

Microbiología Española

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



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 SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
MICROBIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

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
Formas L fijas del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> obtenidas por medio de glicocola, por M. Rubio-Huertos y R. Beltrá ...	219
Factores de patogenicidad del <i>Staphylococcus aureus</i> sensible y resistente a la bencilpenicilina, por E. Porto y B. Regueiro.	231
<i>Carotenobacter subtropicalum</i> , nueva especie del orden Pseudomonadales en suelos subtropicales de Tucumán, por Anastasia de Rokitzka ...	259
Digestión de uredosporas por <i>Verticillium hemileiae</i> , por J. A. Leal y J. R. Villanueva ...	269
Contribución al estudio de la biosíntesis de los ácidos grasos. I. Estudios realizados con células lavadas de <i>Peptostreptococcus elsdenii</i> , por D. Rodríguez y J. Pérez-Silva ...	277
Morfología al microscopio electrónico de las inclusiones granulares del <i>Bacillus megaterium</i> , por R. Moreno ...	289
El VIII Congreso Internacional de Microbiología ...	299
Congreso Internacional de Microscopía Electrónica ...	300
Sociedad de Microbiólogos Españoles ...	301
Información de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología (I. A. M. S.), por R. De Vicente ...	301
Conferencia sobre Microbiología aplicada ...	307

Microbiología Española

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

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

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

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

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

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

Toda la correspondencia para 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

INDICE

	Página
<i>Beltrá, R.</i> : Estudio de la fracción hormonal de los tumores producidos en el olivo por el <i>Pseudomonas savastanoi</i> . I. Biogénesis del ácido β -indolacético contenido en los tumores	13
<i>Beltrá, R.</i> : Véase <i>Rubio-Huertos, M.</i>	
Colección de microorganismos	149
Conferencia del Dr. Rubio	149
Conferencia sobre Microbiología aplicada	307
Congreso Internacional de Microscopía Electrónica	300
<i>Conroy, D. A.</i> : Aislamiento de un pseudomanádido fluorescente, de camarones	89
<i>Conroy, D. A.</i> : Un caso de «manchas rojas» en peces de acuario	95
Curso de Bioquímica microbiana	149
<i>Daurat, Teresa S.</i> : Véase <i>Verna, L. C.</i>	
<i>De Vicente, R.</i> : Información de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología (I. A. M. S.)	301
El Dr. Rubio, Consejero del C. S. I. C.	217
El VIII Congreso Internacional de Microbiología	299
<i>García-Acha, Isabel, y Villanueva, J. R.</i> : Utilización del ácido p-nitrobenzoico por <i>Nocardia V.</i> como única fuente de carbono y nitrógeno	165
<i>García-Gancedo, A. P.</i> : Modificaciones de las células de amnios humano infectadas con el virus «coxsackie»	79
<i>García-Mendoza, Concepción, y Villanueva, J. R.</i> : Acción lítica de un <i>Streptomyces</i> sobre levaduras: obtención de protoplastos	139
<i>Gil, Rosario</i> : Véase <i>Pérez-Silva, J.</i>	
<i>Leal, J. A., and Villanueva, J. R.</i> : Production of pectic enzymes by pathogenic and non-pathogenic species of <i>Verticillium</i>	199
<i>Leal, J. A., y Villanueva, J. R.</i> : Digestión de uredosporas por <i>Verticillium hemileiae</i>	269
<i>Moreno, R.</i> : Morfología al microscopio electrónico de las inclusiones granulares del <i>Bacillus megaterium</i>	289
<i>Pérez-Silva, J., y Gil, Rosario</i> : Algunas observaciones sobre el aparato bucal de <i>Frontonia</i> (ciliados, holotricos)	187
<i>Pérez-Silva, J.</i> : Véase <i>Rodríguez, D.</i>	

<i>Pérez-Ureña, M.^a Teresa: Véase Portolés, A.</i>	
<i>Porto, E., y Regueiro, B.: Caracteres diferenciales entre razas sensibles y resistentes a la bencilpenicilina, del <i>Staphylococcus aureus</i></i>	101
<i>Porto, E., y Regueiro, B.: Factores de patogenicidad del <i>Staphylococcus aureus</i> sensible y resistente a la bencilpenicilina</i>	231
<i>Portolés, A., y Pérez-Ureña, M.^a Teresa: La resistencia de algunas cepas bacterianas al calor como consecuencia de su antibiotorresistencia</i>	207
<i>Puente, A., y Regueiro, B.: Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. VI. Influencia del tratamiento por alcoholes en la fermentación superficial de melazas de azúcar</i>	35
<i>Puente, A., y Regueiro, B.: Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. VII. Influencia de algunos factores en medios de fermentación de melazas y tratamiento de éstas en fermentación sumergida</i>	59
<i>Puente, A., y Regueiro, B.: Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. VIII. Influencia del tratamiento por alcoholes en la fermentación sumergida de melazas de azúcar</i>	171
<i>Quevedo, F.: Véase Rubio-Huertos, M.</i>	
<i>Regueiro, B.: Véase Porto, E.</i>	
<i>Regueiro, B.: Véase Puente, A.</i>	
<i>Rodríguez, D., y Pérez-Silva, J.: Contribución al estudio de la biosíntesis de los ácidos grasos. I. Estudios realizados con células lavadas de <i>Peptostreptococcus elsdenii</i></i>	277
<i>Rokitzka, Anastasia de: <i>Carotenobacter subtropicalum</i>, nueva especie del orden Pseudomonadales en suelos subtropicales de Tucumán</i>	259
<i>Rubio-Huertos, M.: Efectos de la temperatura sobre la sintomatología del virus «ringspot» de la petunia</i>	1
<i>Rubio-Huertos, M., y Beltrá, R.: Formas L fijas del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> obtenidas por medio de glicocola</i>	219
<i>Rubio-Huertos, M., y Quevedo, F.: Recombinación genética entre esferoplastos de <i>Escherichia coli</i> F⁺ × F⁻</i>	151
<i>Sociedad de Microbiólogos Españoles</i>	301
<i>Verna, L. C., y Daurat, Teresa S.: Fotorreactivación bacteriana (<i>Aerobacter aerogenes</i>)</i>	125
<i>Villanueva, J. R.: Véase García-Acha, Isabel.</i>	
<i>Villanueva, J. R.: Véase García-Mendoza, Concepción.</i>	
<i>Villanueva, J. R.: Véase Leal, J. A.</i>	

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

FORMAS L FIJAS DEL *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* OBTENIDAS POR MEDIO DE GLICOCOLA

POR
M. RUBIO-HUERTOS y R. BELTRÁ

INTRODUCCION

En 1956, Rubio-Huertos y Desjardins (6) describieron las formas L inestables de la estirpe B38 de *Agrobacterium tumefaciens* inducidas con glicocola al 1 por ciento; este aminoácido ha sido empleado también por Rubio-Huertos y cols. (4-5, 7-8) para inducir el ciclo L en diferentes bacterias Gram-negativas, excepto en el caso del *Clostridium tetani* (7), y solamente en este último caso se obtuvieron formas L estables, es decir, que no revierten a la forma normal a pesar de ser cultivadas en medios sin el agente inductor.

En el presente trabajo estudiamos la formación de formas L fijas de dos estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*, sus características morfológicas y bioquímicas y su poder patógeno para las plantas.

MATERIALES Y METODOS

Se han utilizado dos estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*, A.T.B. y A.T.vid (*figura 1*), aisladas de vid, intentando la obtención de formas L fijas de dichas estirpes con penicilina y glicocola en diferentes concentraciones, en placas de agar común y agar glucosado.

Inducción con penicilina

Se probaron concentraciones que comprendían de 6.000-100.000 U. I./1 ml; no se han obtenido formas L típicas, sino formas normales mezcladas con formas filamentosas (6.500 U. I.), formas cocáceas y con orejas (8.000 U. I.) y formas ramificadas (11.500-15.000 U. I.) y cocáceas sin ser la forma L típica (15.000-95.000 U. I.). A 100.000 U. I. se inhibe el crecimiento totalmente.

Inducción con glicocola

Se han obtenido colonias L a las concentraciones de 3,3-4 y 5 por ciento; con concentraciones del 10 y 15 por ciento se forman difícilmente, y el crecimiento de formas L que se obtiene es amorfo y no en colonias aisladas.

Obtención de formas L fijas

De las concentraciones citadas anteriormente se elige la del 4 por ciento, por la constancia de los resultados obtenidos.

Se siembran las estirpes ensayadas, A.T.B. y A.T.vid, en agar-glicocola al 4 por ciento y se hace un total de 88 resiembras, con intervalos de dos-tres días de incubación a 26°-28 °C. Simultáneamente de estos cultivos se siembra en placas con agar glucosado sin glicocola, para observar si existe reversión a formas normales. En la resiembra número 50 de agar-glicocola es donde, al pasar a agar glucosado sin glicocola, se obtuvo la forma L fija.

Esta forma L fija se ha seguido cultivando por más de 360 pases en agar glucosado, caldo y agar común, todos sin glicocola, sin observarse reversión a la forma normal.

Prueba de patogenicidad

Se hacen inoculaciones sobre plantas de *Phaseolus vulgaris*, partiendo de colonias aisladas de formas L fijas, empleando punciones en los tallos con una aguja fina.

De los tumores producidos por estas formas L se aislaron de nuevo las mismas por la siguiente técnica: se tuvieron los tumores tres minutos en solución clorhídrica de cloruro mercuríco (ClH, 1,75 ml; Cl₂Hg, 0,5 g; H₂O, 250 ml) y después se lavaron repetidas veces con

agua estéril; se trituraron suavemente en mortero estéril y de la suspensión obtenida se sembró en placas de agar glucosado; a las veinticuatro horas de incubación se observó la formación de colonias típicas de formas L fijas.

Estudio bioquímico

Se ha hecho un estudio comparativo entre las formas bacilares normales, formas L inestables y formas L fijas, para ver la fermentación de azúcares, leche tornasolada, reducción de nitratos y producción de indol, ácido sulfhídrico y amoníaco, empleando los azúcares a una concentración del 1 por ciento, y los reactivos usuales para nitritos, indol, sulfhídrico y amoníaco.

Microscopía electrónica

Se hicieron observaciones al microscopio electrónico a partir de cultivos en medio sólido, suspendiendo las colonias en agua destilada y lavando repetidas veces por centrifugación hasta una suspensión final en agua destilada estéril, que se depositó sobre las rejillas para microscopía electrónica, recubierta de antemano con un film de formvar. Estas rejillas con la suspensión se sombrearon con oro-paladio antes de su observación al microscopio.

El microscopio electrónico empleado fue el Siemens Elmiskop I del Servicio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias Matemáticas, Médicas y de la Naturaleza, del C. S. I. C.

Curvas de crecimiento

Se empleó un aparato de Klett-Summerson, haciéndose los cultivos en caldo común y caldo glucosado.

RESULTADOS

Los tiempos de formación de las formas L varían según la concentración de glicocola; con concentraciones del 3,3-4 y 5 por ciento hay formas L a las dos horas; a las cuatro horas, la mayoría son formas L, obteniéndose la totalidad de transformación a las ocho-doce horas. El

crecimiento amorfo de formas L que se obtiene con concentraciones del 10 y 15 por ciento de glicocola tarda en aparecer dos-tres días.

El tiempo de reversibilidad de las formas L a normales también varía con la concentración de glicocola con que se hayan obtenido. Las formas L procedentes de cultivos con glicocola al 3,3-4 y 5 por ciento pasan a formas normales sobre agar glucosado, entre una-cuatro horas, mientras que las obtenidas con glicocola al 10 y 15 por ciento pasan a normales desde veinticuatro horas en adelante, aunque procedan de diferentes pases de glicocola al 10 y 15 por ciento. A partir de concentraciones de glicocola al 4 por ciento y mediante resiembras sucesivas, se obtuvieron las formas L fijas, según se ha expuesto anteriormente.

Características de las formas L fijas

a) Aspecto macroscópico de las colonias

Sobre agar glucosado, son redondas, de borde entero, blanquecinas, gelatinosas y translúcidas (*figura 2*). Sobre agar común son de la misma forma, pero menos gelatinosas. No poseen, tanto sobre agar glucosado como sobre agar común, la típica forma de «huevo frito» de las colonias L, es decir, con un centro oscuro o más denso, que se

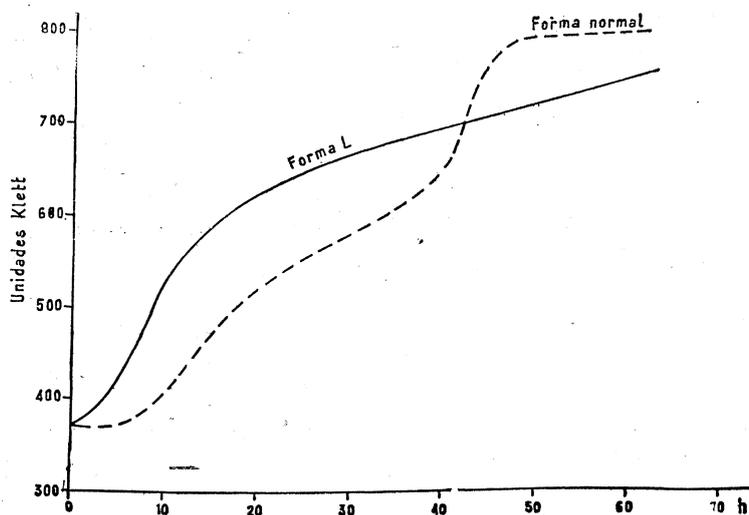


Figura 3

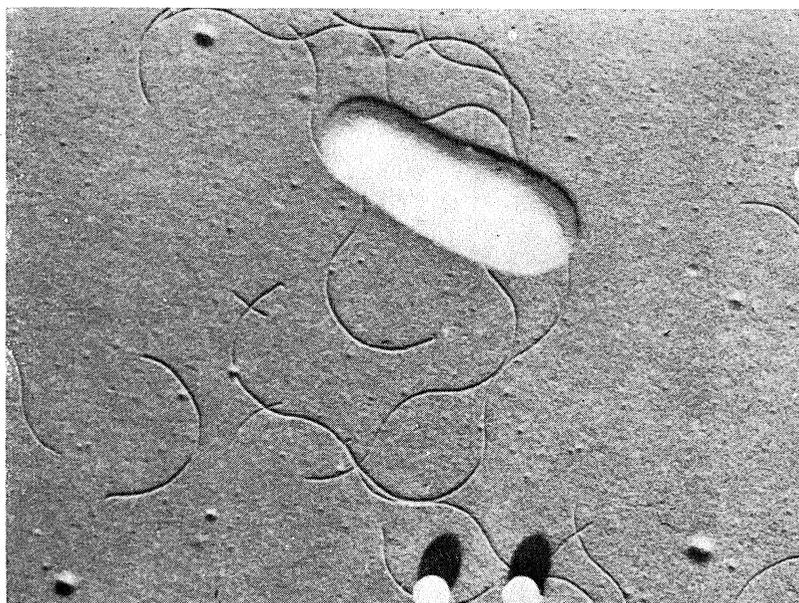


Figura 1. Microfotografía electrónica de *Agrobacterium tumefaciens* normal
× 20.000

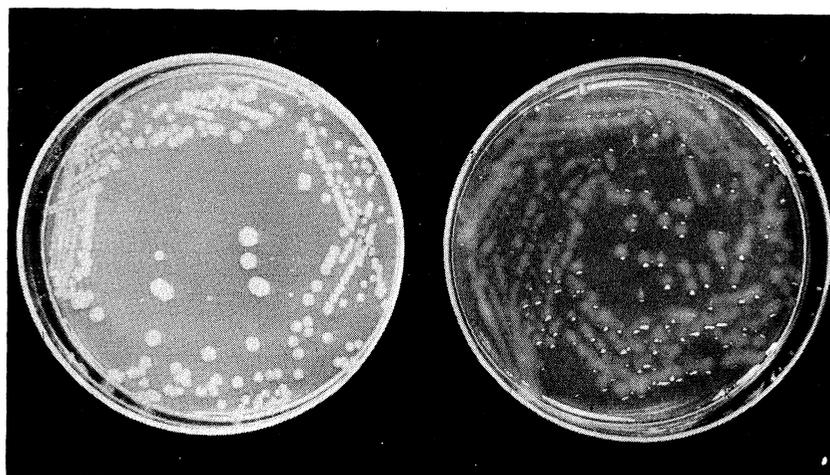
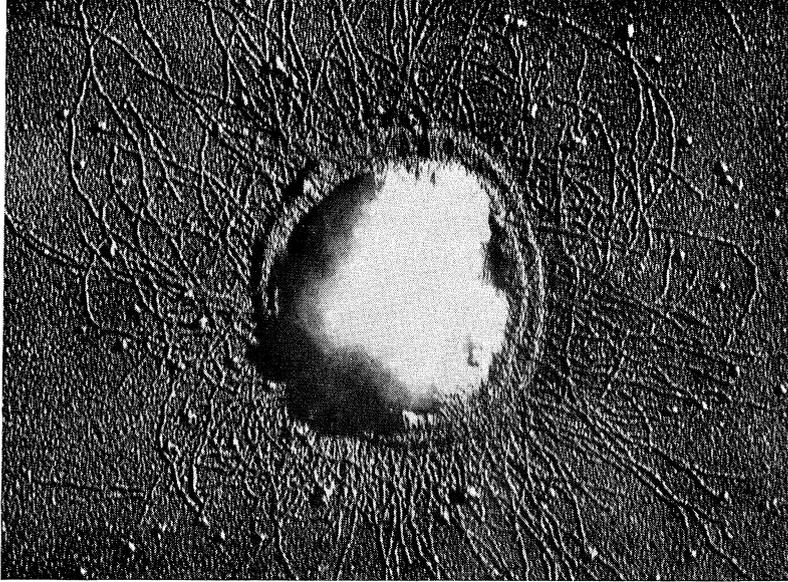


Figura 2. Colonias de *A. tumefaciens* en agar glucosado. A la izquierda, forma normal; a la derecha, formas L fijas



*Figura 4. Microfotografía electrónica de forma L de A. tumefaciens. Los restos de la cápsula son los filamentos que se ven alrededor de la célula.
× 38.000*

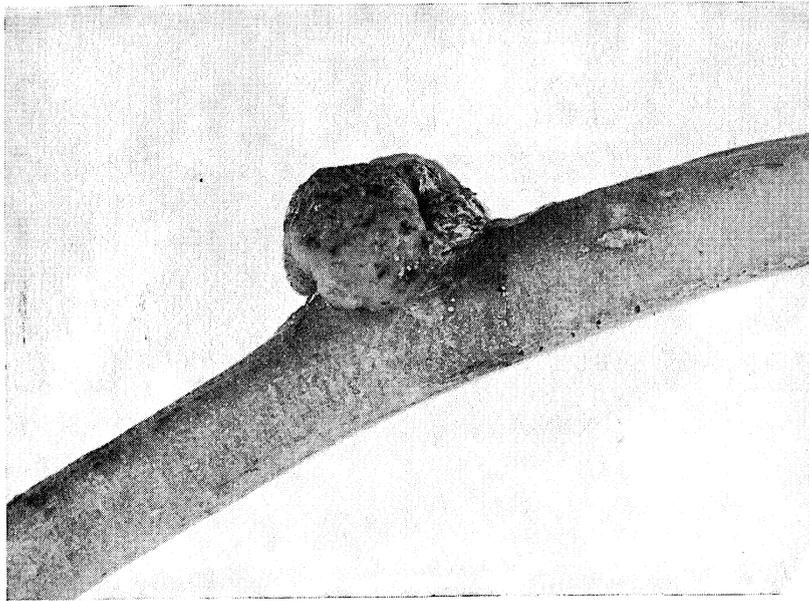


Figura 5. Tumor producido por formas L fijas de A. tumefaciens en Phaseolus vulgaris

introduce en el agar y un crecimiento en capa más fina formando un halo alrededor del centro denso. En medio líquido, las formas L crecen algo más lentamente que las formas normales; sin embargo, a las veinticuatro horas a 25 °C se puede apreciar bastante enturbiamiento en el medio, produciéndose un depósito abundante a las cuarenta y ocho horas.

Tanto en medio sólido como líquido las formas L fijas no necesitan suero para su multiplicación. En caldo común se obtuvieron las siguientes curvas de crecimiento (*figura 3*).

b) Aspecto microscópico

Las colonias L, como las formas que crecen en caldo, están formadas por elementos esféricos, a veces vacuolados, de tamaño muy uniforme en un 98 por ciento, con un 2 por ciento de formas de tamaño mayor. Observadas al microscopio electrónico, se ve perfectamente que poseen pared celular, membrana citoplasmática y una gruesa cápsula que también hemos podido poner de manifiesto en microscopía óptica por medio de la técnica de Burry. Esta cápsula está formada por dos elementos estructurales diferentes: uno amorfo, que se puede eliminar con relativa facilidad por medio de agitación y lavado con solución salina o agua destilada, y otro fibrilar, que está íntimamente ligado a la pared celular y sólo se puede eliminar lavando con detergentes (*figura 4*). La cápsula es bastante mayor en las formas L cultivadas en medios con glucosa.

c) Características bioquímicas

Las pruebas realizadas con las formas L fijas, formas L inestables y las formas normales de las dos estirpes estructurales dan resultados idénticos. Estos son: acidificación, con formación de gas de los azúcares: glucosa, galactosa, xilosa, lactosa, maltosa, sacarosa, manitol, arabinosa, manosa, ramnosa, rafinosa; y los glucósidos, salicina e inulina. Coagulan la leche tornasolada, reduciendo el tornasol; no hidrolizan el almidón, reducen ligeramente los nitratos y producen sulfhídrico, indol y amoníaco.

d) Patogenicidad

La inoculación de las formas L fijas sobre *Phaseolus vulgaris* dio como resultado la formación de tumores de tamaño y aspecto macroscópico, idénticos a los producidos inoculando plantas de *Ph. vulgaris* de la misma edad y tamaño con formas normales del *Agrobacterium tumefaciens* (figura 5).

De los tumores obtenidos con las formas L fijas se volvieron a recuperar en cultivos puros dichas formas L y, por lo tanto, queda demostrado que tampoco revierten a la forma normal *in vivo* y son patógenas para el huésped.

Las plantas inoculadas con formas L inestables también formaron tumores, pero, sin embargo, de ellas se recuperó la forma normal; es decir, estas formas L revierten a la forma normal en las células de las plantas infectadas; por ello no es posible decir, en el caso de las formas L inestables, que produzcan los tumores, pues la transformación a formas normales puede verificarse tan pronto entran las formas L en las células, y entonces serían éstas las que inducen la formación de tumores.

DISCUSION

Dienes y Zamecnik (1) estudiaron el efecto de diversos aminoácidos sobre *Hemophilus influenzae* y *Salmonella typhimurium*, viendo que la glicocola era el más eficaz para formar esferoplastos y formas L inestables; más tarde, Jeynes (2) y después Welsch (12) lo emplearon también en otras bacterias Gram-negativas, obteniendo esferoplastos. Rubio-Huertos y colaboradores (4-5, 7-8) lo han empleado sistemáticamente desde 1955 en un gran número de bacterias Gram-negativas, obteniendo siempre sus formas L inestables y estudiando sus propiedades, que difieren en ciertos aspectos de aquellas obtenidas por medio de penicilina. Empleando también glicocola se obtuvieron las formas estables del *Clostridium tetani* (7). La obtención de formas L estables de *Agrobacterium tumefaciens* es la primera vez que se consigue en un germen Gram-negativo y sus características difieren algo de las formas L estables obtenidas con penicilina en otros microorganismos; las colonias que forman estos últimos son de un tipo común y muy típico, sea el que sea el microorganismo de que se trate, y tampoco

existen diferencias desde el punto de vista microscópico en los elementos que forman dichas colonias; es decir, es imposible reconocer microscópicamente de qué bacteria proceden las formas L, pues son morfológicamente iguales; sin embargo, las colonias formadas por *A. tumefaciens* difieren de las típicas de formas L, acercándose más al aspecto macroscópico de las formadas por la bacteria normal, y solamente se diferencian de éstas en que son más transparentes.

En cuanto al aspecto microscópico, vistas al microscopio de fases, las formas L del *Agrobacterium tumefaciens* son esféricas y presentan un tamaño poco variable, a diferencia de las colonias L en general, que tienen elementos de tamaño muy variable, aunque en aquellas se encuentran también formas mayores en un tanto por ciento reducido y formas enanas o filtrables sólo observables al microscopio electrónico; la estructura de las formas esféricas al microscopio electrónico parece estar más cerca de una estructura normal, pues aunque son esféricas, en ellas se puede distinguir perfectamente la presencia de una cápsula, pared celular y membrana citoplasmática con un citoplasma denso.

Ya en 1955, Stempen (9); por tinciones y microscopía de contraste de fases, demostró la presencia de pared celular en formas L. También en 1955, en fotografías con el microscopio electrónico, nosotros pudimos observar perfectamente la presencia de una verdadera pared celular, aunque de estructura flexible, a diferencia de la forma normal rígida, y que algunas formas intermedias poseían todavía flagelos (8). El comportamiento ante el choque osmótico, de las formas L, tanto inestables como estables, obtenidas con glicocola, viene a corroborar que poseen una pared celular bastante resistente. En el caso de las formas L estables de *Agrobacterium tumefaciens*, además de esta pared celular bien definida se ve otra estructura que no hemos visto en otros casos y es una gruesa cápsula.

Durante bastantes años se pensaba que las formas L no eran patógenas para los huéspedes, aunque se obtuvieran de cepas normales muy virulentas, llegándose hasta pensar en emplearlas como vacunas, ya que poseen poderes antigénicos iguales o muy aproximados a las de la bacteria original, pero en 1954 Lavillaureix y Tulasne (3, 10) encontraron que la forma L de *Vibrio cólera* era patógena. Rubio-Huertos y González (7) describieron las formas L del *Clostridium tetani* obtenidas con glicocola, comprobando que eran capaces de pro-

ducir toxina y ser patógenas para ratón y cobayo, pudiéndose recuperar otra vez la forma L de los animales inoculados.

De los tumores producidos por inoculación con la forma L fija nos fue posible recuperar dicha forma, demostrando así que éstas eran el agente de la formación de los tumores y no había habido reversión *in vivo* a la forma normal, constituyendo éste el primer caso de patogenicidad comprobada de formas L procedentes de una bacteria patógena para las plantas. Es de notar en este caso que, según Van Lanen y cols. (11), el cultivo continuado de *Agrobacterium tumefaciens* virulento en medios conteniendo glicocola en concentraciones de 0,1 por ciento y superiores, en medio neutro o ligeramente alcalino, hace que pierda su virulencia; esto parece que se contradice con nuestros resultados, aunque las concentraciones de glicocola empleadas han sido diferentes y aquellos investigadores nunca obtuvieron formas L. De todas formas, hay que tener en cuenta la importancia que tiene, tanto para conseguir formas L como para que éstas sean patógenas o no, el trabajar con estirpes adecuadas, pues nosotros hemos encontrado grandes variaciones de unas a otras.

Las variaciones en cuanto al comportamiento de diferentes estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* frente a diversas concentraciones de glicocola para formar colonias L (algunas estirpes no las forman), junto con las observaciones microscópicas de las formas L fijas, en las que parece que éstas se multiplican por división, como la bacteria normal, hacen pensar en la posibilidad de que estas formas sean un mutante inducido por la glicocola y que posee enzimas defectivas para la formación de las estructuras rígidas de la pared celular. Para comprobar esto estamos actualmente trabajando en la producción de mutantes por radiaciones ultravioletas y estudiando, al mismo tiempo, la multiplicación en microcultivos, que se pueden observar directamente en el microscopio de contraste de fases, *in vivo*.

RESUMEN

Se han obtenido las formas L fijas de dos estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* por medio de cultivo repetido en medio de agar glucosado con 4 por ciento de glicocola, después de 50 pases. Estas formas L crecen en medios sólidos y líquidos sin glicocola, sin revertir a la forma normal. Las colonias en medio sólido son redondas, de borde

entero, gelatinosas y transparentes; están formadas por elementos esféricos de gran regularidad de tamaño. Estas formas, vistas al microscopio electrónico, presentan una cápsula, pared celular flexible, membrana citoplasmática y un citoplasma denso. Fermentan los mismos azúcares con formación de gas que la forma normal del *A. tumefaciens* y producen sulfhídrico y amoníaco y dan la reacción del indol.

Son patógenas para las plantas, produciendo tumores de tamaño y aspecto macroscópico iguales a los producidos por la forma normal. Las formas L fueron recuperadas de los tumores producidos por ellas.

Se comparan estas propiedades con las de las formas normales y formas L no estables y se apunta la posibilidad de que las formas L estables sean mutantes de la forma normal, inducidos por la glicocola, que tengan enzimas defectivas para la formación de las estructuras rígidas de la pared celular.

SUMMARY

Fixed forms of *Agrobacterium tumefaciens* were obtained from two strains A.T.B. and A.T.vid through 50 transfers in media with 4 per cent glycine. They did not revert to the normal form in media without glycine after more than 360 transfers.

They grow in solid and liquid media, their colonies are round, gelatinous and transparent, they have not the typical appearance of L colonies with the dark centre. Microscopically, they are formed by spherical elements of very regular size, 0.8 μ ; only a few very big forms can be observed. At the electron microscope a suspension of L forms showed a flexible cell wall, cytoplasmic membrane and a dense cytoplasm. They also showed big capsule. The capsular material was composed of two different structural materials; one amorphous easily removable by washing in water and a fibrous material which remained attached to the cell wall.

The L forms fermented the same sugars than the normal parental strains, they were pathogenic for *Phaseolus vulgaris* inducing the formation of crown-gall of the same size and macroscopical appearance than those induced by the normal form, the L form was recovered from crown-gall induced by them.

A comparison of the properties of normal, L unstable and fixed

L form was made, and the possibility of being these fixed L forms a glycine induced mutant with defective enzymes for the formation of rigid structure of the cell wall is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. DIENES, L., y ZAMENICK, P. C. 1952. Transformation of bacteria into L forms by amino acids. *J. Bacteriol.*, 64, 770.
2. JEYNES, M. H. 1957. Growth and properties of bacterial protoplasts. *Nature*, 180, 867.
3. LAVILLAUREIX, M. J. 1954. Première étude sur les propriétés pathogènes d'une souche de formes naines (formes L) fixées, obtenue à partir d'un vibron. *Compt. Rend.*, 239, 1.155.
4. RUBIO-HUERTOS, M. 1957. El ciclo L de las bacterias. *Microbiol. Españ.*, 10, 361.
5. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Fixed pathogenic L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 195, 4.836, 101.
6. RUBIO-HUERTOS, M., y DESJARDINS, P. L. 1956. Microscopía electrónica de las formas L y filtrables del *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, 9, 375.
7. 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.
8. RUBIO-HUERTOS, M.; KUSTER, E., y FLAIG, W. 1955. Licht- und electronenmikroskopische Untersuchungen an L formen bei *Pseudomonas fluorescens*, *B. proteus* und *Rhizobium*. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt. I. Orig.*, 162, 24-31.
9. STEMPEN, H. 1955. Demonstration of a cell wall in the large bodies of *Proteus vulgaris*. *J. Bacteriol.*, 70, 177.
10. TULASNE, R., y LAVILLAUREIX, M. J. 1954. Pouvoir pathogène expérimental, pour la souris d'une souche de formes L des bactéries. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, 148, 2.080.
11. VAN LANEN, J. M.; BALDWIN, I. L., y RIKER, A. J. Attenuations of crown-gall bacteria by cultivation in media containing glycine. *J. Bacteriol.*, 63, 715-21.
12. WELSCH, M., y OSTERRIETH, P. 1958. A comparative study of the transformation of Gram-negative rods into «protoplasts» under the influence of penicillin and glycine. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, 24, 257-73.

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

FACTORES DE PATOGENICIDAD DEL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSIBLE Y RESISTENTE A LA BENCILPENICILINA

POR
E. PORTO y B. REGUEIRO

INTRODUCCION

Los autores, en un trabajo anterior (37), estudiaron las diferencias en caracteres morfológicos y de crecimiento en diferentes medios, de una raza de *Staphylococcus aureus*, sensible a la bencilpenicilina y tipo fago 42D y de un mutante de la misma, obtenido en este laboratorio, resistente a la bencilpenicilina y tipo fago 80. En unión de aquellas diferencias, se estudian en el presente trabajo los llamados factores de patogenicidad del estafilococo en ambas razas, con objeto de establecer relaciones y posibles conclusiones sobre la virulencia y resistencia del estafilococo.

Precisamente en relación con tales factores de patogenicidad, del tipo de toxinas y de enzimas, se ha realizado una separación de razas de estafilococo virulentas, de las avirulentas, al tiempo que se han sugerido hipótesis sobre el posible papel de tales factores en la iniciación de la infección estafilocócica. Sin embargo, a pesar de la abundante bibliografía existente, hasta el momento presente no se conoce ningún buen método que nos dé el grado de virulencia de una determinada raza de estafilococo, así como que nos determine el grado de resistencia del organismo humano o animal, tal como se desprende de las revisiones que sobre el estafilococo realizaron varios autores (6, 9, 17).

Se afirma (20) que la patogenicidad es la expresión de una relación específica y dinámica entre parásito y organismo, siendo éste el medio

ambiente de aquél; en el caso de la infección estafilocócica, la patogenicidad depende de la virulencia del germen (ésta se asocia con sus caracteres biológicos) y de la resistencia del organismo (la cual se asocia con mecanismos de fagocitosis y con determinados factores del plasma).

Se han estudiado una serie de factores de patogenicidad, de los cuales unos se demostraron más fundamentales que otros. Nosotros revisamos los siguientes: leucocidina, hemolisina, coagulasa, tributirinas, penicilinas, fosfatasa y transaminasa; de cada uno de los cuales hacemos una breve revisión bibliográfica.

La mayoría de las razas virulentas de estafilococo producen *leucocidina* en cantidades variables, siendo su actividad la de destruir los leucocitos. Se ha demostrado en estudios de fagocitosis que la destrucción de los leucocitos polinucleados, después de la ingestión de estafilococos por los mismos, se debe a la actividad de esta toxina. Se ha determinado que el estafilococo produce, por lo menos, tres leucocidinas (49), una de las cuales ataca específicamente a los leucocitos, inhibiendo su respiración, disminuyendo la velocidad de la glicólisis, variando la permeabilidad y otros caracteres.

En relación con esta toxina sabemos se encuentra el fenómeno de fagocitosis, cuyo mecanismo aún no es bien conocido (45). En relación con esto, el problema fundamental está en mantener *in vitro* las condiciones más similares a lo que sucede *in vivo*, para poder interpretar los resultados obtenidos adecuadamente, sobre todo en su aspecto cuantitativo (31). Sobre fagocitosis de estafilococos es necesaria aún más experimentación, según afirman algunos autores (4, 24).

También las razas virulentas de estafilococo producen *hemolisinas*, de las cuales podemos señalar por lo menos tres: una alfa-hemolisina, que destruye hematíes de conejo, pero no de cordero o humanos y que parece no es fundamental en la patogenicidad; una beta-hemolisina, que destruye hematíes de cordero, pero no de conejo o humanos, y una delta-hemolisina, que destruye hematíes de conejo, cordero y humanos y que la producen el 90 por ciento de los estafilococos virulentos humanos y que generalmente está asociada a la alfa-hemolisina. La delta-hemolisina fue la más estudiada (26), encontrándose su máximo de actividad a pH 6,8-7,1; en su curva de actividad hemolítica presenta una velocidad inicial rápida, con cambio brusco a velocidad lenta; las otras hemolisinas producen curvas más bien de tipo sigmoi-

dal. Las hemolisinas fueron también muy estudiadas (39), en relación con su producción y purificación, influencia de los componentes del medio en su producción e influencia de varios factores sobre su actividad.

Puede afirmarse que el factor del estafilococo más relacionado con su patogenicidad es la *coagulasa*, enzima que tiene la propiedad de hacer coagular el plasma sanguíneo. Para producirse esta coagulación se necesita el concurso de un factor del plasma mismo, factor coagulasa reactivo, conocido ya hace algún tiempo (23) y del que hay diferentes cantidades en cada tipo de plasma; por sus propiedades se parece a la protrombina.

La producción de coagulasa (12) varía con la raza del estafilococo y con la composición del medio, siendo su producción máxima en la fase estacionaria del crecimiento. Duthie (16) demuestra la existencia de dos coagulasas, una unida a la célula y que da una reacción de precipitación con el plasma sanguíneo y no necesita factor coagulasa reactivo, y otra exocelular, que es la que produce la coagulación del plasma antes mencionada. Algunos autores estudiaron el mecanismo de coagulación (15), así como la inhibición de este fenómeno (32) por algunas sustancias.

La coagulasa parece que también tiene acción de fosfatasa (25). Los autores, en general, estudiaron más la naturaleza de la coagulasa y su modo de acción que el carácter biológico de la misma en el estafilococo; por esta razón, interesa más trabajo en esta dirección. Algunos autores en vez de estudiar la acción coagulasa o estafilocoagulasa sobre el plasma sanguíneo, logran preparar medios selectivos (51), en los cuales las razas coagulasas positivas dan crecimiento característico.

También en relación con la actividad estafilocoagulasa, algunos autores (18, 47, 50) observan que el suero humano normal tiene actividad antibacteriana. Por ejemplo, los estafilococos productores de coagulasa crecen en suero normal, mientras que los no productores no crecen y esto sólo se demuestra en sueros frescos. Se comprende que esto se debe a un factor antibacteriano del suero relacionado con la actividad coagulasa; tanto es así, que si a las razas no productoras se añade coagulasa purificada, crecen en el suero. Las razas productoras de coagulasa son las virulentas y son las que crecen. El mencionado factor antibacteriano se localiza en la fracción globulínica del suero humano, de conejo y caballo. Relacionado con esto, Murray y cols. (33) observan que

la gammaglobulina interfiere el estafilococo y sus productos, en especial la coagulasa.

Las enzimas que hidrolizan grasas son esterasas; una de éstas es la *tributirinasa*, que actúa específicamente sobre la tributirina. Los gérmenes hidrolizan muchas sustancias grasas y, por ejemplo, Davies (13) demuestra que el estafilococo produce una exolipasa. Se demostró (14) que preparaciones de estafilocogulasa, de una serie de substratos grasos, solamente actúan sobre la tributirina; esta acción se asocia a una enzima que se puede separar de la coagulasa y que mereció alguna atención.

Una enzima sobre la que se ha acumulado mucho trabajo es la *penicilinas*, que tiene la propiedad de destruir la penicilina. Esta enzima se encuentra en numerosos gérmenes y tanto intracelular como extracelularmente. Kirby (27) fue el primero que la describió en el estafilococo, aunque donde fue más estudiada fue en el *Bacillus cereus* (36).

Respecto a la penicilinas estafilocócica, así como hay razas resistentes a la penicilina y productoras de penicilinas, también hay razas resistentes que no producen penicilinas (7), lo que quiere decir que la resistencia no siempre se debe a la producción de esta enzima. Numerosos factores (5) influyen en su producción y esto es importante (57) en relación con la patogenicidad del estafilococo, sobre lo que se necesita más trabajo experimental.

Es interesante y muy estudiado el fenómeno de la inducción de resistencia del estafilococo a la penicilina, con o sin producción de penicilinas. Todavía se discute si la penicilinas estafilocócica es inducible o no, aunque parece que la opinión general se inclina por lo primero. Claro que, como ocurre frecuentemente en bacteriología, todo depende de la raza utilizada; de aquí la dificultad de las generalizaciones en este terreno.

Los estafilococos que crecen *in vivo* pueden diferir en actividad enzimática y metabólica de cuando crecen *in vitro* y esto puede ocurrir también con el fenómeno de inducción y factores que en ella influyen, estudiados por varios autores (1, 19, 21-22, 29, 44). Por ejemplo, las necesidades nutritivas de las razas productoras o no de penicilinas, son similares, aunque parece que las no productoras no pueden sintetizar aminoácidos esenciales al crecimiento (8). También algunos autores (41-42) buscaron inhibidores específicos de la actividad penicilínica.

sica, pero las sustancias hasta el momento probadas con éxito resultaron tóxicas para el organismo.

Otra enzima muy estudiada en relación con la patogenicidad del estafilococo fue la *fosfatasa* (2, 10-11, 46, 52), que separa grupos fosfato de numerosos substratos orgánicos. Parece que la fosfatasa producida por el estafilococo tiene cierta correlación con la producción de coagulasa y hemolisina, lo cual tiene cierto interés diagnóstico. Barnes y Morris (3) hacen un estudio cuantitativo de la fosfatasa del estafilococo en función de varios factores, como: substrato, tiempo de incubación, pH, edad del cultivo, etc.

Por último, una enzimas interesantes en todo tipo de microorganismos (30) son las *transaminasas*, encargadas del transporte de grupos amínicos desde aminoácidos a cetoácidos. Han sido estudiadas en numerosos gérmenes, aunque muy poco en el estafilococo. Solamente Lam y Sevag (28) estudiaron transaminasas de estafilococos sensibles y resistentes al sulfatiazol, demostrando que la adquisición de resistencia se acompaña de disminución de actividad transaminásica, punto muy interesante a estudiar.

Sobre todos estos factores que hemos revisado someramente es sobre lo que trata el presente trabajo, con el fin de buscar relaciones con los caracteres morfológicos y de crecimiento estudiados anteriormente y tratando de buscar una generalización al fenómeno de resistencia y de virulencia.

MATERIALES Y METODOS

Como gérmenes, empleamos la raza de *Staphylococcus aureus* 209-P (sensible a la bencilpenicilina y tipo fago 42D) y el mutante espontáneo de la misma obtenido en nuestro laboratorio (resistente a la bencilpenicilina y tipo fago 80). Ambos se mantienen por pases semanales en medio antibiótico núm. 3, de Difco.

Para seguir el fenómeno de fagocitosis, en un tubo de hemólisis colocamos 1 ml de sangre humana oxalatada reciente, con un asa de cultivo de veinticuatro horas, de estafilococo (o de filtrado) y se incuba en baño a 37 °C; a diferentes intervalos de tiempo, se toma una muestra, sobre la que por la técnica normal, se hace: recuento globular, fórmula leucocitaria y recuento de estafilococos (método de Wright). La activi-

dad leucocídica se determina por el porcentaje de leucocitos desaparecidos en un tiempo determinado en cada experiencia.

La determinación de hemolisinas se realiza por el método cuantitativo de Roberts (38), para lo cual una suspensión de hematíes al 5 por ciento en disolución salina, se pone en un tubo de hemólisis, con igual volumen de cultivo o filtrado de estafilococo; se incuba en baño a 37 °C, de donde a intervalos de tiempo se toma una muestra y determina la extinción en fotocolorímetro (filtro 53) Kipp; si el color es muy intenso, se hace dilución al 1/5. Como testigo de la hemólisis se emplea una suspensión de hematíes en igual volumen de agua destilada, lo que produce un 100 por ciento de hemólisis. Se emplea un tubo para cada muestra y experiencia.

La determinación de la exocoagulasa se realiza por el método de Duthie (16), para lo cual, en tubo de hemólisis se pone 0,5 ml de plasma reciente al 1/10 y 5 gotas de cultivo de estafilococo de veinticuatro horas; se incuba en estufa a 37 °C y se observa la coagulación a intervalos de tiempo que se indican más adelante. Para aislamiento de colonias productoras de coagulasa, empleamos el medio agar-telurito-glicina, donde crecen como colonias negras, tanto de la raza sensible como de la resistente.

La determinación de la actividad tributirínica se realiza por el método indicado por Otero y Regueiro (34), valorando los ácidos grasos liberados del substrato de tributirina, con KOH, 0,05 N en metanol, empleando fenolftaleína como indicador.

La determinación de la penicilinasasa se realiza por el método yodométrico de Weiss (48). En cuanto a la inducción de resistencia, lo hacemos de la manera siguiente: a 250 ml de cultivo de estafilococo a 37 °C durante veinticuatro horas, añadimos 25, 50, 100 y 200 U. I. de bencilpenicilina/1 ml; se deja durante dos horas, se centrifuga y el sedimento de gérmenes se deseca en acetona y éter; a 20 mg de gérmenes desecados se añaden 100 ml de agua destilada y 100 mg de bencilpenicilina; a intervalos de tiempo se toma una muestra y se hace la determinación yodométrica por el método antes mencionado, determinando de esta manera la penicilinasasa intracelular.

La determinación de fosfatasa se realiza por el método indicado por Otero y Regueiro (35), en el que a 1 ml de beta-glicerofosfato sódico al 10 por ciento, con 5 ml de tampón de veronal, se añaden 0,5 ml de filtrado de cultivo de estafilococo ó 10 ml de gérmenes desecados; se

deja en baño a 25 °C durante tres horas; ahora se añade 1 ml de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$, se filtra y en el filtrado se determina el fósforo inorgánico liberado, por método colorimétrico. El fósforo liberado por la enzima es la diferencia entre el liberado por la enzima activa y el liberado por una preparación igual, inactivada.

Por último, la actividad transaminásica se hace determinando las glutámico-oxalacético y glutámico-pirúvico transaminasas (GOT y GPT), por el método colorimétrico dado por «Sigma Co.» (43), con sus reactivos, por lo que agradecemos su desprendimiento.

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

Se desarrollan a continuación las experiencias realizadas y los resultados obtenidos en ellas, con las razas sensible y resistente de *Staphylococcus aureus*, en cada caso. Se estudian algunos factores que creemos de posible influencia en la actividad de las toxinas y enzimas objeto del trabajo.

a) Actividad leucocidínica

Ya dijimos anteriormente que se conoce por determinación del porcentaje de destrucción de leucocitos. En una experiencia primera, hacemos el recuento de leucocitos a los treinta, sesenta y ciento veinte minutos; se determina que no hay variación en el número de monocitos, linfocitos y mononucleares eosinófilos, basófilos o neutrófilos, cuando se añaden a la sangre cultivos de estafilococo sensible o resistente. En cambio, en los neutrófilos polinucleares se observa lo expuesto en el cuadro 1.

Cuadro 1

Minutos	Sangre-testigo	Sangre con estafilococo sensible	Sangre con estafilococo resistente
	Porcentaje		
0	59	59	59
30	58	55	56
60	59	44	56
120	60	45	56

Es decir, que la presencia de estafilococo en la sangre produce lisis de leucocitos debido a su actividad leucocidínica. Se observa que esta actividad es mayor en la raza sensible que en la resistente, y que a partir de los sesenta minutos no hay aumento de actividad o lisis.

Para saber dónde reside la mayor actividad leucocidínica se realiza otra experiencia, con cultivo total de estafilococo, filtrado del mismo, sobre sangre total o solamente glóbulos sanguíneos. Como en la experiencia anterior, a los treinta minutos, no hay variación en el número de monocitos, linfocitos y mononucleares eosinófilos, basófilos o neutrófilos; en cambio, en los neutrófilos polinucleares observamos lo expuesto en el *cuadro 2*.

Cuadro 2

	Sangre-testigo	Sangre con estafilococo sensible	Sangre con estafilococo resistente
		Porcentaje	
Con cultivo total	60	36	38
Sólo con filtrado	60	52	48
Con cultivo total y solamente glóbulos	60	42	37

Se demuestra actividad leucocidínica en todos los casos probados. La actividad se encuentra tanto en el filtrado como en el cultivo total. Por otro lado, puede señalarse que la presencia del plasma (por lo menos en las condiciones experimentales empleadas) no influye en la actividad leucocidínica del estafilococo, tanto sensible como resistente.

Interesaría conocer si la presencia de penicilina en la sangre, en dosis terapéuticas (0,6 U. I./1 ml de sangre) afecta a la actividad leucocidínica. Para esto se prepara una experiencia como las anteriores, con y sin penicilina; los resultados referidos a los neutrófilos polinucleares se recogen en el *cuadro 3*.

Cuadro 3

Sangre	Sangre-testigo	Sangre con estafilococo sensible	Sangre con estafilococo resistente
		Porcentaje	
Normal	60	36	38
Con penicilina	60	40	42

Se observa que la presencia de bencilpenicilina inhibe muy poco la actividad leucocidínica en los dos casos del estafilococo, sensible y resistente.

Asimismo, nos interesa conocer si la presencia de lisozima en la sangre afecta a la actividad leucocidínica, sabiendo, por otra parte, que la lisozima está siempre presente en los flúidos orgánicos en diferentes concentraciones. Se realiza la experiencia como en los casos anteriores y se determina la cantidad de leucocitos a los treinta minutos. También como entonces, la actividad sólo se manifiesta, sobre todo, en neutrófilos polinucleares y muy poco en los monocitos. Los resultados obtenidos se exponen en el *cuadro 4*.

Cuadro 4

Lisozima, gammas/mililitro	Sangre-testigo	Sangre con estafilococo sensible	Sangre con estafilococo resistente
	Porcentaje		
Testigo (sin lisozima)	60	55	56
12,5	60	53	52
25,0	60	47	43
50,0	60	42	42
100,0	60	32	36

Observamos que el aumento en la concentración de lisozima se acompaña de aumento proporcional de actividad leucocidínica o, por lo menos, de lisis de leucocitos, tanto con estafilococo sensible como resistente.

b) Fagocitosis de estafilococos

Ya señalábamos en la parte correspondiente a los métodos, que la fagocitosis de gérmenes se determinaba por el número de leucocitos que se veían con gérmenes intracelulares y en proporción al total de leucocitos.

En extensiones de sangre total con estafilococos, en la forma que se indicaba en los métodos y a los treinta minutos, se observa fagocitosis en un 92 por ciento de leucocitos polinucleares, en el caso del estafilococo sensible, y del 78 por ciento, en el caso del estafilococo resistente. Si la experiencia se realiza solamente con glóbulos, es decir, en

ausencia de plasma, las cifras son, respectivamente, del 90 y 76 por ciento, es decir, que no hay variación apreciable o significativa. De aquí se podría deducir que en las condiciones experimentales empleadas, el plasma no influye en la fagocitosis.

Aparte de los estafilococos fagocitados, se observa abundancia de ellos extracelularmente. También observamos que en las preparaciones de sangre total estos estafilococos extracelulares se encuentran más lisados o deformados que en el caso de emplear solamente glóbulos sanguíneos, lo que podría indicar actividad del principio antibacteriano de la sangre. Por otra parte, en el caso del estafilococo sensible aparecen formas más aumentadas de tamaño; en cambio, en el estafilococo resistente, las formas están más lisadas.

Como en las experiencias de leucocidina, interesa aquí conocer si la presencia de penicilina en sangre en concentraciones terapéuticas (0,6 U. I./1 ml de sangre) afecta en algo a la actividad fagocitaria. En la experiencia realizada, vemos que la fagocitosis normal del 92 por ciento (estafilococo sensible) y del 78 por ciento (estafilococo resistente) pasa a 92 y 86 por ciento, respectivamente, en presencia de penicilina; lo cual quiere decir que no hay variación en la fagocitosis de la raza sensible, pero sí en la de la resistente. También observamos que en la sangre tratada por penicilina aparecen un 80 por ciento de formas globosas de estafilococo (3 veces mayores que las normales), abundando por otra parte, las formas aisladas y muy escasos agrupamientos (1/3 campos). Las formas globosas también se fagocitan. Estos casos pueden producirse por acción de la penicilina sobre los gérmenes.

También probamos si la presencia de lisozima afecta en algo a la actividad fagocitaria de los leucocitos. En la experiencia realizada, vemos que la fagocitosis normal del 92 por ciento (estafilococo sensible) y del 78 por ciento (estafilococo resistente) pasa en los dos casos al 95 por ciento, es decir, hay un aumento general de la fagocitosis, que es independiente de la cantidad de lisozima añadida y que son las cantidades dadas en la experiencia de actividad leucocidínica. En estas experiencias, los gérmenes tienden a agruparse cuando hay poca cantidad de lisozima, pero cuando hay más de 50 γ /1 ml, los gérmenes tienden a formar parejas y se hacen ovalados y al tiempo, de 4-6 veces mayores, habiendo más fagocitosis de estas formas globosas.

c) Actividad hemolítica

La actividad lítica del estafilococo sobre los hematíes de la sangre puede determinarse cualitativamente y cuantitativamente; nosotros lo hacemos por los dos métodos y con filtrados de estafilococo, libres de gérmenes. En primer lugar, se prueban filtrados de raza sensible y resistentes, sobre hematíes de sangres diferentes; observamos actividad sobre hematíes de conejo, siendo negativa sobre hematíes de cordero,

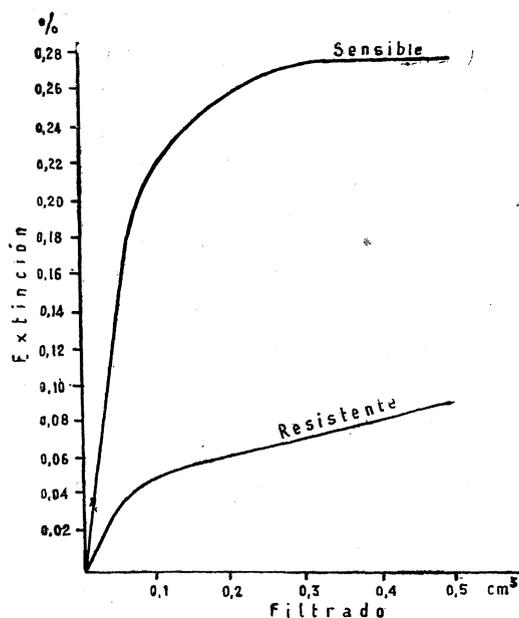


Figura 1

caballo, ternera y humanos; en todos los casos también es negativa la reacción de hemolisina «calor-frío». Estas experiencias indican la presencia de alfa-hemolisina y el que todas las experiencias posteriores las realicemos con hematíes de conejo.

Se determina la actividad alfa-hemolítica con diferentes cantidades de filtrados de las razas sensibles y resistente, de veinticuatro horas, en caldo común; los resultados se expresan en la *figura 1*.

Se encuentra que en todos los casos la producción de alfa-hemolisi-

na es mayor en la raza sensible. Filtrados de medio antibiótico núm. 3. de Difco, también por veinticuatro horas, aunque dan menos actividad que en el caso anterior, sigue siendo la producción de la raza sensible mayor que la resistente.

Se realiza ahora una experiencia en medio de caseína hidrolizada (Difco), empleando filtrados de seis, catorce y veinticuatro horas, de las dos razas, sensible y resistente. En todos los casos, la producción siempre es mayor en la raza sensible, aunque menos que en el caso de los dos medios anteriores. Los niveles de producción de alfa-hemolisina en cada caso y a las quince horas podrían expresarse según el *cuadro 5*.

Cuadro 5

Filtrado del cultivo, horas	Actividad, porcentaje	
	Raza sensible	Raza resistente
6	30	25
14	54	48
24	78	70

Se deduce de estos resultados que la producción de alfa-hemolisina guarda estrecha relación con la edad del cultivo y con la raza de estafilococo empleada.

d) Actividad coagulática libre

Habiendo señalado la importancia que las coagulasas tienen en la patogenicidad del estafilococo, es por lo que realizamos su determinación en nuestras razas sensible y resistente, empleando plasma humano o de conejo.

En una primera experiencia, con cultivos de veinticuatro horas y plasma humano al 1/10, observamos que la raza sensible coagula más que la resistente, a los sesenta minutos; tanto, que una gota de la primera tiene el mismo efecto que cuatro de la segunda. Esta actividad da los mismos resultados sobre plasma de conejo. Sin embargo, en una experiencia posterior, se demuestra que la raza sensible es más activa sobre plasma de conejo que sobre el humano.

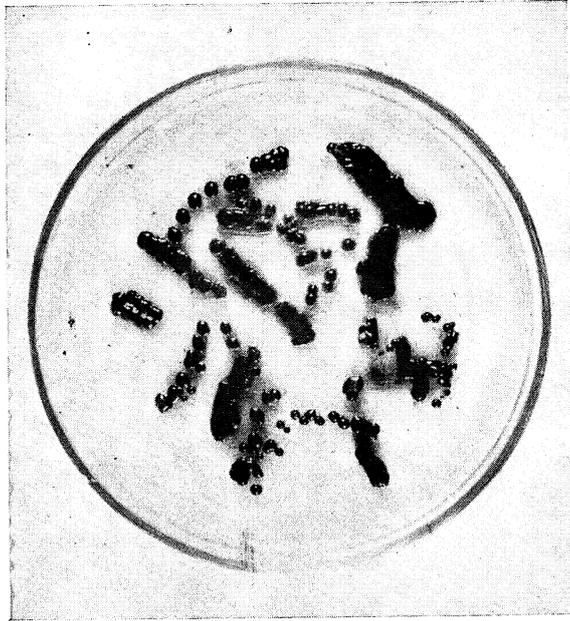


Figura 2

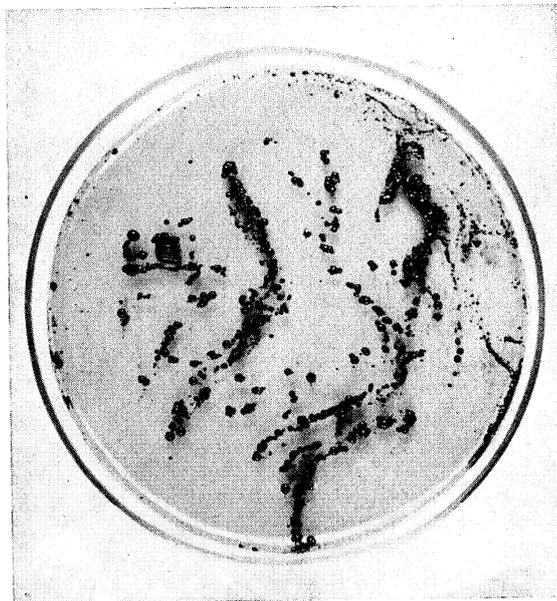


Figura 3

Se realiza ahora una experiencia cuantitativa con plasma humano y de conejo, diluidos al 1/10 y en presencia de cantidades variables de filtrados de estafilococo en caldo común durante veinticuatro horas; los resultados a las cuatro horas son los expuestos en el *cuadro 6*.

Cuadro 6

Filtrado, mililitros	Con plasma humano		Con plasma de conejo	
	Estafilococo sensible	Estafilococo resistente	Estafilococo sensible	Estafilococo resistente
0,200	++	++	+++	++
0,100	++	+	++	++
0,050	+	+	+	+
0,025	±	—	±	±
0,012	—	—	—	—

Se observa una mayor actividad de la raza sensible. Si las pruebas se realizan en plasmas de ternera, cordero y caballo al 1/10, en todos los casos da reacción de coagulasa, sobre todo en el plasma de caballo, lo que indica presencia de factor coagulasa reactivo; asimismo, la actividad es siempre mayor con la raza de estafilococo sensible.

También ambas razas, sensible y resistente, dan colonias negras (coagulasopositivas) cuando se inoculan en medio agar-telurito-glicina, pero se observa alguna diferencia incubadas a 37 °C durante veinticuatro horas, pues la raza sensible tiende a ser confluyente según se observa en las *figuras 2-3*.

e) Actividad tributirínica

Conocida es la presencia de actividad tributirínica en cultivos de estafilococo; nosotros realizamos algunas experiencias sobre esta enzima en gérmenes desecados y en filtrados de las razas sensible y resistente. En primer lugar, no se observa actividad en los filtrados, lo que indica la naturaleza intracelular de esta enzima. Determinando la actividad tributirínica intracelular, se observa que ésta es mayor en la raza sensible, como se indica gráficamente (*figura 4*).

Se observa que su producción se inicia a las veinticuatro horas aproximadamente hasta las noventa y seis horas. Si se prolonga el tiempo de cultivo, aparece actividad tributirinásica en los filtrados, lo cual indicaría lisis de los estafilococos.

Ya señalamos anteriormente la existencia de discrepancias en cuanto al origen de la penicilinas estafilocócica. En este trabajo sólo realizamos algunas experiencias con la raza resistente, pues como es ló-

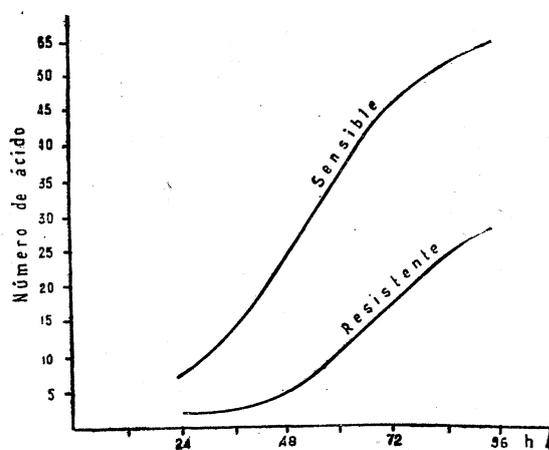


Figura 4

f) Actividad penicilínica

gico pensar, la raza sensible no produce esta enzima, o por lo menos no se detecta por los métodos empleados.

La producción de penicilinas por la raza resistente de estafilococo es variable; esto se demuestra aislando varias colonias en placa y determinando su capacidad de producción. Nosotros lo hacemos con cinco colonias y determinamos la actividad penicilínica en el germen desecado y en el filtrado de cultivo en caldo común durante veinticuatro horas. Observamos en la *figura 5* que la máxima producción corresponde a la colonia 3, tanto exo como intracelularmente.

Determinamos si el proceso de desecación de gérmenes afecta para algo a la actividad penicilínica y en la correspondiente experiencia no observamos diferencias apreciables.

Se hace una experiencia para ver la velocidad y producción de penicilinasa exocelular durante el crecimiento del estafilococo a 37 °C, en caldo común, en agitación. Se toman muestras, a intervalos de tiempo, que se centrifugan y en el líquido se determina la actividad penicilínica. Los resultados se expresan en la *figura 6*. Se observa que la actividad comienza a las dos horas, quedando estacionaria a partir de las seis horas. En otra experiencia se hace lo mismo, pero realizando

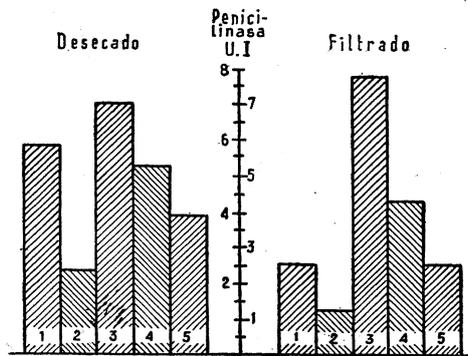


Figura 5

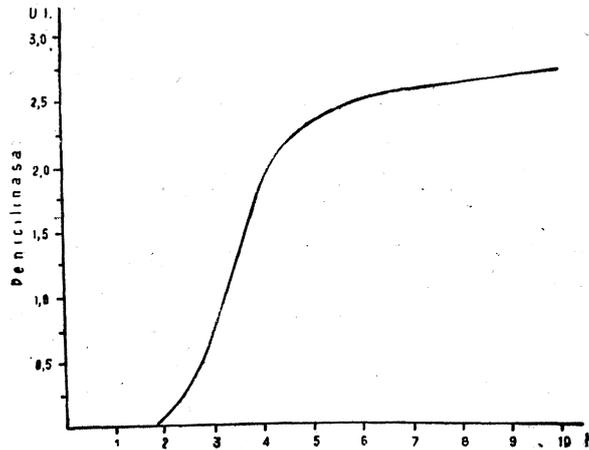


Figura 6

determinaciones en filtrado, germen desecado y germen lavado (*figura 7*).

Otra serie de experiencias se relacionan con la inducción de producción de penicilinas por el estafilococo. Nosotros, con las razas R1, R2, R3, tratadas respectivamente con 25, 50 y 100 U. I. de bencilpenicilina /1 ml de medio; realizando determinaciones de actividad, tanto exo como intracelularmente, no observamos caso alguno de inducción de penicilinas.

Como algunos autores señalan que el hierro y la oxina (8-hidroxi-quinolina) inhiben la inducción y la producción de penicilinas, rea-

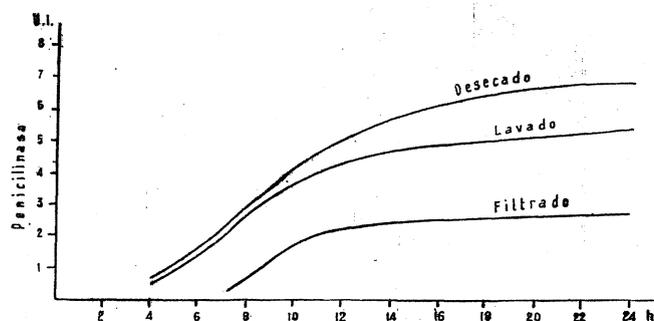


Figura 7

lizamos una experiencia para comprobar este extremo, empleando concentraciones de hierro y oxina de 2×10^{-5} M, hasta $8,3 \times 10^{-4}$ M; en ninguno de los casos observamos variaciones en la actividad penicilínica, ni en la posible inducción de la misma.

g) Actividad fosfatásica

Determinamos la actividad fosfatásica en razas sensible y resistente de estafilococo, tanto en filtrado como en germen desecado, a partir de un cultivo en caldo común a 37 °C, durante veinticuatro horas. Los resultados se expresan gráficamente (*figura 8*).

Observamos actividad en todos los casos, pero sobre todo intracelular en la raza resistente.

Determinamos la sensibilidad a la temperatura de la fosfatasa intracelular de las razas sensible y resistente del estafilococo cultivado

en caldo común a 37 °C, durante veinticuatro horas. Haciendo experiencia de inactivación a partir de 20 °C hasta 100 °C, permaneciendo cada 10 °C durante quince minutos, encontramos el nivel de inactivación para la raza sensible entre 80°-90 °C, siendo para la raza resistente entre 90°-100° C.

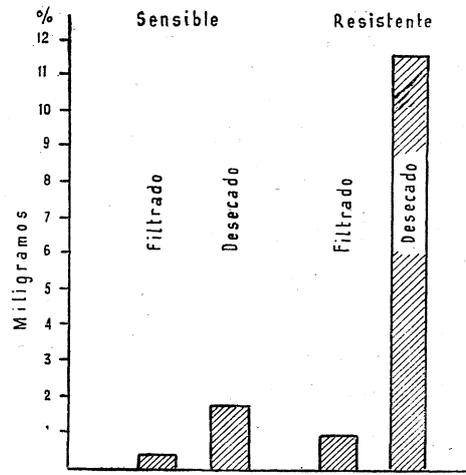


Figura 8

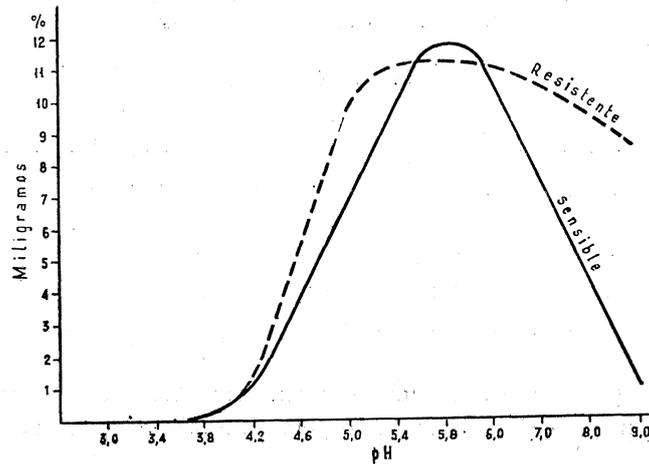


Figura 9

Por otra parte, determinamos el pH óptimo de actividad de ambas fosfatasas, expresando los resultados en la *figura 9*.

Observamos que el pH óptimo de la fosfatasa de la raza sensible está en 5,8, disminuyendo después rápidamente hacia ambos lados; el pH óptimo de la fosfatasa de la raza resistente está entre 5,4-6,0, permaneciendo bastante estable hacia el lado alcalino.

Un posible factor importante en la actividad fosfatásica son los iones metálicos. Nosotros estudiamos la posible influencia del magne-

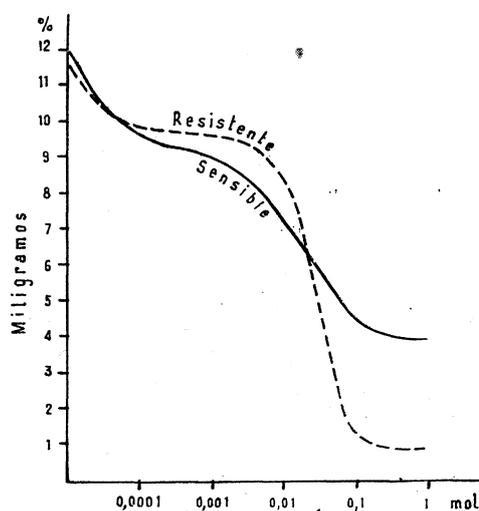


Figura 10

sio, zinc, manganeso, cobre y hierro sobre la actividad fosfatásica de las razas sensible y resistente del estafilococo. Las concentraciones molares empleadas fueron entre 0,0001-1. Se observó que el magnesio no influye en caso alguno, lo mismo que el manganeso; el zinc y el cobre parece que influyen ligeramente, produciendo inhibición a concentraciones elevadas. La acción del hierro se expresa gráficamente en la *figura 10*.

Es decir, que a partir de una concentración 0,01 mol, se produce una inhibición de las fosfatasas, en especial de la raza resistente.

h) Actividad transaminásica

Se realizan determinaciones de la GOT y GPT, en gérmenes lavados, gérmenes desecados y en filtrados de las dos razas, sensible y resistente, del estafilococo, sin que en caso alguno hayamos podido detectar actividad transaminásica.

DISCUSION

En un trabajo anterior, los autores (37) señalaban que el estafilococo presentaba aún amplias perspectivas de investigación, sobre todo en la parte referente a los mecanismos bioquímicos, origen de su patogenicidad y de sus relaciones con los mecanismos de defensa del organismo. Como el origen de la patogenicidad aún no está conocido completamente, son de interés todos los estudios que se orienten a esclarecer en algo tal proceso. De ahí el interés de los trabajos sobre caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos y sus posibles relaciones entre ellos y con factores de defensa del organismo que se encuentran en la sangre.

En el primer trabajo estudiábamos la raza de *Staphylococcus aureus* 209-P, sensible a la penicilina y tipo fago 42D, que se considera normal, y un mutante de la misma que se encontró era resistente a la penicilina y tipo fago 80. Es decir, que se encontró que la variación de sensible a resistente a la penicilina, se acompañó de un cambio de tipo de fago del 42D al 80. Al mismo tiempo habíamos encontrado que la raza mutante crecía más y mejor en todos los medios de cultivo empleados, contenía menor cantidad de ARN y ADN, y adquiría también resistencia al sulfafurazol y aumentaba ligeramente su sensibilidad a otros antibióticos. Como continuación de todo esto, nos interesa conocer las posibles variaciones que ocurren en los llamados factores de patogenicidad.

En primer lugar, las dos razas empleadas son teóricamente patógenas, pero la segunda (tipo fago 80) se conoce que es más virulenta y más estable, según numerosos autores; veremos si esto concuerda con nuestros resultados.

Las dos razas que estudiamos producen leucocidina, aunque la sensible lo hace en mayor cantidad, tanto exo como intracelularmente, no

influyendo en esta actividad ningún factor del plasma sanguíneo. Esta actividad se dirige preferentemente hacia los neutrófilos polinucleares y algo sobre los monocitos. Por otra parte, la penicilina influye muy poco en esta actividad; en cambio, la lisozima tiene tendencia a aumentar la acción leucocidínica, seguramente por facilitar la entrada de los estafilococos.

Son más sensibles a la fagocitosis los estafilococos sensibles (92 por ciento) que los resistentes (78 por ciento), razón quizás a la que se deba una mayor destrucción de leucocitos por la raza sensible; el plasma sanguíneo tampoco influye en esta acción *in vitro*. Observamos la presencia de un factor antibacteriano, porque los gérmenes exocelulares están más lisados en presencia de plasma que en presencia de glóbulos sanguíneos.

Decimos más adelante que la raza sensible produce más coagulasa, quizás por esto se forma alrededor de ellos una capa mayor de fibrina, por lo cual aparecen de mayor tamaño; estas formas también son fagocitadas, lo que indica que la fagocitosis es más bien un proceso mecánico de ingestión.

La penicilina no afecta, en general, al proceso de fagocitosis; en cambio, aparecen muchas formas globosas de estafilococo (80 por ciento), debidas seguramente a la acción de la penicilina sobre el estafilococo. Por otro lado, la lisozima hace aumentar la fagocitosis, quizás por una mayor sensibilización de los gérmenes. Los cambios de forma o agrupación de los gérmenes no parece que afecten a la fagocitosis, y de hacerlo, es en el sentido de favorecerla.

También las dos razas, sensible y resistente, estudiadas producen hemolisina, del tipo alfa-hemolisina, como también en el caso de la leucocidina; aquí la raza sensible produce o es más activa que la resistente, variando esta actividad según el medio de crecimiento.

Tanto la raza sensible como la resistente producen coagulasa libre que actúa sobre varios tipos de plasma (humano, conejo, caballo, ternera, cordero), lo que indica la presencia en todos ellos de un factor coagulasa reactivo, en cantidades variables. Como en los dos factores anteriores, también aquí la raza sensible es más activa que la resistente (observamos que hasta cuatro veces más). El crecimiento de ambas razas en medio agar-telurito-glicina demuestra, a un tiempo, la producción de coagulasa y que las colonias del estafilococo sensible presentan una morfología diferente a las del resistente, con una especial tendencia a

hacerse confluentes. Se acepta hoy totalmente que la prueba coagulasa es característica de las razas de estafilococos patógenos.

Como con los factores anteriores, las dos razas, sensible y resistente, de estafilococo poseen actividad tributirínica, que en los dos casos es de tipo intracelular y mayor en la raza sensible; se observa que su producción se inicia a las veinticuatro horas y dura hasta las noventa y seis; a partir de este tiempo aparece actividad en los filtrados, seguramente debida a autólisis de los estafilococos.

Mucho trabajo ha sido realizado sobre la enzima penicilinasas en general, y sobre la penicilinasas estafilocócica, en particular. Las discrepancias son grandes, sobre todo en lo relativo a la posible inducción de esta enzima, aunque quizás el origen de todo esté en el carácter de variabilidad de este germen. Así nosotros encontramos actividad penicilínica, solamente en la raza resistente, es decir, que así como en los factores precedentes, en general, las dos razas muestran actividad, en esta enzima fue una variación profunda. Claro está que la afirmación no puede ser completa, pues hay que tener en cuenta la sensibilidad de las técnicas utilizadas, que en este caso no es muy grande.

Que la variabilidad del estafilococo es grande, lo observamos aquí al determinar la actividad penicilínica de varias colonias aisladas, tanto de penicilinasas exocelular como intracelular. Determinamos que la penicilinasas exocelular empieza a producirse a las dos horas de crecimiento, cesando su producción a las seis horas.

Las mayores discusiones sobre la penicilinasas estafilocócica se refieren a su posibilidad de ser inducible o no, como decíamos antes. Nosotros no encontramos aumento de actividad penicilínica cuando el estafilococo crece en presencia de penicilina, en concentraciones de 25-100 U. I./1 ml de medio, probando varias razas resistentes y determinando actividad, tanto exo como endocelularmente.

Por otra parte, no hemos podido determinar influencia del hierro y de la 8-hidroxiquinolina en la actividad penicilínica o en la inducción de la misma, como habían estudiado algunos autores; quizás debido a la diferencia de razas empleadas.

Encontramos que ambas razas, sensible y resistente, del estafilococo poseen actividad fosfatásica, pero en este caso la raza resistente da cinco veces más que la sensible. Aunque casi todos los autores dan esta enzima como intracelular, nosotros encontramos también actividad exocelular, aunque en menor proporción. Determinando las posibles di-

ferencias entre fosfatasa de raza sensible y de raza resistente, observamos alguna en cuanto a la inactivación por la temperatura, que es algo más baja en la sensible que en la resistente. En cuanto al pH óptimo de la fosfatasa, observamos una mayor diferencia entre la del estafilococo sensible y la del resistente. Varios autores señalan como pH óptimo de la fosfatasa estafilocócica el pH 6,0; nosotros encontramos para la raza sensible el pH 5,8 y para la resistente 5,4-6,0; la raza sensible, a su vez, es menos resistente a los pH alcalinos que la resistente, lo cual indica una cierta diferencia.

Por otra parte, se estudia el comportamiento de ambas fosfatasas en presencia de diferentes concentraciones de diversos elementos metálicos. Así, no encontramos influencia de los iones magnesio y manganeso, encontramos una ligera acción en el sentido de inhibición de los iones cobre y zinc. Observamos influencia marcada del ion hierro sobre las dos fosfatasas y, sobre todo, sobre la del estafilococo resistente, a la que inactiva completamente a una concentración 0,1 M.

En resumen, creemos que por la diferencia de inactivación al calor, pH óptimo de actividad y comportamiento en presencia del hierro nos encontramos con dos tipos de actividad fosfatásica.

Por último, en ninguno de los casos encontramos actividad transaminásica en las dos razas de estafilococo, sensible y resistente; creemos que esto se debe especialmente a la técnica empleada en las determinaciones, lo cual merece un estudio especial.

Resumiendo todo este trabajo, podemos decir que las dos razas de estafilococo, sensible y resistente, producen los factores de patogenicidad siguientes: leucocidina, hemolisina, coagulasa libre, tributirina y fosfatasa; en todos los casos, menos en el último, la raza sensible produce más que la resistente. La penicilina es sólo producida por la raza resistente y no es de tipo inducido, en el caso por nosotros estudiado. Estos resultados están en contradicción con la afirmación de que la raza de estafilococo resistente, al ser de tipo fago 80, tenga una mayor actividad en factores de patogenicidad, eso que crece mejor en los medios de cultivo. Es decir, que la variación de sensible a resistente a la penicilina, aparte de cambiar el tipo de fago (42D a 80), hace disminuir la producción de factores de patogenicidad, a excepción de la fosfatasa. Lo que no sabemos es cuál de todos los caracteres es el que inicia la variación, problema sobre el que continuamos este trabajo.

RESUMEN

Continuando el trabajo sobre razas de *Staphylococcus aureus* y relaciones entre sus caracteres y factores de patogenicidad, estudiamos la raza 209-P, sensible a la penicilina y tipo fago 42D, y una variación espontánea de la misma, resistente a la penicilina y tipo fago 80.

Determinamos que esta variación se acompaña de disminución en la actividad leucocidínica, alfa-hemolisínica, coagulásica libre y tributirínica; en cambio, hay cambio de tipo de fosfatasa, acompañado de aumento de producción de este nuevo tipo. A pesar de la mayor actividad de la raza sensible en los factores anteriores, ésta es más susceptible a la fagocitosis, proceso en el que no influyen factores del plasma, ni la penicilina, pero que, en cambio, aumenta por la acción de la lisozima. La raza resistente adquiere la propiedad de producir penicilinas, que, en nuestro caso, no es de tipo inducible.

SUMMARY

Following the work on *Staphylococcus aureus* strains and its relations we study the 209-P strain, penicillin-sensitive and 42D phage type and a spontaneous variation, penicillin-resistant and 80 phage type.

We specify that such a one variation it is accompanied by decrease on activity of leucocidin, alfa-haemolysin, free coagulase, and tributyrinase; on the contrary, there is a change on the phosphatase type, with increase in its production. In spite of the larger activity of precedent factors on the sensitive-strain, this staphylococci is more susceptible to the phagocytosis, which process it is not affect by plasme factors, nor penicillin, but increase by lisozyme action. The resistant-strain produce penicillinase, that in the present case it is not inductible type.

BIBLIOGRAFIA

1. BARBER, M. 1949. The incidence of penicillin-sensitive variant colonies in penicillinase-producing strains of *Staphylococcus pyogenes*. J. Gen. Microbiol., 3, 274.
2. BARBER, M., y KUPER, S. W. 1951. Identification of *Staphylococcus pyogenes* by the phosphatase reaction. J. Pathol. Bacteriol., 63, 57.
3. BARNES, E. H., y MORRIS, J. F. 1957. A quantitative study of the phosphatase activity of *Micrococcus pyogenes*. J. Bacteriol., 73, 100.
4. BARRY WOOD (Jr.), W. 1960. Phagocytosis with particular reference to encapsulated bacteria. Bacteriol. Rev., 24, 41.
5. BELLAMY, W. D., y KLIMEK, J. W. 1958. Some properties of penicillin-resistant staphylococci. J. Bacteriol., 55, 153.
6. BLAIR, J. E. 1958. Factors determining the patogenicity of staphylococci. Ann. Rev. Microbiol., 12, 491.
7. BONDI, A. J. R., y DIETZ, C. C. 1945. Penicillin resistant staphylococci. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 60, 55.
8. BONDI, A. J. R.; KORNBLAUM, J., y PHALLE, M. S. 1954. The aminoacid requirements of penicillin resistant and penicillin sensitive strains of *Micrococcus pyogenes*. J. Bacteriol., 68, 617.
9. BURNS, J., y HOLTMAN, D. F. 1960. Biochemical properties of virulent and avirulent staphylococci. Ann. N. Y. Acad. Sci., 88, 1.115.
10. CAPOCACCIA, L. 1956. L'uso del test della phosphatase quale indice di patogenicità degli stafilococchi. Giorn. Mal. Infettive e Parassit., 8, 400.
11. CARRERE, L., y ROUX, J. 1954. Activite phosphatasique des staphylocoques. Ann. Inst. Pasteur., 87, 349.
12. DAVIES, G. E. 1951. Factors influencing the *in vitro* production of staphylococcal coagulase. J. Gen. Microbiol., 5, 687.
13. DAVIES, G. E. 1954. A study of the diffusible lipase produced by staphylococci and its immunological activity. J. Gen. Microbiol., 2, 37.
14. DRUMMOND, M. C., y TAGER, M. 1959. Enzymatic activity of staphylocoagulase. II. Dissociation of plasma clotting from tributyrinase activity. J. Bacteriol., 78, 413.
15. DRUMMOND, M. C., y TAGER, M. 1962. Enzymatic activities associated with clotting of fibrinogen by staphylocoagulase and coagulase-reacting factor and their inhibition by DFP. J. Bacteriol., 83, 975.
16. DUTHIE, E. S. 1954. Evidence for two forms of staphylococcal coagulases. J. Gen. Microbiol., 10, 427.
17. ELEX, S. D. 1959. *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. E. & S. Livingstone Ltd. Edimburgo.
18. EKSIEDT, R. D., y YOTIS, W. W. 1960. Studies on staphylococci. II. Effect of coagulase on the virulence of coagulase negative strains. J. Bacteriol., 80, 496.

19. FAIRBROTHER, R. W.; PARKER, L., y EATON, B. R. 1954. The stability of penicillinase producing strains of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., 10, 309.
20. GARBER, E. D. 1960. The host as a growth medium. Ann. N. Y. Acad. Sci., 88, 1187.
21. GERONIMUS, H., y COHEN, S. 1957. Increased staphylococcal penicillinase activity accompany in penicillin treatment of infected mice. J. Bacteriol., 74, 507.
22. GERONIMUS, H., y COHEN, S. 1958. Further evidence for inductibility of staphylococcal penicillinase. J. Bacteriol., 76, 117.
23. HALE, J. H. 1944. The nature and mode of action of staphylocoagulase. Brit. J. Exptl. Pathol., 25, 101.
24. HARRIS, H. 1960. Mobilization of defensive cells in inflammation tissue. Bacteriol. Rev., 24, 3.
25. INNIS, W. E., y SANCLEMENTE, C. L. 1962. Biochemical studies on staphylocoagulase and an allied phosphatase activity. J. Bacteriol., 83, 941.
26. JACKSON, A. W., y LITTLE, R. M. 1958. Staphylococcal toxins. II. Factors affecting hemolysis activity of delta-lysin. Can. J. Microbiol., 4, 435.
27. KIRBY, W. M. M. 1944. Extraction of a potent penicillin inactivation from penicillin resistant staphylococci. Science., 99, 452.
28. LAM, G. T., y SEVAG, M. C. 1959. Inhibition and competitive effects of sulfathiazol on transaminases and the permeability of sensitive and resistant *Staphylococcus aureus*. Antibiot. Chemotherapy, IX, 214.
29. LETTNER, F., y COHEN, S. 1962. Effect of pH and inorganic salts on penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 83, 314.
30. LICHSTEIN, H. C., y COHEN, P. D. 1945. Transamination in bacteria. J. Biol. Chem., 157, 85.
31. LINZ, R., y MANDELBAUM, E. 1960. Sur la phagocytose *in vitro* des bacteries par les leucocytes des cobayes. Ann. Inst. Pasteur., 98, 524 y 664.
32. MILLER, J. M.; JACKSON, D. A., y COLLIER, C. S. 1960. Inhibition by dequadin chloride of the clotting of fibrinogen and the coagulase of *Staphylococcus aureus*. Antibiot. Chemotherapy, X, 46.
33. MURRAY, M. M.; SALLMAN, B., y SCHOELSON, S. M. 1959-1960. Gamma-globulin inhibition *in vitro* of staphylococcal free and bound coagulase. Antibiot. Ann., 761.
34. OTERO, R., y REGUEIRO, B. 1960. Estudios sobre el metabolismo enzimático del *Streptomyces griseus*. IV. Actividad lipásica. Microbiol. Españ., 13, 241.
35. OTERO, R., y REGUEIRO, B. 1960. Estudios sobre el metabolismo enzimático del *Streptomyces griseus*. III. Actividad fosfatásica. Microbiol. Españ., 13, 225.
36. POLLOCK, M. P. 1953. Stages in enzyme adaptation. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 3 (1960), 150.
37. PORTO, E., y REGUEIRO, B. 1962. Caracteres diferenciales entre razas sensibles y resistentes a la bencilpenicilina, del *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Españ., 15, 101.

38. ROBERTS, J. E. 1957. Toxin production by *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol., 74, 439.
39. ROBINSON, J.; TATCHER, F. S., y MONTFORD, J. 1960. Studies with staphylococcal toxins. VI. Can. J. Microbiol., 6, 195.
40. SABATH, L. D., y FINLAND, M. 1962. Diffusion of penicillinase from *Staphylococcus aureus*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 109, 478.
41. SALLIMAM, B., y STREITFELD, M. M. 1958-1959. The *in vitro* inhibition of staphylococcal penicillinase by various compounds of chemotherapeutic potential. Antibiot. Ann., 647.
42. SAZ, A. K.; LOWERY, D. L., y JACKSON, L. J. 1961. Staphylococcal penicillinase. I. Inhibition and stimulation of activity. J. Bacteriol., 82, 298.
43. Sigma Bulletin, núm. 505. 1957.
44. STEIMMAN, H. G. 1961. Factors modifying-induced penicillinase. J. Bacteriol., 81, 895.
45. SUTER, E. 1956. Interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms. Bacteriol. Rev., 20, 94.
46. VACCARO, H., y PAREDES, L. 1958. Production of phosphatase by the staphylococci: its relation to other test of pathogenic capacity. Intern. Congr. Microbiol., 7th. Congr., Stockholm, 1958, Abstr., 325.
47. WLODARCZAK, K., y JEJASZEWITZ, J. 1959. Influence of coagulase on the growth of staphylococci in normal human serum. Nature., 184, 1514.
48. WEISS, P. J. 1959. A consideration of factors affecting the iodometric assay of penicillin. Antibiot. Chemotherapy, IX, 660.
49. WOODIN, A. M. 1961. The effect of staphylococcal leucocidin on the leucocyte. Biochem. J., 80, 562.
50. YOTIS, W. W., y EKSTEDT, R. D. 1960. Studies on staphylococci. III. Further studies on purification and mechanisms of action of an antibacterial human serum factor. J. Bacteriol., 80, 719.
51. ZEBOVITZ, E.; EVANS, J. B., y NIVEN (Jr.), C. F. 1955. Tellurite-glycine agar: a selective plating medium for the quantitative detection of coagulase positive staphylococci. J. Bacteriol., 70, 686.
52. ZANGALIA, O. 1958. In valore della reazione della fosfatasi di altre prove biochimiche e della tipizzazione fagica nello studio della patogenicità del *M. pyogenes*. Riv. Ist. Sieroterap. Ital., 33, 1.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA

CAROTENOBACTER SUBTROPICALUM, NUEVA
ESPECIE DEL ORDEN PSEUDOMONADALES EN
SUELOS SUBTROPICALES DE TUCUMAN

POR

ANASTASIA DE ROKITZKA

En el estudio de la microflora del suelo de la provincia de Tucumán (Argentina) fue descubierta una bacteria original impregnada de un pigmento de color amarillo que espontáneamente pasa a rojizo.

Dicha bacteria fue encontrada por primera vez en un perfil del suelo de la rizosfera del limonero, a la profundidad de 50 cm, pero más adelante también en varios perfiles del suelo, fuera del sistema radicular de las plantas.

La bacteria pigmentada está difundida en el suelo de la provincia de Tucumán, independientemente del tipo de suelo y de la influencia de las plantas, entre 25-75 cm de profundidad.

Presenta gran interés el hecho de que la bacteria pigmentada siempre se desarrolla en las colonias compuestas, con algunos otros representantes de la microflora del suelo.

Bien conocido es que las colonias compuestas de los microorganismos del suelo se encuentran en varios lugares de nuestro globo, en diferentes tipos de suelo y clima.

De tal modo, algunas colonias del *Azotobacter*, fijador del nitrógeno atmosférico, conservan en sus colonias las bacterias que descomponen la celulosa y que preparan los productos de su metabolismo muy favorables para el *Azotobacter*, por ejemplo, la oxixelulosa.

Pero en las colonias compuestas, sin duda, no siempre existen relaciones mutuamente ventajosas para cada componente de la colonia, sino también antagonismo y parasitismo.

Para nuestro estudio ha tenido interés comprender qué papel juega la bacteria pigmentada en las colonias donde vive y también qué es su pigmento coloreado y muy característico para dicho biotipo de las bacterias del suelo.

MATERIALES Y METODOS

A) *Morfología de la bacteria pigmentada*

El cultivo puro de la bacteria pigmentada fue sembrado sobre el medio de agar-agar albuminado, de pH 7,0, a la temperatura de 28 °C.

Las colonias son de consistencia mucosa y densa, de forma redonda y con los bordes lisos y color amarillo. En los medios naturales, como los de zanahoria y patata, la bacteria forma una película mucosa y brillante.

Después de dos-tres meses, el pigmento de las colonias, de color amarillo, pasa espontáneamente a color rojizo. Además, el pigmento de color rojizo aparece en colonias muy frecuentemente en los medios de los cultivos artificiales con asparagina e inulina y también sobre zanahoria.

Las células de la bacteria pigmentada, bajo el microscopio, en gota pendiente, tienen la forma de bastoncitos rectos con gránulos en sus dos extremos, notándose que algunos tienen gránulos pequeñísimos en todo el cuerpo. Estos gránulos se pueden teñir con el azul de Loeffler, con matices metacromáticos. Las células tienen flagelos del tipo peritrico, porque la bacteria tiene una gran movilidad, pero desordenada (*figura 1*).

En la gota pendiente, las células se agrupan formando agregados característicos. Este fenómeno se puede ver cuando dos o tres células tienen sus flagelos entrelazados, perdiéndose así su movilidad; entonces se agregan nuevas células, que muy pronto aumentan los agregados (*figura 2*).

Las dimensiones de las células corresponden a 1-2 μ por 0,5-0,2 μ de anchura. La reproducción se realiza por división directa. La temperatura óptima de desarrollo es 28 °C, y la mínima, 4 °C.

La reacción del medio de cultivo más favorable para la bacteria pigmentada corresponde a un pH de 5,0-7,0.

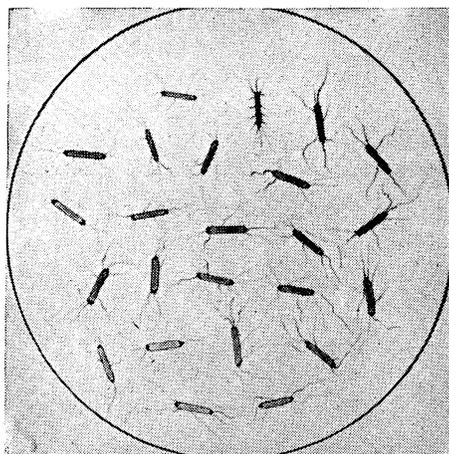


Figura 1

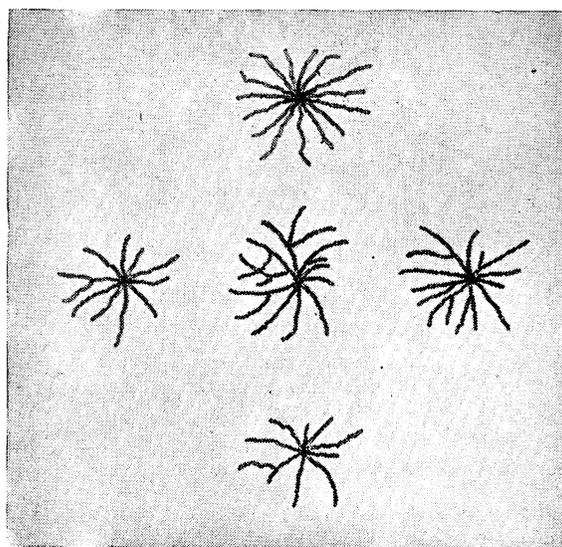


Figura 2

Los cultivos jóvenes son Gram-negativos, pero los viejos se transforman en Gram-positivos. Además, las células en cultivos viejos cambian su forma de bastoncitos por la ovalada, casi redonda, pero algunas conservan la forma de bastoncitos.

En el medio de cultivo con inulina aparece el citoplasma en bandas en las células de la bacteria (*figura 3*).

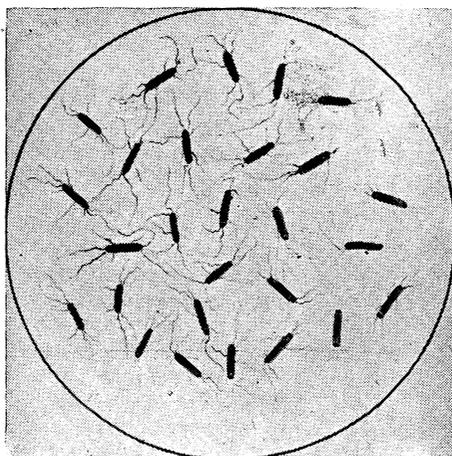


Figura 3

En los medios de cultivo con asparagina, las células de la bacteria pigmentada, en la gota pendiente, se agrupan en paquetes muy parecidos a la sarcina, con la diferencia de que la sarcina está formada por células en forma de cocos, pero las células de nuestra bacteria conservan su forma de bastoncitos (*figura 4*).

En cultivos de seis-ocho meses, frecuentemente, la bacteria se transforma en bacteroide (*figura 5*).

Nuestra bacteria se cultivó en diversos medios. Se desarrolla bien en el gel de sílice de Winogradsky, cambiando algunas veces su forma, pero siempre conserva su pigmento, que impregna cada célula de la bacteria y que es muy característico para el citado biotipo de la microflora del suelo subtropical.

En colonias compuestas, junto con varios microorganismos del suelo, la bacteria pigmentada vivía desde algunos meses hasta un año, pero

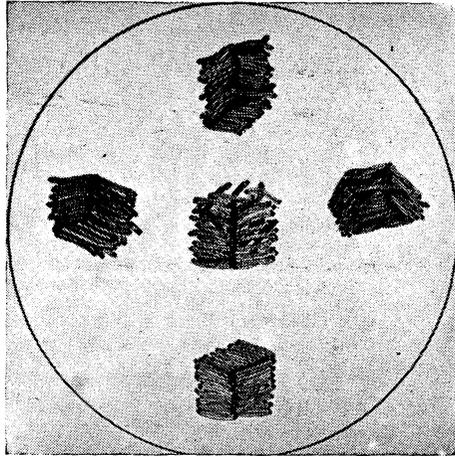


Figura 4

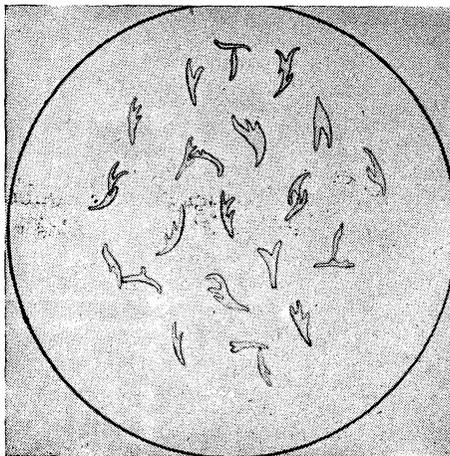


Figura 5

en cultivos puros, especialmente en medios de cultivo con asparagina, vivía hasta tres años. Después de este lapso, sus células, lentamente, se autolisan.

B) Fisiología de la bacteria y naturaleza de su pigmento

Cuadro 1. Actividad fisiológica de la bacteria pigmentada sobre varios substratos

Substratos	Bacteria con pigmento amarillo	Bacteria con pigmento rojizo
1. Sacarosa	+++	++++
2. Glucosa	++	++++
3. Levulosa	+++	+++++
4. Maltosa	+	+++++
5. Rafinosa	++	+++++
6. Lactosa	++	+++
7. Galactosa	+	++++
8. Xilosa	—	—
9. Manita	+++	+++++
10. Glicerina	++	+++
11. Inulina	+	+++
12. Gelatina	Licúa	Licúa
13. Almidón tornasolado	—	—
14. Almidón	—	—
15. Leche tornasolada	Peptoniza	Peptoniza
16. Leche	Peptoniza	Peptoniza

+ Acidez débil. ++++ Acidez fuerte. — Neutro.

Los cultivos de la bacteria con pigmento de ambos colores no dan las reacciones del H₂S y del indol y no reducen los nitratos.

Naturaleza del pigmento

El estudio de la naturaleza del pigmento de la bacteria del suelo se hace por dos métodos: a) Precipitación; b) Disolución.

a) *Precipitación.* A la suspensión de la bacteria se añade disolución de KOH en alcohol metílico. En el fondo del tubo de ensayo se forma un precipitado cristalino, que después de ser tratado con ácido sulfúrico concentrado se tiñe de color azul. Esta reacción es típica para los pigmentos del grupo de los carotinoides.

b) *Disolución.* Los resultados de dicho método se pueden ver en el cuadro 2.

Cuadro 2. La disolución de los pigmentos en varios disolventes

Disolventes	Pigmento amarillo	Pigmento rojizo
1. Eter de petróleo	No	No
2. Benzol	No	No
3. Xilol	No	No
4. Acetona	No	Muy poco
5. Bencina	No	No
6. Cloroformo	Muy poco	Muy poco
7. Alcohol etílico	No	No
8. Alcohol metílico	Bien	Muy bien
9. Alcohol butílico	No	No
10. Glicerina	No	No
11. Agua	No	No
12. Agua con 10 % de ácido	No	No
13. Agua con 20 % de álcali	No	No

Los resultados del método de disolución mostraron que el pigmento se disuelve muy bien en alcohol metílico, que es el mejor disolvente para los pigmentos del grupo de los carotinoides.

Sobre la base de los resultados de los dos métodos, el pigmento puede ser clasificado en el grupo de los carotinoides.

Verificación de la virulencia de la bacteria

Respecto a los vegetales. Los cultivos puros de la bacteria, a las cuarenta y ocho horas de su incubación, con el pigmento de color amarillo y de color rojizo, fueron inoculados en las hojas y tallos de tomate, pimiento, patata, lechuga, trébol, alfalfa, cacahuete, altramuz blanco, tabaco y alhelí.

Respecto a los animales. De la emulsión del cultivo de la bacteria a las cuarenta y ocho horas de incubación, con el pigmento amarillo y rojizo, se inocularon 0,5 cm³ en el vientre de una rata blanca macho y 0,2 cm³ en el de una rata blanca hembra. La inoculación no mostró reacción patógena alguna para los animales.

DISCUSION

Los microorganismos del suelo viven en la naturaleza, formando asociaciones ecológicas, hasta hoy en día muy poco estudiadas.

Pero en los procesos de adaptación a las condiciones específicas del suelo, los microorganismos, sin duda, han elaborado sus características originales y también su propio modo de vida, de los que dependen muchos procesos fundamentales de la fertilidad del suelo.

Por dicha razón, el fenómeno de asociación entre los microorganismos del suelo tiene un gran interés, tanto desde el punto de vista teórico como del práctico.

Nuestro hallazgo, la bacteria pigmentada, atrajo nuestra atención por su actividad en colonias compuestas y por la naturaleza de sus dos pigmentos, muy característicos del microorganismo.

Los microorganismos, generalmente, elaboran en sus células uno o varios grupos de carotinoides, que son los pigmentos fotosintéticos, muy activos en los procesos del metabolismo de las células microbianas y que sirven como transformadores del hidrógeno y como fuentes de vitamina A, la substancia específica que actúa sobre la nutrición y crecimiento de los organismos vivos, acelerando en alto grado las funciones básicas del metabolismo.

Los pigmentos elaborados por los microorganismos, en condiciones naturales, pueden dividirse en cuatro grupos, sobre la base de su estructura química, que son:

1. Prodigiosina. Pigmento rojo, derivado del pirrol.
2. Piocianina. Pigmento azul oscuro, derivado de la fenocina.
3. Piocol. Pigmento derivado de la naftoquinona, aislado de los bacilos de la tuberculosis.
4. Carotinoides. Grupo de los carotenos.

Los pigmentos del grupo de los carotinoides están difundidos ampliamente en el reino vegetal, así como en el animal.

La bacteria pigmentada descubierta en el suelo de la provincia de Tucumán, merced a su pigmento del grupo de los carotinoides, podría actuar en colonias compuestas, con varios microorganismos del suelo, como transformadora del hidrógeno, que no existe en las capas del suelo por razón de su ligereza, y como la productora de la vitamina A para los microorganismos del suelo.

La bacteria pigmentada descubierta en los suelos de la provincia de Tucumán representa un tipo original por sus propiedades morfológicas y fisiológicas y pertenece a la microflora del suelo subtropical. Por su pigmento carotinoideo fue nombrada *Carotenobacter subtropicalum* (*), nueva especie del orden Pseudomonadales. Se encuentra en los suelos periódicamente y hay años en los que no se ha podido aislar. Se observó por primera vez en 1952.

CONCLUSIONES

1. En el estudio de la microflora del suelo de la provincia de Tucumán fue descubierta una bacteria pigmentada cromatógena y polimórfica, que se desarrolla en colonias compuestas, con varios microorganismos del suelo. Su tamaño corresponde a 1-2 μ por 0,2-0,5 μ . En cultivos jóvenes tiene la forma de bastoncitos rectos, pero en la vejez cambia la forma de sus células a ovalada y casi redonda. Posee flagelos del tipo peritrico. El protoplasma, granulado, con matices metacromáticos. Gram-negativa en cultivos jóvenes y Gram-positiva en cultivos viejos.

La temperatura óptima, 28 °C; la mínima, 4 °C. pH, 7,0-5,0. Reproducción por división directa, no tiene esporas. No virulenta para el reino vegetal ni para el animal.

2. El pigmento de su célula pertenece al grupo de los carotinoides. Podría servir como transformador del hidrógeno y productor de la vitamina A en los procesos de su metabolismo.

En colonias compuestas muere más rápidamente que sus otros componentes y desaparece por autólisis.

3. La nueva bacteria pigmentada representa un tipo original por sus caracteres morfológicos y fisiológicos y pertenece a la microflora del suelo subtropical. Se la ha designado *Carotenobacter subtropicalum*; nueva especie del orden *Pseudomonadales*.

Dejo constancia de mi reconocimiento al Dr. Luis C. Verna, Director del Instituto de Microbiología, así como también a todas aquellas personas que directa o indirectamente prestaron su ayuda para la realización de este trabajo.

(*) *Carotenobacter*, por poseer un pigmento del grupo de los carotinoides; *subtropicalum*, por haber sido encontrada en suelos subtropicales.

SUMMARY

In the study of the soil microflora of the province of Tucumán an original biotype of bacterium was found. It is the bacterium from the chromogenic, polymorphic group, which lives in symbiosis with various soil microbes. This bacterium has the shape of a small rod with the length of 1-2 μ and wide of 0.2-0.5 μ .

In old cultures it has some ellipsoidal and sometimes spherical formes. The protoplasm of the cells has always granules, which become metachromatic colours when treated by the Loeffler methylene blue. The young cultures are Gram-negative and the old ones are Gram-positive. The optimum temperature is 28 °C., and the minimum, 4 °C.

The reproduction is by direct division. It is not virulent towards vegetals and animals.

The bacterium is most interesting for their pigment from the carotenoids group. Thanks to its pigment this microorganism is able to play the role of transformer hydrogen and vitamin A for its associates in processes of the life in soil. For their physiological and morphological properties our bacterium has been called for *Carotenobacter subtropicalum* n. sp. of the Pseudomonadales.

BIBLIOGRAFIA

1. Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 1948. Baltimore.
2. GLINKA, K. 1932. Edafología. Moscú-Leningrado.
3. OMELIANSKY, W. 1922. Principios de Microbiología. Moscú-Leningrado.
4. PÉREZ-SILVA, J. 1954. Microbiol. Españ., 7.
5. WAKSMAN, S. 1932. Principles of Soil Microbiology. Baltimore.
6. WINOGRADSKY, S. 1940. Microbiologie du Sol: Problèmes et méthodes. Paris.

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

DIGESTION DE UREDOSPORAS POR *VERTICILLIUM* *HEMILEIAE*

POR

J. A. LEAL y J. R. VILLANUEVA

INTRODUCCION

Se han realizado pocos estudios sobre hongos parásitos o asociados con royas u otros hongos. La mayoría de los investigadores en este campo describen la asociación con uredíneas, considerándola, unas veces, como comensalismo, y otras, como parasitismo. Hulea (3) ha estudiado un extenso grupo de estos organismos, considerándoles «comensales» en uredíneas. Fedorintchik (2) describe detalladamente la asociación de *Darluca filum* con diferentes puccíneas de los cereales y la forma en que aquel hongo se desarrolla en las plantas, demostrando el «parasitismo» que se da sobre las royas y no sobre los vegetales huéspedes. Oliveira (7) trató de establecer algunas de las relaciones fisiológicas de *D. filum* y *Tuberculina* sp. Villanueva (8) ha investigado algunos de los aspectos nutricionales del hongo *T. persicina*, que vive asociado a ciertas royas.

En el presente trabajo exponemos algunos resultados experimentales obtenidos de la asociación *Verticillium-Hemileia*, que pueden ayudar a interpretar estas relaciones y ver si *V. hemileiae* tiene alguna acción sobre la planta atacada por la roya.

MATERIAL Y METODOS

Organismo

Sobre las uredosporas de la roya *Hemileia vastatrix*, que ataca a las hojas del café, se desarrolla un hongo que llega a cubrir con su micelio blanco todo el soro y del que no se conoce su influencia en las posteriores lesiones que se manifiestan en las hojas atacadas por la roya. Una vez aislado el citado hongo, lo identificamos como perteneciente al género *Verticillium*, presentando unas características semejantes al *V. hemileiae* descrito por Bouriquet (1). Según este autor, el hongo ataca a las uredosporas de *Hemileia vastatrix* introduciendo su micelio en el interior de éstas.

La cepa de *Verticillium hemileiae*, objeto del presente estudio, se ha aislado por cultivo monospórico de soros de *Hemileia vastatrix* sobre hojas de café.

Medios de cultivo

La cepa de *Verticillium hemileiae* se mantiene en el laboratorio por resiembra sobre medios Czapek y GAE (glucosa, 10 g; asparagina, 1 g; extracto de levadura, 0,5 g; PO_4HK_2 , 0,5 g; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g; agar, 20 g; agua, 100 cm³, y agua destilada, 900 cm³. La glucosa se esteriliza separadamente y se mezcla en frío).

Tipos de esporas de royas empleadas

Se han empleado uredosporas, aisladas de las lesiones producidas en distintas plantas, principalmente por *Hemileia vastatrix* sobre hojas de café, por *Puccinia graminis* sobre hojas de trigo, y por *Melampsora sp.* sobre hojas de chopo. En un trabajo próximo a publicarse se describirán experimentos parecidos, pero utilizando teleutosporas en vez de uredosporas.

Obtención de microcultivos

Se emplean placas grandes del tipo de las de Petri, como cámaras húmedas. En su interior obtenemos microcultivos inoculando el *Verticillium* sobre cubreobjetos con las distintas uredosporas. Este método

nos permite retirar en diferentes tiempos de incubación, uno de estos microcultivos, y estudiarlos microscópicamente, bien en fresco o después de una tinción, empleando una solución de azul de algodón en lactofenol.

Se preparan los microcultivos en las condiciones más estériles posibles, poniendo sobre un cubreobjeto una gota de la suspensión de uredosporas lavadas y otra gota de una suspensión de conidiosporas de *Verticillium hemileiae*. A continuación, los cubreobjetos se colocan en el fondo de las placas sobre papel de filtro humedecido con agua estéril, para conservar la humedad necesaria para un buen desarrollo del hongo. Estas cámaras húmedas se llevan a la estufa para incubar a 28 °C. A intervalos de tiempo de unas doce horas, vamos retirando microcultivos para observarlos.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Las observaciones realizadas sobre los microcultivos de uredosporas en diferentes tiempos de incubación, demuestran que *Verticillium hemileiae* se desarrolla bien, utilizando como única fuente de alimento las uredosporas (4-5). Cuando crece sobre uredosporas de *Hemileia vastatrix* podemos observar cómo, después de veinticuatro horas, las esporas toman todavía el colorante, aunque están rodeadas por el micelio del *Verticillium*, sin poder distinguirse si penetra en ellas o no. A las cuarenta y ocho horas, ya no toman el colorante de forma regular; el protoplasma de la uredospora va contrayéndose y la pared externa se va haciendo tenue. A los tres días, y a lo largo de los siguientes, el ataque se hace más manifiesto, con liberación de parte del contenido interno y desaparición de la membrana, hasta llegar a los catorce días, en que no puede apreciarse resto alguno de las uredosporas.

Estudios semejantes realizados sobre *Puccinia graminis* demuestran que el ataque es más lento, observándose restos de la pared de la uredospora a los quince días, aunque hemos de reconocer que apenas dan contraste en el microscopio de fases. Sin embargo, el tipo de uredosporas más sensibles a la acción del *Verticillium* es el de *Melampsora* sp. (figura 1), en las que se observa que el ataque se produce rápidamente, encontrándose la cubierta totalmente desintegrada tres días después de la inoculación (figuras 2-4). En uredosporas mantenidas

en las mismas condiciones de humedad y temperatura, sin inocular con *Verticillium*, no encontramos ninguna alteración, aunque llegue a desarrollarse algún hongo contaminante.

Se ha podido observar que cuando se efectúan inoculaciones pulverizando esporas de *Verticillium hemileiae* sobre plantas de café sanas, éstas no sufren ataque alguno por parte de este hongo. Si sobre una hoja depositamos una buena cantidad de uredosporas de *Hemileia vastatrix* y después se pulveriza con *Verticillium*, éste crece, desarrollándose igual que lo hacía sobre los soros formados por la roya. Este ataque es tan rápido que el tubo germinativo de las uredosporas no tiene tiempo de penetrar en la hoja, por lo que no llegan a aparecer las lesiones típicas debidas a la roya. Un experimento testigo realizado en las mismas condiciones de las descritas, pero sin la inoculación con *Verticillium*, provoca experimentalmente la enfermedad en plantas de café, demostrándose así la función protectora que juega el *Verticillium*. De la misma forma, en aquellas hojas de café atacadas por la roya con uredosporas y, además, con *V. hemileiae*, no aparece mancha o lesión alguna, lo que demuestra que al crecer, el *V. hemileiae* no segrega sustancias capaces de producir lesiones sobre las hojas, ni llega a atacar a la planta, aunque se desarrolle sobre la roya que la parasita.

A la vista de los resultados logrados, y teniendo en cuenta que se han obtenido resultados semejantes de digestión de las uredosporas utilizando caldos metabólicos de *Verticillium hemileiae*, después de separar por precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ las fracciones capaces de desintegrar las cubiertas de *Melampsora sp.*, deducimos que este hongo segrega una sustancia lítica para las paredes celulares, con propiedades características de una enzima o enzimas. Esta enzima o enzimas, es responsable de la desintegración de las uredosporas de *Puccinia*, *Melampsora* y *Hemileia*, si bien los períodos de incubación que se requieren para la desintegración sugieren diferencias substanciales en la composición de las paredes de las uredosporas de estas royas.

Las inoculaciones practicadas sobre plantas de café demuestran que *Verticillium hemileiae* no tiene acción sobre la planta. Estos últimos resultados han sido confirmados por medio de un extenso estudio de actividades enzimáticas de este grupo de hongos, demostrándose que las especies de *Verticillium* patógenas para las plantas, presentan actividad pectolítica, mientras que las que, como el *V. hemileiae*, son de carácter saprofito no presentan tales actividades (6).

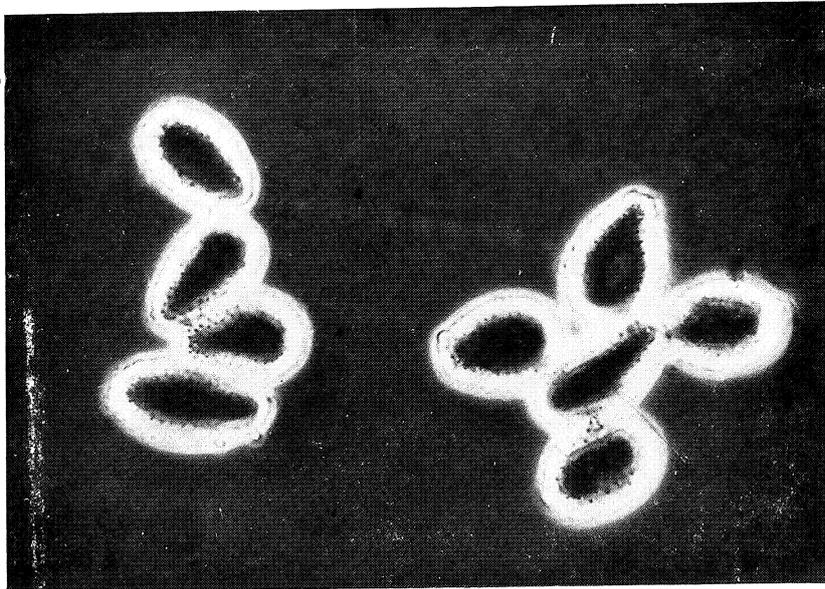


Figura 1. Uredosporas de Melampsora, sin inocular

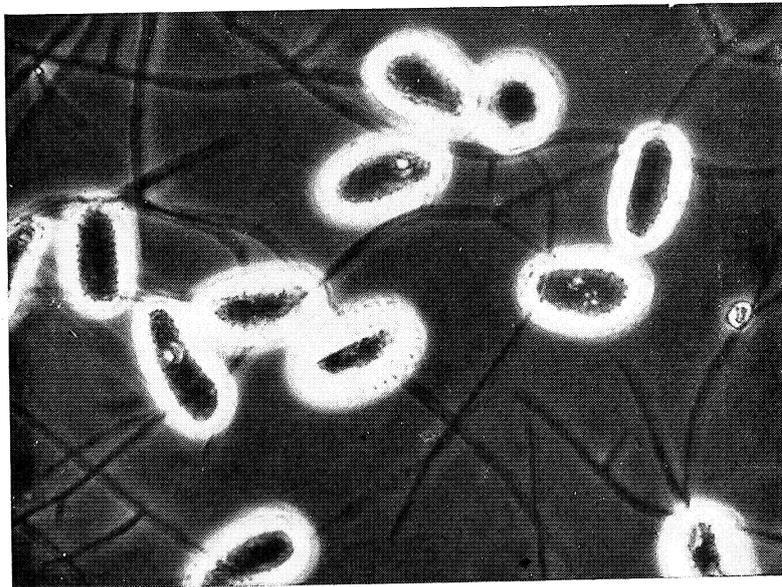


Figura 2. Uredosporas de Melampsora después de veinticuatro horas de incubación con Verticillium hemileiae. Se observa el micelio de Verticillium

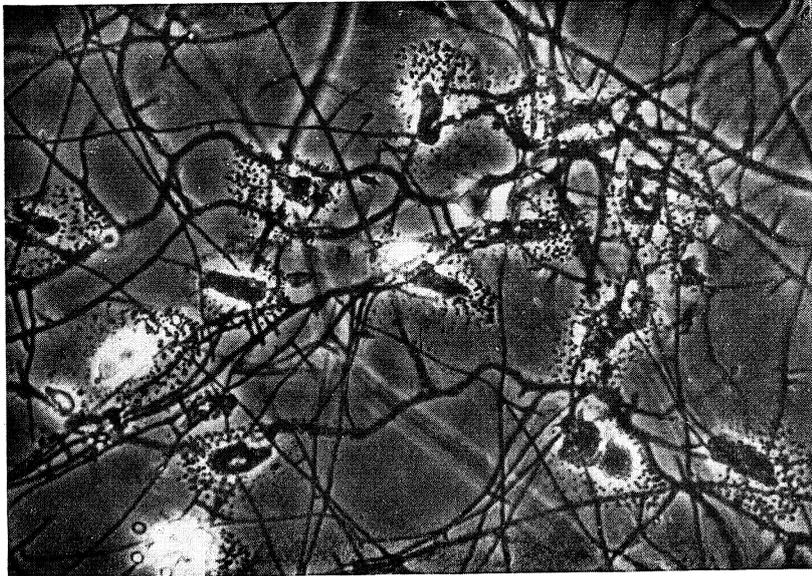


Figura 3. Uredosporas digeridas por V. hemileiae, después de cuarenta y ocho horas de incubación

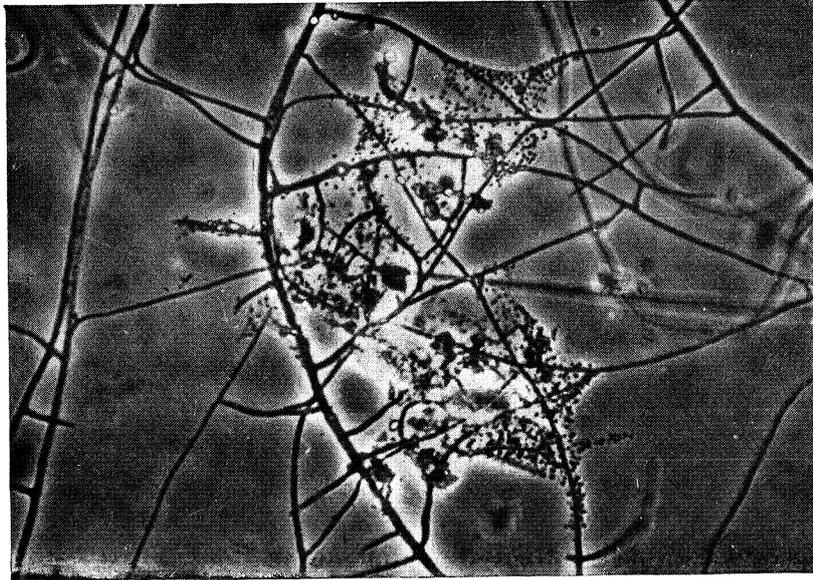


Figura 4. Restos de la cubierta de uredosporas, después de ochenta horas de incubación

RESUMEN

En este trabajo se demuestra la acción lítica del *Verticillium hemileiae* sobre uredosporas de las royas *Puccinia graminis*, *Hemileia vastatrix* y *Melampsora sp.* Se observan considerables variaciones en el tiempo transcurrido para la digestión de estos tipos de uredosporas, lo que puede sugerir una diferencia substancial en la composición química de sus estructuras externas, aún desconocidas. Se encuentran en curso estudios semejantes, empleando teleutosporas en vez de uredosporas.

El *Verticillium hemileiae* no parece tener ninguna acción perjudicial sobre las plantas de café y sólo sobre los soros de las royas, demostrándose el crecimiento del hongo exclusivamente a expensas de las uredosporas.

SUMMARY

As elucidated by the foregoing procedures and digestions on uredospores of the rust *Puccinia graminis*, *Hemileia vastatrix* and *Melampsora sp.* this study substantiates the thesis that the uredospore envelopes possess distinct layers of yet unknown composition. Similar studies to that described before but using teliospores instead of uredospores are in progress.

The diverse tests employed show that the *Verticillium hemileiae* attacks the uredospore soros without affecting the leaves of the host.

BIBLIOGRAFIA

1. BOURIQUET, G. 1946. Les maladies des plantes cultivées à Madagascar. Lechevalier, Paris.
2. FEDORINTCHIK, N. S. 1939. Rev. Appl. Mycol., 18, 580.
3. HULFA, A. 1939. Bull. Sect. Sci. Acad. Roumaine, 22, 1.
4. LEAL, J. A., y VILLANUEVA, J. R. 1962. Science, 136, 715.
5. LEAL, J. A., y VILLANUEVA, J. R. Intern. Congr. Microbiol., 8th Congr. Montreal. 1962.
6. LEAL, J. A., y VILLANUEVA, J. R. 1962. Nature, 195, 1.328.
7. OLIVEIRA, A. B. 1941. Bull. Soc. Portug. Sci. Nat., 13, 344.
8. VILLANUEVA, J. R. 1955. Agronomía Lusitana, 17, 335.

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

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS DE LOS ACIDOS GRASOS

I. Estudios realizados con células lavadas de *Peptostreptococcus elsdenii*

POR
D. RODRIGUEZ y J. PEREZ-SILVA

La mayor parte de los estudios sobre biosíntesis de ácidos grasos se ha realizado con células animales, principalmente células hepáticas. Se conocen muy pocos microorganismos capaces de sintetizar ácidos grasos superiores al butírico como productos finales de su metabolismo.

Ya Kluyver (8) señala que el estudio de la síntesis de ácidos grasos es, en principio, posible con cualquier célula, aunque es evidente la gran ventaja que representa el empleo de microorganismos capaces de realizar dicha síntesis a partir de substratos sencillos. Los trabajos más completos en este sentido son los de Barker (1) y Stadtman y Barker (11), llevados a cabo con *Clostridium kluyveri*, que sintetiza hasta el ácido caprónico a partir del etanol.

El microorganismo que hemos empleado en nuestras investigaciones, *Peptostreptococcus elsdenii*, se comporta, en cuanto a la biosíntesis de ácidos grasos, de un modo análogo a *Clostridium kluyveri*, hecho que consideramos de interés, puesto que nos permite extender lo que se conocía sólo a través de las investigaciones de Stadtman y Barker (11).

Elsden y Lewis (3), Elsden y cols. (4) y Lewis y Elsden (9), en sus trabajos sobre *Peptostreptococcus elsdenii*, han utilizado siempre lactato como substrato; pero nosotros observamos que las células lavadas podían fermentar la glucosa, lo que sugería la posibilidad del cultivo de *P. elsdenii* en un medio que tuviese glucosa como única fuente de carbono.

En este trabajo exponemos las condiciones de adaptación de dicho microorganismo al crecimiento sobre glucosa y los resultados obtenidos

en la fermentación de diversos sustratos por células lavadas de *Peptostreptococcus elsdenii* crecidas sobre glucosa.

MATERIAL Y METODOS

Hemos realizado todos nuestros experimentos con células lavadas de una estirpe de *Peptostreptococcus elsdenii*, aislada por Elsdén y Lewis (3) del contenido de la panza de la oveja, y denominada provisionalmente L. C. («large cocci») por estos mismos autores. Posteriormente Gutiérrez y Davis (6) le han dado el nombre de *Peptostreptococcus elsdenii*.

Medio de conservación

Mantenemos los cultivos de *Peptostreptococcus elsdenii* en tubos conteniendo medio semisólido de la composición siguiente:

Lactato sódico	2,00 g
Extracto de levadura Difco	0,40 g
Acido tioglicólico	0,03 g
Agar	0,20 g
Agua	100,00 ml

Se ajusta el pH a 7,4

El medio, después de distribuido en tubos, se esteriliza en autoclave a 120 °C durante veinte minutos.

Medio glucosado

Después de una serie de tanteos previos conseguimos adaptar el microorganismo a crecer sobre glucosa, empleando el medio de la composición siguiente:

Glucosa	1,00 g
Cloruro amónico	0,05 g
Extracto de levadura Difco	0,40 g
Cloruro magnésico	0,03 g
Acido tioglicólico	0,03 g
Agar	0,20 g
Tampón de fosfatos 1M, pH 7,3	15,00 ml
Agua	85,00 ml

La glucosa (en solución al 20 por ciento) y el tampón de fosfatos se esterilizan aparte y luego se añaden al resto del medio previamente esterilizado a 120 °C durante veinte minutos.

La primera inoculación se realiza con unas gotas de un cultivo de veinticuatro horas crecido en el medio de conservación. Después de cuarenta y ocho horas de incubación a 38 °C en medio glucosado, se aprecia una ligera turbidez; de este cultivo volvemos a inocular otros tubos de medio glucosado y así sucesivamente durante tres o cuatro siembras, al término de las cuales el microorganismo presenta un desarrollo normal a las veinticuatro horas de incubación.

Obtención de células lavadas

Inoculamos 500 ml de medio líquido de la composición siguiente:

Glucosa	1,00 g
Extracto de levadura Difco	0,40 g
Sulfuro sódico	0,03 g
Tampón de fosfatos 1M, pH 7,3	15,00 ml
Agua	85,00 ml

Después de dieciséis horas de incubación a 38 °C recogemos las células por centrifugación, lavamos y resuspendemos en tampón de fosfatos 0,1 M a pH 6,5, que contiene 0,03 por ciento de sulfuro sódico.

Dado que el *Peptostreptococcus elsdenii* es un anaerobio estricto, todos los cultivos se han de mantener en condiciones de anaerobiosis; además, para evitar en lo posible la pérdida de actividad de las células lavadas, las manteníamos en atmósfera de hidrógeno durante el tiempo transcurrido desde la obtención de las suspensiones hasta su uso en los diferentes experimentos.

Determinación de la concentración de células

Para medir la concentración de las suspensiones de células relacionamos su densidad óptica a 600 m μ con el peso seco.

Análisis de los productos de la fermentación de la glucosa

En un matraz de 100 ml (*figura 1*) colocamos una suspensión de células; en uno de los brazos laterales, una solución de glucosa, y en el otro, una solución de NaOH 2N impregnando un papel de filtro. Pasamos una corriente de nitrógeno e incubamos a 38 °C. Iniciamos la fermentación vertiendo la solución de glucosa sobre la suspensión de células lavadas.

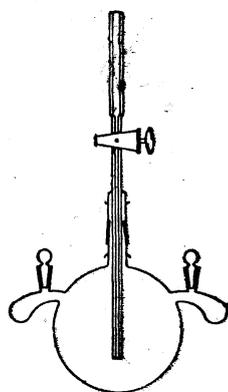


Figura 1

Al finalizar la fermentación recogemos cuantitativamente el anhídrido carbónico absorbido por el hidróxido sódico y lo valoramos manométricamente en el aparato de Warburg.

El hidrógeno desprendido se midió mediante el respirómetro de Warburg en experimentos paralelos al anteriormente descrito.

Los ácidos grasos volátiles fueron separados del líquido metabólico mediante la doble destilación de Friedemann (5).

La identificación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía sobre columna de celita, basándonos en las técnicas descritas por Bueding y Yale (2) y Moyle y cols. (10) y, además, por cromatografía sobre papel siguiendo el método de Hiscox y Berridge (7).

RESULTADOS

Las células lavadas de *Peptostreptococcus elsdenti* fermentan la glucosa, con producción de los ácidos acético, propiónico, butírico, valerianico y caprónico, y de los gases anhídrido carbónico e hidrógeno. En el cuadro 1 exponemos el balance de carbono y de oxidación-reducción de uno de los experimentos de fermentación. En este caso se hizo actuar 6 ml de una suspensión de células (108 mg de peso seco) frente a 240 μ mol de glucosa. La fermentación se llevó a cabo con agitación

durante noventa minutos y a la temperatura de 37 °C, empleando nitrógeno como fase gaseosa.

Cuadro 1. Balance de carbono y de oxidación-reducción

	Consumido, micromoles	Producido, micromoles	Carbono total, microátomos	Índice de reducción	Índice de oxidación
Glucosa	240	0	1.440	0	0
Acido acético		16	32	0	0
Acido propiónico		4	12	4	0
Acido butírico		37	148	74	0
Acido valeriánico		20	100	60	0
Acido caprónico		93	558	372	0
Anhídrido carbónico		543	543	0	1.086
Hidrógeno		603		603	0

Según se desprende de estos resultados, de 1.440 microátomos contenidos en el sustrato encontramos 1.393 en los productos de la fermentación, lo cual indica que recuperamos el 96 por ciento del carbono. Por otro lado, el índice de oxidación total es de 1.086, y el de reducción, 1.113; la relación ox./red. es, pues, 0,97.

Estudio comparativo entre células crecidas sobre glucosa y crecidas sobre lactato

A fin de comparar el comportamiento bioquímico de las células crecidas sobre glucosa con las crecidas sobre lactato, preparamos suspensiones de células cultivadas sobre ambas sustancias y las hacemos actuar frente a los sustratos siguientes: glucosa, fructosa, lactato y acrilato. Seguimos el curso de la fermentación midiendo los microlitros de hidrógeno desprendidos en cada caso.

En los cuadros 2-3 se exponen las cantidades de hidrógeno desprendidas por células lavadas, crecidas sobre lactato y glucosa, respectivamente.

Cuadro 2

Substrato	Hidrógeno, microlitros				
	Minutos				
	10	20	30	40	50
Glucosa	25	34	50	68	91
Fructosa	17	41	53	63	71
Piruvato	104	265	269	245	216
Lactato	122	158	169	102	107
Acrilato	92	64	56	50	42
Testigo, sin substrato	6	4	2	2	2

Cuadro 3

Substrato	Hidrógeno, microlitros				
	Minutos				
	10	20	30	40	50
Glucosa	84	152	224	306	385
Fructosa	67	114	195	242	312
Piruvato	205	347	354	338	325
Lactato	8	10	18	25	32
Acrilato	10	12	10	10	10
Testigo, sin substrato	5	6	6	6	6

Estos mismos resultados se representan gráficamente en las figuras 2-3.

Estos resultados indican que las enzimas que atacan al lactato y acrilato, son de adaptación, mientras que las que atacan al piruvato, glucosa y fructosa son constitutivas.

Se observa, además, que durante la fermentación del piruvato hay una producción rápida de hidrógeno seguida de un consumo del mismo. Elsdén y Lewis (3) ya habían observado este hecho con células crecidas sobre lactato y lo interpretaron como que las células consumen el hidrógeno en la última fase de la fermentación para realizar procesos de síntesis. Nosotros, al encontrar este mismo hecho con células crecidas sobre glucosa creímos conveniente intentar confirmar la inter-

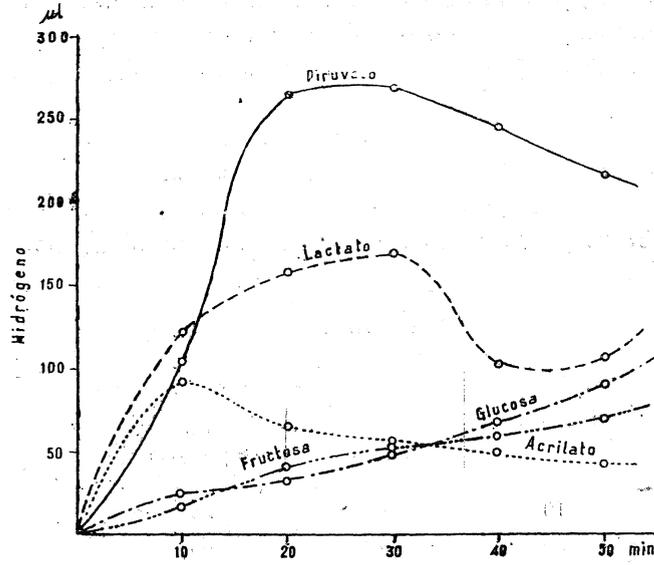


Figura 2

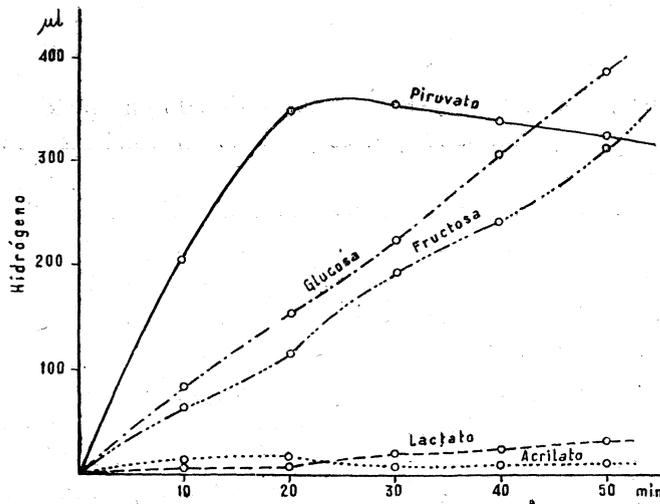


Figura 3

pretación anterior, para lo cual realizamos un experimento en el que observamos el comportamiento de células lavadas de *Peptostreptococcus elsdenii* frente a piruvato en atmósferas de hidrógeno y de nitrógeno.

En el *cuadro 4* exponemos los resultados obtenidos de un experimento realizado empleando en cada taza manométrica 0,2 ml de suspensión de células (2 mg de peso seco) frente a 20 μ mol de piruvato, incubadas a 37 °C y en atmósfera de hidrógeno o de nitrógeno.

Cuadro 4

Minutos	Hidrógeno, microlitros	
	En nitrógeno	En hidrógeno
10	93	25
20	178	55
30	265	77
40	377	93
50	385	104
60	383	112

Como vemos, la cantidad de hidrógeno producido en atmósfera de nitrógeno es muy superior a la que se produce en atmósfera de hidrógeno.

Con el fin de comprobar que las células utilizan el hidrógeno en los procesos de síntesis, realizamos un experimento en el que a las células crecidas sobre glucosa agregamos como sustrato, acetato, propionato y butirato, además del piruvato. Para ello colocamos en el compartimiento lateral de las tazas manométricas 20 μ mol de piruvato junto con 20 μ mol de la sal sódica de los ácidos acético, propiónico o butírico. En el compartimiento central, colocamos 2 ml de suspensión de células (34,2 mg de peso seco) crecidas sobre glucosa y, como en los experimentos anteriores, 0,2 ml de hidróxido sódico en el pocillo central. Incubamos a 37 °C y empleamos hidrógeno como fase gaseosa. Los resultados obtenidos se exponen en el *cuadro 5*.

Cuadro 5

Substrato	Hidrógeno, microlitros							
	Minutos							
	10	20	30	40	50	60	70	80
Piruvato	41	84	136	168	192	176	139	122
Piruvato + butirato	29	68	102	110	96	84	56	23
Piruvato + propionato	14	38	46	58	22	12	-14	-31
Piruvato + acetato	8	19	32	26	11	-35	-68	-92
Testigo, sin substrato	3	3	3	3	3	2	2	2

Se observa que la adición de acetato o de propionato lleva consigo un consumo de hidrógeno superior a la cantidad producida, mientras que con la adición de butirato, aún cuando dá lugar a un consumo de hidrógeno, éste es inferior al desprendimiento.

Al final de la fermentación se destiló por arrastre de vapor el contenido de las tazas manométricas y el destilado, una vez neutralizado, se evaporó casi a sequedad. De este concentrado tomamos muestras para realizar una cromatografía sobre papel.

El cromatograma obtenido nos indica, aunque de forma cualitativa, que en la fermentación del piruvato se produce acetato, propionato, hidrógeno y anhídrido carbónico; la adición de acetato conduce, además, a la síntesis de butirato; la de propionato, a la formación de valerianato, y la de butirato da lugar a capronato.

DISCUSION

Desde un principio nos pareció interesante estudiar el comportamiento de *Peptostreptococcus elsdenii* frente a la glucosa, puesto que ello nos daría idea de si este microorganismo, en estas condiciones, era capaz de llevar a cabo la biosíntesis de los mismos ácidos grasos que cuando se desarrolla sobre lactato. Por nuestros resultados hemos visto que, tras la adaptación previa a desarrollarse sobre glucosa, *P. elsdenii* lleva a cabo la fermentación de la misma con producción de hidrógeno y anhídrido carbónico y ácidos grasos entre los que predominan los de número par de átomos de carbono (acético, butírico y

caprónico), mientras que, según los resultados de Elsdén, cuando este microorganismo fermenta el lactato hay una mayor producción de los ácidos grasos de número impar de átomos de carbono (propiónico y valeriánico). Podemos interpretar este hecho suponiendo que, durante la fermentación de la glucosa, se llega hasta piruvato y la mayor parte de éste, en lugar de reducirse a lactato, se descarboxila, dando lugar a acetilcoenzima A, parte de la cual se transforma en acetato, y la otra parte, por condensación, daría lugar a ácidos grasos superiores.

RESUMEN

Las suspensiones de células lavadas de *Peptostreptococcus elsdénii*, previamente adaptado a crecer sobre glucosa, fermentan este azúcar con producción de hidrógeno, anhídrido carbónico y los ácidos acético, propiónico, butírico, valeriánico y caprónico, predominando los de número par de átomos de carbono.

Los sistemas enzimáticos del *Peptostreptococcus elsdénii* que atacan el acilato y lactato, son de tipo adaptativo, mientras que los que atacan al piruvato, glucosa y fructosa son constitutivos. Las células lavadas de *P. elsdénii* crecidas sobre glucosa fermentan el piruvato con producción de acetato, propionato, hidrógeno y anhídrido carbónico. El hidrógeno producido en la fermentación del piruvato es posteriormente utilizado en procesos de síntesis.

SUMMARY

Washed cells suspensions of *Peptostreptococcus elsdénii*, previously adapted to grow on glucose, ferment glucose producing the following products: hydrogen, carbon dioxide, acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid and caproic acid.

The enzymatic systems that attack acrylate and lactate are adaptative while those that attack pyruvate, glucose and fructose are constitutive.

Washed cells of *Peptostreptococcus elsdénii* grown on glucose ferment pyruvate giving acetate, propionate, hydrogen and carbon dioxide. The hydrogen produced in the fermentation of pyruvate is then utilized in syntheses processes.

BIBLIOGRAFIA

1. BARKER, H. A., y TAHA, S. N. 1942. *Clostridium kluyveri*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. J. Bacteriol., 43, 347.
2. BUEDING, E., y YALE, H. W. 1951. Production of alfa methylbutyric acid by bacteria free *Ascaris lumbricoides*. J. Biol. Chem., 193, 411.
3. ELSDEN, S. R., y LEWIS, D. 1959. The production of fatty acids by a Gram-negative coccus. Biochem. J., 55, 183.
4. ELSDEN, S. R.; VOLCANI, B. E.; GILCHRIST, F. M. C., y LEWIS, D. 1956. Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. J. Bacteriol., 72, 681.
5. FRIEDEMANN, T. E. 1938. The identification and quantitative determination of volatile alcohols and acids. J. Biol. Chem., 123, 161.
6. GUTIÉRREZ, J.; DAVIS, R. E.; LINDAHL, I. L., y WARWICK, E. J. 1959. Bacterial changes in the rumen during the onset of feed-lot bloat of cattle and characteristics of *Peptostreptococcus elsdenii* n. sp. Appl. Microbiol., 7, 16.
7. HISCOX, E. R., y BERRIDGE, N. J. 1950. Use of paper partition chromatography in the identification of the volatile fatty acids. Nature, 166, 522.
8. KLUYVER, A. J. 1956. The microbe's contribution to Biology.
9. LEWIS, D., y ELSDEN, S. R. 1955. The fermentation of L-threonine, L-serine, L-cysteine and acrylic acid by a Gram-negative coccus. Biochem. J., 60, 683.
10. MOYLE, V.; SCARISBRICK, A., y BALDWIN, E. 1948. Separation and estimation of saturated C₂-C₈ fatty acids by buffered partition columns. Biochem. J., 43, 308.
11. STADTMAN, E. R., y BARKER, H. A. 1950. Fatty acid synthesis by enzyme preparation of *Clostridium kluyveri*. J. Biol. Chem., 184, 769.

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

MORFOLOGIA AL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE LAS INCLUSIONES GRANULARES DEL *BACILLUS MEGATERIUM*

POR
R. MORENO

INTRODUCCION

En algunas razas de *Bacillus megaterium* y en otras especies del género *Bacillus* han sido señalados gránulos de naturaleza lipídica, que se tiñen por el negro sudán y que generalmente son considerados como formados por un polímero del ácido β -hidroxibutírico, descrito por Lemaigne (4). También han sido considerados así por Macrae (5) y Williamson y Wilkinson (10).

Estos gránulos han sido también señalados en las células «espectrales» (*) de protoplastos de *Bacillus megaterium* por Weibull (7), siendo descritos en la raza KM como de naturaleza lipídica y formados por el polímero del ácido β -hidroxibutírico. En cambio, según Weibull y Bergström (8) y Weibull y Thorsson (9), en una raza de *B. megaterium*, raza M, los gránulos encontrados en las células «espectrales» no son de naturaleza lipídica, creyéndoles formados por una sustancia nitrogenada, no proteínica.

Otros investigadores, sin embargo, han creído identificar estos corpúsculos como organitos nucleares o nucleoides (1-3). Algunos, incluso, han pretendido que estos organitos eran reproducibles y regeneraban la bacteria (2).

(*) «Ghosts».

Dada, pues, la disparidad de criterios de los diversos investigadores, hemos creído interesante realizar este trabajo sobre el núcleo bacteriano, del cual presentamos una primera parte, estudiando las características morfológicas al microscopio electrónico, de las inclusiones granulares del *Bacillus megaterium*, en protoplastos bacterianos, que, indudablemente, es el procedimiento de elección para el estudio de la estructura interna bacteriana.

MATERIAL Y METODOS

Organismo empleado

Una raza de *Bacillus megaterium* (*) con las siguientes características: acidifica la arabinosa, manosa, glucosa y sacarosa; no acidifica la rhamnosa, lactosa y glicerina. Voges y nitratos, reacción negativa.

Obtención de protoplastos

El *Bacillus megaterium* se cultiva en agua de peptona al 2 por ciento, durante una noche, a 28 °C, por agitación. Después, el cultivo es diluido hasta cinco veces su volumen, también con agua de peptona, y se deja incubar dos horas todavía, con agitación. Las bacterias son recogidas por centrifugación y lavadas dos veces con tampón de fosfatos 0,01 M a pH 7,6, haciendo una suspensión posterior en un medio hipertónico (compuesto por SO_4Mg 0,016M, PO_4HNa_2 0,1M, con pH 6,1 y sacarosa 0,3M) hasta una densidad óptica de 0,6, a la cual se añade lisozima en proporción de 200 $\gamma/1 \text{ cm}^3$. Estando a una temperatura de 37 °C, los protoplastos se producen media hora después.

Microscopía electrónica

Las muestras de protoplastos sin fijar se colocan sobre película de parlodión y se examinan al microscopio electrónico, empleando el modelo Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica, a 60 kV., siendo las muestras previamente sombreadas con oro-paladio.

(*) Raza L. A., suministrada por el Dr. Francisco Fernández.

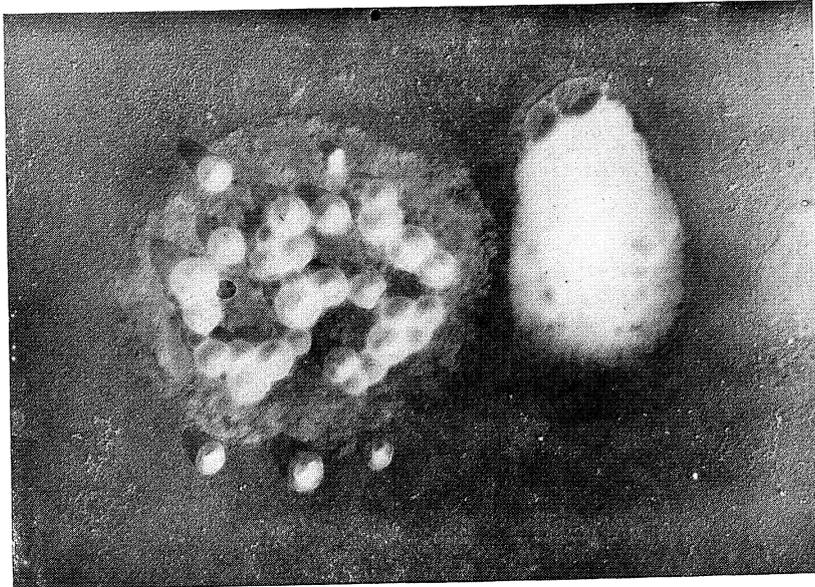


Figura 1

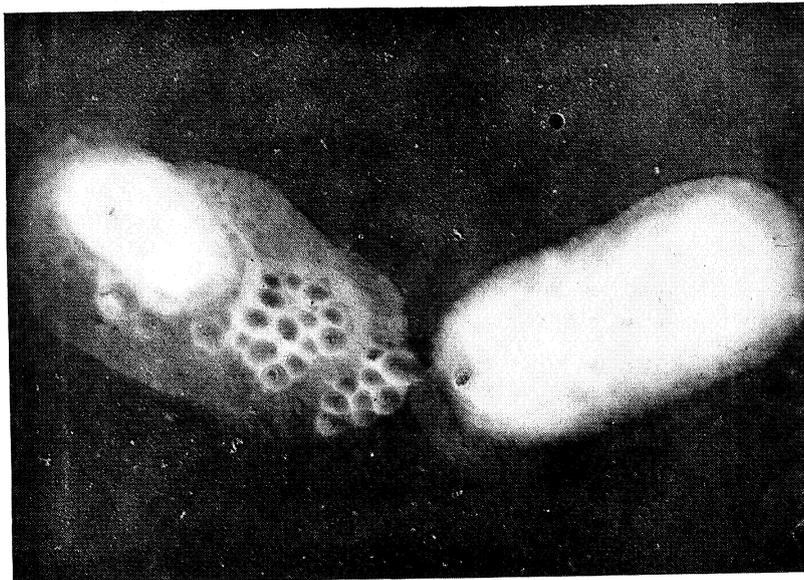


Figura 2

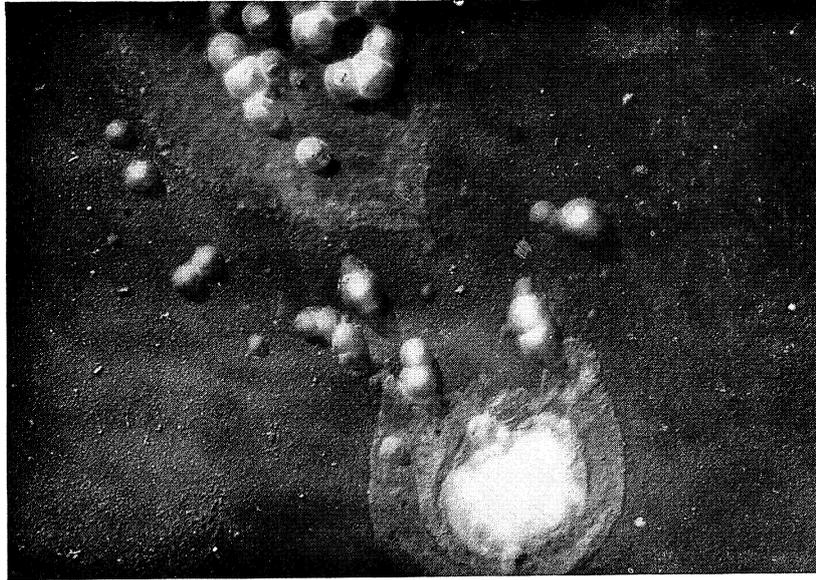


Figura 3

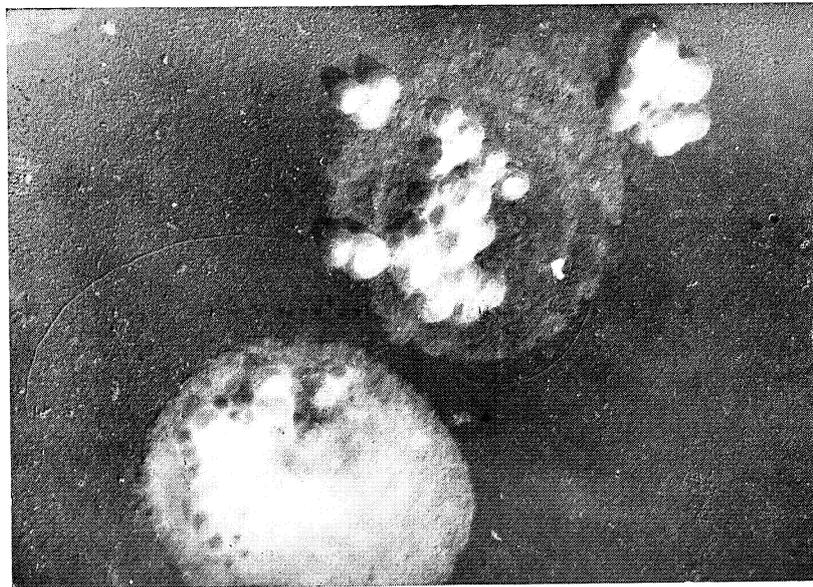


Figura 4

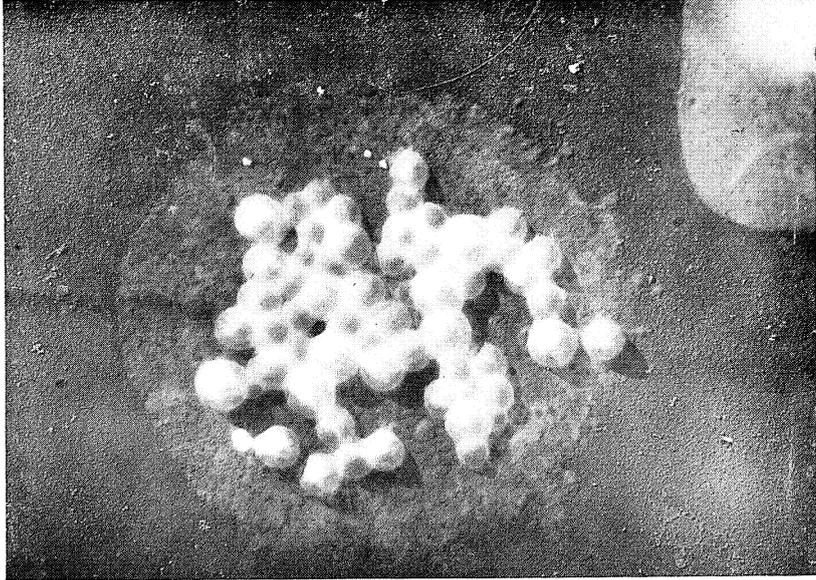


Figura 5

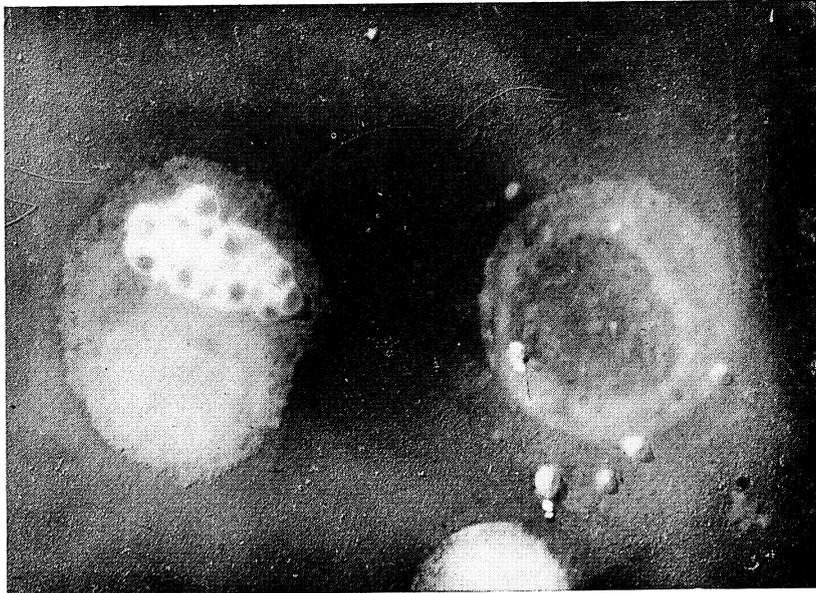


Figura 6

RESULTADOS

Los protoplastos obtenidos por el procedimiento descrito, observados al microscopio de contraste de fases, aparecen como grandes cuerpos redondos que al principio son opacos, pero que más tarde se van haciendo transparentes, observándose que dentro de ellos quedan pequeños gránulos. Son éstos, sin duda, los que vemos al microscopio electrónico, o quizá los más grandes de ellos. Cuando se lisa el protoplasto, se pueden ver los gránulos en el medio, donde presentan un movimiento browniano.

La lisis de los protoplastos puede hacerse sometiéndoles a un choque osmótico, al pasarles del medio hipertónico en que se han obtenido, a agua destilada, o bien por un detergente suave. Nosotros hemos usado para romperlos digitonina añadida al mismo medio hipertónico.

En este trabajo solamente examinamos las muestras de protoplastos sin haberlos lisado previamente con detergente; éstos fueron observados directamente, sin fijar.

En las fotografías obtenidas por nosotros se puede apreciar cómo estos gránulos existen en la bacteria, llenando casi por completo el citoplasma y liberándose de ella al ser lisada la pared por la lizozima (*figuras 1-2*). También puede apreciarse cómo los gránulos se encuentran en el interior de los protoplastos ya formados, y una vez efectuada la lisis salen del citoplasma al exterior (*figuras 3-4*). Como lecho de estos gránulos (*figura 5*) existe una estructura no bien delimitada, que también aparece aislada (*figura 6*), que puede ser considerada como las células «espectrales» descritas en la literatura, y que parece estar constituida más bien por restos de citoplasma que por la membrana citoplasmática.

DISCUSION

Muchos autores han creído encontrar en protoplastos de *Bacillus megaterium* estructuras que han descrito como cuerpos nucleares. Sin embargo, el examen electrónico de las estructuras granulares que se han supuesto ser equivalentes a núcleos o nucleoides revela que no se puede considerar a éstas como tales. En las preparaciones examinadas, cuyas fotografías son incluidas, vemos que estos gránulos son más bien

equivalentes a los sudanófilos o no sudanófilos descritos por los autores citados en la introducción. En un análisis previo hecho por nosotros de estos gránulos (6) no ha sido encontrado ácido desoxirribonucleico; por lo tanto, se debe descartar la identidad de estas estructuras con los núcleos bacterianos.

Es de resaltar la uniformidad y tamaño de los gránulos encontrados, así como la cantidad en que se encuentran. En un trabajo posterior, en marcha, trataremos de aclarar la composición de estos gránulos, que creemos de gran interés.

RESUMEN

En este trabajo se hace un estudio morfológico, por medio del microscopio electrónico, de las inclusiones granulares de *Bacillus megaterium*, como investigación previa a un análisis químico de su naturaleza y significación.

Agradecemos al Dr. Rubio Huertos, Jefe del Servicio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias Matemáticas, Médicas y de la Naturaleza, del C. S. I. C., la ayuda prestada en la obtención de las fotografías presentadas en este trabajo.

SUMMARY

In this paper a morphological study of the granular inclusions of *Bacillus megaterium* by the electron microscope has been made, as a previous work to a subsequent chemical analysis of their nature.

BIBLIOGRAFIA

1. CHATTERJEE, B. R., y WILLIAMS, R. P. 1962. Cytological observations on the chromatin bodies of two *Bacillus* species. *J. Bacteriol.*, 82, 1.112.
2. CHATTERJEE, B. R., y WILLIAMS, R. P. 1962. Growth and organising ability of the nuclear material isolated from *Bacillus megaterium*. *Intern. Congr. Microbiol.*, 8th Congr., Montreal, 1962, Abstr., 8, 6, 39.
3. DELAMATER, E. D. 1959. A cytological and chemical analysis of the bacterial nucleus, I. A method for the isolation of nucleus from *Bacillus megaterium* and cytology of the isolated structures. *Exptl. Cell Research*, 16, 636.

4. LEMOIGNE, M.; DELAPORTE, B., y CROSON, M. 1944. Contribution a l'étude botanique et biochimique des bacteries du genre *Bacillus*. Valeur du test des lipids β -hydroxybutyriques pour la caracterisation des especes. Ann. Inst. Pasteur, 70, 244.
5. MACRAE, R. M., y WILKINSON, J. E. 1955. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. J. Gen. Microbiol., 19, 210.
6. MORENO, R. El núcleo y los ácidos nucleicos en los protoplastos bacterianos. Memoria para la Fundación «Juan March».
7. WEIBULL, C. 1953. Characterization of the protoplasmic constituents of *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol., 66, 696.
8. WEIBULL, C., y BERGSTROM, L. 1958. The chemical nature of the cytoplasmic membrane and cell wall of *Bacillus megaterium*, strain M. Biochim. et Biophys. Acta, 30, 340.
9. WEIBULL, C., y THORSSON, K. J. 1957. Comparative studies on sections of intact cells. Protoplasts and «ghosts» of a *Bacillus species*. Electron Microscopy, Proc. Stockholm Conf., 1956, 226.
10. WILLIAMSON, D. H., y WILKINSON, J. F. 1955. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus species*. J. Gen. Microbiol., 19, 210.

EL VIII CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA

En Montreal (Canadá), del 19 al 24 del pasado mes de agosto, se reunió, con asistencia de más de dos mil participantes, el VIII Congreso Internacional de Microbiología, patrocinado por S. E. el Gobernador General del Canadá. En el transcurso de dichas fechas se celebraron trece simposios, y se presentaron más de cuatrocientas comunicaciones, distribuidas en cinco secciones: A) Estructura y función; B) Microbiología agrícola; C) Microbiología industrial; D) Virología, y E) Microbiología médica y veterinaria. Las comunicaciones de autores españoles fueron las siguientes:

- A) Las formas L fijas y patógenas del *Agrobacterium tumefaciens*, por M. Rubio-Huertos y R. Beltrá.

La alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos del *Bacillus cereus* por la acción de los rayos ultravioletas, por Eulalia Cabezas de Herrera y Pilar Aznar.

Sodio precisado por la despolimerasa del ácido poli- β -hidroxibutírico del *Micrococcus halodenitrificans*, por G. Sierra y N. E. Gibbons.

- C) Un sistema de enzimas líticas del *Verticillium hemileiae*, por J. A. Leal y J. R. Villanueva.

- D) Un nuevo virus, Petunia «ringspót», por M. Rubio-Huertos. Estudios metabólicos y genéticos utilizando ADN sintetizado enzimáticamente de un virus cancerígeno (cancervirus), por I. Valladares.

- E) La resistencia de estirpes de *Streptococcus faecalis* al calor como consecuencia de su antibioticorresistencia, por A. Portolés y M.^a Teresa Pérez-Ureña.

Del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, asistieron los Jefes de Sección, Investigadores científicos, Dr. Miguel Rubio-Huertos y Dr. Julio Rodríguez Villanueva; el Investigador científico Dr. Román De Vicente Jordana y los Colaboradores científicos Dra. Eulalia Cabe-

zas de Herrera Sánchez y Dr. Gonzalo Sierra Rico (pensionado en Toronto); el primero, vocal de la Junta Directiva y, los demás, miembros de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Como resumen de este Congreso, puede afirmarse que, al igual que en el anterior de Estocolmo, no hubo aportaciones que modificaran de manera fundamental el campo de la Microbiología, pero, a diferencia del anterior, se expusieron nuevos métodos y técnicas—especialmente en los aspectos bioquímico y de microscopía electrónica—y los progresos logrados, como consecuencia, en el conocimiento de las estructuras celulares bacterianas y la función de éstas. El cordial intercambio de puntos de vista se vio favorecido y reforzado siempre por las atenciones de cuantos intervinieron en la dirección y organización del Congreso y de los colegas canadienses.

A las reuniones celebradas por la A.I.S.M. asistió como Delegado de la S.M.E. el Dr. De Vicente, de quien publicamos más adelante la información recibida.

CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Del 29 de agosto al 5 de septiembre pasados tuvo lugar el V Congreso Internacional de Microscopía Electrónica, en la ciudad de Filadelfia (Estados Unidos de América del Norte), bajo los auspicios de la Federación Internacional de Sociedades de Microscopía Electrónica.

La representación española estuvo formada por el Dr. Miguel Rubio-Huertos, Jefe del Servicio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias del C. S. I. C.; los Dres. Fernando Catalina y Miguel Solís, Jefes de Sección del Instituto «Daza de Valdés», de Óptica, y el Dr. Juan José Alonso, Colaborador del Instituto de Edafología.

zas de Herrera Sánchez y Dr. Gonzalo Sierra Rico (pensionado en Toronto); el primero, vocal de la Junta Directiva y, los demás, miembros de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Como resumen de este Congreso, puede afirmarse que, al igual que en el anterior de Estocolmo, no hubo aportaciones que modificaran de manera fundamental el campo de la Microbiología, pero, a diferencia del anterior, se expusieron nuevos métodos y técnicas—especialmente en los aspectos bioquímico y de microscopía electrónica—y los progresos logrados, como consecuencia, en el conocimiento de las estructuras celulares bacterianas y la función de éstas. El cordial intercambio de puntos de vista se vio favorecido y reforzado siempre por las atenciones de cuantos intervinieron en la dirección y organización del Congreso y de los colegas canadienses.

A las reuniones celebradas por la A.I.S.M. asistió como Delegado de la S.M.E. el Dr. De Vicente, de quien publicamos más adelante la información recibida.

CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Del 29 de agosto al 5 de septiembre pasados tuvo lugar el V Congreso Internacional de Microscopía Electrónica, en la ciudad de Filadelfia (Estados Unidos de América del Norte), bajo los auspicios de la Federación Internacional de Sociedades de Microscopía Electrónica.

La representación española estuvo formada por el Dr. Miguel Rubio-Huertos, Jefe del Servicio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias del C. S. I. C.; los Dres. Fernando Catalina y Miguel Solís, Jefes de Sección del Instituto «Daza de Valdés», de Optica, y el Dr. Juan José Alonso, Colaborador del Instituto de Edafología.

SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES

NOTA DE LA SECRETARIA

Las páginas de MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA se han honrado siempre en recoger cuanta información ha llegado a nosotros acerca de las circunstancias personales de carácter científico de los miembros de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Es muy de lamentar que por falta de comunicación directa muchas noticias escapen a nuestro buen deseo. Esta Secretaría agradecerá cualquier dato que, por enaltecer a nuestros socios, enaltezca a nuestra Sociedad.

INFORMACION DE LA ASOCIACION INTERNACIONAL DE SOCIEDADES DE MICROBIOLOGIA

(I. A. M. S.)

En interés de que todo microbiólogo quede debidamente enterado de las actividades de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, su Asamblea General—reunida en Montreal, con motivo del VIII Congreso Internacional—tomó, a propuesta del Delegado de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, el grato acuerdo de recomendar que los boletines y revistas editados por las Sociedades-miembros recogiesen, en lo posible, la información que suministra la I. A. M. S. a través de sus delegados.

Nobleza obligá, y pues los señores Presidente y Secretario de nuestra Sociedad han tenido a bien acoger la iniciativa, como siempre que se ha tratado de incrementar y mejorar el prestigio de la Revista, ésta publicará cuantas noticias de interés procedan de la Secretaría General de la I. A. M. S., así como de sus distintas Comisiones y Secciones. Naturalmente, no se trata de una sección fija de la Revista y su publicación dependerá de la información que se vaya recibiendo y de la urgencia o interés del caso. La sección, no obstante, queda abierta a la colaboración de todo comentarista que posea información de primera mano, y cuando las circunstancias así lo in-

SOCIEDAD DE MICROBIÓLOGOS ESPAÑOLES

NOTA DE LA SECRETARIA

Las páginas de MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA se han honrado siempre en recoger cuanta información ha llegado a nosotros acerca de las circunstancias personales de carácter científico de los miembros de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Es muy de lamentar que por falta de comunicación directa muchas noticias escapen a nuestro buen deseo. Esta Secretaría agradecerá cualquier dato que, por enaltecer a nuestros socios, enaltezca a nuestra Sociedad.

INFORMACION DE LA ASOCIACION INTERNACIONAL DE SOCIEDADES DE MICROBIOLOGIA (I. A. M. S.)

En interés de que todo microbiólogo quede debidamente enterado de las actividades de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, su Asamblea General—reunida en Montreal, con motivo del VIII Congreso Internacional—tomó, a propuesta del Delegado de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, el grato acuerdo de recomendar que los boletines y revistas editados por las Sociedades-miembros recogiesen, en lo posible, la información que suministra la I. A. M. S. a través de sus delegados.

Nobleza obligá, y pues los señores Presidente y Secretario de nuestra Sociedad han tenido a bien acoger la iniciativa, como siempre que se ha tratado de incrementar y mejorar el prestigio de la Revista, ésta publicará cuantas noticias de interés procedan de la Secretaría General de la I. A. M. S., así como de sus distintas Comisiones y Secciones. Naturalmente, no se trata de una sección fija de la Revista y su publicación dependerá de la información que se vaya recibiendo y de la urgencia o interés del caso. La sección, no obstante, queda abierta a la colaboración de todo comentarista que posea información de primera mano, y cuando las circunstancias así lo in-

diquen la sección se limitará a publicar los comunicados que vayan llegando. De esta forma, más de una vez, la noticia procederá directamente del propio Secretario general o de los Presidentes de las Comisiones y Secciones de la Asociación.

En contrapartida, la I. A. M. S. reclama de las Sociedades-miembros una mayor frecuencia y fidelidad en sus informes. En reciente carta circular, el Secretario general, Dr. Gibbons, dice que mal pueden darse aquellas noticias que no se reciben. Casi podríamos decir, con parecidas palabras a las del Dr. Gibbons, que es fácil elevar críticas y desplegar entusiasmos en un momento determinado sobre la labor de los órganos rectores, pero que a la hora de comunicar iniciativas, asistir a reuniones y responder a los cuestionarios son muy pocos los verdaderamente entusiastas.

Es imprescindible, por tanto, que toda noticia o iniciativa de interés se comunique lo más pronto posible al Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles para que le dé el curso correspondiente, e incluso pueda ser publicada en esta Revista.

La I. A. M. S. y la Sociedad de Microbiólogos Españoles agradecerán la mayor actividad y colaboración de todos, para alcanzar una eficacia acorde con el beneficio también de todos y de las ciencias microbiológicas.

EL CONGRESO DE MONTREAL

Bajo el alto patronazgo de S. E. el Mayor General G. P. Vanier, Gobernador General del Canadá, y convocado por la Asociación Interfraccional de Sociedades de Microbiología (I. A. M. S.), se ha celebrado en Montreal, durante los días 19 a 24 de agosto pasado, el VIII Congreso Internacional de Microbiología. Con anterioridad, los días 16, 17 y 18 del mismo mes, tuvieron lugar una serie de reuniones previas de las distintas Comisiones y Subcomisiones que rigen la Asociación. A la terminación del Congreso, una parte de los delegados se trasladó a Ottawa para asistir a la Conferencia de Especialistas en Colecciones de Cultivo. Delegados de 43 países tomaron parte en el Congreso, al que asistieron más de 1.500 congresistas activos y un número igual o superior de congresistas asociados.

España estuvo representada por la Sociedad de Microbiólogos Es-

pañoles, miembro de la I. A. M. S., desde su fundación, en 1946. Actuó como delegado el Dr. Román De Vicente Jordana, Investigador científico del C. S. I. C., y participaron como congresistas los Dres. Miguel Rubio-Huertos y Julio Rodríguez Villanueva, Investigadores científicos del C. S. I. C.; Eulalia Cabezas de Herrera, Colaborador científico; F. Holguera y F. Rejas, Directores de Producción e Investigación, respectivamente, de «Antibióticos», León. También actuaron en las sesiones los Dres. Isidro Valladares, Gonzalo Sierra y Moisés Riaño, actualmente en el extranjero. Enviaron trabajos, que fueron leídos o discutidos por delegación, los Dres. Antonio Portolés, María Teresa Pérez de Ureña y Ramona Beltrá.

Los participantes españoles aportaron su valiosa colaboración a las sesiones científicas con siete comunicaciones y tuvieron diversas intervenciones en las discusiones de algunos de los trabajos presentados.

El delegado español contribuyó igualmente al estudio de varios aspectos relacionados con la organización general y discusión de los nuevos Estatutos de la Asociación; tomó parte también en las reuniones de distintas Comisiones, en especial de la Subcomisión de Enterobacteriáceas y del Comité Permanente de Documentación Microbiológica, del que es miembro corresponsal en España; y presentó la comunicación de la que son autores los Dres. Portolés y Pérez de Ureña.

La impresión general que se puede recoger del Congreso, de las reuniones y de las Asambleas Generales de la I. A. M. S., es que la vida de la Asociación ha entrado en un período efectivo de madurez y coordinación. Lo más destacable de la labor realizada está en las estrechas relaciones que la I. A. M. S. ha establecido durante los últimos años con otras importantes entidades científicas de carácter internacional, y el apoyo que recibe de éstas. Así, la I. A. M. S., que ya era miembro de la Unión Internacional de Ciencias Biológicas (I. U. B. S.) y, como tal, parte del Consejo Internacional de Uniones Científicas (I. C. S. U.); ha sido aceptada como miembro del Consejo Internacional de Organizaciones Médico-Científicas (C. I. O. M. S.), dependiente de la U. N. E. S. C. O. Su Comisión de Normalización Microbiológica ha establecido contacto con la Sección de Normalización Biológica de la Organización Mundial de la Salud (O. M. S.); y el Comité de Documentación Microbiológica colabora activamente con la Junta de Documentación del I. C. S. U. Por otra parte, la F. A. O. ha solicitado el apoyo de la I. A. M. S. para la campaña «Freedom

from Hunger Campaign». Igualmente, ante el éxito obtenido por el Año Geofísico Internacional, se ha pedido que la Asociación contribuya a preparar el Programa Biológico Internacional. En resumen, se puede decir que la I. A. M. S. está representada o mantiene relaciones permanentes con las siguientes organizaciones internacionales: OMS, UNESCO, FAO, ICSU, IUBS y COSPAR (Grupo Consultivo sobre los posibles efectos nocivos derivados de los experimentos del espacio).

La I. A. M. S. ha venido igualmente organizando diversos Simposios y Reuniones, y publicando las conclusiones y resultados de los estudios. Entre estas publicaciones se mencionan el «International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy», y las relativas a los trabajos de la Sección de Normalización Microbiológica (Bruselas, 1958; Jerusalén y Opatija, 1959; Wiesbaden, 1960; Londres, 1961), así como las de la Sección de Microbiología e Higiene de los Alimentos (Harwell, 1958; Atenas, 1959). También a cargo de la Asociación y de la W. H. O. está el Centro Internacional para la Información y Distribución de Cultivos Tipo), de Lausana, Suiza.

Dependen de la Asociación las siguientes Comisiones Permanentes de Estudio, con carácter de Comisiones o Comités Internacionales: de Nomenclatura; de Normalización Microbiológica; de Documentación Microbiológica e Inmunológica; de Microbiología e Higiene de los Alimentos; de Microbiología Económica y Aplicada, y de Diagnóstico por Fagos Entéricos. La Conferencia de Ottawa acordó recomendar a la I. A. M. S. el establecimiento de un Comité Permanente de Colecciones de Cultivo.

La Asociación reúne entre sus miembros más de 40 Sociedades nacionales de Microbiología, y desde el Congreso anterior han sido admitidos siete nuevos miembros, entre los que se encuentran los iberoamericanos: Sociedad de Microbiólogos de la Argentina e Instituto de Higiene de Montevideo, Uruguay.

Los nuevos Estatutos aprobados por el Congreso incluyen en primer lugar, el propósito de la Asociación de asegurar la continuidad de los Congresos Internacionales de Microbiología y organizar otras reuniones y simposios. Estos Congresos tienen una periodicidad cuatrienal, y en los últimos años se han celebrado en Copenhague, Río de Janeiro, Roma, Estocolmo y Montreal. Otros fines de la Asociación son estimular la investigación microbiológica; crear pensiones y becas para el intercambio de investigadores entre los países-miembros; re-

lacionar entre sí a las Sociedades nacionales de Microbiología; mantener las Comisiones Internacionales de Estudio sobre aquellos temas de importancia general, en especial la de nomenclatura; y mantener estrecho contacto con las Organizaciones de las Naciones Unidas.

Se establecen dos clases de miembros: a) Miembros nacionales, que lo serán las Sociedades nacionales de Microbiología u organización de Sociedades de Microbiología; y, en su defecto, cuando no haya Sociedad nacional de Microbiología, cualquier institución científica interesada en el progreso de la Microbiología. b) Socios protectores, que pueden serlo toda organización o individuo que desee financiar las actividades de la Asociación.

Ante el incremento que va tomando la Asociación, la Junta saliente propuso, y así se acordó, aumentar el número de miembros que han de regir o asesorar a la Organización. En consecuencia, se crearon dos organismos: el Comité Ejecutivo y el Consejo Asesor.

El Consejo Asesor lo forman, bajo la presidencia del Vicepresidente y secretaría del Secretario general, los Presidentes de cada Comité Permanente o Sección, junto con seis miembros elegidos por los delegados nacionales. Para uno de estos seis puestos fue nombrado, a propuesta del delegado español, el Prof. Luis C. Verna, de la Universidad de Buenos Aires, ligado a la Sociedad de Microbiólogos Españoles por antiguos y sólidos lazos de amistad personal y de colaboración científica, ya que publica trabajos de investigación en la Revista de nuestra Sociedad. El Prof. Verna, que queda así como representante de Sudamérica, y el Prof. A. Pomales-Lebrón, de la Universidad de Puerto Rico, que también fue elegido, formarán la brillante embajada de los países ibéricos e iberoamericanos en los mandos de la Asociación Internacional.

Se trató también del problema económico de la Asociación y se acordó que las suscripciones de las Sociedades miembros se ajustasen a un módulo o unidad—cuyo valor será de 50 dólares U. S. A.—, pudiendo cada miembro determinar su suscripción por el número de unidades que desee. El Secretario general saliente, Dr. Hedén, pidió generosidad para estabilizar debidamente la economía de la I. A. M. S., pues, según el estado de cuentas, los ingresos apenas cubrían los gastos de Secretaría y suscripciones necesarias. Recalcó igualmente cómo el programa que se lleva adelante requiere de un apoyo económico, y

destacó el desinterés del Presidente saliente y otros miembros directivos por sus aportaciones personales y por cubrir a sus expensas gran parte de sus actuaciones y gastos de viaje. Es lógico que esta situación tienda a desaparecer, pues no se puede mantener indefinidamente.

Como sede del IX Congreso fue propuesta la ciudad de Moscú. No se llegó a un acuerdo definitivo, en espera de la invitación oficial, que se esperaba llegase pronto. En estas condiciones, otras delegaciones esperaban que se organizase la próxima reunión en Jerusalén o Tokio. En carta reciente, el Secretario general, Dr. Gibbons, comunica que la sede del Congreso que se celebrará en 1966 será, efectivamente, Moscú.

Por falta de instrucciones concretas, este delegado omitió comunicar al Comité Ejecutivo de la I. A. M. S. el deseo, ya antiguo, de la Sociedad de Microbiólogos Españoles de que el citado IX o el X Congreso se celebrase en España; pero al dar cuenta de sus impresiones al Prof. Lorenzo Vilas, Secretario de la Sociedad, éste cursó al excelentísimo señor Ministro de Educación la petición correspondiente para que, si Su Excelencia así lo estima procedente, autorice la celebración del X Congreso en nuestro país y confirme el envío de la invitación oficial. Como motivo fundamental para la organización del X Congreso en Madrid, en el año 1970, está el que para esa fecha la Sociedad de Microbiólogos Españoles y el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, celebrarán el XXV aniversario de su fundación.

Al finalizar el Congreso, los Dres. Holguera, Rejas, Valladares y De Vicente se trasladaron a Ottawa para tomar parte en las reuniones de la Conferencia de Especialistas en Colecciones de Cultivo.

Comité Ejecutivo de la I. A. M. S. (ECIAMS). Presidente: Dr. A. Lwoff, Institut Pasteur, París V^e (Francia); Presidente saliente: Dr. Stuart Mudd, University of Philadelphia, Philadelphia 4, Pa. (Estados Unidos de América del Norte); Vicepresidente y Presidente del Consejo Asesor: Dr. Carl-Göran Hedén, Karolinska Institutet, Stockholm (Suecia); Tesorero: Prof. Maurice Welsch, Université de Liège, Liège (Bélgica); Secretario General: Dr. N. E. Gibbons, National Research Council, Ottawa, Ontario (Canadá); Vocal: Prof. V. D. Timakov, USSR Medical Sciences Academy, Moscú (U. R. S. S.).

Consejo Asesor de la I. A. M. S. Dr. Carl-Göran Hedén, Presidente; Dr. N. E. Gibbons, Secretario.

Comité Permanente para Documentación Microbiológica: Prof. P. R. Brygoo, Institut Pasteur, París (Francia). *Comité de Nomenclatura:* Dr. S. T. Cowan, National Collection of Type Cultures, London N.W.9 (Inglaterra). *Comité Internacional para el Diagnóstico por Fagos Entéricos:* Dr. J. Craigie, Imperial Cancer Research Fund Laboratory, London N.W.7 (Inglaterra); Dr. P. Nicolle, Institut Pasteur, París XV^e (Francia). *Sección Permanente para Microbiología e Higiene de Alimentos:* Dr. M. Ingram, Low Temperature Research Station, Cambridge (Inglaterra). *Microbiología Económica y Aplicada:* Prof. M. J. Johnson, University of Wisconsin, Madison 6, Wisc. (Estados Unidos de América del Norte). *Sección de Normalización Biológica:* Dr. A. Lafontaine, Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie, Bruxelles 5 (Bélgica).

Seis Vocales: Dr. Toshinobu Asai, The Brewing Science Research Institute, Tokyo (Japón); Prof. L. C. Verna, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (Argentina); Prof. Gunner Löfstrom, University of Uppsala, Uppsala (Suecia); Prof. E. F. Gale, University of Cambridge, Cambridge (Inglaterra); Prof. A. Pomales-Lebrón, University of Puerto Rico, San Juan 22 (Puerto Rico); Prof. V. B. D. Skerman, Medical School, Brisbane (Australia).

R. De Vicente

CONFERENCIA SOBRE MICROBIOLOGIA APLICADA

Del 29 de julio al 3 de agosto próximos se celebrará en Estocolmo una conferencia acerca de las perspectivas y repercusiones de la Microbiología aplicada. Para toda clase de información, las personas interesadas deben dirigirse a: Global impacts of applied Microbiology, Dr. M. Tveit, Secr. Gen. Arlöv (Suecia).

Consejo Asesor de la I. A. M. S. Dr. Carl-Göran Hedén, Presidente; Dr. N. E. Gibbons, Secretario.

Comité Permanente para Documentación Microbiológica: Prof. P. R. Brygoo, Institut Pasteur, París (Francia). *Comité de Nomenclatura:* Dr. S. T. Cowan, National Collection of Type Cultures, London N.W.9 (Inglaterra). *Comité Internacional para el Diagnóstico por Fagos Entéricos:* Dr. J. Craigie, Imperial Cancer Research Fund Laboratory, London N.W.7 (Inglaterra); Dr. P. Nicolle, Institut Pasteur, París XV^e (Francia). *Sección Permanente para Microbiología e Higiene de Alimentos:* Dr. M. Ingram, Low Temperature Research Station, Cambridge (Inglaterra). *Microbiología Económica y Aplicada:* Prof. M. J. Johnson, University of Wisconsin, Madison 6, Wisc. (Estados Unidos de América del Norte). *Sección de Normalización Biológica:* Dr. A. Lafontaine, Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie, Bruxelles 5 (Bélgica).

Seis Vocales: Dr. Toshinobu Asai, The Brewing Science Research Institute, Tokyo (Japón); Prof. L. C. Verna, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (Argentina); Prof. Gunner Löfstrom, University of Uppsala, Uppsala (Suecia); Prof. E. F. Gale, University of Cambridge, Cambridge (Inglaterra); Prof. A. Pomales-Lebrón, University of Puerto Rico, San Juan 22 (Puerto Rico); Prof. V. B. D. Skerman, Medical School, Brisbane (Australia).

R. De Vicente

CONFERENCIA SOBRE MICROBIOLOGIA APLICADA

Del 29 de julio al 3 de agosto próximos se celebrará en Estocolmo una conferencia acerca de las perspectivas y repercusiones de la Microbiología aplicada. Para toda clase de información, las personas interesadas deben dirigirse a: Global impacts of applied Microbiology, Dr. M. Tveit, Secr. Gen. Arlöv (Suecia).

DEPÓSITO LEGAL: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15 - Madrid