) con leucina; en EMB lactosa y EMB galactosa. Incubábamos durante veinticuatro-cuarenta y ocho horas, a 37 °C.

Como este medio lleva estreptomycin, las células HFrH no pueden crecer en él; por otro lado, la falta de factores de crecimiento indispensables para la estirpe PA678 en este medio hace que las células puras de esta estirpe tampoco puedan desarrollarse, por lo que toda colonia que crezca en este medio en veinticuatro-cuarenta y ocho horas, ha de tener los caracteres de resistencia a la estreptomycin y al mismo tiempo, treonina, leucina, etc., positivos, lo que hace que tengan que ser necesariamente recombinantes de las dos estirpes empleadas.

Luego procedíamos a la observación y análisis de las colonias presentes, valiéndonos de los mismos medios y de los medios con azúcares que hemos señalado. Hemos hecho también observaciones microscópicas de los recombinantes.

RESULTADOS

A los tres o cuatro días de haber sembrado con las dos estirpes de *Escherichia coli* en forma normal sobre el medio Koser-Simmons modificado, adicionado de suero, sacarosa y glicocola, aparecían unas

colonias pequeñas, translúcidas, algo mucilaginosas, que presentaban las características descritas para las colonias L del tipo B; al hacer la observación microscópica de ellas, se podían apreciar unas formas grandes, globosas, con membrana bien definida y citoplasma retraído, adoptando muchas veces una forma semilunar.

Hemos encontrado que la estirpe PA678 formaba los esferoplastos con mayor dificultad que la HFrH, es decir, en algunos casos, un porcentaje de las colonias obtenidas en medios con glicocola, además de un 80 por ciento de esferoplastos tenían formas filamentosas y alguna forma normal, y las resiembras de estas colonias en medio con glicocola nos daban colonias normales, casi todas. Por ello teníamos que examinar bien las colonias obtenidas, de manera que sólo empleáramos colonias completamente formadas por esferoplastos.

La observación directa de las colonias en el microscopio nos permitía apreciar que el total de gérmenes que las constituían estaba bajo la forma de esferoplastos, presionados unos contra otros (*figura 1*).

Estos esferoplastos, cuando eran sembrados en medios con glicocola seguían reproduciéndose en forma de esferoplastos, pero sembrados en medios sin glicocola revertían a la forma normal.

Morfológicamente, estos esferoplastos no se diferencian en nada de los obtenidos con penicilina, pero son mucho más resistentes al choque osmótico, pudiendo ser suspendidos en agua destilada durante más de media hora sin lisarse (*figura 2*).

Una vez seleccionadas las colonias puras de esferoplastos PA678 y HFrF, se juntaron en caldo con glicocola, según el método expuesto anteriormente, y, tras un tiempo no menor de dos horas ni mayor de seis, se hicieron siembras con pipeta en las placas preparadas de medios GS y EMB, en sus distintas variantes ya señaladas, obteniéndose a las cuarenta y ocho horas colonias aisladas, que, dada la composición específica de los medios, tenían que ser necesariamente recombinantes, y cuyo análisis dio los siguientes resultados:

El mayor porcentaje fue de recombinantes $T^+ Sm^r$. En gran proporción obtuvimos también los recombinantes $T^+ L^+ Sm^r$.

En muy pequeña proporción fueron aislados también: $T^+ L^+ Lac^+ Sm^r$, $T^+ L^+ Galb^+ Sm^r$, $Galb^+$ y $Lac^+ Sm^r$.

Frente a los demás azúcares, maltosa, xilosa y manita, hemos obtenido siempre resultados negativos.

Observados microscópicamente los recombinantes, presentaban la

morfología de F-PA678, aunque en algunos casos hemos observado formas anormales, parecidas a las de reversión de esferoplastos a las formas bacilares normales, probablemente por haber efectuado la observación antes de su completa reversión a forma normal.

Los recombinantes han mantenido estables los caracteres adquiridos.

Las formas L observadas al microscopio electrónico presentaban las mismas características que hemos encontrado en trabajos anteriores con *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Rhizobium*, etc., obtenidas con glicocola (6, 7, 9), es decir: las formas esféricas grandes, con una membrana bien definida, que a veces queda vacía; formas intermedias, de tamaño algo menor y citoplasma más compacto; y formas enanas, de menos de 300 m μ , que presentan una membrana fina (figuras 3-4).

Además de lo citado anteriormente, hemos encontrado masas pequeñas de filamentos (figura 5), con forma y tamaño parecidos a los que se observan en cortes ultrafinos de *Escherichia coli*, y otras bacterias situadas en la zona llamada nuclear y que la mayoría de los especialistas creen que son filamentos de ácido desoxirribonucleico. Estas masas de filamentos provienen de la lisis de algunos esferoplastos, debida al tratamiento de las muestras para su observación al microscopio electrónico; en un caso concreto hemos podido ver estos filamentos unidos a masas citoplasmáticas de esferoplastos lisados (figura 6).

DISCUSION

Como se ha visto claramente en los resultados obtenidos, es posible la recombinación con esferoplastos obtenidos con glicocola, al igual que sucede con los obtenidos con penicilina por Lederberg y St. Clair. Según Hagiwara (2) sería posible obtener la recombinación de verdaderos protoplastos de *Escherichia coli* Y-70 F⁻ con K12 58-161 F⁺, obtenidos por la acción de la lisozima y estabilizados con sacarosa 0,6 M. Ahora bien, los verdaderos protoplastos no poseen la propiedad de resintetizar la pared celular, por lo que no está claro cómo pueden formar colonias de tipo normal después de efectuada la recombinación. Hagiwara, además, admite que no podía lograr la conversión a protoplastos en un 100 por ciento; por lo tanto, en los cruzamientos inter-

vendrían formas normales de ambas estirpes parentales, con lo que los resultados serían dudosos por ambas razones.

El concepto de esferoplasto según Brenner y cols., es aquella forma esférica que ha perdido la rigidez original de la pared celular, pero todavía conserva parte o partes de dicha pared, como pudimos demostrar nosotros con microfotografías electrónicas en las formas grandes esféricas, en el ciclo L del *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* y *Rhizobium lupinus* (9); y más tarde, en un experimento con *Escherichia coli* y bacteriófago T₂ (realizado en colaboración con el Dr. Cota-Robles, de California), pudimos comprobar que los esferoplastos de *E. coli* eran capaces de fijar el bacteriófago, o sea, conservaban todavía las estructuras de la pared celular específicas para dicha fijación, a diferencia con los verdaderos protoplastos, en los que la pared celular desaparece totalmente, siendo incapaces de fijar bacteriófago; por lo tanto, no se puede descartar el que en la pared celular existan determinadas estructuras específicas para la conjugación y éstas se conserven en los esferoplastos.

El comportamiento casi idéntico en cuanto a capacidades de recombinación genética entre esferoplastos producidos por glicocola y aquellos obtenidos con penicilina, parece indicar que las modificaciones de la pared celular en uno y otro tipo de esferoplastos implican la conservación de algunas estructuras comunes, aunque, como hemos dicho anteriormente, la mayor resistencia al choque osmótico de los esferoplastos producidos por glicocola supone que éstos, posiblemente, conservan una mayor cantidad de estructuras o de restos de la pared celular que los producidos por penicilina.

Otra diferencia con el experimento de Lederberg y St. Clair es que las colonias L obtenidas por ellos lo han sido siempre sumergidas en el medio sólido, no habiendo podido obtenerlas en superficie, y, por el contrario, las colonias L de las dos estirpes de *Escherichia coli* obtenidas por medio de glicocola, han sido en superficie, aunque también las hemos podido obtener sumergidas en el medio.

Recientemente se ha probado que las formas L fijas de *Agrobacterium tumefaciens* obtenidas por medio de glicocola, son tan patógenas para las plantas huéspedes como las formas normales (7), así como también las formas L de *Clostridium tetani* son capaces de producir tanta toxina como las normales (8), lo que nos da idea de una conser-

vación en la fase L obtenida por glicocola, de la mayoría de las capacidades o propiedades de la fase normal.

La posibilidad de que existan estructuras específicas en la superficie de la célula bacteriana, en la pared celular, no queda descartada, por lo tanto, con los experimentos realizados con esferoplastos obtenidos tanto con penicilina como con glicocola.

RESUMEN

Se han obtenido colonias puras de esferoplastos de *Escherichia coli* PA678 (F^-) y HFrH (F^+) por medio de glicocola. Los esferoplastos de ambas estirpes de *E. coli* puestos en contacto en medio líquido adicionado de 6 por ciento de glicocola, conservaron la capacidad de recombinación genética, siendo el mayor porcentaje de recombinantes $T^+ Sm^r$ seguido por $T^+ L^+ Sm^r$. En muy pequeña proporción fueron también aislados: $T^+ L^+ Lac^+ Sm^r$, $T^+ L^+ Galb^+ Sm^r$, $Galb^+ Sm^r$ y $Lac^+ Sm^r$.

La frecuencia de recombinación parece que ha sido menor que la obtenida con las formas normales, aunque no hemos analizado el suficiente número de recombinantes para poder afirmar este punto estadísticamente.

No se puede rechazar la existencia de estructuras específicas para la conjugación en la pared celular bacteriana, ya que los esferoplastos, especialmente los inducidos por glicocola, conservan parte de las estructuras de la pared celular.

SUMMARY

Escherichia coli PA678 and HFrH spheroplasts obtained with 6 per cent glycine were able of genetic recombination when mixed in liquid medium with glycine.

The higher percentage of recombinants was for $T^+ L^+ Sm^r$. A few colonies were isolated with the characteristics of $T^+ L^+ Lac^+ Sm^r$, $T^+ L^+ Galb^+ Sm^r$, $Galb^+ Sm^r$ and $Lac^+ Sm^r$.

The frequency of recombinations seems to be less for the spheroplasts than for the parental bacteria.

The existence of specific structures for recombination in the bacterial cell wall cannot be ruled off by these experiences because spheroplasts, specially those induced by glycine, are known to retain part of the structures of the normal cell wall.

BIBLIOGRAFIA

1. BRENNER, S.; DARK, F. A.; GERHARDT, J.; JEYNES, M. H.; KANDLER, O.; KELLEMBERGER, E.; KLIENEBERGER-NOBEL, E.; MCQUILLEN, K.; RUBIO-HUERTOS, M.; SALTON, M. R. J.; STRANGE, R. E.; TOMCSIK, J., y WEIBULL, C. 1958. Bacterial Protoplasts. *Nature*, 181, 1.713.
2. HAGIWARA, A. 1958. Recombination ability of *Escherichia coli*, K-12 protoplasts. *Nature*, 182, 456.
3. LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M.; ZINDER, N. D., y LIVELY, E. R. 1951. Recombination analysis of bacterial heredity. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 16, 413-43.
4. LEDERBERG, J., y ST. CLAIR, J. 1958. Protoplasts and L-type growth of *Escherichia coli*, J. *Bacteriol.*, 75, 143-60.
5. PARK, J. T., y STROMINGER, J. L. 1957. Mode of action of penicillin. *Science*, 125, 99-101.
6. RUBIO-HUERTOS, M. 1957. El ciclo L de las bacterias. *Microbiol. Españ.*, 10, 361-86.
7. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1961. Fixed, pathogenic L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 195, 101.
8. RUBIO HUERTOS, M., y GONZÁLEZ VÁZQUEZ, C. 1960. Morphology and pathogenicity of L forms of *Clostridium tetani* induced by glycine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 79, 626-31.
9. RUBIO HUERTOS, M.; KUSTER, E., y FLAIG, W. 1955. Licht und electronenmikroskopische untersuchungen an L-formen bei *Pseudomonas fluorescens*, *B. proteus* und *Rhizobium*. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk.*, 1, Orig., 162.
10. WELSCHE, M. 1957. *Escherichia coli* sous l'influence de la glycine en milieu saccharose. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 151, 1.990.

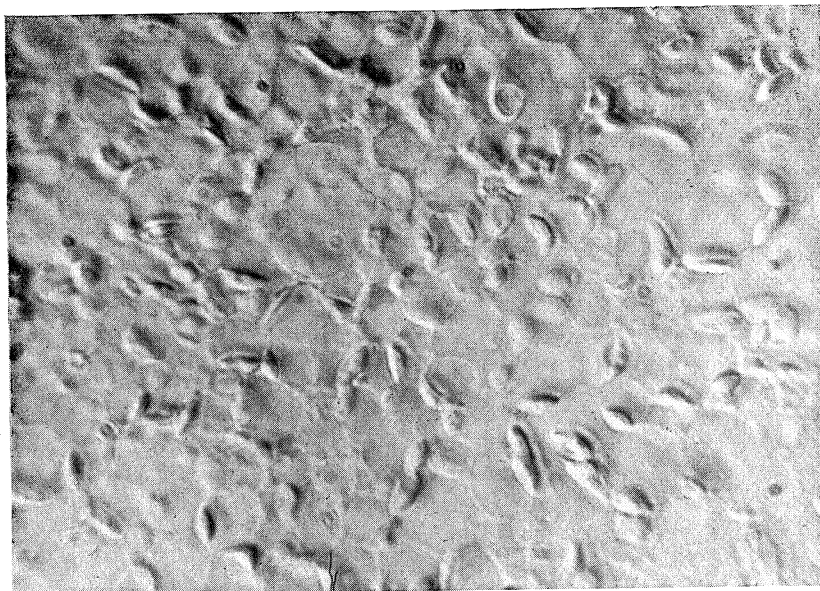


Figura 1. Escherichia coli. PA678. Colonia de esferoplastos. Microscopio de contraste de fases. $\times 1.200$

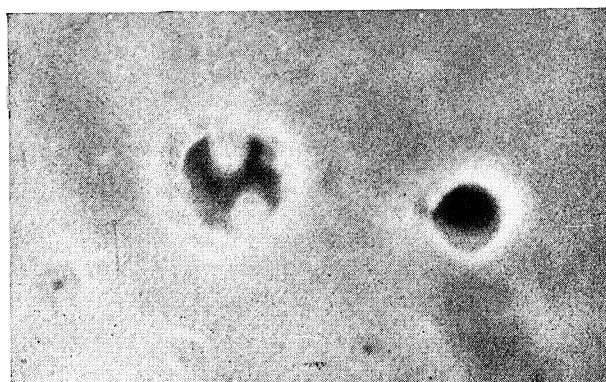


Figura 2. Estirpe HFrH. Esferoplastos suspendidos en agua destilada. M. de contraste de fases. $\times 1.500$

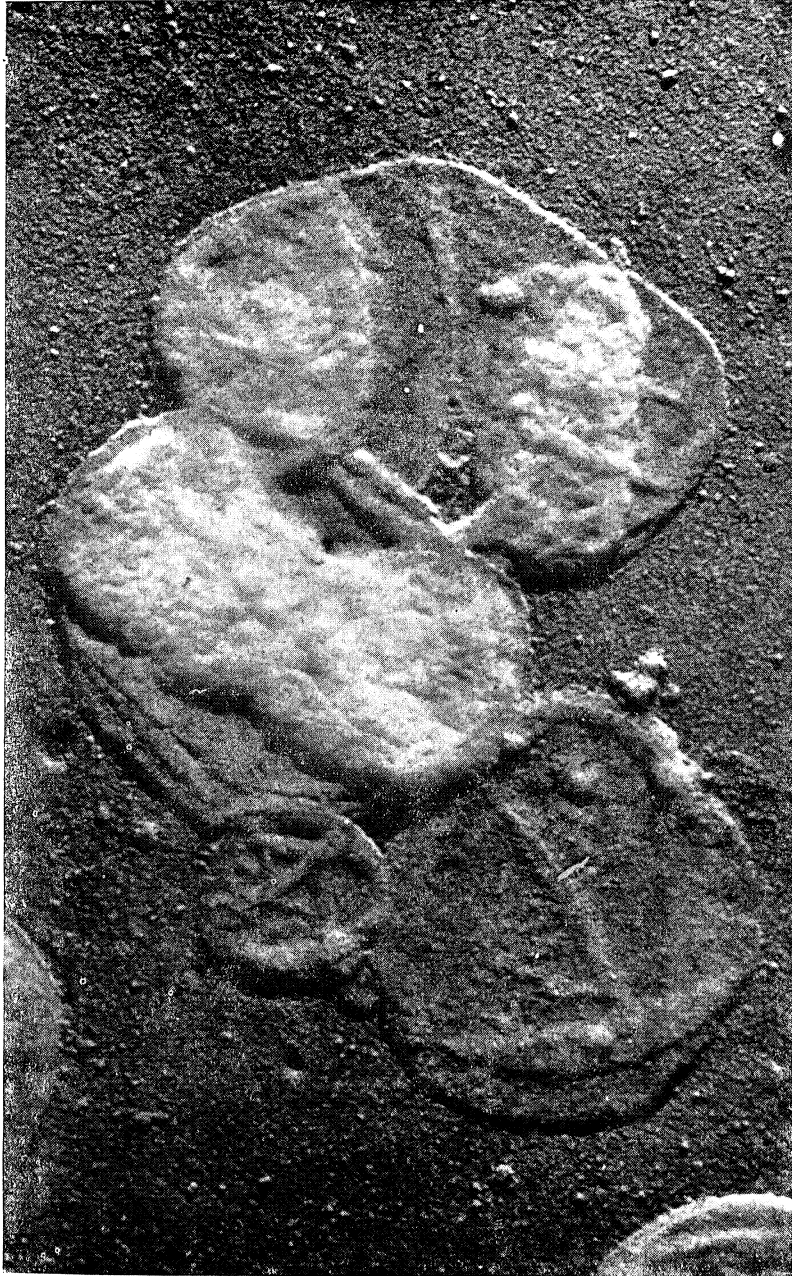


Figura 3. Esferoplastos. Microscopio electrónico. $\times 20.000$

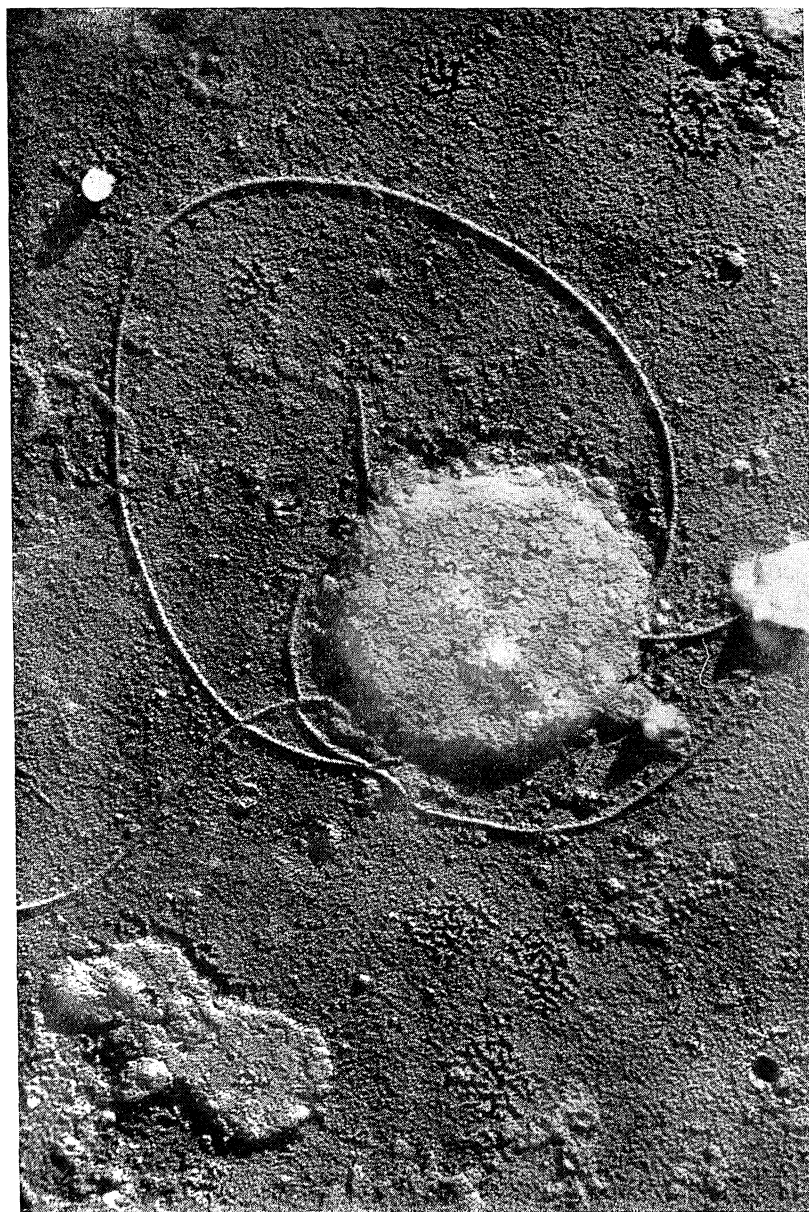


Figura 4. Esferoplastos. M. electroni. $\times 20,000$

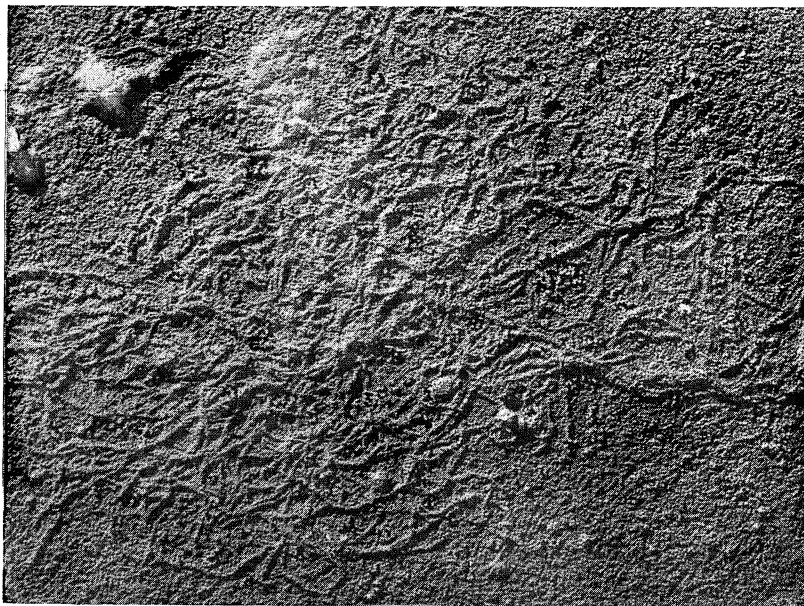


Figura 5. Filamentos procedentes de esferoplastos lisados. M. electrónico. $\times 28.000$

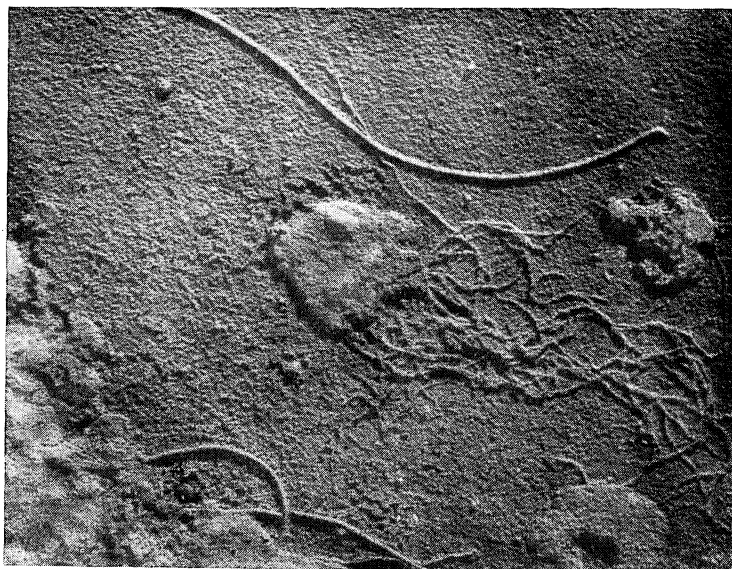


Figura 6. Parte de citoplasma y filamentos de esferoplastos lisados. En la parte superior se pueden observar restos de un flagelo. M. electrónico. $\times 28.000$

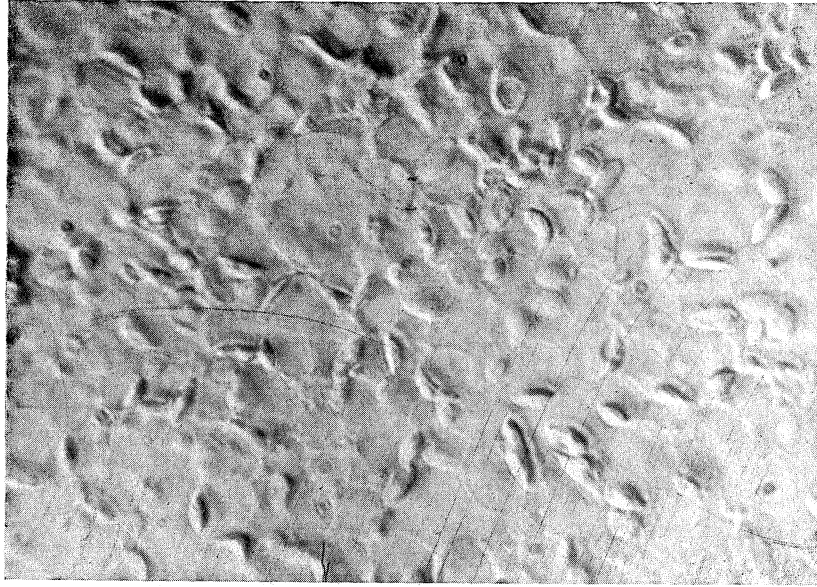


Figura 1. Escherichia coli. PA678. Colonia de esferoplastos. Microscopio de contraste de fases. $\times 1.200$

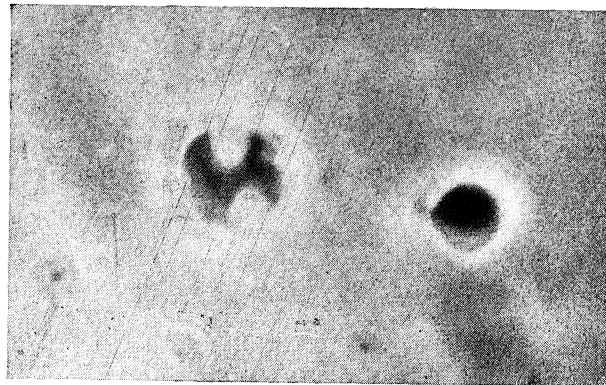


Figura 2. Estirpe HFrH. Esferoplastos suspendidos en agua destilada. M. de contraste de fases. $\times 1.500$



Figura 3. Esferoplastos. Microscopio electrónico. $\times 20.000$

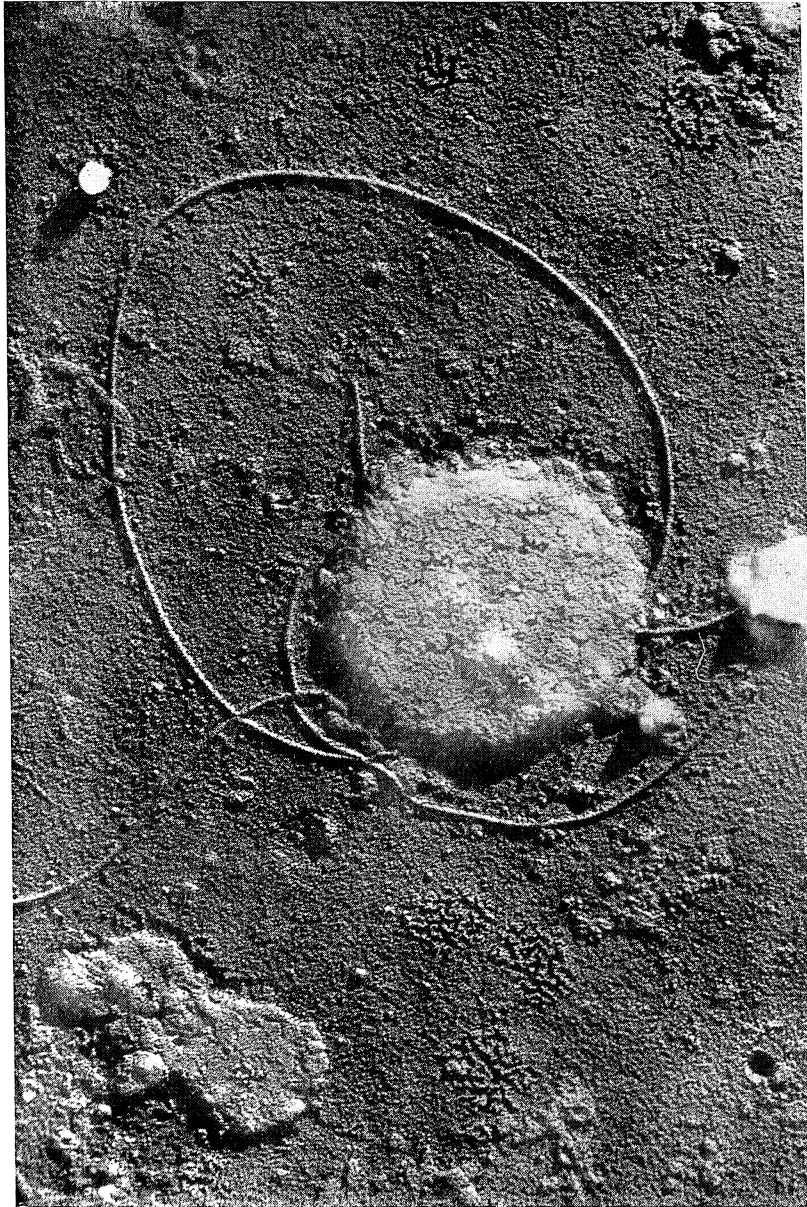


Figura 4. Esferoplastos, *M. electrophilum*. $\times 20.000$

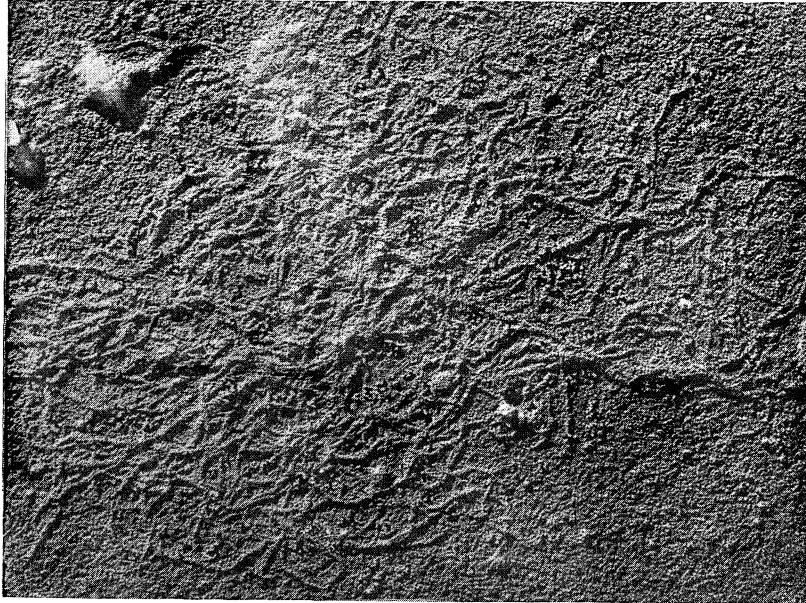


Figura 5. Filamentos procedentes de esferoplastos lisados. M. electrónico. $\times 28.000$

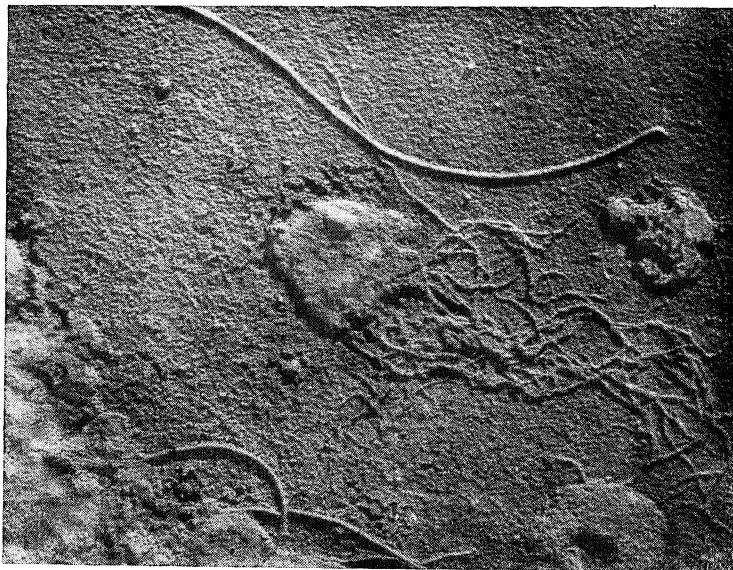


Figura 6. Parte de citoplasma y filamentos de esferoplastos lisados. En la parte superior se pueden observar restos de un flagelo. M. electrónico. $\times 28.000$

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

UTILIZACION DEL ACIDO P-NITROBENZOICO POR *NOCARDIA* V. COMO UNICA FUENTE DE CARBONO Y NITROGENO

POR
ISABEL GARCIA-ACHA y J. R. VILLANUEVA

Se conoce aún poco acerca de la transformación biológica de los nitroderivados aromáticos, que generalmente son tóxicos y tienen un pronunciado efecto inhibidor sobre los procesos de asimilación en el metabolismo celular. Se podía sospechar de la existencia de organismos capaces de descomponer los nitroderivados orgánicos por el hecho de que en los últimos años se ha visto que tales compuestos se forman biológicamente (1-2, 5, 7).

En relación con la desasimilación de los nitroderivados orgánicos, Erikson (4) demostró, bastante tiempo antes del descubrimiento de la biosíntesis de esta clase de compuestos, que ciertas cepas de *Micromonospora* son capaces de utilizar ácido pícrico (trinitrofenol) y trinitroresorcinol, y Moore (6) mencionó dos protoactinomicetos, no especificados, capaces de usar nitrobenceno como origen simultáneo de carbono y nitrógeno.

La presente comunicación se ocupa de un organismo que ha sido aislado de suelos utilizados en experimentos de desintoxicación con dinitro-o-cresol, y que se ha descrito como capaz de descomponer una serie de compuestos aromáticos (8, 9).

MATERIAL Y METODOS

Medio de crecimiento

El medio utilizado consistía en 0,1 por ciento de la sal sódica del ácido p-nitrobenzoico; 0,5 por ciento de PO_4HNa_2 ; 0,2 por ciento de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$; 0,02 por ciento de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 0,001 por ciento de $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, disuelto todo en 1.000 ml de agua destilada. El pH se ajustaba a 7. El nitroderivado se esterilizaba separadamente por filtración y se añadía después de esterilizar el resto de la solución en autoclave. Los reactivos utilizados eran de grado analítico. La sal sódica del ácido p-nitrobenzoico («British Drug House») era recristalizada tres veces antes de incorporarla al medio, e inclusive, en un experimento, purificada cromatográficamente sobre papel.

Condiciones de crecimiento

El organismo crecía en el medio descrito, en matraces de Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio. Cada matraz se inoculaba con 0,1 ml de un cultivo de dieciocho horas en medio de sulfato amónico (8). La incubación se efectuaba a 30 °C, durante un tiempo mínimo de seis días.

Determinación de la curva de crecimiento

La curva de crecimiento del organismo se determinaba midiendo la densidad óptica del cultivo en diferentes intervalos de tiempo con una longitud de onda de 700 $\text{m}\mu$, en un espectrofotómetro Beckman, modelo D.U. Las lecturas eran efectuadas frente a una muestra del mismo medio, antes de la inoculación.

Determinaciones colorimétricas

Las determinaciones de nitrito se efectuaban colorimétricamente utilizando el reactivo de Griess y midiendo la intensidad del color rojo, en el espectrofotómetro, a 525 $\text{m}\mu$.

La desaparición del nitroderivado del medio de cultivo se seguía espectrofotométricamente, con 273 $\text{m}\mu$ y un pH de 7,4.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como se desprende de los resultados expresados gráficamente en la figura 1, la *Nocardia* V. es capaz de utilizar el ácido *p*-nitrobenzoico como única fuente de carbono y nitrógeno. Sin embargo, se observa que el organismo debe de encontrar ciertas dificultades para crecer, una vez inoculado en el medio de cultivo, al tener posiblemente que fabricar un equipo enzimático en gran parte nuevo, lo que justifica el período de adaptación tan excesivamente largo, de casi cuarenta

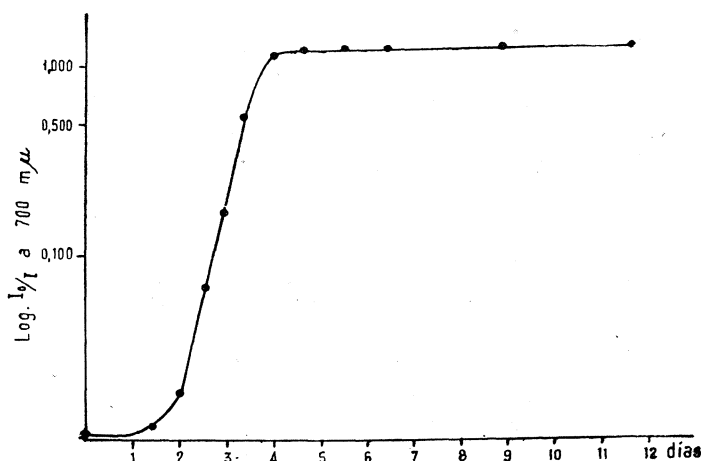


Figura 1

y ocho horas. Las células, una vez adaptadas, comienzan a dividirse rápidamente, con un tiempo de generación semejante al que poseen en otros medios de cultivo complejos y ricos, sin nitroderivados. El mecanismo por el que este compuesto es incorporado para construir el material celular, es desconocido, suponiéndose que el nitroderivado es inicialmente hidroxilado en alguno de los carbonos libres del anillo bencénico, antes de que el grupo nitro sea reducido a grupo amino, ya que el ácido *p*-aminobenzoico no es utilizado directamente por el organismo como fuente de carbono ni de nitrógeno. Recientemente, Cartwright y Cain (3), utilizando la técnica de la adaptación simultánea de Stanier, han demostrado que una especie de *Nocardia* no era capaz

de producir, como consecuencia del metabolismo del ácido p-nitrobenzoico, el ácido p-aminobenzoico, detectando solamente los compuestos intermedios de la reducción, ácidos nitroso e hidroxilaminobenzoico. No se ha observado liberación alguna de nitrito a partir del nitroderivado en el medio de cultivo.

Resultados parecidos en cuanto al crecimiento se han obtenido en medios de la misma composición química solidificados con agar al 2 por ciento, observándose abundante proliferación de colonias.

Actualmente se llevan a cabo una serie de investigaciones con la sal sódica del ácido p-nitrobenzoico con ^{14}C , con el fin de aclarar los posibles productos metabólicos y la forma en que el nitroderivado es incorporado en el interior del organismo; los resultados serán objeto de una próxima publicación. Los dos tipos de ácido p-nitrobenzoico utilizados, se preparaban a partir de ácido benzoico, marcado uno con sólo ^{14}C lábil en el grupo carboxilo, y otro a partir del ácido benzoico, con todos los carbonos marcados, procedentes ambos del «The Radiochemical Centre», Amersham (Inglaterra).

RESUMEN

Se ha descrito una cepa de *Nocardia* V. aislada de suelos previamente tratados con herbicidas del tipo de nitroderivados, que es capaz de utilizar la sal sódica del ácido p-nitrobenzoico como única fuente de carbono y nitrógeno. Los experimentos se efectuaban con una concentración de 0,1 por ciento del nitroderivado añadido al medio base, que es utilizado para el crecimiento. No se ha observado liberación alguna de nitrito en el medio de cultivo como consecuencia del metabolismo del nitroderivado por el organismo. Se encuentran en curso una serie de experimentos utilizando nitroderivados marcados con ^{14}C .

SUMMARY

It has been described a strain of *Nocardia* V. which has been isolated from a soil used in detoxication experiments, that is able to use the sodium salt of p-nitrobenzoic acid in liquid media as well as on agar as sole source of carbon and nitrogen. Experiments were

carried out with 0.1 per cent of the nitrocompound which is used for growth. It has not been observed any release of nitrite from the organic nitrocompound metabolism by the organism. Experiments using C¹⁴ labeled nitrocompounds are in progress.

BIBLIOGRAFIA

1. BUSH, M. T.; TOUSTER, O., y BROCKMAN, J. E. 1961. J. Biol. Chem., 188, 685-93.
2. CARTER, C. L., y MCCHESENEY, W. J. 1949. Nature, 164, 575-76.
3. CARTWRIGHT, N. J., y CAIN, R. B. 1959. Biochem. J., 71, 248.
4. ERIKSON, D. 1941. J. Bacteriol., 41, 277-300.
5. HIRATA, Y.; OKUHARA, K., y NAITO, T. 1954. Nature, 173, 1.101.
6. MOORE, F. W. 1949. J. Gen. Microbiol., 3, 143-47.
7. RAISTRICK, H. 1949. Nature, 163, 553-54.
8. VILLANUEVA, J. R. 1960. Microbiol. Españ., 13, 169.
9. VILLANUEVA, J. R. 1960. Microbiol. Españ., 13, 387.

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

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR FERMENTACION

VIII. Influencia del tratamiento por alcoholes en la fermentación sumergida de melazas de azúcar

POR
A. PUENTE y B. REGUEIRO

INTRODUCCION

En un trabajo anterior, Malo y Regueiro (2) estudian la influencia del metanol en la fermentación sumergida, empleando un medio sintético, observándose que con un 5 por ciento de alcohol, el óptimo de producción era del 17,4 por ciento. Se pensó en la influencia de los iones metálicos como causa de la baja producción, y estudiados el zinc, cobre, hierro y manganeso, no se observó aumento de producción, aunque sí disminución en el caso de la adición de alguno de ellos.

Posteriormente, Puente y Regueiro (5) estudian la influencia de los alcoholes en la fermentación superficial de melazas de azúcar, tratadas y sin tratar por ferrocianuro, y observando que el metanol es el que produce el rendimiento mejor, pues al 6 por ciento y con un pH inicial de 5,5, da un 81,6 por ciento de ácido cítrico, se encuentra conveniente la adición de complexona IV, que permite reducir la cantidad de metanol, sin variar la producción.

Referencias anteriores a estos trabajos sólo las encontramos en Meyer (3).

En el presente trabajo, se estudia la adición de: metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol y morfolina a medios con

melazas de remolacha o caña, ambos tratados o sin tratar por ferrocianuro. También se estudia la influencia del medio de esporulación en medios de melazas con etanol.

MÉTODOS

En este trabajo se utilizan los métodos y técnicas dados por Malo y Regueiro (1) y Puente y Regueiro (2). Se emplea el mutante del *Aspergillus niger* 72-4 Wiss. aislado en nuestro laboratorio y los medios de conservación y fermentación, así como técnicas de control mencionadas. La adición de alcoholes se realiza después de la esterilización del medio.

Se hacen determinaciones de: pH, cantidad de micelio, azúcar remanente, acidez titulable y ácido cítrico.

RESULTADOS

En primer lugar, se estudia la influencia de los diferentes alcoholes (metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol y morfolina) en la fermentación de melazas de remolacha y caña. Se estudia, al final, la posible influencia del medio de esporulación en la fermentación sumergida de melazas.

Influencia del metanol

Para estudiar esta influencia se utilizan cuatro tipos de medios, a los que se adiciona el metanol en cantidades que se indican en cada caso.

a) Es medio con melazas de remolacha en el cual adiciones de hasta 5 por ciento de metanol producen muy ligeras variaciones en el volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico (± 19 por ciento). En cuanto a las características morfológicas, a los diez días de fermentación, el testigo se presenta en pequeñas pellas y poco fibroso, mientras que las muestras con metanol presentan pellas grandes y pequeñas con escasas fibras largas y gruesas.

b) Es medio con melazas de remolacha, pero adicionadas de ferro-

cianuro (0,08 por ciento). Hasta 5 por ciento de metanol, hay poca variación en el volumen de micelio, ligera disminución del consumo de azúcar y poca variación en la producción de ácido cítrico (± 38 por ciento). En cuanto a los caracteres morfológicos, el testigo presenta a los diez días de fermentación pellas pequeñas, mientras las muestras con metanol presentan pellas pequeñas con algunas fibras largas y gruesas, con poco metanol, y cortas y finas, con más metanol.

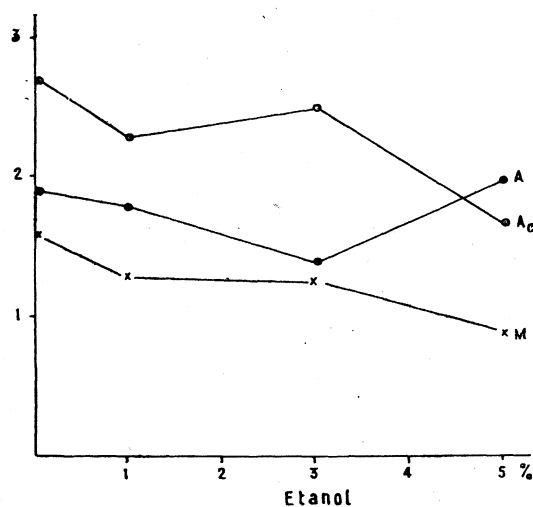
c) Es medio con melazas de caña, en el cual adiciones de hasta 3 por ciento de metanol producen muy ligera variación de volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico (± 17 por ciento). En cuanto a los caracteres morfológicos, a los diez días de fermentación, el testigo es de tipo fibroso, con escasas pellas grandes, mientras que en las muestras con metanol los caracteres son parecidos, pero con mayor proporción de pellas.

d) Es medio con melazas de caña, pero adicionado con ferrocianuro (0,07 por ciento). Adiciones de hasta un 7 por ciento de metanol producen ligera variación de volumen de micelio, el consumo de azúcar baja gradualmente y el ácido cítrico se mantiene a un nivel más bajo que el testigo (± 20 por ciento). En cuanto a los caracteres morfológicos, el testigo es fibroso, con unas pocas pellas grandes; en cambio, en las muestras con metanol, las pellas son pequeñas y hay escasas fibras cortas y gruesas, que no se presentan cuando se añade un 7 por ciento de metanol.

Influencia del etanol

Como en el caso anterior, se emplean cuatro tipos de medios de fermentación, a los que se adicionan diferentes cantidades de etanol, que se indican en cada caso.

a) Es medio con melazas de remolacha, cuyos resultados se expresan en la *figura 1*. Se observa una disminución progresiva del volumen de micelio y del consumo de azúcar y producción de ácido cítrico (25 por ciento) hasta adición de 3 por ciento de etanol; después hay disminución de estos dos últimos factores. En cuanto a los caracteres morfológicos, el micelio en el testigo se presenta en pellas pequeñas y escasas fibras, mientras que en las muestras con etanol el micelio es fibroso, en fibras cortas y gruesas, con escasas pellas grandes; con más etanol, las fibras se hacen más finas.



A = Azúcar, porcentaje. Ac = Ácido cítrico, porcentaje. M = Micelio (volumen), porcentaje

Figura 1

Ac $\times$ (*) 10. M $\times$ 20

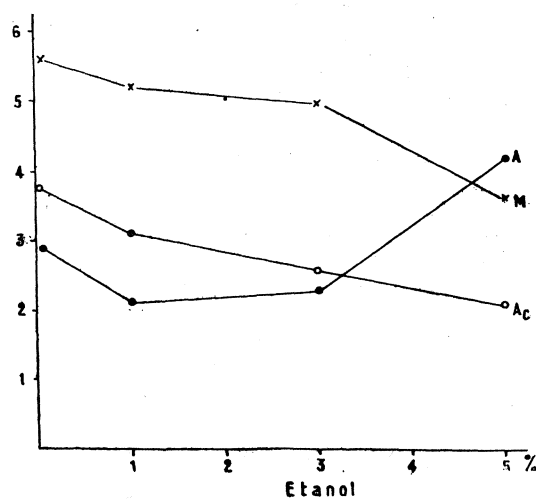


Figura 2

Ac $\times$ 10. M $\times$ 5

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

b) Es medio con melazas, pero adicionado de ferrocianuro (0,08 por ciento). Sus resultados se expresan en la *figura 2*. Se observa un descenso progresivo de volumen de micelio y de consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, con adiciones de hasta 5 por ciento de etanol. En cuanto a los caracteres morfológicos, todas las muestras dan micelio con pellas pequeñas; al aumentar la cantidad de etanol, las pellas se hacen más grandes.

c) Es medio de melazas de caña, cuyos resultados se expresan en la *figura 3*. Se observa una disminución progresiva de volumen de micelio. El consumo de azúcar y la producción de ácido cítrico suben hasta 2 por ciento de etanol, para luego disminuir. En cuanto a los caracteres morfológicos, todas las muestras dan micelio con fibras cortas y gruesas, con escasas pellas grandes; con más etanol, las fibras se hacen más finas.

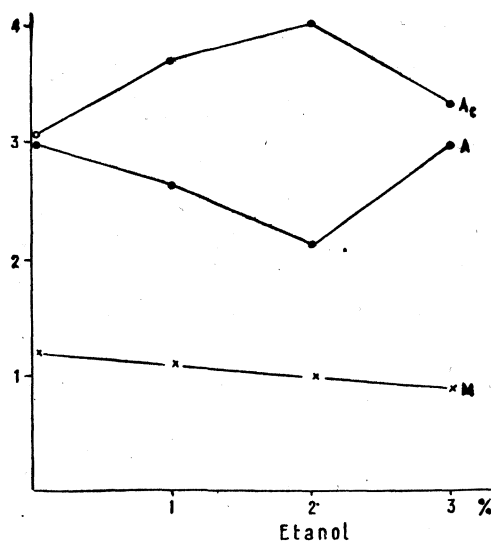


Figura 3

A. $\times 5$. M $\times 30$

d) Es medio de melazas de caña, pero adicionado con ferrocianuro (0,07 por ciento), cuyos resultados se expresan en la *figura 4*. Se observa una disminución progresiva de volumen de micelio y consumo de azúcar; asimismo, la producción de ácido cítrico baja lentamente

hasta un 5 por ciento de etanol, después de lo cual baja rápidamente. En cuanto a los caracteres morfológicos, el testigo presenta fibras cortas y finas con alguna pella grande, pero con etanol las fibras son escasas y las pellas pequeñas.

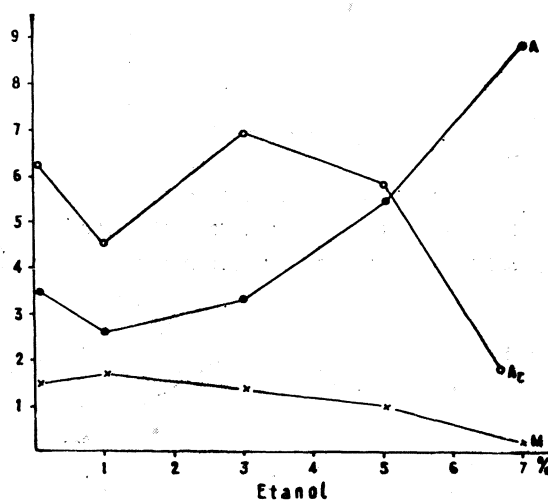


Figura 4

A. $\times 3$. M $\times 20$

Influencia del propanol

Como en casos anteriores, utilizamos cuatro tipos de medios de fermentación, a los que se adicionan diferentes cantidades de propanol, como se indica en cada caso.

a) Es medio de melazas de remolacha, cuyos resultados se expresan en la figura 5. Observamos que a partir de la adición de un 0,8 por ciento de propanol hay una caída rápida de volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, que se anula adicionando 2,4 por ciento de propanol. En cuanto a los caracteres morfológicos, los micelios son fibrosos en todos los casos; cuando se añade un 2,4 por ciento de propanol, no hay crecimiento.

b) Es medio de melazas de remolacha, pero adicionado con ferrocianuro (0,08 por ciento). Observamos que hasta 1,6 por ciento de propanol hay ligero aumento de micelio, y ligeras variaciones en el

consumo de azúcar y de la producción de ácido cítrico, aunque con tendencia a disminuir. En cuanto a los caracteres morfológicos, en general, se forman pellas pequeñas, pero con 1,2 por ciento de propanol se forman, a su vez, algunas pellas grandes y fibras cortas y finas.

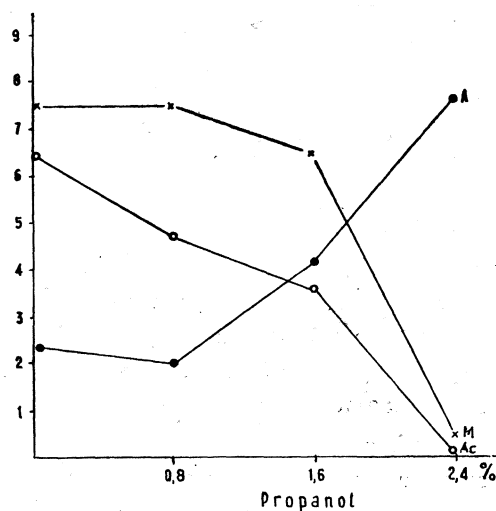


Figura 5

A. $\times$ 5. M $\times$ 4

c) Es medio de melazas de caña, en el que se observa que la adición de hasta 1,2 por ciento de propanol produce muy ligeras variaciones en el volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico. Asimismo, en cuanto a los caracteres morfológicos, todas las muestras presentan fibras gruesas.

d) Es medio de melazas de caña, pero adicionado de ferrocianuro (0,07 por ciento). Observamos que hasta adiciones de 2,4 por ciento de propanol hay una ligera disminución progresiva de volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico. En cuanto a los caracteres morfológicos, el micelio del testigo es fibroso; en cambio, las muestras con propanol son en forma de pellas pequeñas.

Influencia del isopropanol

Como en todos los casos, empleamos cuatro tipos de medios de fermentación, a los que se adicionan diferentes cantidades de isopropanol, como se indica en cada caso.

a) Es medio de melazas de remolacha. Observamos que adiciones de hasta 1,2 por ciento de isopropanol no afectan a la producción de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, aunque este último tiene tendencia a disminuir. En cuanto a los caracteres morfológicos, en todos los casos es fibroso y con formación de pellas pequeñas.

b) Es medio de melazas de remolacha, pero adicionado con ferrocianuro (0,08 por ciento). Adiciones de hasta 1,6 por ciento de isopropanol producen ligeras variaciones de volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico (± 38 por ciento). En cuanto a los caracteres morfológicos, en todos los casos, el micelio son pellas pequeñas, sin fibras, excepto al final.

c) Es medio con meladas de caña. Observamos que adiciones de hasta 1,2 por ciento de isopropanol hacen disminuir, aunque poco, el volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico. Los caracteres morfológicos son parecidos en todos los casos, dando fibras gruesas.

d) Es medio de melazas de caña, tratado por ferrocianuro (0,07 por ciento). Observamos muy ligeras variaciones hasta 1,6 por ciento de alcohol en volumen de micelio y consumo de azúcar, y una disminución progresiva, aunque ligera, de producción de ácido cítrico (± 16 por ciento). En cuanto a los caracteres morfológicos, el testigo da micelio fibroso, mientras que las muestras con alcohol dan pellas pequeñas, con escasa proporción de fibras cortas y finas.

Influencia del butanol

Como en los casos anteriores, empleamos cuatro tipos de medios de fermentación, a los que se adicionan diferentes cantidades de butanol, como se indica en cada caso.

a) Es medio de melazas de remolacha, cuyos resultados se expresan en la *figura 6*. Observamos ligera variación del volumen de micelio;

el consumo de azúcar aumenta rápidamente, sobre todo a partir de la adición de 0,4 por ciento de butanol; en cuanto a la producción de ácido cítrico, disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración de alcohol. En cuanto a los caracteres morfológicos, en todos los casos es fibroso, con escasas pellas pequeñas.

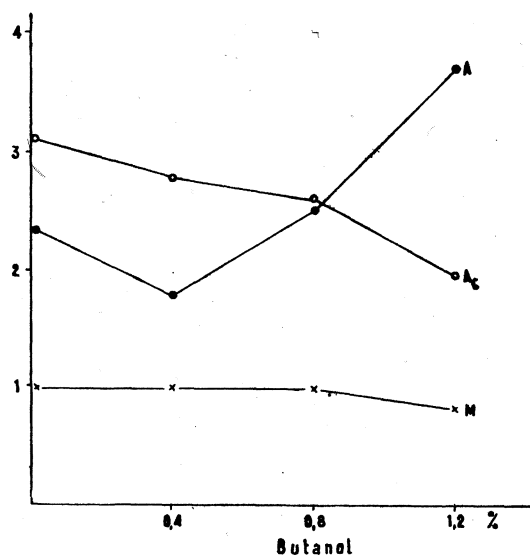


Figura 6

A. $\times$ 10. M $\times$ 30

b) Es medio de melazas de remolacha, adicionado con ferrocianuro (0,08 por ciento), cuyos resultados se expresan en la *figura 7*. Observamos una disminución progresiva de volumen de micelio, un aumento del consumo de azúcar y de la producción de ácido cítrico, hasta 1,2 por ciento de butanol (41,6 por ciento), que luego disminuye. En cuanto a los caracteres morfológicos, en todos los casos, se forman pellas pequeñas con algunas grandes y algunas fibras largas y gruesas.

c) Es medio de melazas de caña, cuyos resultados se expresan en la *figura 8*. Observamos ligera disminución del volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico. Con relación a los caracteres morfológicos, el testigo presenta micelio fibroso con escasas pellas grandes, mientras que en presencia del alcohol no se presentan dichas pellas.

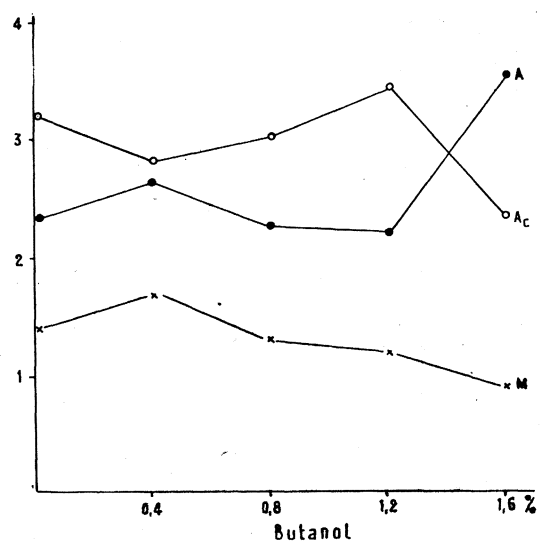


Figura 7

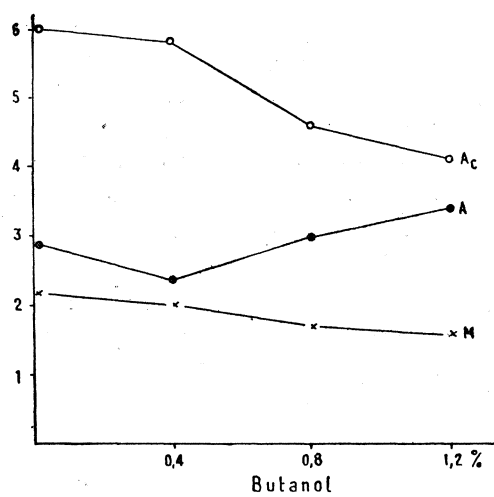
 $A_{\circ} \times 12. M \times 20$ 

Figura 8

 $A_{\circ} \times 3. M \times 15$

d) Es medio de melazas de caña, pero adicionadas con ferrocianuro (0,07 por ciento) y cuyos resultados se expresan en la *figura 9*. Observamos ligera caída de volumen de micelio, ligera variación de consumo de azúcar y disminución de producción de ácido cítrico con 0,4 por ciento de butanol y aumento posterior con más alcohol, pero sin pasar de la concentración que da el testigo. Caracteres morfológicos: el testigo presenta micelio fibroso y con pocas pellas grandes y

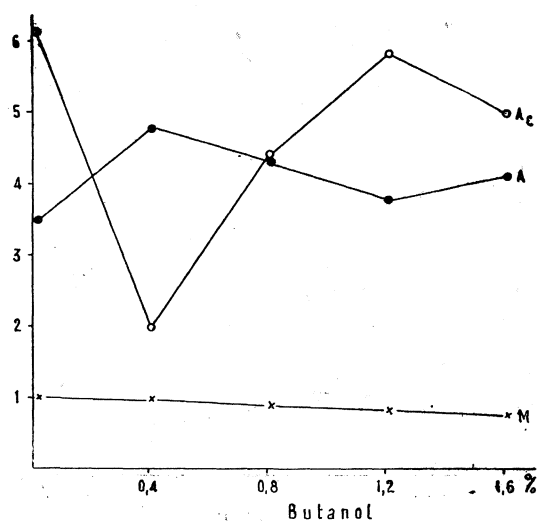


Figura 9.

A. $\times$ 3. M $\times$ 30

fibras largas y gruesas; con 0,4-0,8 por ciento de butanol, se presenta el micelio en pellas pequeñas y escasas fibras, mientras que con más alcohol el micelio es fibroso y con pocas pellas pequeñas.

Influencia del isobutanol

Como en los casos anteriores, empleamos cuatro tipos de medios de fermentación, a los que se adicionan diferentes cantidades de isobutanol, como se indica en cada caso.

a) Es medio de melazas de remolacha. En adiciones de hasta 1,2 por ciento de isobutanol, no se observan variaciones de volumen de

micelio, consumo de azúcar y sí sólo un ligero descenso en la producción de ácido cítrico. En cuanto a los caracteres morfológicos, en todos los casos los micelios son de tipo fibroso, con pellas pequeñas.

b) Es medio de melazas de remolacha, adicionado con ferrocianuro (0,08 por ciento). Se observa que hasta 1,6 por ciento de isobutanol hay ligero descenso en el volumen de micelio, no varía el consumo de azúcar y la producción de ácido cítrico varía muy poco, habiendo un

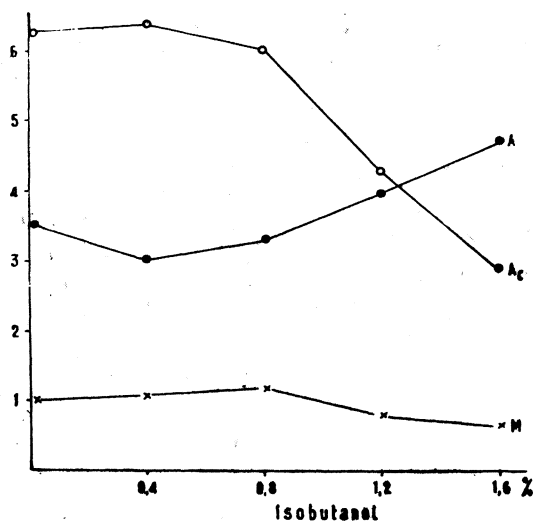


Figura 10

A. $\times 3$. M $\times 30$

óptimo del 46,2 por ciento con 0,8 por ciento de isobutanol. En cuanto a los caracteres morfológicos, en todos los casos se forman pellas pequeñas con fibras largas y gruesas, aunque en el medio testigo también se forman algunas pellas grandes.

c) Es medio de melazas de caña. Se encuentra poca variación de volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, hasta 1,2 por ciento de isobutanol. En cuanto a los caracteres morfológicos, los micelios son fibrosos con alguna pella grande en el testigo y pellas pequeñas en los medios con alcohol.

d) Es medio de melazas de caña, adicionado con ferrocianuro (0,07 por ciento); sus resultados se observan en la figura 10. El volu-

men de micelio sube ligeramente, para luego disminuir; el consumo de azúcar aumenta con la cantidad de alcohol, y la producción de ácido cítrico disminuye rápidamente, a partir de la adición de 0,8 por ciento de isobutanol. En cuanto a los caracteres morfológicos, el micelio del testigo es fibroso, con alguna pella grande, mientras que en las muestras con alcohol son pellas grandes, con alguna fibra larga y gruesa.

Influencia de la morfolina

En este último caso, se emplean dos medios de fermentación, a los que se adicionan diferentes cantidades de morfolina, como se indica en cada caso.

a) Es medio con melazas de remolacha, al que se adiciona hasta 0,10 por ciento de morfolina. No se observa variación apreciable en el volumen de micelio; el consumo de azúcar y la producción de ácido cítrico disminuyen ligeramente. En cuanto a los caracteres morfológicos, no se observan diferencias; el micelio se presenta en pellas grandes y fibras cortas y finas.

b) Es medio de melazas de caña, al que se adiciona hasta 0,10 por ciento de morfolina. Se observan muy ligeras variaciones de volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico. En cuanto a los caracteres morfológicos, el micelio es de tipo fibroso, con fibras cortas y gruesas y algunas pellas grandes.

Influencia del medio de esporulación

Por los métodos y técnicas generales, se prepara una experiencia para ver la posible influencia que ejerce el medio de esporulación sobre la fermentación sumergida de melazas de remolacha (con 0,08 por ciento de ferrocianuro) y de caña (con 3 por ciento de etanol).

Utilizando medios de esporulación: sintético, remolacha I, remolacha II y caña, no se observan variaciones en cuanto a la producción de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, en medios de melazas de remolacha (46,3 por ciento de rendimiento) y de caña (21,7 por ciento de rendimiento). En cuanto a los caracteres morfológicos, en medio de remolacha se forman pellas pequeñas, y en caña, fibras cortas y algunas pellas grandes.

DISCUSION

Estudiamos en el presente trabajo el efecto de la adición de alcoholes de cadena corta a medios de fermentación de melazas de remolacha y caña, tratados o sin tratar por ferrocianuro, por la técnica de fermentación sumergida. En general, se hacen las experiencias en cuatro medios: remolacha, remolacha tratada por ferrocianuro, caña y caña tratada por ferrocianuro.

Medios tratados o adicionados con diferentes cantidades de metanol sufren muy ligeras variaciones, las cuales tienen tendencia al aumento de micelio y consumo de azúcar, así como a disminuir la producción de ácido cítrico, que, en general, da un rendimiento aproximado de: 19 por ciento en remolacha, 38 por ciento en remolacha con ferrocianuro, 17 por ciento en caña y 20 por ciento en caña con ferrocianuro.

Medios adicionados con diferentes cantidades de etanol tienen tendencia a disminuir su volumen de micelio y de consumo de azúcar, así como de producción de ácido cítrico.

La adición de propanol a los diferentes medios produce en medio de melazas de remolacha una rápida disminución de volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, hasta 2,4 por ciento de propanol, que inhibe el crecimiento del hongo. En los demás medios, la adición de propanol produce muy ligeras variaciones, aunque todas ellas con tendencia a disminuir.

En cuanto a la adición de isopropanol a los medios de fermentación mencionados, produce muy ligeras variaciones de volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, aunque, en general, éste tiene tendencia a bajar.

El butanol adicionado en diferentes cantidades a medios de cultivo de melazas produce, en general, disminución en la producción de volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, con excepción de los medios de melazas de remolacha, en los que el consumo de azúcar aumenta a partir de la adición de 0,4 por ciento de butanol; en los tratados por ferrocianuro, también hay un aumento de ácido cítrico, hasta 1,2 por ciento de butanol (41,6 por ciento), disminuyendo después.

En cuanto a la adición de isobutanol, en los medios de fermenta-

ción antes indicados se producen muy ligeras variaciones en cuanto al volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, con excepción de las melazas de remolacha tratadas por ferrocianuro, que dan un óptimo de 46,2 por ciento de ácido cítrico, con 0,8 por ciento de isobutanol.

También probamos la influencia de la adición de morfolina a los diferentes medios de fermentación, encontrando muy ligeras variaciones en cuanto al volumen de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico.

Variaciones en la composición del medio de esporulación no ejercen influencia en la fermentación de melazas de remolacha y caña en fermentación sumergida.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la influencia de los alcoholes de bajo peso molecular sobre la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida de melazas de remolacha y caña, por una raza mutante de *Aspergillus niger*, obtenida por selección natural en nuestro laboratorio.

Se prueban los alcoholes: metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol y morfolina, en medios de melazas de remolacha y caña, tratados y sin tratar por ferrocianuro, encontrándose que, en general, dichos alcoholes producen muy ligeras variaciones en la producción de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, produciendo, en cambio, variaciones en cuanto a los caracteres morfológicos del micelio. En fermentación sumergida, el medio de esporulación ejerce muy poca influencia en la fermentación.

SUMMARY

In this paper we study the influence of alcohols of a low molecular weight, on the production of citric acid by submerged fermentation of molasses by a mutant of *Aspergillus niger* obtained by natural selection in our laboratory.

In general terms, we see very small variations in the mediums of

beet and cane molasses, treated or not treated by ferrocyanide, when we added several concentration of methanol, ethanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol and morfoline. We also see that de sporulation medium dont have influence in the submerged fermentation.

BIBLIOGRAFIA

1. MALO, J. L., y REGUEIRO, B. 1957. Microbiol. Españ., 10, 425.
2. MALO, J. L., y REGUEIRO, B. 1959. Microbiol. Españ., 12, 139.
3. MOYER, A. 1953. J. Appl. Microbiol., 1, 7.
4. PUENTE, A., y REGUEIRO, B. 1961. Microbiol. Españ., 14, 209.
5. PUENTE, A., y REGUEIRO, B. 1962. Microbiol. Españ., 15, 35.

ALGUNAS OBSERVACIONES SOBRE EL APARATO BUCAL DE *FRONTONIA* (CILIADOS, HOLOTRICOS)*

POR

J. PEREZ-SILVA y ROSARIO GIL

Desde que Chatton y colaboradores, hace unos treinta años, emitieron la hipótesis de la autonomía y continuidad genética de la infraciliatura de los protozoos ciliados, se ha ido concediendo cada vez mayor importancia taxonómica a la disposición y morfogénesis de las cinetias, especialmente a las que constituyen la infraciliatura de las organelas bucales.

Furgason (10), en 1940, propuso la idea de que la organización tetrahiménica del aparato bucal de los holotricos del grupo *Colpidium-Glaucoma* constituye un esquema básico al que es posible referir las organelas bucales de muchos de los holotricos. Esta idea ha sido generalmente aceptada, a juzgar por las publicaciones que en este sentido se han hecho, principalmente sobre los géneros *Leucophrys*, *Tetrahymena* (3), *Paramecium* (7, 20), *Stokesia* (8), *Disematostoma* (16), *Frontonia* (8, 18), *Pseudomicrothorax* (5) y *Saprophilus* (19).

En 1956, Corliss (4), basándose en la hipótesis de Furgason y en las sugerencias de Faure-Fremiet (9) acerca de la morfogénesis de las organelas bucales, propuso una nueva clasificación de los ciliados, en la que, entre otras cosas, se suprime el orden Trichohymenostomata de Gelei (11) y se hace una reagrupación de los subórdenes Gymnostomina, Trichostomina e Hymenostomina de los sistemas de Jahn y Jahn (13) y de Hall (12), dándoles categoría de orden y trasladando al último de ellos (Hymenostomatida) todas aquellas formas en las que

(*) Comunicación presentada al XXV Congreso Lusoespañol para el Progreso de las Ciencias. Sevilla, noviembre de 1960.

ya se había demostrado la organización tetrahiménica de su aparato bucal.

Según Corliss (4), el género *Frontonia* es uno de los que requieren mayor atención en cuanto al estudio de la infraciliatura del aparato bucal. Además, a través del análisis de la literatura, se observa disparidad entre los resultados que en este sentido han encontrado Gelei, por una parte, y Faure-Fremiet, por otra. Estas circunstancias nos han movido a emprender un estudio del género *Frontonia*, con vistas a una posible clasificación del mismo basada en la morfología, disposición y constitución de las organelas bucales. En la presente comunicación nos limitamos a hacer algunas observaciones sobre el particular.

MATERIAL Y METODOS

Hemos utilizado para este estudio: *Frontonia leucas* Ehrenberg, que se mantiene en cultivo en el «Zoologisches Institut der Universität» (Tübingen); *F. depressa* Kahl, aislada por nosotros de un charco del «Botanische Garden» (Tübingen), y *Frontonia* sp., también aislada por nosotros de la fuente que hay en el patio del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid), y que, según los sistemas de Kahl (14) y de Bullington (1), se puede identificar como *F. leucas*.

Para poner de manifiesto la infraciliatura empleamos el método de impregnación argéntica de Chatton-Lwoff tal como lo ha descrito Corliss (2).

Para el estudio de la ciliatura bucal nos valemos del método de Ruthmann (17) para el montaje de cortes histológicos de piezas incluidas en metacrilato y examen por microscopía de contraste de fases.

RESULTADOS

Según nuestras observaciones, el complejo de organelas bucales consta, en las tres especies de *Frontonia* estudiadas, de tres penículos situados en la pared izquierda de la cavidad bucal y de una «membrana endoral» que se encuentra junto al borde derecho de la cavidad bucal (figuras 1-2). Numerando los penículos de fuera a dentro (desde la abertura bucal hacia el citostoma), vemos que los penículos 1 y 2 están muy próximos entre sí y corren paralelos al borde izquierdo de

la cavidad bucal, mientras que el penículo 3 está algo separado de los otros dos y más o menos incurvado hacia el fondo de la cavidad.

La llamada membrana endoral está representada en las preparaciones obtenidas por el método de Chatton-Lwoff por una línea longitudinal argentófila que, situada en la pared derecha de la cavidad bucal, se extiende desde la parte anterior hasta poco más de la mitad de dicha cavidad (*figuras 1-2*). En las preparaciones obtenidas por el método de Ruthmann (*figuras 5-6*) se aprecia un engrosamiento en la pared derecha de la cavidad bucal, el cual corresponde, según nuestra opinión, a la línea argentófila. No hemos encontrado, pues, en el lado derecho de la cavidad bucal una auténtica membrana, de constitución ciliar; en cambio, en la pared izquierda se pueden observar claramente los cilios de los tres penículos.

Dentro de este plan general se pueden apreciar diferencias entre las tres formas que hemos estudiado. Así:

En *Frontonia leucas* (*figura 7*), cada penículo consta de cuatro hileras de cilios, mientras que en *F. depressa* (*figuras 5-6*) y en *Frontonia sp.* (*figura 4*), los penículos constan de cinco hileras.

El penículo 3 está muy poco incurvado en *Frontonia sp.* (*figura 3*) y en *F. leucas* (*figura 7*), mientras que en *F. depressa* (*figura 1*) está notablemente incurvado.

La línea argentófila (¿membrana endoral?) es mucho más patente y definida en *Frontonia depressa* que en las otras dos especies estudiadas.

En cuanto a la cinetia paraoral, descrita por Roque en *Disematosoma tetraedrica* (16) y por Yusa en siete especies de *Paramecium*, la hemos podido observar sólo en *Frontonia sp.*; recorre todo el borde izquierdo de la abertura bucal (*figura 3*) y está integrada por cinetosomas muy finos, aproximadamente de la misma magnitud que los cinetosomas peniculares.

DISCUSION

Como ya hemos indicado, *Frontonia sp.* se puede considerar, según las claves de Kahl (14) y de Bullington (1), como *F. leucas* Ehrenberg, pero, dado que el número de cinetias de cada penículo no es el mismo en ambas formas, hemos de quedar en expectativa hasta que posteriores estudios decidan si este carácter es o no constante dentro de

cada especie; actualmente parece haber contradicción en este sentido, ya que Corliss (4) admite que «cada especie posee una norma característica y estable de estructuras argentófilas, principalmente los gránulos basales o cinetosomas», y, por otra parte, en *Paramecium bursaria* se han encontrado unas veces once y otras veces ocho cinetias peniculares (7, 20).

También parece que existe diversidad dentro del género *Frontonia* con respecto al número de penículos: Gelei (11) dice que hay dos, Faure-Fremiet (8) encuentra cuatro y Dragesco (18) describe dos penículos; nosotros hemos observado siempre tres; en esto coincidimos con los resultados que han encontrado Small y Profant (18) en *F. leucas*. Según la hipótesis de Furgason, el número básico de organelas izquierdas ha de ser tres (AZM de los Hymenostomatida Tetrahymenina); este número ha sido encontrado en otros géneros de Peniculina, como, por ejemplo, en *Disematostoma* (16) y en *Paramecium* (7, 20). En los Tetrahymenina, las tres organelas izquierdas son membranelas; en *Disematostoma* y *Frontonia* son penículos, mientras que en *Paramecium* existen dos penículos y el *quadrulus*; teniendo en cuenta que tanto en *F. depressa* (figura 1) como en *Disematostoma* (16), el penículo 3 lleva, en general, una trayectoria análoga a la del cuádrulo de *Paramecium* (20), no creemos aventurado concluir que ambas estructuras son homólogas, aun cuando existan diferencias en el número y disposición de las cinetias y en el tamaño de los cinetosomas.

En cuanto a la llamada membrana endoral, se observa una cierta confusión en la literatura; se suele describir como una cinetia longitudinal, corta, integrada por cinetosomas muy pequeños, pero unos autores, como Yusa (20), la localizan dentro de la cavidad bucal, mientras que otros, como Roque (16), la sitúan en el borde derecho de la abertura bucal; ambos la relacionan con la membrana ondulante de los Tetrahymenina. Por otro lado, Corliss (6) distingue, aunque no con precisión, dos organelas a la derecha del citosoma: la membrana endoral y la membrana paraoral, considerando esta última denominación como sinónima de membrana ondulante. Nosotros, en los cortes transversales a la altura de la cavidad bucal de *Frontonia depressa* (figuras 5-6), no hemos podido observar, en la pared derecha de dicha cavidad, la organela externa (¿membrana endoral?) correspondiente a la línea argentófila que se pone de manifiesto (figura 1) por el método de Chatton-Lwoff. Tampoco aparece la membrana endoral en la elec-

tronofotografía que publican Ehret y Powers (7) de un corte transversal de *Paramecium bursaria*, donde, en cambio, se pueden observar claramente los penículos y el cuádrulo. Vemos, pues, que no siempre existe una correspondencia exacta entre ciliatura e infraciliatura: a veces puede faltar la contrapartida externa. Este hecho, a nuestro juicio, puede ser de utilidad para el estudio de la evolución y taxonomía de los Ciliados.

Faure-Fremiet (8), basándose en la organización y morfogénesis del aparato bucal, ha propuesto la línea ortogenética *Paramecium* → *Stokesia* → *Disematostoma* → *Frontonia*, pero, a la luz de trabajos más recientes, parece más verosímil la línea propuesta por Parducz (15): *Colpidium* → *Glaucoma* → *Disematostoma* → *Frontonia* → *Paramecium*, aunque también cabe la posibilidad de que la línea que va desde los Tetrahymenina a los Peniculina se bifurque en dos direcciones. Una de ellas (en la que estarían *Stokesia* y *Paramecium*) llevaría consigo la aparición del cuádrulo; en la otra (*Disematostoma*-*Frontonia*) se conservaría la constitución penicular de la tercera organela de la AZM. Esto, evidentemente, sólo son conjeturas en espera de un estudio más extenso de la organización del aparato bucal, no solamente de los Peniculina, sino de todo el orden Hymenostomatida.

Expresamos nuestra gratitud más sincera al Prof. Dr. Karl G. Grell, Director del «Zoologisches Institut», de la Universidad de Tübingen, y a sus colaboradores, Dr. Bierbrodt, Dr. Ruthmann, Dr. Czihak y Sr. Heckman, así como al restante personal de dicho Centro, por la ayuda y enseñanzas que nos han prodigado.

RESUMEN

Se estudia la ciliatura (por el método de Ruthmann) y la infraciliatura (por el método de Chatton-Lwoff) de las organelas bucales de *Frontonia* sp., *F. leucas* y *F. depressa*. En la pared izquierda de la cavidad bucal se observan tres penículos, cada uno de los cuales consta de cuatro hileras de cilios en *F. leucas* y de cinco hileras en las otras dos especies estudiadas. En la pared derecha de la cavidad bucal se

pone de manifiesto, mediante impregnación argéntica, una línea longitudinal que, según la hipótesis de Furgason, se habría de considerar como la infraciliatura de la membrana endoral; sin embargo, en los cortes obtenidos según el método de Ruthmann no se observa tal membrana.

Se discute el posible significado taxonómico de la morfología y constitución de las organelas bucales.

SUMMARY

In this work the ciliature (using Ruthmann method) and the infraciliature (Chatton-Lwoff method) of the buccal organelles of *Frontonia* sp., *F. leucas* and *F. depressa* have been studied. On the left side of the buccal cavity we can see three peniculi which consist of four rows of cilia in *F. leucas* and five rows in the other two species. Using silver impregnation we can see on the right side of the buccal cavity a longitudinal argentophilic line which could be the infraciliature of the endoral membrane according Furgason's hypothesis. No such a membrane is observed in the cross sections that have been prepared by means of Ruthmann's method.

The authors discuss the possible taxonomic significance of the morphology and organization of the buccal organelles.

BIBLIOGRAFIA

1. BULLINGTON, W. E. 1939. A study of spiralling in the ciliate *Frontonia* with a review of the genus and a description of two new species. Arch. Protistenk., 92, 10-66.
2. CORLISS, J. O. 1953. Silver impregnation of ciliated protozoa by the Chatton-Lwoff technic. Stain Technol., 28, 97-100.
3. CORLISS, J. O. 1953. Comparative studies on holotrichous ciliates in the *Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena* group. II. Morphology, life cycles, and systematic status of strain in pure culture. Parasitology, 43, 49-87.
4. CORLISS, J. O. 1956. On the evolution and systematic of ciliated protozoa. Systematic Zool., 5, 68-91, 121-40.
5. CORLISS, J. O. 1958. The systematic position of *Pseudomicrothorax dubius*, ciliate with a unique combination of anatomical features. J. Protozool., 5, 184-93.

6. CORLISS, J. O. 1959. An illustrated key to the higher groups of the ciliated protozoa with definition of terms. *J. Protozool.*, 6, 265-81.
7. EHRET, C. F., y POWERS, E. L. 1957. The organization of gullet organelles in *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.*, 4, 55-59.
8. FAURE-FREMIET, E. 1949. Morphologie comparée des ciliés holotriches Trichostomata et Hymenostomata. *Compt. Rend. Congr. Intern. Zool.*, 13e Congr., París, 1948, 215-16.
9. FAURE-FREMIET, E. 1950. Morphologie comparée des ciliés holotriches trichostomes. *Anais Acad. Brasil. Cienc.*, 22, 257-61.
10. FURGASON, W. H. 1940. The significant cytostomal pattern of the *Glaucoma-Colpidium* group, and a proposed new genus and species, *Tetrahymena geleii*. *Arch. Protistenk.*, 94, 224-66.
11. GELEI, J. von. 1934. Der feinere Bau des *Cytopharynx* von *Paramecium* und seine systematische Bedeutung. *Arch. Protistenk.*, 82, 331-62.
12. HALL, R. P. 1953. *Protozoology*. Prentice-Hall, Inc. Nueva York.
13. JAHN, T. L., y JAHN, F. F. 1949. *How to know the Protozoa*. C. Brown Company Publishers, Dubuque, Iowa.
14. KAHL, A. 1931. *Urtiere oder Protozoa*. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). II. Holotricha. *En Die Tierwelt Deutschlands*. G. Fischer, Jena.
15. PÁRDUZ, B. 1940. Verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den Gattungen *Uronema* und *Cyclidium*. *Bau und Lebensweise von Cyclidium glaucoma* Müll. *Arch. Protistenk.*, 93, 185-214.
16. ROQUE, M. 1957. Ciliature somatique et ciliature buccale chez *Disematostoma tetraedrica* (Cilié holotriche). *Compt. Rend.*, 244, 2.657-60.
17. RUTHMANN, A. 1960. Comunicación personal (actualmente ya publicada*).
18. SMALL, E. B., y PROFANT, R. J. 1960. A revaluation of the morphology of the Hymenostome Ciliate, *Frontonia leucas* Ehrenberg, 1838, with emphasis on the buccal organization. (Abstr.). *J. Protozool.*, Supp. 9.
19. STOUT, J. D. 1956. *Saprophilus muscorum* Kahl, a tetrahymenial ciliate. *J. Protozool.*, 3, 28-30.
20. YUSA, A. 1957. The morphology and morphogenesis of the buccal organelles of *Paramecium* with particular reference to their systematic significance. *J. Protozool.*, 4, 128-42.

(*) 1961. Die Mikroskopische Untersuchung von Methacrylat-Schnitten. *Zeiss-Mitteilungen*, 2, 155-62.

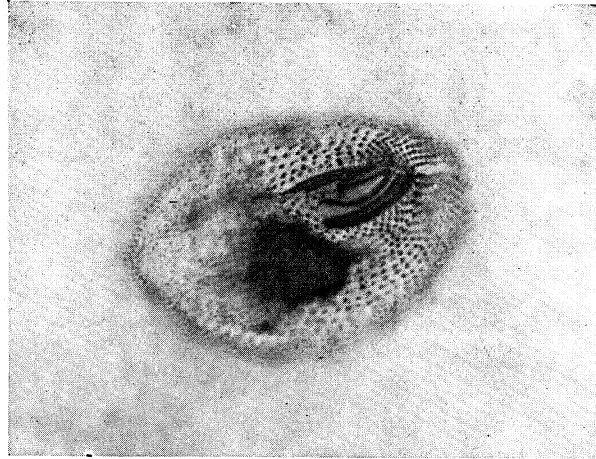


Figura 1. Frontonia depressa. Impregnación argéntica. × 450



Figura 2. Frontonia sp. Impregnación argéntica. × 450

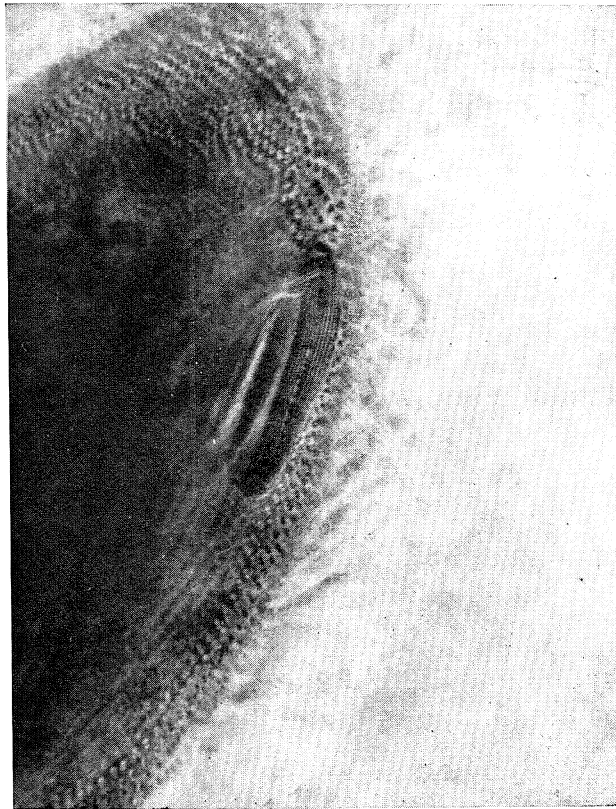


Figura 4. *Frontonia* sp. Impregnación argéntica. $\times 1.200$

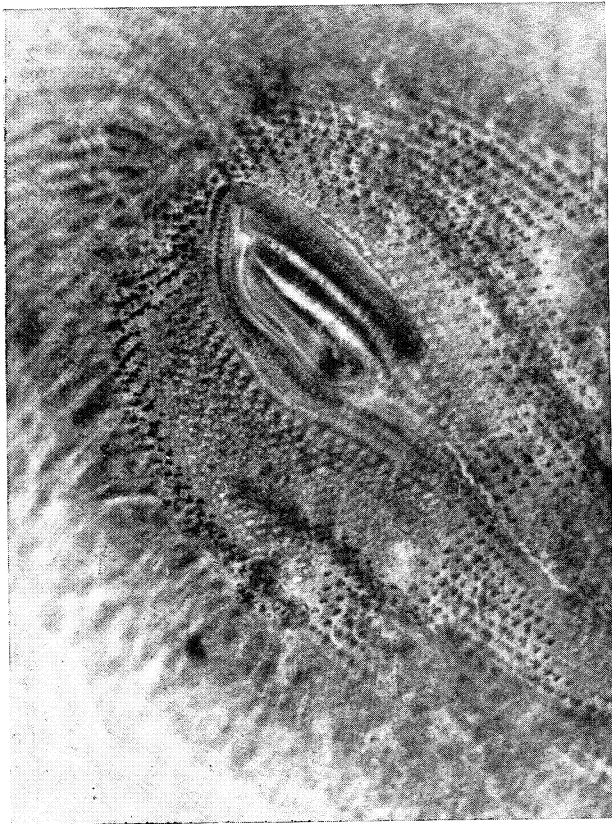


Figura 3. *Frontonia* sp. Impregnación argéntica. $\times 1.200$

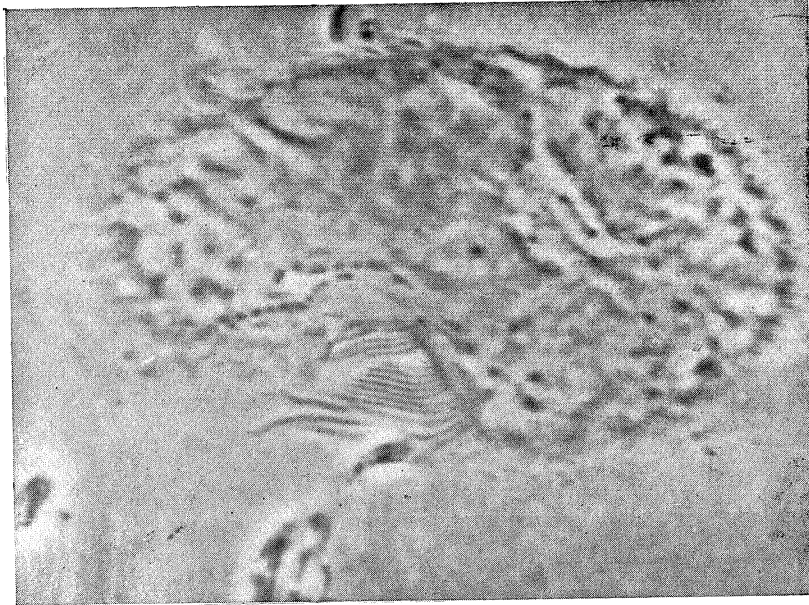


Figura 5. Frontonia depressa. Corte transversal pasando por la parte anterior de la cavidad bucal. Observación en contraste de fases. $\times 2.000$ (aproximadamente)

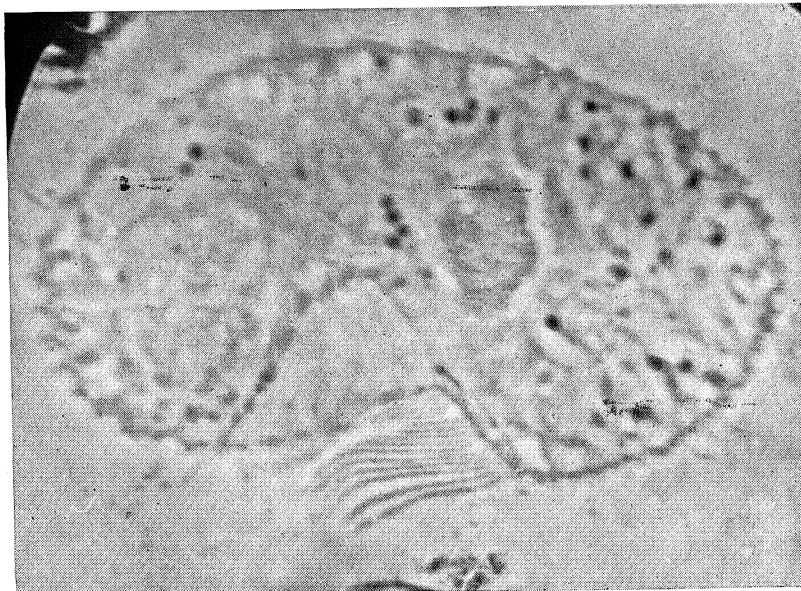


Figura 6. Frontonia depressa. Corte transversal pasando por la parte posterior de la cavidad bucal. Observación en contraste de fases. $\times 2.000$ (aproximadamente)

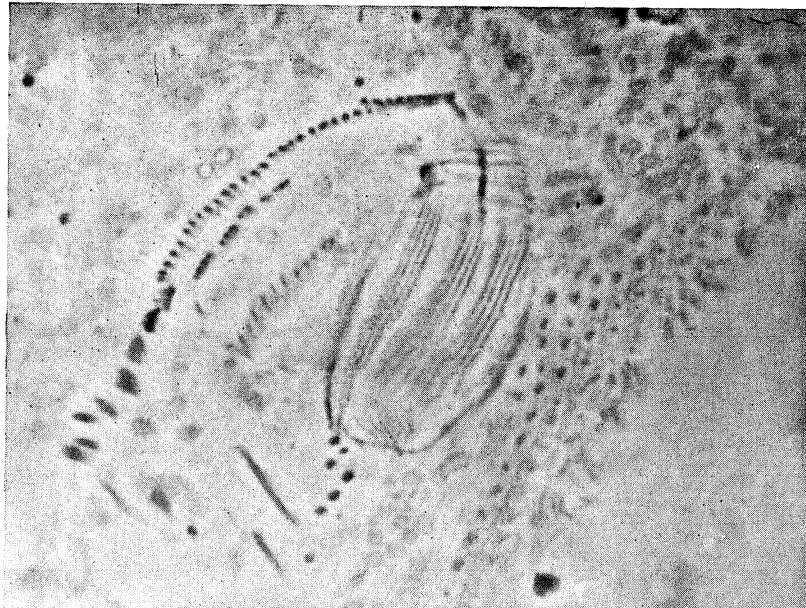


Figura 7. Frontonia leucas. Corte longitudinal, algo oblicuo, pasando por la zona distal de la cavidad bucal. Observación en contraste de fases. $\times 2.000$ (aproximadamente)

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

PRODUCTION OF PECTIC ENZYMES BY PATHOGENIC AND NON-PATHOGENIC SPECIES OF *VERTICILLIUM*

BY
J. A. LEAL and J. R. VILLANUEVA

Fungi of several genera are known to degrade pectic materials. There is, however, little knowledge of the enzymic processes involved on the differences between the enzyme systems of pathogenic and non-pathogenic species. Pectolytic activity in fungi has been found to depend upon a complex of enzymes which may include pectinmethylesterase, polygalacturonase and one or more of a group of glycosidases. It appears that the cell wall is the principal site of attack, pectic substances appearing to occur in most, perhaps all, plant tissues. It has been suggested that the formation of pectic enzymes may play an important role in producing the wilting symptoms of many plant diseases. *Verticillium* wilt occurs generally throughout many countries on a variety of plants and is one of the most serious of the diseases of crops caused by a soil borne-pathogen.

Several species of the fungi *Verticillium* have been tested for ability to produce pectic enzymes *in vitro*. Studies of the pectolytic enzymes may be especially valuable in understanding the exact role of the enzymes in the penetration of the pathogen into the host cells.

MATERIALS AND METHODS

Organisms

Stock cultures of *Verticillium* obtained from the sources described in Table I were maintained on GAE medium, stored in the refrigerator after 10 days growth. Designations used by the persons who supplied the cultures were accepted without checking.

Table I. Strains of the genera *Verticillium* used to study pectic enzyme production

Organisms	Number of strains tested	Isolated from
<i>Verticillium alboatrum</i>	11	lucerne, tomato, mentha
<i>Verticillium tricorpus</i>	4	tomato
<i>Verticillium dahliae</i>	10	lucerne, mentha
<i>Verticillium nigrescens</i>	3	potato
<i>Verticillium hemileiae</i>	3	a saprophite
<i>Verticillium</i> sp.	2	tomato, potato
<i>Verticillium</i> sp. n° 14	1	peony
<i>Verticillium</i> sp. n° 3	1	black raspberry
<i>Verticillium</i> sp. n° 17	1	mallow
<i>Verticillium</i> sp. n° 22	1	peppermint
<i>Verticillium</i> sp. n° 39	1	strawberry
<i>Verticillium</i> sp. n° 40	1	maple
<i>Verticillium</i> sp. n° 74	1	portulaca

Media

GAE medium. Glucose, 10 g; asparagine, 1 g; yeast extract, 0.5 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g; agar, 20 g; distilled water, 900 ml, and tap water, 100 ml. The glucose was autoclaved separately and mixed when cool.

Pectin media. Fundamentally the pectin media described by Smith (3) were used.

Pectin substrates. A commercial pectin (British Drug House) and Na polipectate prepared by us, were used for the preparation of the pectin media.

Growth of the organisms

Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 100 ml of pectin medium, were inoculated with 1 ml of spore suspensions of the various species of *Verticillium* and incubated statically at 28 °C. At three days intervals, samples were withdrawn and centrifuged at 1,500 g for 15 min. The supernatant fluids were used for pectolytic activity determinations.

Pectolytic enzyme production

Pectolytic activity was determined by the loss of the precipitate formed on adding ethanol. The test was conducted as follows: Absolute ethanol (6 ml) was added to 3 ml of culture supernatant fluid, shaken and centrifuged; the sediment was compared with that from an uninoculated control and graded arbitrarily. In some cases the pectic enzyme methods described by Waggoner and Dimond (4) were also used.

Parallel studies on the pectolytic activity of the *Verticillium* were also made following the pectin-agar plate method described by Wieringa (5) but with a light modification. To the medium described by the previous worker to cultivate pectolytic microbes, were added a few drops of bromothymol blue solution (1.5 per cent). In due time colonies will be formed and pectic breakdown was easily recognised as gelatin liquefaction on a gelatin plate, the fungi that had this powder making pits in the pectin layer with change in the colorant from yellow to blue colour. With this method the pectolytic organisms were easily detected.

RESULTS

A determination of the pectinolytic enzymes of *Verticillium hemileiae* as well of other *Verticillium* species in culture was considered essential to demonstrate their possible relationships to the uredospore digestion process (1, 2).

Employing the alcohol precipitation method of analysis of pectin, filtrates of 40 isolates of the genera *Verticillium* were assayed during 20 days over a wide pH range. The results obtained demonstrated that

all the pathogenic strains produced active pectinolytic enzymes under the test conditions. The inability of the non-pathogenic strains of *Verticillium* to degrade pectic substrates was demonstrated (figure 1).

Absence of pectic enzymes in *Verticillium hemileiae* was further confirmed by the plate method described by Wieringa. The growth of the *V. hemileiae* isolates in solid medium containing pectin-agar, resulted in abundant fungal growth without loss of integrity of the medium surface. These results represent conclusive proof of the inability of the isolates of *V. hemileiae* to produce pectic enzymes in artificial conditions.

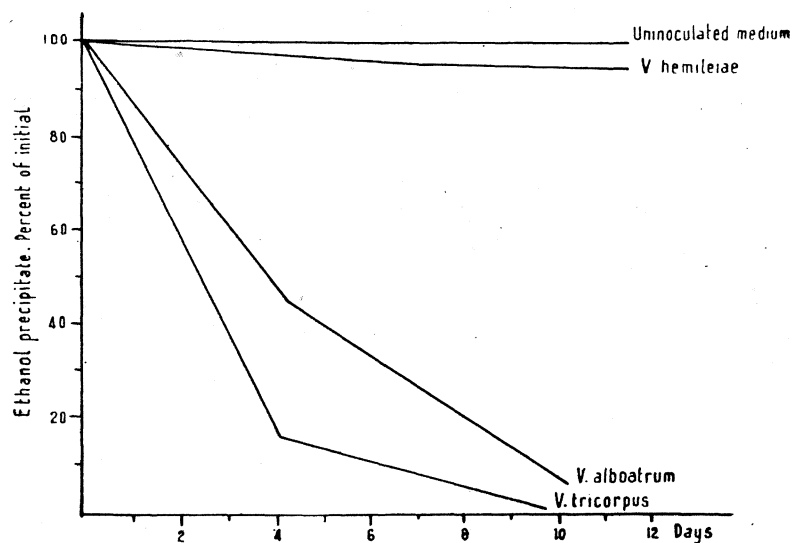
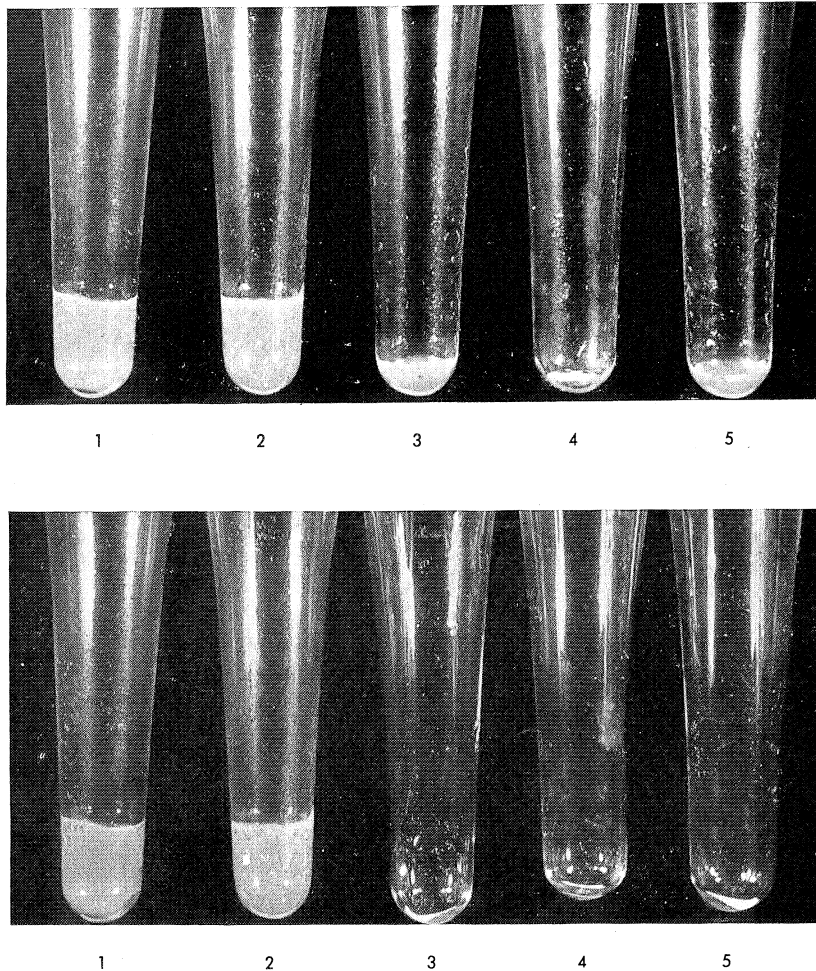


Figure 1. Reduction in alcoholic precipitate of pectin medium caused by the growth of *Verticillium* sps

DISCUSSION

Although the direct mechanisms active in pathogenesis were not the immediate objectives of this study, some of the findings apply to the facet of the disease problem. Most of the species of the form genus *Verticillium* occurring in association with plants or plant parts, are members of the soil microflora or are facultative parasites although observations establish a limited period of survival with no living host.



Figures 2-3. Ethanol precipitation of pectin in culture filtrates: 1, uninoculated medium; 2, *Verticillium hemileiae*; 3, *V. alboatrum*; 4, *V. tricorpus*; 5, *V. nigriscens*. Above, after 4 days inoculation and below, after 12 days inoculation

Pectolytic activity of *Verticillium hemileiae* was either very low or undetectable. None of the non-pathogenic molds tested were pectolytic. This fact may be inherent in the strains tested or some strains may have lost the faculty during laboratory cultivation. That this was not the case was demonstrated by using also in these investigations fresh isolates of the saprophytic *Verticillium*, which gave practically the same results. Failure to demonstrate pectolytic activity in the non-pathogenic *V. hemileiae* culture filtrates, might suggest that the role and the very high activity of this enzyme in all the other pathogenic species of *Verticillium* is important in pathogenesis of this group of organisms on plants. Smith (3) has described how the production of a pectolytic enzyme, pectinmethylesterase, is reserved to a small number of pathogenic bacteria.

From the results of this investigation it seems presumptive to assume that the pectic enzymes elaborated *in vitro* by the pathogenic strains of *Verticillium* might be responsible for the plant responses observed under conditions of natural infection. Admittedly, these results are not conclusive but they give evidence that the presence or absence of pectolytic activity in the *Verticillium* strains might play a significant role in the decomposition of host tissues by the pathogenic strains of this organism.

SUMMARY

Forty cultures of plant pathogenic and non-pathogenic fungi of the genera *Verticillium* from various sources were tested for production of pectic enzymes in culture using the ethanol precipitation and the pectin-agar plate methods. All the pathogenic strains of *Verticillium* tested showed high pectolytic activity. No evidence of pectic enzyme production was found in the non-pathogenic strains of *Verticillium hemileiae*. The nature of the diseases caused by those pathogenic species might suggest that pectic degradation is involved.

ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful to Prof. A. Branquinho d'Oliveira, of the «Estação Agronómica Nacional» (Portugal), Prof. M. E. Corden and C. E. Horner of the Oregon State University (U. S. A.), and Dr. I. Isaac of the Uni-

versity College of Swansea (England), for providing cultures, and also to Mr. M. N. Moneró for his assistance in obtaining photographs during the course of this work.

RESUMEN

Se han utilizado cuarenta cepas de especies patógenas y no patógenas del género *Verticillium* procedentes de varios orígenes, para estudiar la producción de enzimas pécticas en cultivo, usando los métodos de precipitación con etanol y el de la placa con pectina-agar. Todas las cepas patógenas de *Verticillium* que se han ensayado, mostraban elevada actividad pectolítica, mientras que no había evidencia alguna de producción de enzimas pécticas en las especies no patógenas. La naturaleza de las enfermedades causadas por estas especies patógenas pudiera sugerir que una de las primeras fases de la enfermedad consiste en una degradación péctica.

REFERENCES

1. LEAL, J. A., and VILLANUEVA, J. R. 1962. Science, 136, 715.
2. LEAL, J. A., and VILLANUEVA, J. R. 1962. Nature (in press).
3. SMITH, W. K. 1958. J. Gen. Microbiol., 18, 33.
4. WAGGONER, P. E., and DIMOND, A. E. 1955. Phytopathology, 45, 79.
5. WIERINGA, K. T. 1949. Intern. Congr. Microbiol., 4th Congr., Copenhagen, 1947. Rept. Proc., 482.

LA RESISTENCIA DE ALGUNAS CEPAS BACTERIANAS AL CALOR COMO CONSECUENCIA DE SU ANTIBIOTICORRESISTENCIA

POR
A. PORTOLÉS y M.^a TERESA PEREZ-UREÑA

Hace tiempo que, al preparar autovacunas de gérmenes muertos por calor, hemos observado una acusada termorresistencia al calor húmedo, precisamente, en aquellas cepas que mostraban manifiesta antibioticorresistencia de carácter polivalente.

Esta posible relación entre termorresistencia y antibioticorresistencia, se hizo más patente aún, cuando después de un cierto tiempo intentamos revisar los resultados por repetición de ensayos con las mismas cepas, pero ya coleccionadas y, por tanto, sometidas a un ritmo periódico de resiembras: los resultados mostraron que las «temperaturas críticas» de estos gérmenes habían descendido de 8 °C a 18 °C y que esta variación coincidía con un aumento en la sensibilidad a los antibióticos.

MATERIAL Y METODOS

Los gérmenes, procedentes de un medio hospitalario, se aislaron de enfermos intensamente sometidos a antibioterapia y todos presentaban como característica común una acusada resistencia polivalente a los antibióticos, que obligó a pensar en que para su eliminación del organismo infectado sería necesario el empleo de inmunoterapia mediante autovacunas.

Seguidamente, el *cuadro 1*, dará idea de las bacterias utilizadas y su origen, así como de la proporción de termorresistencias en ellas observadas.

Cuadro 1. Especies bacterianas utilizadas

Gérmenes	Procedencia	Totales	Termo-resistentes
<i>Staphylococcus aureus</i>	Forunculosis (30), otitis (1), absceso (1)	32	28
<i>Streptococcus faecalis</i>	Cistitis (32), colitis (15)	47	44
<i>Escherichia coli</i>	Colitis (3), infecciones de vías urinarias (11)	14	9

El comportamiento frente a los antibióticos fue estudiado sobre medio líquido (4), mediante determinación de las concentraciones mínimas inhibitoras correspondientes para cada uno de los 15 antibióticos examinados: penicilina, estreptomina, cloromicetina, tetraciclina, aureomicina, terramicina, eritromicina, polimixina B, neomicina, novobiocina, oleandomicina, ristocetina, kanamicina, colimicina y paromomicina.

Para la determinación de la resistencia al calor recurrimos a los métodos de Esty y Williams (1), de Khegifets (2) y de Willis (6), y de ellos sacamos una modificación propia, aplicable al estudio de termorresistencia en autovacunas bacterianas. La técnica seguida por nosotros, fundamentalmente, consiste en preparar una suspensión con el germen problema en solución salina estéril y poner 2 cm³ de ella en cada una de una serie de ampollas estériles, que se cierran a la lámpara.

Con las ampollas así preparadas se siguió el estudio en sus distintas variantes, valorando previamente la proporción de gérmenes viables en la suspensión problema. Para la *curva de supervivencia*, se tienen sumergidas las ampollas en un baño de agua, cuya temperatura se va elevando gradualmente a razón de 1 °C/min, y cada diez minutos se saca una ampolla, determinando en ella la proporción de gérmenes viables sobre la placa; el número de ampollas incluidas en el baño estará de acuerdo con las determinaciones que se van a efectuar. Cuando se trata de conocer la *curva de tiempos de muerte por calor*, se mantienen sumergidas todas las ampollas necesarias en un baño a 0 °C, y después de un minuto de calentamiento previo a 37 °C, se sumergen en baños de agua a diferentes temperaturas; al cabo de tiempos varia-

bles, se van sacando ampollas, y de ellas, inoculando al 10 por ciento en tubos de hemólisis con 2 cm³ de caldo-levadura-resazurina, que se incuban en baño María a 37 °C, para comprobar, a las pocas horas, si hubo crecimiento bacteriano. La determinación de *temperatura crítica* o de inactivación durante treinta minutos se realizó de idéntico modo, sobre distintos baños, pero a período fijo de calentamiento; este dato nos sirvió para comprobar las variaciones dentro de una misma cepa después de varias resiembras.

RESULTADOS

Los datos encontrados se resumen gráficamente, pudiendo ver las *curvas de tiempos de muerte por calor* para cepas sensibles y resistentes en las *figuras 1-3*; en ellos se incluyen los valores medios calculados, sobre un sistema de coordenadas que recogen logaritmos de tiempo en minutos y las distintas temperaturas, de 50°-100 °C.

Las *curvas de supervivencia* se determinaron para las cinco cepas más termorresistentes y otras tantas sensibles de cada especie; y los valores medios calculados, se indican en las *figuras 4-6*.

Después, para regular más fácilmente las posibles variaciones dentro de cada cepa, determinamos las *temperaturas de inactivación durante treinta minutos* como una expresión de la termorresistencia en los distintos lotes experimentales. Los límites de temperatura encontrados se resumen en el *cuadro 2*.

Cuadro 2. Temperatura eficaz durante treinta minutos para producir la muerte de las bacterias

Gérmenes	°C
Estafilococos normalmente termosensibles	65-70
Estafilococos termorresistentes recién aislados	85-90
Estafilococos termorresistentes después de resiembras	73-78
Enterococos termosensibles normalmente	65-73
Enterococos termorresistentes recién aislados	87-93
Enterococos termorresistentes después de resiembras	75-85
Colibacilos normalmente termosensibles	62-68
Colibacilos termorresistentes recién aislados	82-85
Colibacilos termorresistentes después de resiembras	70-75

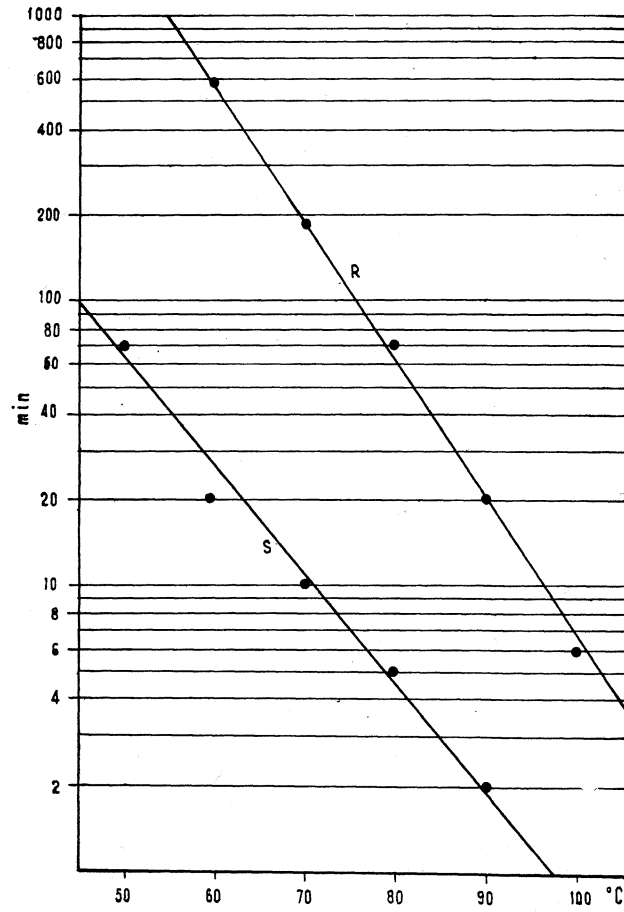


Figura 1. Estafilococos

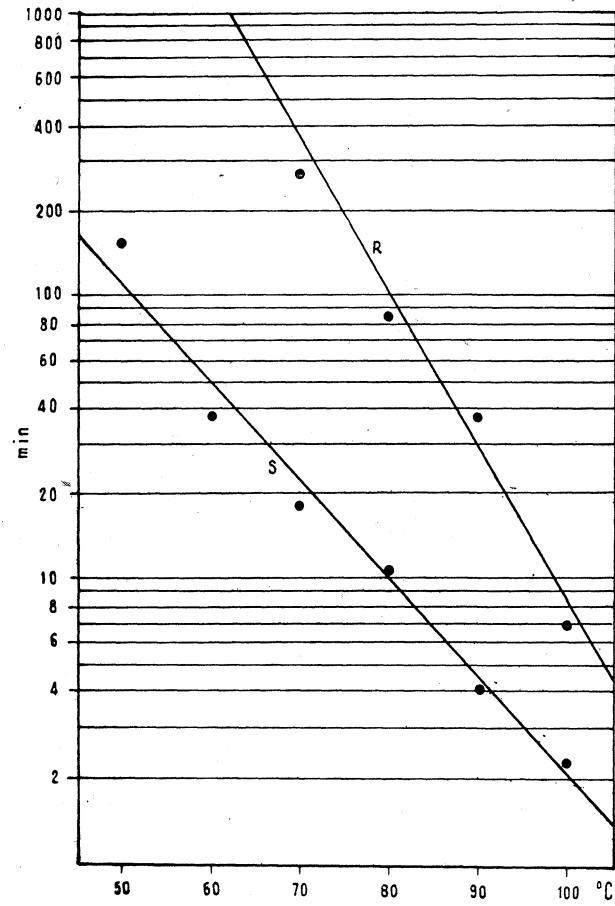


Figura 2. Estreptococos

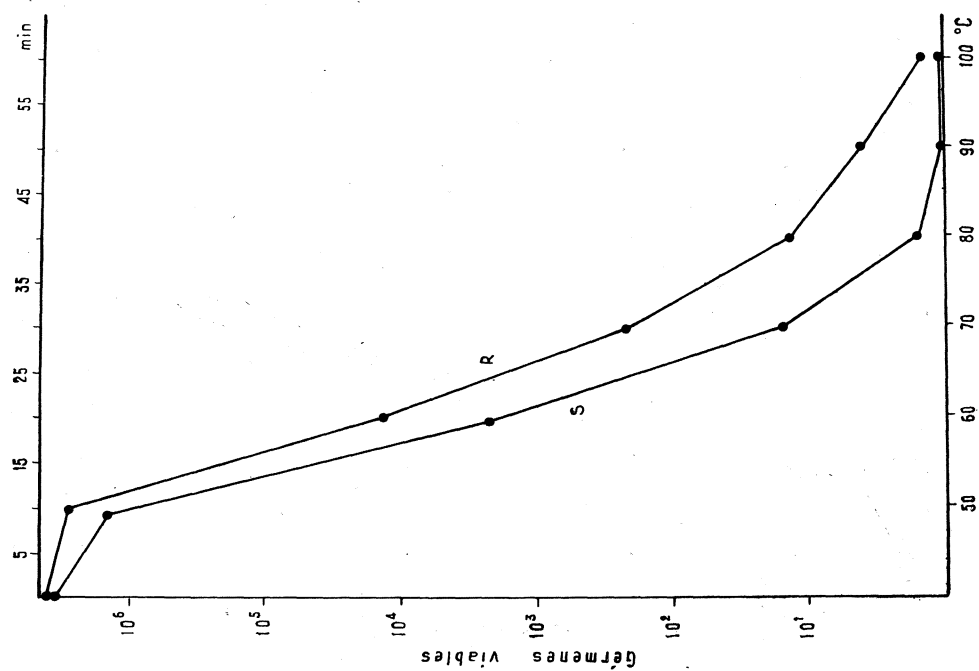


Figura 4. Estafilococos

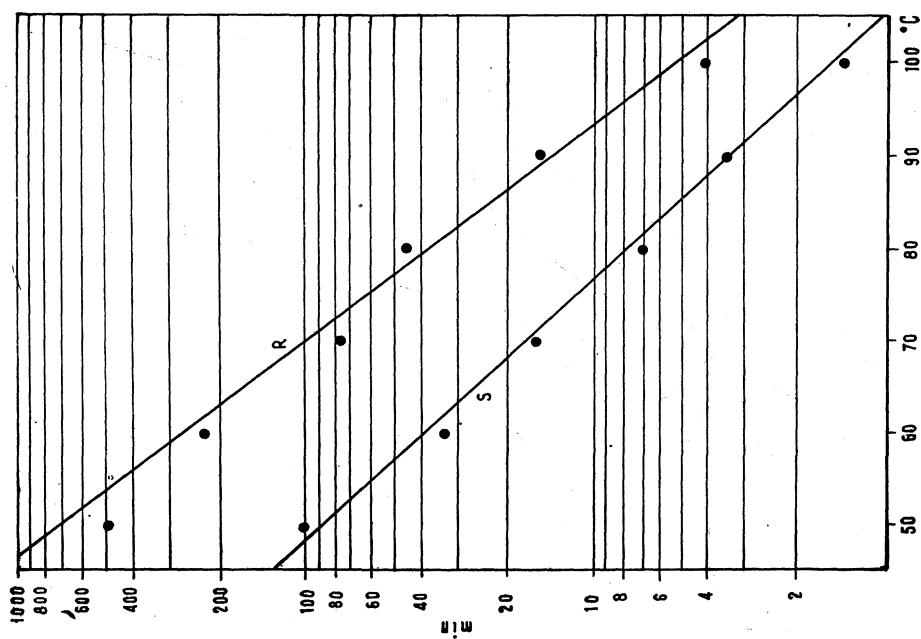
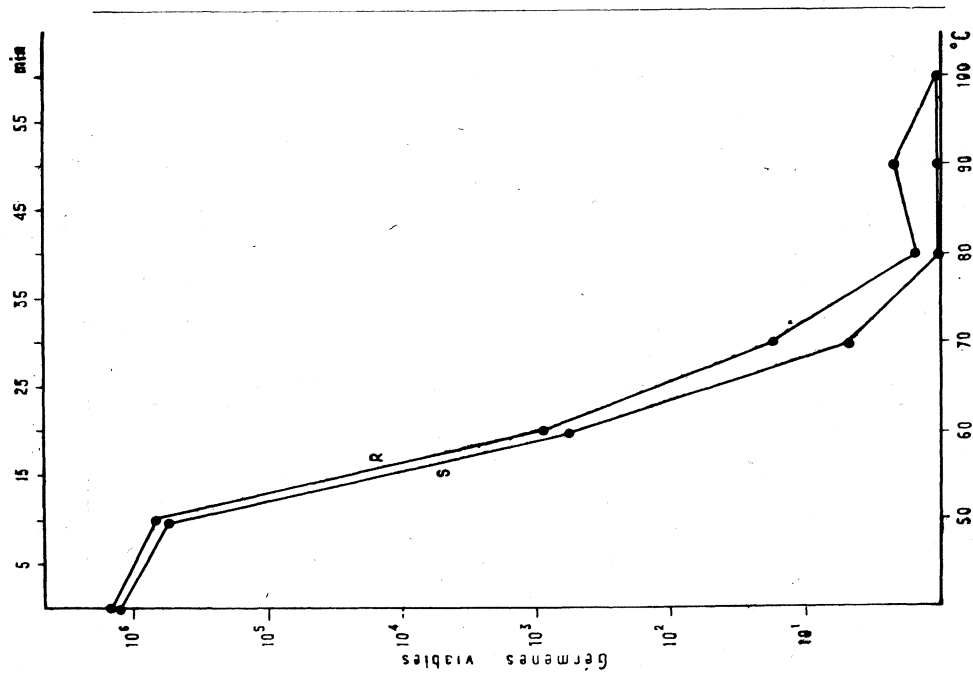
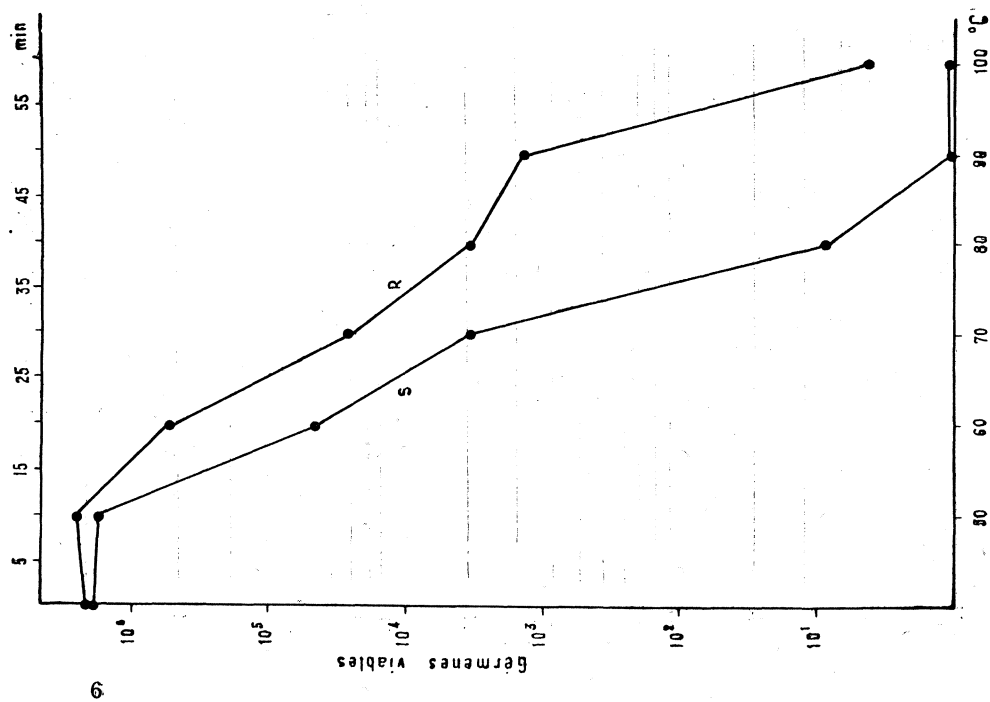


Figura 3. Colibacilos

Figura 6. *Colibacilos*Figura 5. *Streptococos*

Cuadro 3. Variaciones para las C.M.I. () de los distintos antibióticos frente a las diferentes cepas de gérmenes, según que sean normales (a), resistentes recién aisladas (b) o de varias resiembras (c) (en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$)*

Antibióticos	Estafilococos			Enterococos			Colibacilos		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Penicilina	7,50	90,00	60,00	11,25	> 90,00	45,00	30,00	> 90,00	> 90,00
Estreptomina	56,25	> 150,00	112,50	56,25	> 150,00	150,00	4,60	56,25	37,50
Cloromicetina	5,62	67,50	45,00	5,62	45,00	22,50	4,20	67,50	45,00
Tetraciclina	8,40	67,50	33,70	8,40	67,50	45,00	8,40	45,00	33,70
Aureomicina	5,62	67,50	33,70	5,62	45,00	45,00	8,40	67,50	45,00
Terramicina	8,40	90,00	45,00	5,62	67,50	45,00	8,40	67,50	45,00
Eritromicina	4,20	22,50	16,80	5,62	33,70	22,50	45,00	> 45,00	> 45,00
Polimixina B	7,10	28,20	18,75	9,37	18,75	14,10	4,68	14,10	9,37
Neomicina	8,40	45,00	22,50	16,80	22,50	22,50	11,25	33,70	22,50
Novobiocina	5,62	33,70	11,25	8,40	16,80	11,25	33,70	45,00	45,00
Oleandomicina	22,50	> 90,00	75,00	7,50	22,50	15,00	30,00	45,00	45,00
Kanamicina	3,50	14,10	9,37	7,10	14,10	9,37	28,12	56,25	37,50
Colimicina	45,00	> 90,00	67,50	45,00	67,50	67,50	2,10	16,80	11,25
Humatina	90,00	> 90,00	> 90,00	67,50	90,00	67,50	16,80	45,00	33,70

(*) Concentraciones mínimas inhibitorias.

Las variaciones en el comportamiento frente a los antibióticos se resumen en el *cuadro* 3, que recoge los valores medios de los datos más frecuentemente encontrados.

CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

Se ha visto que las curvas de tiempos de muerte por acción del calor son sensiblemente paralelas en las cepas normales de las tres especies bacterianas examinadas y, en general, puede deducirse que la destrucción por este agente físico sigue una gráfica exponencial, o lo que es lo mismo, que es una constante en función del tiempo para todas las bacterias estudiadas.

Cuando se consideran los datos de las curvas de supervivencia, esta significación exponencial es aplicable para temperaturas comprendidas entre 60°-80 °C; por debajo de ellas, hay una desviación de la gráfica que señala la muerte de una pequeña proporción de células más sensibles, y por encima, hay irregularidades que recuerdan al fenómeno de colonias residuales («tailin») en antibioticorresistencia, que corresponde a individualidades extraordinariamente termorresistentes.

Parece ser que la termorresistencia observada es independiente del origen patógeno de la cepa, quedando tan sólo vinculada a una fuerte antibioticorresistencia originada *in vivo*. En un trabajo previo (5), tuvimos ocasión de comprobar que cepas de estafilococo dorado hechas, experimentalmente, *in vitro*, penicilinoresistentes, no alcanzaban esta termotolerancia de un modo tan acusado como las penicilinoresistentes producidas *in vivo*.

Aun cuando se ha comprobado que el grado de termorresistencia disminuye por sucesivas resiembras, análogamente a lo que sucede con la antibioticorresistencia lograda mediante mecanismos de adaptación, no podemos evitar la idea de que en el origen de estas termorresistencias existe un mecanismo de mutación. Las diferentes teorías comprobadas por muchos investigadores, de producción de antibioticorresistencia por variación, adaptación o mutación y nuestras observaciones (3) de que, según como sea administrada la antibioterapia, se obtienen cepas con un grado de resistencia reversible o irreversible, sencilla o múltiple, nos reafirman en la idea de la mutabilidad: las mutaciones originan cepas con un grado de resistencia más elevado, en ellas es

más frecuente detectar el fenómeno de resistencia cruzada o polivalente. Por tanto, no sería de extrañar que en una mutación *in vivo*, provocada por la presencia de un antibiótico, surgieran células bacterianas con resistencia tan acusada a factores adversos del medio ambiente, que incluyeran entre sus actividades la termorresistencia.

Esta termorresistencia se ha encontrado en un 87,5 por ciento de los estafilococos examinados, en el 93,6 por ciento de los enterococos y en el 64,2 por ciento de colibacilos; y en ellos disminuye su grado de efectividad en, aproximadamente, un 10-14 por ciento después de ocho resiembras cada veinte días sobre tubo de agar común inclinado.

RESUMEN

Se ha determinado la termorresistencia de algunas cepas antibióti-corresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli*, mediante curvas de supervivencia y de tiempos de muerte por acción del calor, así como también se estudiaron las variaciones en esta resistencia, al calor, mediante determinación de temperaturas de inactivación por calentamiento durante treinta minutos, en tanto que se controlaban las variaciones en sus antibiogramas.

Se señala una estrecha relación entre termorresistencia y antibióti-corresistencia, suponiendo que el segundo fenómeno biológico—cuando es de gran intensidad—produce cambios inespecíficos en las bacterias, que condicionan la aparición de propiedades biológicas que incrementan la resistencia a otros factores externos.

SUMMARY

The authors, by survival curves and time-death curves, have determined the thermo-resistance on several antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* and *Escherichia coli* strains. On the other hand, they have also reported the variations in this resistance to the heat by determination of inactivation temperature.

The intimate relationship between thermo-resistance and antibiotic-resistance is pointed to and also they mind that in the strong antibiotic-

resistance cases a unespecified change in the bacteria is produced with the consequent apparition of biological properties that increasing the resistance to another external factors.

BIBLIOGRAFIA

1. ESTY, J. R., y WILLIAMS, C. C. 1924. J. Infectious Diseases, 34, 516.
2. KHEGIFETS, M. A. 1958. Mikrobiologuija, 27, 189.
3. PORTOLÉS, A. 1959. Aportaciones al estudio de la antibióticorresistencia microbiana *in vivo*. C. S. I. C. Madrid.
4. PORTOLÉS, A. 1960. Laboratorio, 29, 21.
5. PORTOLÉS, A. 1960. Z. allgem. Microbiol., 1, 1.
6. WILLIS, B. A. 1957. J. Pharm. and Pharmacol., 9, 864.

EL DR. RUBIO, CONSEJERO DEL C. S. I. C.

En el «Boletín Oficial del Estado» del 6 de julio último se ha publicado el nombramiento del Dr. Miguel Rubio Huertos como Consejero de número del Pleno del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, del Patronato «Alonso de Herrera».