

Microbiología Española

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

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

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



CONSEJO DE REDACCION

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

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

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

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

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

INDICE

	Página
Formas L inestables del <i>Pseudomonas syringae</i> inducidas por glicocola, por <i>Madelaine Montalbano</i> , <i>M. Rubio-Huertos</i> y <i>J. C. Maruzzella</i>	1
Estudio de la fracción hormonal de los tumores producidos en el olivo por el <i>Pseudomonas savastanoi</i> . II. Valoración química y biológica del ácido β -indolacético, por <i>R. Beltrá</i>	15
Obtención y análisis químico de paredes celulares del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y de sus formas L fijas, por <i>M. Santaolalla</i>	25
Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. VI. Alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos del <i>Bacillus cereus</i> , por <i>Eulalia Cabezas de Herrera</i> y <i>Pilar Aznar</i>	41
The study of a tuberculosis-like condition in neon tetras (<i>Hyphessobrycon innesi</i>). I. Symptoms of the disease and preliminary description of the organism isolated, by <i>D. A. Conroy</i>	47
Gigantismo y variación en la dotación de cirros en <i>Stylonychia</i> , por <i>Pilar Alonso</i> y <i>J. Pérez-Silva</i>	55
Otras observaciones sobre la putrefacción de la aleta caudal en los peces, por <i>D. A. Conroy</i>	63
Curso sobre Microbiología del Suelo	67
Conferencias de los Profs. Lépine y Pochon	67
Conferencias del Dr. Rubio	68
Premio «Alonso de Herrera»	68
Ayuda de investigación	68

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 INESTABLES DEL *PSEUDOMONAS* *SYRINGAE* INDUCIDAS POR GLICOCOLA

POR

MADELAINE MONTALBANO, M. RUBIO HUERTOS y J. C. MARUZZELLA (*)

INTRODUCCION

Junto al bien conocido mecanismo de reproducción de las bacterias por simple división en células hijas, existe otro que se puede observar cuando algunas bacterias se encuentran sometidas a diferentes factores disgenésicos, que bien pueden ser físicos, como las bajas temperaturas; químicos, como pequeñas concentraciones de fenol o algunos aminoácidos; biológicos, como los propios productos de desecho del metabolismo de las mismas bacterias; sustancias antibióticas, como la penicilina, estreptomycin, etc., y por la acción débil del bacteriófago.

Así, si hacemos actuar cualquiera de estos factores sobre un cultivo joven de bacterias (siembras de dos-cinco horas), vemos la aparición de grandes formas discoidales (formas L grandes), resistentes a la causa disgenésica que las produjo. Estas formas L grandes se multiplican, generalmente, como tales en medios que lleven el agente inductor, pero resembrándolas en medios sin éste, revierten a la forma normal y son llamadas en este caso formas L no estables; o, por el contrario, pueden multiplicarse indefinidamente en forma L en los medios sin agente inductor, denominándose entonces formas L fijas o estables.

Después de los trabajos de Dienes (2) la mayoría de los investigadores han empleado la penicilina como agente inductor de las for-

(*) Este trabajo es parte de la tesis de uno de nosotros (M. M.) para el grado de M. Sc. de la Universidad de Long Island, Nueva York. N. Y.

mas L como método más seguro y de mejores resultados, dada su acción de interferencia con los componentes de la síntesis de la pared celular bacteriana. En los trabajos que Rubio-Huertos ha realizado empleando como agente inductor la glicocola (6-7, 10) pudo comprobar que las formas L obtenidas por este método diferían en varios aspectos de aquellas obtenidas con penicilina y otros agentes.

En el presente trabajo estudiamos las formas L del *Pseudomonas syringae* (*) inducidas por glicocola, sus características bioquímicas y patogenicidad.

MATERIALES Y METODOS

Medios de cultivo

Hemos empleado agar-caldo común para mantener los cultivos normales. Para la obtención y pases sucesivos de formas L se probaron diferentes medios con glicocola a concentraciones de 4, 6, 8 y 10 por ciento, de las cuales la más eficaz resultó ser la del 6 por ciento en todos ellos; el medio mejor para la posterior resiembra de las colonias L obtenidas en el primer pase fue el medio de Kosser con citrato, modificado por nosotros, al que le añadimos 1 por ciento de suero de caballo y 6 por ciento de glicocola. La fórmula del medio de Kosser con citrato, según nuestra modificación, es la siguiente:

Fosfato amónico	1,5 g
Fosfato monopotásico	1,0 g
Sulfato magnésico	2,0 g
Citrato amónico	1,0 g
Cloruro sódico	1,5 g
Agua	1.000 ml

pH 7

Pruebas bioquímicas

Se ha hecho un estudio comparativo entre las formas bacilares normales y formas L, para ver la fermentación de los azúcares, acidifica-

(*) La estirpe que utilizamos nos fue facilitada por la Dra. R. Beltrá, a quien nos complace dar aquí las gracias.

ción de la 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.

Para los experimentos de filtración hemos empleado filtros de Seitz, siguiendo la técnica de Vicente (14).

Para las pruebas de patogenicidad hemos utilizado plantas jóvenes de *Phaseolus vulgaris* y de *Pisum sativum*, las cuales fueron inoculadas con las formas normales y L tres veces aproximadamente, con cuatro meses de intervalo. Las inoculaciones fueron hechas por punción con aguja estéril y con el inóculo y sobre las punciones colocamos trocitos de agar para evitar su desecación rápida.

Las microfotografías se hicieron utilizando un microscopio Zeiss de contraste de fases. En algunos casos utilizamos preparaciones teñidas con las tinciones usuales de Gram y simples (azul de metileno, fucsina fenicada y violeta de genciana).

Las preparaciones para el microscopio electrónico se hicieron por suspensión en agua destilada, previo lavado de las células por centrifugación, y se sombrearon con oro-paladio para su observación.

El microscopio electrónico empleado ha sido 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.

RESULTADOS

Formación, evolución y morfología de las colonias L

La inoculación con abundante inóculo de *Pseudomonas syringae* a medio agar-caldo común adicionado de glicocola al 6 y 10 por ciento dio lugar, a las veinticuatro horas, a la formación de colonias redondas, algo transparentes y gelatinosas, compuestas de elementos esféricos L, formas filamentosas y alguna célula normal. Los elementos de estas colonias revertían a la forma normal (*figura 1*) en cuarenta y ochosetenta y dos horas en el mismo medio.

Inoculando con una concentración de células de *Pseudomonas syringae* también abundante, medio de Kosser modificado y conteniendo un 1 por ciento de suero de caballo y 6 por ciento de glicocola, se formaron colonias redondas, más transparentes que las normales y muy

gelatinosas, sin el pigmento ligeramente anaranjado de las colonias normales; estas colonias se encontraban formadas exclusivamente por elementos esféricos (*figuras 2-3*) a las treinta horas, no cambiando a la forma normal en las horas siguientes. La segunda y tercera siembras, hechas con estas colonias también en medio de Kosser como el anterior, dan lugar a colonias compuestas de formas esféricas de diferentes tamaños y de apariencia igual a las obtenidas previamente. Sin embargo, a la cuarta siembra en el medio de Kosser, las colonias se hacen mucho más gelatinosas y transparentes y de un tamaño seis-siete veces mayor que las originales, y en ellas sólo se encuentran elementos granulares muy pequeños (*figura 4*), que sembrados subsecuentemente en nuevo medio no se desarrollan, es decir, no se obtiene crecimiento alguno.

Cuando se resiembró en medios sin glicocola de las colonias L formadas en la primera, segunda y tercera siembras en medio de Kosser, se obtienen colonias normales formadas por elementos bacilares.

El paso de la forma bacilar normal a la forma esférica se produce, como en el caso de otras bacterias (12-13), por hinchamiento de las formas normales y, en muchos casos, formación de largos filamentos con hinchamientos laterales o terminales; estos filamentos, creemos que no son viables.

Los esferoplastos, componentes de las colonias L, son resistentes al choque osmótico. Al microscopio electrónico se ve que poseen una fuerte membrana (*figuras 4-5*).

Las formas esféricas crecen en caldo común adicionado de 6 por ciento de glicocola, formando un depósito ligero. En caldo común sin glicocola reversion a la forma normal.

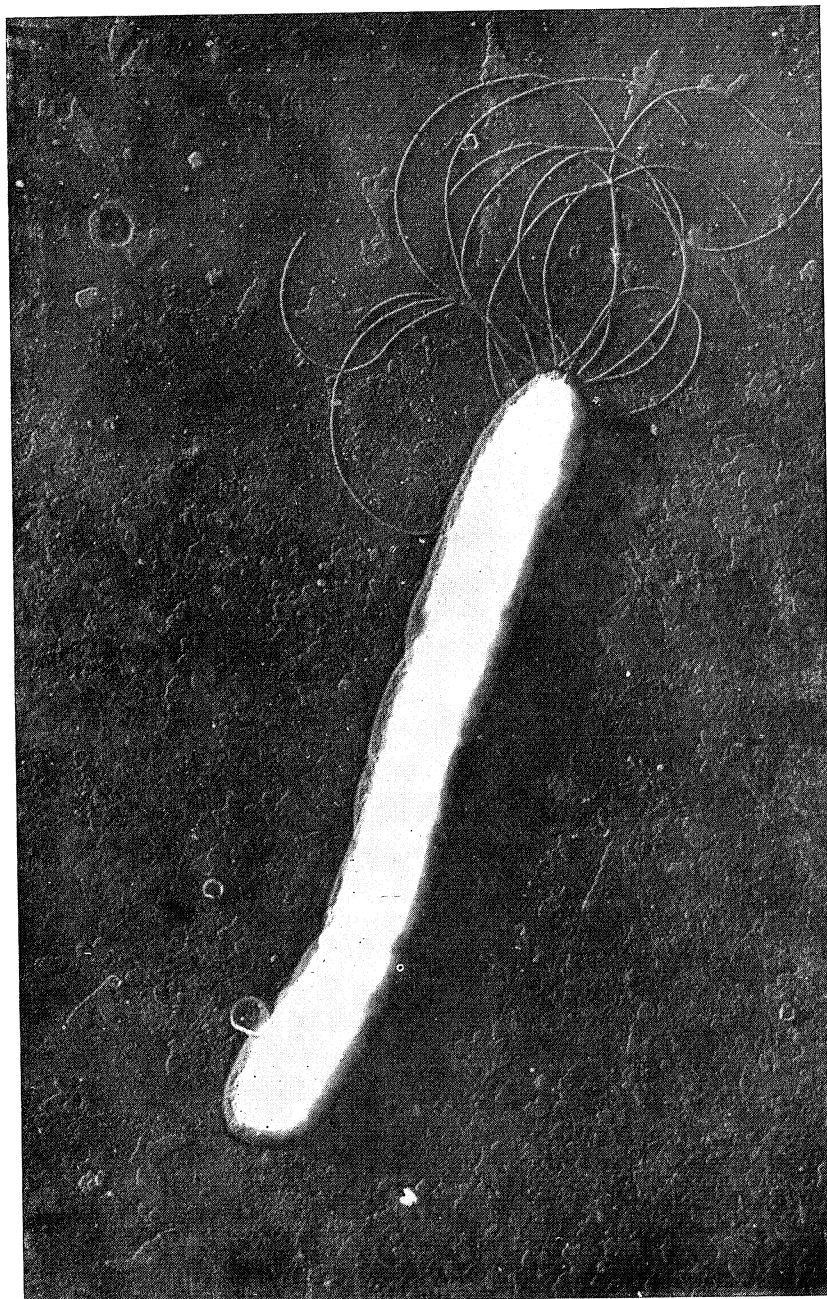


Figura 1. Pseudomonas syringae: forma bacilar normal. $\times 40.000$ (Microscopio electrónico)



Figura 2. Ps. syringae: esferoplastos. $\times 1.200$ (Microscopio de contraste de fases)

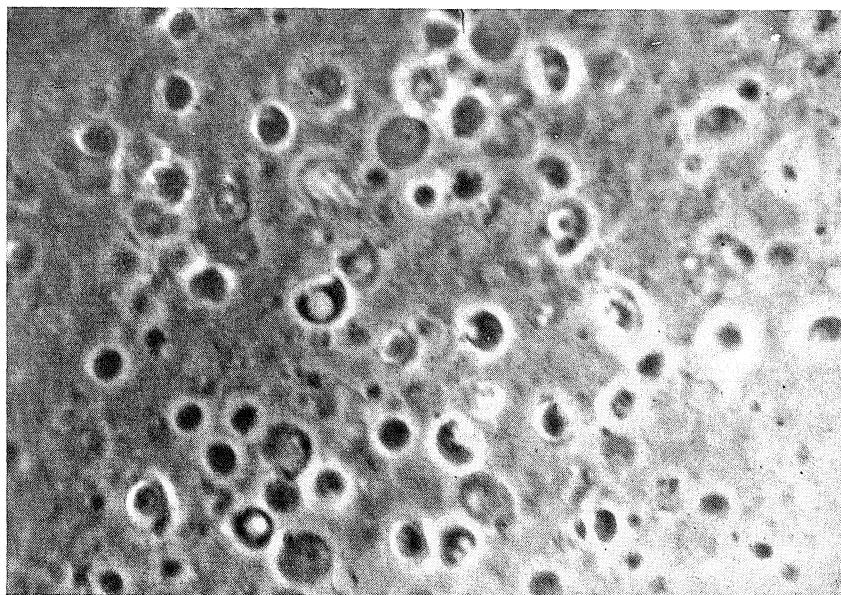


Figura 3. Ps. syringae: esferoplastos. $\times 1.000$ (M. de contraste de fases)



*Figura 4. Ps. syringae: esferoplastos; la flecha señala formas filtrables. $\times 40.000$
(M. electrónico)*

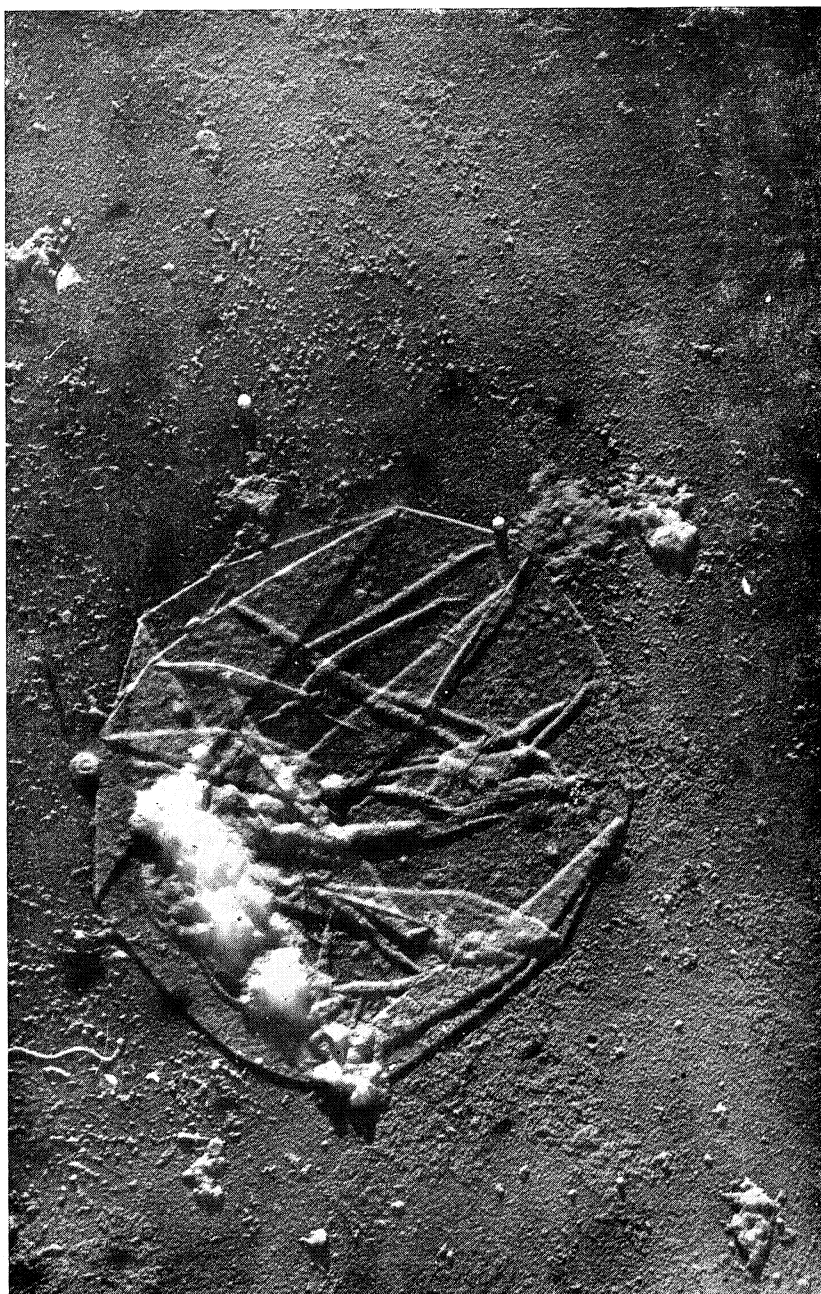


Figura 5. Ps. syringae: membrana vacía de un esferoplasto; la flecha señala una forma filtrable. $\times 40.000$ (M. electrónico)

Pruebas bioquímicas

Los resultados de las pruebas bioquímicas se dan en los cuadros 1-3.

Cuadro 1

Substrato	Forma bacilar		Forma L	
	Acido	Gas	Acido	Gas
Almidón	+++	—	+++	—
Arabinosa	+++	—	+++	—
Celobiosa	++	—	++	—
Dextrosa	++	—	++	—
Galactosa	+++	—	+++	—
Glicerina	++	—	++	—
Glicógeno	++	—	++	—
Glucosa	++	—	++	—
Inulina	++	—	++	—
Lactosa	—	—	—	—
Levulosa	+++	—	+++	—
Maltosa	—	—	—	—
Manitol	+++	—	+++	—
Manosa	+++	—	+++	—
Melobiosa	+++	—	+++	—
Rafinosa	—	—	—	—
Ramnosa	—	—	—	—
Sacarosa	++	—	++	—
Sorbitol	++	—	++	—
Trehalosa	++	—	++	—
Xilosa	++	—	++	—

+ =muy ligero, ++ =ligero, +++ =moderado, ++++ =abundante.

Cuadro 2

Reacciones	Forma bacilar		Forma L	
	Licuefacción		Licuefacción	
Gelatina	Alcalinidad, +++		Alcalinidad, +++	
Leche	—		—	
Producción de indol	—		—	
Producción de sulfhídrico	—		—	
Reacción de Voges-Proskauer	++		++	
Reducción de nitratos a nitritos	—		—	

Cuadro 3

Medio	Crecimiento	
	Forma bacilar	Forma L
Albúmina	—	—
Caldo	++	++
Caldo-urea (1 %)	+++	+++
Caldo-ClNa (1 %)	+	+
Caldo-NO ₃ K (1 %)	++	++
Peptona	+++	+++
Kosser	++++	++++

Como se puede observar en los cuadros anteriores, las reacciones bioquímicas de la forma normal y la forma L obtenida de la primera siembra fueron idénticas.

Patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad con las formas L sobre *Phaseolus vulgaris* y *Pisum sativum* fueron negativas.

Filtración

Aunque en los filtrados se encontraron elementos granulares muy pequeños, no se consiguió su multiplicación al inocularlos a medios normales.

DISCUSION

Klieneberger-Nobel (5) define la forma L como un crecimiento formado por elementos protoplásmicos blandos, moldeables, sin una morfología definida y los cuales no poseen ya formas bacilares rígidas ni revierten a ellas aunque sean sembrados en medios normales, y además forman un tipo de colonias con un centro oscuro y un halo (típica colonia en «huevo frito») sobre medio sólido, independientemente de la especie bacteriana de la cual se haya derivado el crecimiento L. Como vemos, sólo podrían ser llamadas formas L aquellas no reversibles a la forma normal y, sin embargo, la misma Klieneberger-Nobel

describe las llamadas formas L de transición o formas L inestables que son capaces de revertir a la forma bacilar.

En el caso del *Pseudomonas syringae* hemos visto que puede multiplicarse y dar colonias formadas por elementos esféricos de diversos tamaños solamente en presencia del agente inductor, y que colocadas en medios normales revierten a la forma bacilar; por lo tanto, nos encontramos en presencia de un crecimiento de tipo L inestable, que además presenta ciertas particularidades que le hacen diferir de la mayoría de los casos descritos para este mismo tipo de crecimiento en otras especies bacterianas, y empleando generalmente la penicilina como agente inductor. Estas diferencias son:

1.^a Aspecto macroscópico de las colonias. Estas colonias son redondas, de bordes enteros, a diferencia de la colonia típica de «huevo frito»; son transparentes, aunque a veces tengan uno o varios centros más oscuros en su interior, y son muy gelatinosas. Los trabajos de Rubio-Huertos y Beltrá (8) y Rubio-Huertos y González (9) sobre formas L fijas no reversibles de *Agrobacterium tumefaciens* y *Clostridium tetani*, también obtenidas con glicocola, han demostrado que el tipo clásico de colonia L, descrito anteriormente como formado siempre independientemente del género de bacteria de que se trate y del medio empleado para su inducción en crecimiento L, no es adecuado, puesto que se han encontrado excepciones.

2.^a La extraordinaria resistencia al choque osmótico que presentan los elementos esféricos que componen estas colonias parece ser una característica general del crecimiento L inducido por glicocola (10), debido a una menor destrucción de los componentes químicos de la pared celular de estas formas (11); por lo tanto, estas formas esféricas constituyen verdaderos esferoplastos, según la definición de Brenner y colaboradores (1).

3.^a Su facilidad de crecimiento en medios pobres, aunque adicionados de glicocola.

Las demás características, tales como falta de patogenicidad, morfología, propiedades bioquímicas iguales a la bacteria normal, etc., coinciden con las formas L inestables descritas para otras especies gram-negativas (2, 4, 13).

La posibilidad de obtención de formas L estables, que no revierten a la forma bacilar nunca más, parece estar unida a las características de

la estirpe de la bacteria con que se trabaje, es decir, a una cierta disposición genética.

RESUMEN

Se han obtenido formas L inestables de *Pseudomonas syringae* realizando la inducción por medio de glicocola al 6 por ciento y en medio de Kosser modificado por los autores. Las colonias L se encuentran formadas por esferoplastos, o sea, formas esféricas con una membrana bien definida, según se ve al microscopio de fases y electrónico; son resistentes al choque osmótico, y capaces de reproducirse como tales en medios con glicocola, bien que sembradas en medios normales revierten a la forma bacilar.

Las propiedades bioquímicas de estas formas son idénticas a las de la forma normal bacilar. Sin embargo, y a diferencia de la forma normal, no fueron patógenas para *Phaseolus vulgaris*.

Las colonias L del *Pseudomonas syringae* difieren en morfología de las colonias típicas L en «huevo frito», descritas para la mayoría de bacterias gram-negativas.

SUMMARY

Under the influence of glycine *Pseudomonas syringae* formed transitory or reversible L forms. The L forms reverted back to the normal bacillary form when placed in a medium without the inducing agent. When the L forms were transferred to a medium with glycine they continued to multiply as such.

The L colonies had a different morphology than the typical L colonies («fried egg»). *Pseudomonas syringae* L colonies were round, with a definite outline, transparent and very gelatinous. They were composed of spherical elements of different sizes and with a well defined membrane as observed in the phase contrast and electron microscopes. They were resistant to osmotic shock.

The L and normal forms of *Pseudomonas syringae* exhibited identical biochemical tests. The L forms were not pathogenic for *Phaseolus vulgaris*.

BIBLIOGRAFIA

1. BRENNER, S.; DARK, F. A.; GERHAJDT, J.; JEYNES, M. H.; KANDLER, O.; KELLEMBERGER, E.; KLIENEGER-NOBEL, E.; MCQUILLEN, K.; RUBIO-HUERTOS, M.; SALTON, M. R. J.; STRANGE, R. E.; TOMCSIK, J., y WEIBULL, C. 1958. Bacterial protoplasts. *Nature*, 181, 1.713-15.
2. DIENES, L. 1948. The isolation of L type cultures from bacteroides with the aid of penicillin and their reversion into the usual bacilli. *J. Bacteriol.*, 56, 445-56.
3. DIENES, L., y ZAMECNIK, P. C. 1952. Transformation of bacteria into L forms by amino acids. *J. Bacteriol.*, 64, 770-71.
4. KLIENEGER-NOBEL, E. 1951. The L-cycle: a process of regeneration in bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 525-30.
5. KLIENEGER-NOBEL, E. 1960. L-forms of bacteria (cap. 7). *The Bacteria. I: Structure*, 361-86. I. C. GUNSALUS y R.Y. STANIER. Ed. Academic Press, Nueva York.
6. MORENO, R., y RUBIO-HUERTOS, M. 1958. Obtención y estudio de un crecimiento de tipo L en *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Españ.*, 11, 327-42.
7. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Formas L fijas del *Agrobacterium tumefaciens* obtenidas por medio de glicocola. *Microbiol. Españ.*, 15, 219-30.
8. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Fixed pathogenic L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 195, 101.
9. RUBIO-HUERTOS, M. y GONZÁLEZ, C. 1960. Morphology and pathogenicity of L forms of *Clostridium tetani* induced by glicine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 79, 626-31.
10. RUBIO-HUERTOS, M.; KÜSTER, E., y FLAIG, W. 1955. Licht- und electronenmikroskopische Untersuchungen an L-formen bei *Pseudomonas fluorescens*, *B. proteus* und *Rhizobium*. *Zentr. Bakteriolog., Parasitenk., Abt. I. Orig.*, 162, 24-31.
11. SANTAOLALLA, M. 1963. Obtención y análisis químico de paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas. *Microbiol. Españ.*, 16, 25.
12. STEMPEL, H., y HUTCHINSON, W. G. 1951. The formation and development of large bodies in *Proteus vulgaris* OX-19. I. Bright phase contrast observations of living bacteria. *J. Bacteriol.*, 61, 321-35.
13. STEMPEL, H., y HUTCHINSON, W. G. 1951. The formation and development of large bodies in *Proteus vulgaris* OX-19. II. Comparative cytology of bacilli and large bodies. *J. Bacteriol.*, 61, 337-44.
14. VICENTE, R. de. 1959. Study on adsorption of bacteriophage by filters. *Appl. Microbiol.*, 7, 239-47.

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

ESTUDIO DE LA FRACCION HORMONAL DE LOS TUMORES PRODUCIDOS EN EL OLIVO POR EL *PSEUDOMONAS SAVASTANOI*

II. Valoración química y biológica del ácido β -indolacético

POR
R. BELTRA

En la primera parte de este trabajo (4) hemos estudiado la biogénesis del A.I.A. (*) a partir del triptofano, utilizando como material de experimentación los tumores que produce en el olivo la bacteria *Pseudomonas savastanoi*. En esta segunda parte estudiamos su valoración química y biológica.

PARTE EXPERIMENTAL

I. Valoración química

Después de haber estudiado cromatográficamente los distintos extractos hormonales del tumor y haber encontrado una auxina cuyo Rf coincide con el del A.I.A., hemos procedido a su identificación, mediante la obtención de cristales típicos del A.I.A. a partir de la sustancia auxínica aislada del cromatograma, así como a la valoración colorimétrica del A.I.A. contenido en los extractos ensayados y separado por cromatografía.

(*) Acido β -indolacético.

1. Obtención de cristales típicos de A.I.A.

Se ha seguido, como en un trabajo anterior (3), la técnica dada por Schwarz y cols. (14), que identifican la auxina presente en los cromatogramas, después de extraída con alcohol o con éter, por los cristales característicos que forma en presencia de ácido pícrico.

El extracto del cromatograma (área de papel que comprende la mancha) lo hemos evaporado sobre un portaobjetos, aplicándole una gota de solución saturada de ácido pícrico. Los cristales que obtuvimos se observaron microscópicamente y se estudiaron comparativamente con los obtenidos con A.I.A. puro (Merck).

2. Colorimetría.

En los métodos de Mitchell y cols. (11), Salkowski (13), Tang y Bonner (15), etc., se determinaba el color desarrollado por el A.I.A. con una solución de hierro en ácido sulfúrico.

Gordon y Paleg (8), Gordon y Weber (9), Platt y Thimann (12) y otros mejoran los métodos anteriores, y como en el caso de Gordon y Weber, obtienen mayor sensibilidad en los métodos modificados al agregar una solución de hierro en ácido perclórico (reactivo de Salper) a una solución acuosa de A.I.A.

En el caso especial de nuestra determinación, hemos seguido con algunas modificaciones la técnica dada por Yamaki y Nakamura (17) en la parte de elución de la sustancia y determinación cuantitativa.

a) Elución del A.I.A. Se prepararon dos cromatogramas del extracto hormonal que se desarrollaron en alcohol isopropílico-amoniaco (28 %)-agua (80 : 10 : 10). Uno de ellos fue revelado con el reactivo de Salkowski-Tang, desarrollándose la mancha roja del A.I.A. en la región de R_f 0,49-0,52; comprobada la localización de la mancha del A.I.A., se recortaron las áreas de R_f comprendidas entre 0,49-0,52, de los cromatogramas no revelados, extrayéndolas posteriormente, durante tres horas, con éter, en aparato Soxhlet.

b) Determinación cuantitativa. Después de haber extraído la sustancia del cromatograma por acción del éter, se eliminó éste por eva-

poración y el residuo de la extracción se disolvió en 4 ml de agua bi-destilada.

Una parte de esta solución del extracto etéreo del cromatograma se destinó a bioensayos; para la determinación colorimétrica tomamos 2 ml de esa solución que se mezclaron con 8 ml del reactivo de Salkowski-Tang recién preparado, que es más específico y presenta más sensibilidad que el de Salkowski-Ling. Después de calentar al baño María la solución rosa obtenida se extrajo con 3,5 ml de alcohol isoamílico.

Separada la capa coloreada de alcohol isoamílico, se estudió su concentración en A.I.A. por colorimetría, en un fotómetro de Pulfrich-Zeiss; tuvimos que elegir primeramente el filtro más conveniente y de los ensayos, S-43, S-47, S-50, S-57, S-61, etc., el S-50 fue el que nos dio un coeficiente de extinción máximo (figura 1).

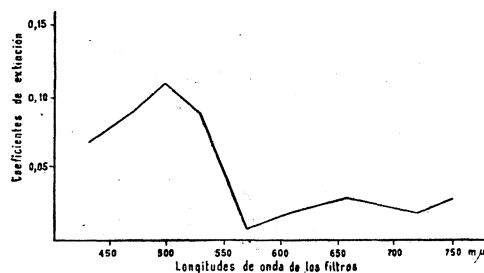


Figura 1. Relación entre coeficientes de extinción y soluciones de A. I. A. que demuestra la elección del filtro S-50 para las lecturas en el fotómetro de Pulfrich-Zeiss, por obtenerse el máximo coeficiente

Posteriormente se comprobó si el A.I.A. en alcohol isoamílico seguía la ley de Beer, para lo cual se realizaron colorimetrías con soluciones de A.I.A. puro, cuyas concentraciones iban de 0,5-6 γ y que se midieron después de haber transcurrido cuatro horas de la reacción coloreada; la obtención de una línea recta nos demostró que al menos

entre esos límites de concentración, el A.I.A. sigue la ley de Beer (figura 2).

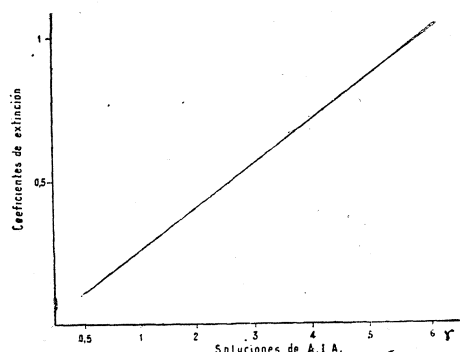


Figura 2. Relación entre coeficientes de extinción y soluciones de distintas concentraciones de A. I. A., demostrándose que dichas soluciones siguen la ley de Beer

La cantidad de A.I.A. de la solución problema se determinó refiriéndonos a la curva patrón y teniendo en cuenta las diluciones seguidas en los métodos de preparación del extracto, así como de la cantidad de material tumoral de que se partió.

También se ha determinado el A.I.A. de las manchas de los cromatogramas por el método de Kefford (10), que se basa en que el área de dicha mancha es proporcional al logaritmo de la concentración del A.I.A. presente.

II. Valoración biológica

Como se ha dicho anteriormente, parte de la solución del extracto que contenía el A.I.A. separado del cromatograma se ha dedicado a bioensayos, principalmente a estudiar su acción sobre la elongación de coleoptilos de avena, raíces de guisante (prueba de Went) y sobre la curvatura de epicotilos de guisante por inmersión total en los líquidos a estudiar.

En esta parte de las experiencias, de la bibliografía consultada (1-2, 5, y otros), seguimos principalmente las indicaciones de Kefford en lo que se refiere a pérdida de actividad biológica de los cromatogramas

que contienen las sustancias de crecimiento, y que comprobamos se evitan guardándolos en la oscuridad y a -10°C .

La avena y guisante, de variedades puras («Vitoria 180» y «Lureola», respectivamente), se cultivaron sobre serrín húmedo a $24^{\circ}\text{--}25^{\circ}\text{C}$, humedad de 65-75 por ciento y con luz roja para evitar la biosíntesis de auxinas por el tejido de la planta (16).

Una vez separados los coleóptilos de avena y las raíces de guisante, se sometieron a la acción de las soluciones a investigar, así como de soluciones patrón con concentraciones de 0,1-1,5-2-3-4 y 5 g por mil de A.I.A. puro.

Las soluciones testigo y problema se agregan a razón de 1 ml de cada una de ellas y 5 ml de solución de sacarosa al 3 por ciento, pH, 5, poniendo 8 secciones de raíces o de coleóptilos, respectivamente, en cada uno de las pruebas; en un ensayo paralelo hemos probado la acción de la fracción ácida total.

III. Microcultivos

En esta parte de ensayos hemos intentado observar la acción de los extractos hormonales en conjunto y algunas de sus fracciones aisladas, sobre cultivos de tejidos vegetales, en cámaras especiales.

Para este fin, hemos usado la cámara húmeda de Van Tieghem, construida en el Instituto de Optica «Daza de Valdés» (C. S. I. C.), según diseño dado por nosotros (*figura 3*), cultivando en el medio semisólido de Zinzadzé modificado (6) y en el medio de Heller, con macroelementos (7).

Los extractos que se han utilizado en estos microcultivos se han ensayado previamente probando su actividad por la prueba de Went de elongación celular.

La esterilización de los cortes donde se iba a ensayar la acción de los extractos tumorales, secciones de tallos de judía (crecidas en la oscuridad), se consiguió pasando los cortes por el medio de cultivo estéril varias veces; los medios de cultivo ensayados se renovaron de las cámaras cada dos días.

La elección como material vegetal para el microcultivo de tallos de judía se ha debido a que ha sido imposible obtener cultivos de tallos de olivo, como se pensó en un principio, y a que dichos tallos de judía responden igual que el olivo a la infección por el *Pseudomonas savas-*

tanoi; además tiene la ventaja de que son mucho más manejables y tienen el tejido más blando.

Hemos hecho tres tipos de microcultivos, cultivando los fragmentos de tallos sobre el medio de Zinzadze y de Heller; éstos fueron: 1) medios de cultivo desprovistos de sustancias estimulantes; 2) con concentraciones conocidas de A. I. A. (de 1×10^{-3} - 1×10^{-6} por mil); 3) adicionados de la solución de A. I. A., eluido del cromatograma, y 4) adicionados de la fracción ácida total, preparada según Yamaki y Nakamura.

RESULTADOS

En la valoración química del A. I. A. presente en los tumores del olivo, hemos obtenido en estado cristalino y mediante precipitación con ácido pícrico, el A. I. A. en forma de agujas de color amarillorrojizo, observándose la igualdad de los cristales obtenidos con A. I. A. puro (Merck) y con los eluatos del cromatograma (*figuras 4-5*).

En la valoración cuantitativa, la concentración máxima hallada por los métodos de Yamaki y Nakamura y Kefford fue la de $2,8 \times 10^{-6}$ de A. I. A./1 g de tumor, observando que esta concentración es un dato variable que depende de la edad de los tumores extraídos, pues hemos determinado desde esa concentración máxima de $2,8 \times 10^{-6}$ correspondiente a tumores muy jóvenes y frescos, a otras de valor mínimo y que correspondían a tumores viejos y coriáceos.

Valorando biológicamente el A. I. A., hemos encontrado que en las raíces de guisantes tratadas con la solución de A. I. A. eluido del cromatograma se produce un aumento de la longitud media a las veinte horas, de 0,6 mm/sección de raíz, dando por tanto una elongación del 104 por ciento; en un ensayo paralelo hemos probado la acción de la fracción ácida total, encontrando solamente un aumento medio de 0,4 mm, lo que supone un aumento de la longitud de las raíces del orden del 102 por ciento.

De esta diferencia de resultados parece deducirse que en la fracción ácida tumoral, que en este caso comprende los productos de degradación del ácido β -indolpirúvico (4), y en los que va incluido el A. I. A., existe un inhibidor del crecimiento que actúa sobre las elongaciones que produce el A. I. A., aislado del mismo cromatograma.

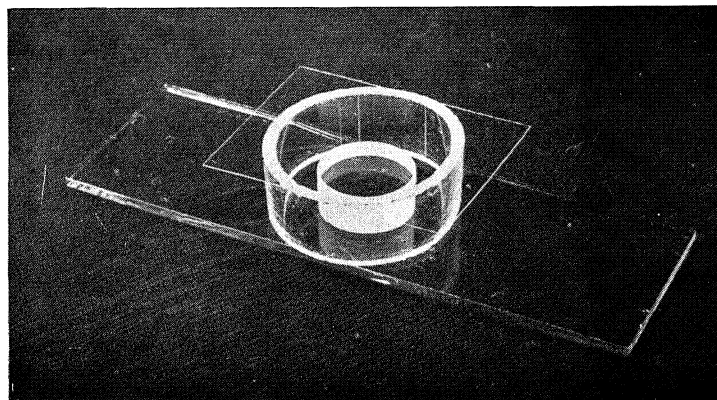


Figura 3. Cámara de microcultivos de Van Tieghem

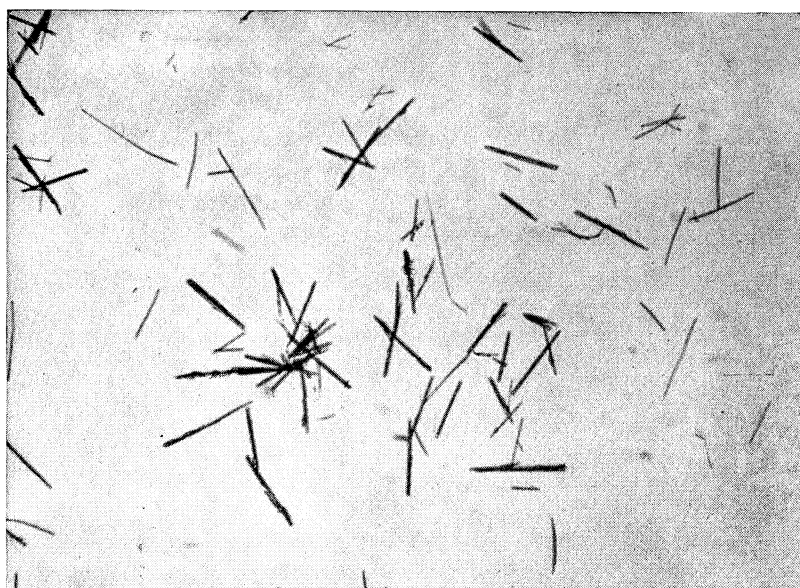


Figura 4. Microcristales obtenidos por la acción del ácido pícrico sobre un extracto de una sección de cromatograma comprendida entre los Rf 0.49-0.52



Figura 5. Microcristales obtenidos, como los de la figura anterior, con ácido β -indolacético puro (Merck)

Los resultados observados en los microcultivos demuestran que el tejido vive mejor, aunque no prolifera, sobre el medio de Heller; no se ha observado en ninguno de los tipos de cultivos citados, proliferación celular, no habiendo paralelismo, por tanto, entre la acción de los extractos ensayados sobre las raíces de guisante y sobre el cultivo de tallos de judía. Esta disparidad creemos se debe a que en el primer caso, el extracto actúa sobre las raíces activando el proceso de crecimiento, y en el segundo caso, hubiéramos querido observar por acción de los mismos extractos, un efecto completamente distinto, como es un proceso de multiplicación celular.

RESUMEN

En el presente trabajo se valora el A. I. A. de los tumores del olivo. Por métodos químicos hemos encontrado que la concentración del A. I. A. es de $2,8 \times 10^{-6}$ en tumores jóvenes; por valoración biológica hemos observado un aumento medio de la elongación de raíces de guisante del orden del 104 por ciento, comprobándose, en la fracción hormonal total, la presencia de un inhibidor del crecimiento, sin identificar.

SUMMARY

In the present work the I. A. A. of the olive tree tumors has been estimated. By chemical methods, we have found that the concentration of I. A. A. is 2.8×10^{-6} in young tumors. Biologically tests gave an average increase in the elongation of peas roots, which amounts to about 104 per cent. In the total hormonal fraction we have observed the presence of a growth inhibitor, which has not been identified.

BIBLIOGRAFIA

1. ABAD, J. B. 1951. «El ensayo guisante» en la valoración de hormonas vegetales. *Farmacognosia*, núm. 21, 241-58.
2. ABAD, J. B. 1952. El método de inmersión total en la valoración de hormonas vegetales. *Farmacognosia*, núm. 25, 191-284.
3. BELTRÁ, R. 1959. El ácido beta-indolacético y los tumores vegetales de origen bacteriano. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 2, 23-32.

4. BELTRÁ, R. 1962. Estudio de la fracción hormonal de los tumores producidos en el olivo por el *Pseudomonas savastanoi*. I. Biogénesis del ácido β -indolacético contenido en los tumores. Microbiol. Españ., 15, 13-33.
5. BENNET-CLARK, T. A., y KEFFORD, N. P. 1953. Chromatography of the growth substances in plants extracts. Nature, 171, 645-47.
6. GAUTHERET, R. J. 1942. Manuel technique de culture des tissus vegetaux. Masson et Cie.
7. GAUTHERET, R. J. 1954. Catalogue des cultures de tissus vegetaux. Rev. Gen. Botan., 61.
8. GORDON, S. A., y PALEG, L. G. 1957. Observations on the quantitative determination of indolacetic acid. Physiol. Plantarum, 10, 39-47.
9. GORDON, S. A., y WEBER, R. P. 1951. Colorimetric stimulation of indolacetic acid. Plant Physiol., 26, 192-95.
10. KEFFORD, N. P. 1955. The growth substances separated from plant extracts by chromatography. J. Exptl. Botany, 6, 129-51.
11. MITCHELL, J. W., y BRUNSTELLER, B. C. 1939. Colorimetric methods for the quantitative stimulation of indole-(3)-acetic acid. Botan. Gaz., 100, 802-16.
12. PLATT, R. S., y THIMANN, K. V. 1956. Interference in Salkowski assay of indolacetic acid. Science, 123, 105.
13. SALKOWSKI, E. 1885. Über der Verhalten der Skatol carbonsäure in organisms. Z. Physiol. Chem., 9, 23.
14. SCHWARZ, K.; DIERBERGER, R., y BITANCOURT, A. A. 1955. Studies in plant cancer. I. Chemical identity of the auxins of some normal and tumor plant tissues. Arquiv. Inst. Biol. (Sao Paulo). 22, 93-118.
15. TANG, Y. W., y BONNER, J. 1947. The enzymatic inactivation of indole acetic. Arch. Biochem., 13, 11.
16. YAMAKI, T. 1955. Mecanism de l'acceleration de l'elongation de la plante par l'acide indoleacetique. Compt. Rend. Soc. Biol., 149, 857.
17. YAMAKI, T., y NAKAMURA, K. 1952. Formations of indole acetic acid in maize embryo. Sci. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo, 2, 81, 98.

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

OBTENCION Y ANALISIS QUIMICO DE PAREDES CELULARES DEL *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* Y DE SUS FORMAS L FIJAS

POR

M. SANTAOLALLA

INTRODUCCION

La obtención por Rubio-Huertos y Beltrá (13) de formas L fijas del *Agrobacterium tumefaciens* mediante la inducción con glicocola; la patogenicidad que presentan estas formas L inoculadas en *Phaseolus vulgaris*, de cuyos tumores se aíslan exclusivamente formas esféricas; así como la evidencia de una pared celular en estas formas L, verdaderos esferoplastos, demostrada por microscopía electrónica por Rubio-Huertos y Desjardins (14), nos indujo a obtener las paredes de ambas formas y a realizar el análisis de su componente glucoproteico, empleando la cromatografía sobre papel, con vistas a que las posibles diferencias en su composición química pudiesen ser la causa de la mayor rigidez que presenta la pared de la forma normal y, al mismo tiempo, ver si este estudio bioquímico nos podía orientar sobre el mecanismo de inducción de las formas L por la glicocola.

MATERIALES Y METODOS

Empleamos el *Agrobacterium tumefaciens* estirpe AT vid., que cultivamos en dos matraces de Erlenmeyer de 6 l, en caldo común, con agitación, a 25 °C; a las treinta horas, aproximadamente, separamos los

cuerpos bacterianos por centrifugación y los lavamos con agua destilada estéril (*),

Con el inóculo de las formas L fijas cultivamos 6 frascos de Roux en agar-caldo, a 25 °C; a las treinta horas se aprecia perfectamente la formación de colonias y comprobamos mediante el microscopio de contraste de fases que no existen más que formas L. Entonces, se arrastran éstas mediante perlas de vidrio estériles y agua destilada estéril; posteriormente, son lavadas y separadas por centrifugación.

Obtención de las paredes celulares

Seguimos, fundamentalmente, los métodos de Cummais y Harris (3) y Salton y Horne (16-17).

a) Formas normales

El sedimento que contiene los cuerpos bacterianos lavados, lo diluimos con agua destilada estéril hasta dejarlo a una concentración aproximada de 0,13 g de sustancia seca /10 ml de agua, sometiendo entonces la suspensión a la agitación en el aparato de Mickle con ballotine núm. 12; vamos haciendo observaciones periódicas al microscopio de contraste de fases, hasta comprobar que la totalidad de las bacterias se han vaciado. Centrifugamos el líquido a 3.000 r/m y desechamos el sedimento; el líquido opalino lo centrifugamos a 10.000 r/m, lavamos el sedimento 3 ó 4 veces con ClNa al 0,9 por ciento y después con agua destilada estéril hasta ausencia de Cl⁻ (conservamos siempre en frigorífico). Este sedimento, suspendido en una solución de pH 7,6, lo digerimos con tripsina a 37 °C, a una concentración algo superior a 200 γ /1 ml, durante cuatro horas, con lo que la opacidad de la suspensión decrece considerablemente; centrifugamos, lavamos y en una solución clorhídrica 0,02 N, tratamos las paredes con pepsina a una concentración de 300 γ /1 ml durante seis horas, a 37 °C. Centrifugamos y lavamos.

b) Formas L fijas

Como se aprecia en la *figura 1*, estas formas presentan una cápsula de aspecto gelatinoso, difícil de quitar, por lo que tuvimos que hacer

(*) La estirpe y el inóculo de las formas L fijas nos fueron proporcionados por los Dres. Rubio-Huertos y Beltrá, a quienes expresamos nuestro agradecimiento.

una serie de lavados con alcohol diluido y laurocolato, previos al tratamiento anteriormente expuesto para obtener las paredes limpias.

Microscopía electrónica

Las microfotografías electrónicas fueron hechas con el Microscopio Siemens Elmiskop I del Servicio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias del C. S. I. C., por el Dr. Rubio-Huertos.

Las formas L y las paredes de ambas formas fueron lavadas, suspendidas en agua destilada y depositadas sobre las rejillas portaobjetos para microscopía electrónica, recubiertas de formvar, y después se sombrearon con oro-paladio para su observación.

Análisis cromatográfico sobre papel

Empleamos los mismos métodos para la hidrólisis y determinación del componente glucoproteico en las formas normales y L fijas. Dividimos el sedimento obtenido anteriormente por centrifugación, que contiene las paredes celulares, en dos partes aproximadamente iguales: A, para la determinación de aminoácidos, y B, para la de los azúcares.

a) *Precipitación de la sustancia proteica e hidrólisis posterior.* Añadimos a la parte del sedimento que hemos denominado A, una solución de ácido tricloracético, de tal concentración que la solución final quede al 5 por ciento, así precipitamos las proteínas de la pared; este precipitado lo mantenemos doce horas en frigorífico y a continuación lo separamos por centrifugación; lavamos, primero, con agua y después, con alcohol, alcohol-éter, y, finalmente, con éter; posteriormente lo desecamos en estufa a 50 °C hasta peso constante.

Un centígramo de esta proteína seca lo hidrolizamos en tubo cerrado con 6 ml de ClH 6N, calentando en estufa a 115 °C durante dieciséis horas; evaporamos el líquido a sequedad en estufa a 60 °C, disolvemos el residuo en agua destilada y hacemos dos evaporaciones consecutivas para eliminar las trazas de ácido clorhídrico; el pH deberá ser superior a 5, y si no lo es, hay que neutralizar con hidróxido amónico diluido y, finalmente, completar con agua destilada hasta 3 ml. Con esta solución hacemos el análisis cromatográfico.

b) *Determinación cromatográfica de los aminoácidos de la proteína.* Empleamos papel Whatman núm. 1.

Monodimensional

Disolvente: butanol, 40; etanol, 10; ácido acético, 10, y agua, 20.

Revelador: Solución de ninhidrina al 1 por mil en alcohol isobutílico al 90 por ciento.

Bidimensional

Disolvente: fenol al 80 por ciento, en agua; butanol secundario, 75; ácido fórmico al 88 por ciento, 15; agua, 10.

Revelador: el mismo que anteriormente.

c) *Hidrólisis de los glúcidos y determinación de sus componentes monosacáridos.* La otra mitad que hemos denominado B, de las paredes celulares la secamos en estufa a 80 °C hasta peso constante. Unos 0,015-0,017 g de este residuo seco, pesado exactamente, los hidrolizamos en tubo cerrado con 5 ml de SO_4H_2 2N en estufa a 100 °C durante dos horas; a continuación neutralizamos el exceso de ácido con hidróxido bórico sólido, separamos el SO_4Ba precipitado, por centrifugación; evaporamos el líquido a 50 °C, aproximadamente, y disolvemos el residuo en 1 ml de agua destilada estéril. Esta solución la empleamos para el análisis cromatográfico.

Empleamos papel Whatman núm. 1.

Monodimensional

Disolvente: Butanol n, 40; ácido acético, 10; agua, hasta saturación.

Reveladores: ftalato de anilina y naftoresorcina; para aminoazúcares empleamos el reactivo de Morgan y Elson (2, 11), que consta de lo siguiente: Reactivo A) 1) 0,5 ml de acetilacetona en 50 ml de butanol; 2) 5 ml de solución de KOH al 50 por ciento en 20 ml de etanol; en el momento del uso (no es estable), a 10 ml del 1) se le agregan 0,5 ml del 2). Reactivo B) 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído se disuelve en 30 ml de ClH concentrado y a la solución se agregan 180 ml de butanol. Revelamos pulverizando con A), secando durante cinco minutos a 105 °C e inmediatamente con B) y secando a 90 °C.

Bidimensional

Disolventes: fenol, 80; agua, 19; hidróxido amónico, 1. Butanol n, 40; ácido acético, 10; agua, hasta saturación.

Reveladores: los mismos que anteriormente.

Determinación de nitrógeno

Empleamos el método corriente de micro-Kjeldahl.

RESULTADOS

La *figura 2* muestra las paredes de la forma normal del *Agrobacterium tumefaciens* obtenidas por los métodos anteriormente expuestos. Las formas L fijas, con su cápsula y pared celular perfectamente definidas, también son mostradas en las *figuras 1* y *3*. De estas formas aislamos las paredes celulares por los métodos anteriormente expuestos y con ellas, después de lavadas, obtuvimos dos fotografías que recogemos (*figuras 4-5*).

El examen de estas microfotografías no permite apreciar diferencias estructurales manifestadas entre las formas normal y L fija.

En la hidrólisis de la proteína de las paredes encontramos los aminoácidos indicados en el *cuadro 1* (el número de cruces está en relación directa con la mayor concentración encontrada; los puntos indican las mínimas).

Cuadro 1

Aminoácidos	Forma normal	Forma L fija
Acido diaminopimélico	++	+
Lisina	•	+
Arginina	+	—
Acido aspártico	+++	+++
Acido glutámico	+++	+++
Treonina	+	+
Alanina	++	+++
Valina	•	+
Fenilalanina	+	+
Isoleucina	•	+
Leucina	++	+

Las fotografías de los cromatogramas también evidencian los anteriores resultados (*figuras 6-8*).

Los monosacáridos hallados en las paredes celulares después de la hidrólisis se exponen en el *cuadro 2*.

Cuadro 2

Monosacáridos	Forma normal	Forma L fija
Glucosa	++	+++
Xilosa	+	—
Ribosa	+++	+
Ramnosa	+++	—

Se investigaron azúcares no reductores, así como aminoazúcares, con resultado negativo.

El nitrógeno de la proteína precipitada correspondiente a la pared de la forma normal fue 6,92 por ciento; el de la proteína de la forma L fija, 8,6 por ciento, y el nitrógeno que corresponde a la totalidad de las paredes de esta forma L fue un 7,1 por ciento.

DISCUSION

Encontramos fundamentalmente, tanto en la forma normal como en la L fija, en mayor concentración, tres aminoácidos; ácido aspártico, ácido glutámico y alanina, mencionados por Salton (15), juntamente con el ácido diaminopimélico como principales constituyentes del mucopéptido de la pared celular de los microorganismos gram-negativos.

Del examen comparativo de los resultados del análisis de las paredes celulares de ambas formas, vemos que respecto a los aminoácidos resultantes de la hidrólisis de su componente proteico, lo más significativo es la ausencia de arginina en la pared de la forma L, mientras que este aminoácido se halla presente en la forma normal. También encontramos proporcionalmente mayor cantidad de ácido diaminopimélico en la forma normal, mientras en ésta la cantidad de lisina es mínima. Desde el descubrimiento del ácido diaminopimélico por Work (18) y el posterior estudio de sus isómeros por Hoare y Work (6), sabemos que los distintos isómeros del ácido diaminopimélico son aminoácidos típicos de la pared celular de las bacterias. También Work y

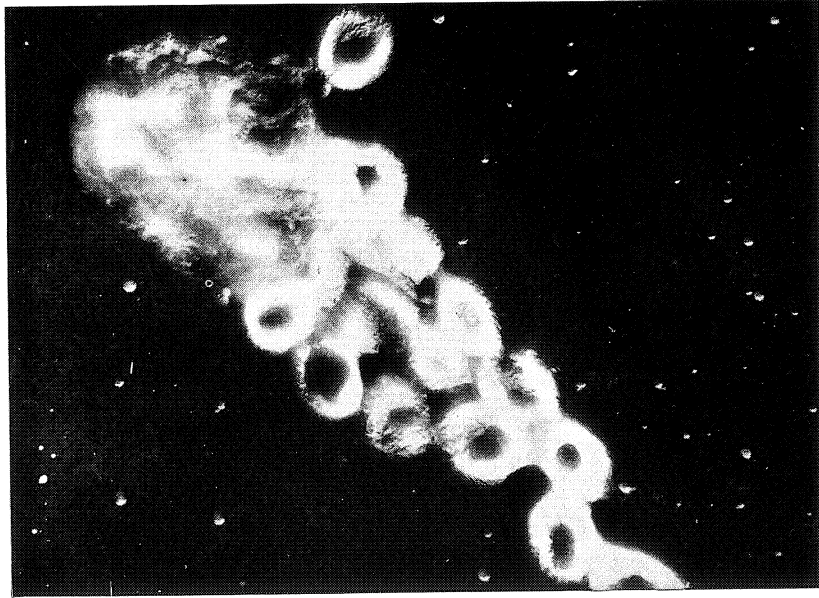


Figura 1. Microfotografía electrónica de formas L del A. tumefaciens. $\times 10.000$

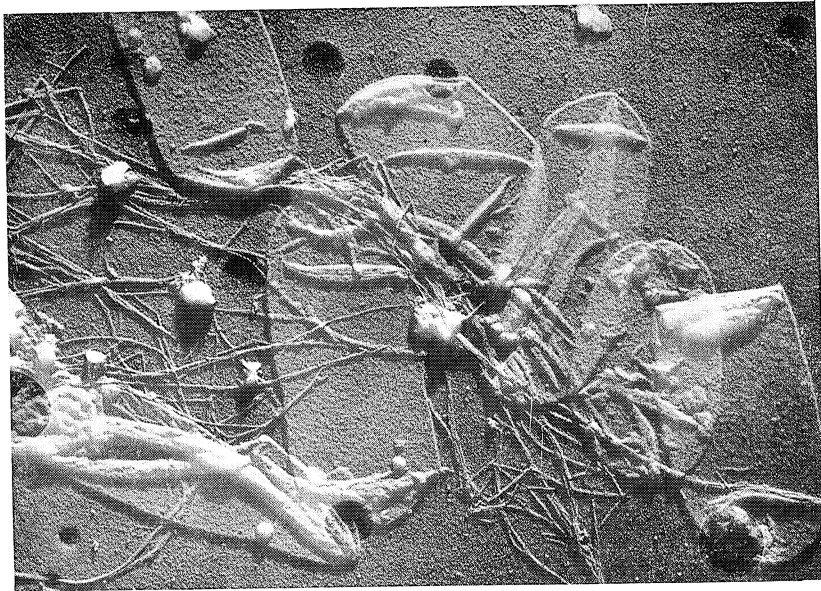
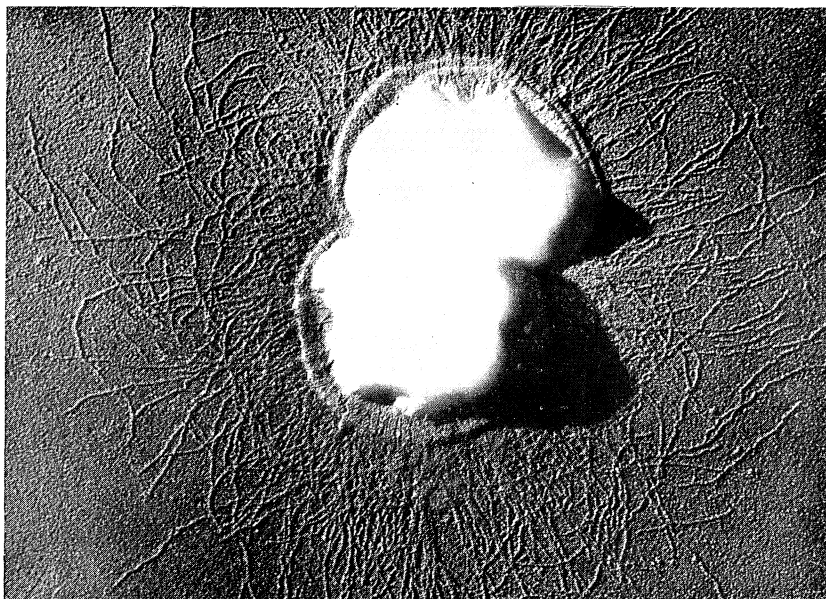
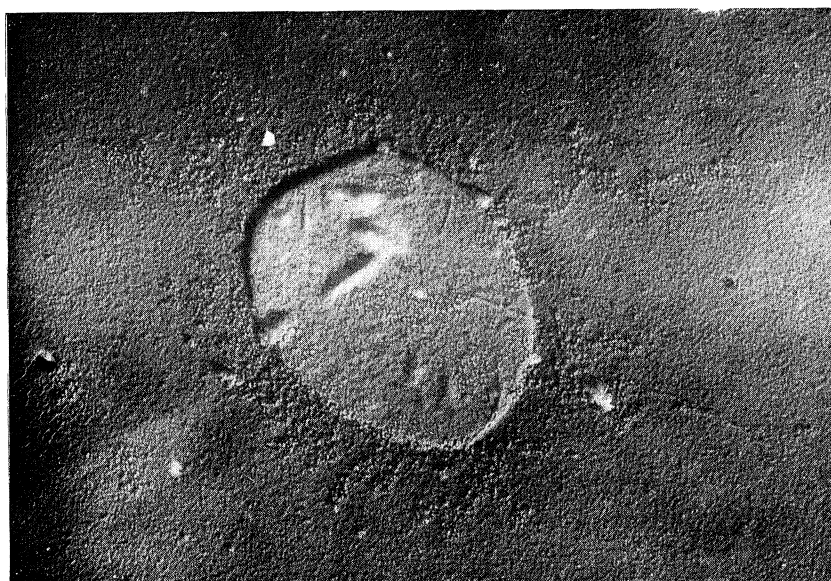


Figura 2. Microfotografía electrónica de formas L del A. tumefaciens. $\times 40.000$



*Figura 3. Microfotografía electrónica de paredes celulares del A. tumefaciens
× 18.000*



*Figura 4. Microfotografía electrónica de paredes de formas L del A. tumefaciens.
× 40.000*

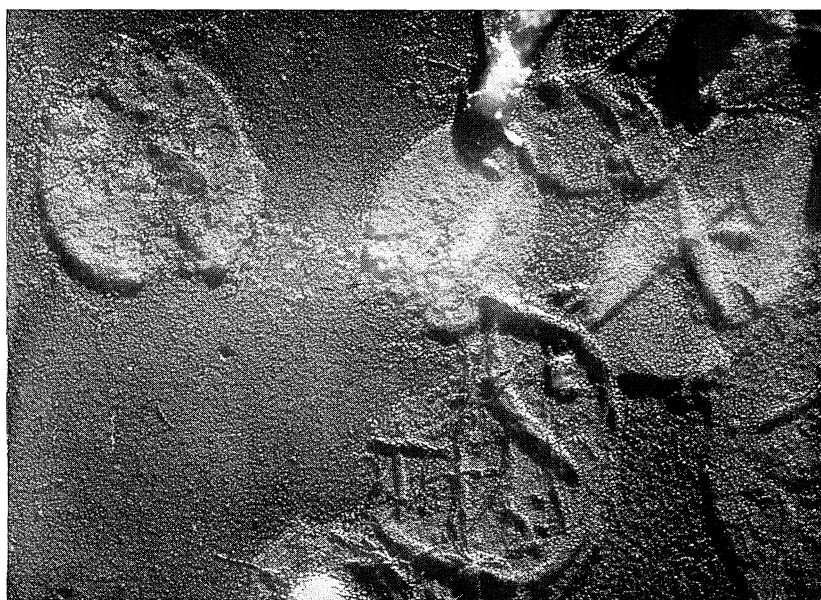


Figura 5. Microfotografía electrónica de paredes de formas L del A. tumefaciens.
× 30.000

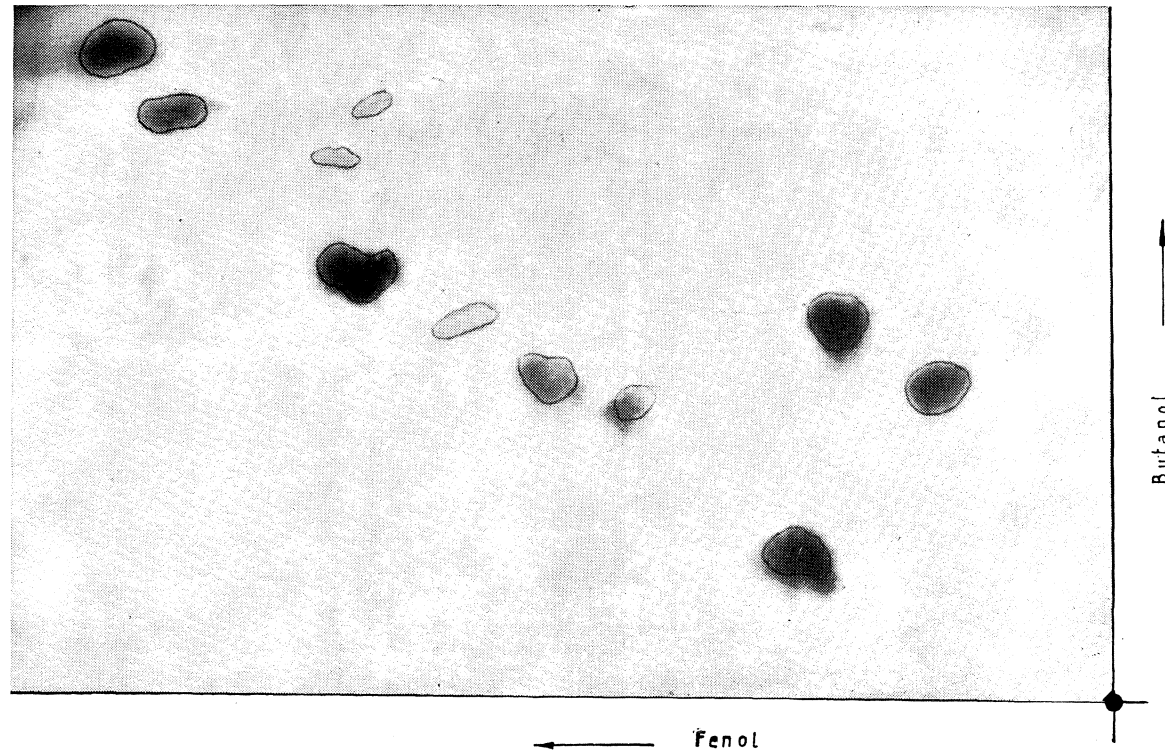


Figura 7. Cromatograma bidimensional de los aminoácidos del hidrolizado de la pared celular de la forma normal del *A. tumefaciens*

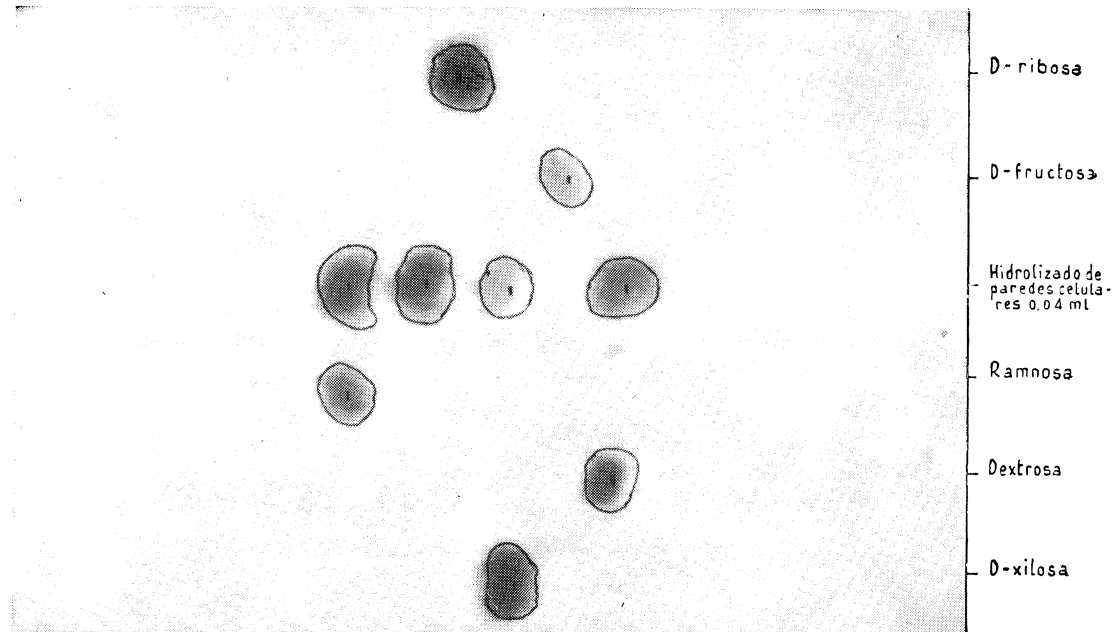
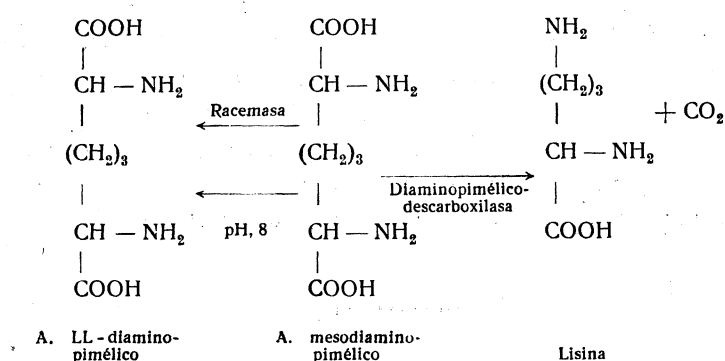


Figura 8. Cromatograma monodimensional de los monosacáridos del componente glucoproteico de la pared celular de la forma normal del *A. tumefaciens*

otros autores (1, 4-5, 9-10, 19) demuestran la presencia en extractos de *Escherichia coli* y *Aerobacter aerogenes* de dos enzimas, diaminopimelicodescarboxilasa y racemasa, capaces de actuar sobre la forma meso del ácido diaminopimélico transformándolo en lisina + anhídrido carbónico; esquemáticamente, se puede representar como sigue:



Fijándose en las anteriores reacciones de equilibrio, se puede pensar que el encontrar proporcionalmente menos cantidad de ácido diaminopimélico en las paredes de la forma L y, sin embargo, más lisina, sea debido a un desplazamiento del equilibrio hacia la producción de lisina, bien por pH más favorable, o por concentración más óptima de la enzima.

La presencia de ácido diaminopimélico en formas L inestables del *Proteus* ya fue comprobada por Kandler y Zehender (8), aunque no lo encontraron en la forma L fija o estable. Posteriormente, en 1962, Morrison y Weibull (12) encontraron ácido diaminopimélico en las formas estables del *Proteus*.

No descartamos la posibilidad de que exista algún otro aminoácido o aminoazúcar, bien en la forma normal o L, capaz de ser destruido durante la hidrólisis en medio ácido, como, por ejemplo, el triptofano. Salton (15) menciona en algunas paredes de bacterias gram-negativas cantidades de lípidos comprendidas entre el 22 y 11 por ciento, referidas a peso seco de paredes, mientras en éstas los aminoazúcares están en mucha menor concentración que en los organismos gram-positivos.

Respecto a los glúcidos, al observar el *cuadro 2*, vemos que las diferencias en composición son mucho más notables. En las paredes de la forma normal se encuentran cuatro monosacáridos: dos pen-

tosas, xilosa y ribosa, y dos hexosas, ramnosa y glucosa; las mayores concentraciones son de ribosa y ramnosa; esta última tiene 6 átomos de carbono (hexosa), pero químicamente podemos considerarla como una pentosa (metilpentosa). En la forma L fija encontramos solamente glucosa y ramnosa, con gran predominio de la primera.

Esta diferencia, tan patente en la composición química entre formas normales y formas L fijas en cuanto a hidratos de carbono se refiere, junto a su gran porcentaje, 70 por ciento, nos hace suponer que el papel que juegan estas sustancias en la constitución de la pared celular y, posiblemente, en la estructura responsable de su rigidez, es más importante de lo que hasta ahora se ha postulado por los investigadores dedicados a estas cuestiones (Salton, Work, etc.).

RESUMEN

Se realiza un estudio por microscopía electrónica y análisis químico comparativo de las paredes celulares obtenidas del *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe A.T. vid, y de sus formas L fijas. En el análisis químico del componente glucoproteico, señalamos la ausencia del aminoácido arginina en la pared de la forma L fija, y la menor proporción de ácido diaminopimélico y mayor de lisina respecto a la forma normal; en cuanto al componente hidrocarbonado, las diferencias son mayores: en la forma normal hallamos ramnosa, ribosa, glucosa y xilosa, mientras en la L fija, solamente glucosa y ramnosa, con gran predominio de la primera. Hacemos constar que esta diferencia, tan manifiesta en los glúcidos, puede significar un papel de éstos en la rigidez de la pared celular, diferencia a la que no se le ha dado la debida importancia por los anteriores investigadores.

SUMMARY

Amino acid and sugar composition in one strain A.T. vid of *Agrobacterium tumefaciens* and its fixed L form induced by glycine were studied. Paper chromatographic determinations revealed the presence of diamino pimelic acid in both forms and the complete absence of arginine in the L form.

In the sugar component the differences are greater, the normal form has rhamnose, ribose xilose and glucose whereas in the L form only was detected glucose and rhamnose. This difference perhaps accounts for a role of sugars in the rigid structure of the cell wall not yet understood.

BIBLIOGRAFIA

1. ANTIA, M.; HOARE, D. S., y WORK, E. 1957. *Biochem. J.*, 65, 448.
2. CRAMER, F. 1958. *Cromatografía sobre papel*. 3.^a edición.
3. CUMMIS, C. S., y HARRIS, H. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 173.
4. DEWEY, D. L.; HOARE, D. S., y WORK, E. 1954. *Biochem. J.*, 58, 523.
5. DEWEY, D. L., y WORK, E. 1952. *Nature*, 169, 533.
6. HOARE, D. S., y WORK, E. 1955. *Biochem. J.*, 61, 562.
7. HOARE, D. S., y WORK, E. 1957. *Biochem. J.*, 65, 441.
8. KANDLER, O., y ZEHENDER, C. 1957. *Z. Naturforsch.*, 12, 725.
9. MEADOW, P., y WORK, E. 1958. *Biochim. Biophys. Acta*, 28, 596.
10. MEADOW, P., y WORK, E. 1959. *Biochem. J.*, 72, 400.
11. MORGAN, W. T. J., y AMINOFF, D. 1948. *Nature*, 162, 579.
12. MORRISON, T. H., y WEIBULL, C. 1962. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 55, 475.
13. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. *Nature*, 195, 4.836.
14. RUBIO-HUERTOS, M., y DESJARDINS, P. R. 1956. *Microbiol. Españ.*, 9, 375.
15. SALTON, M. R. J. 1960. *Microbial cells walls*. Wiley, Londres-Nueva York.
16. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 19.
17. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 177.
18. WORK, E. 1951. *Biochem. J.*, 49, 17.
19. WORK, E. 1961. *J. Gen. Microbiol.*, 25, 167.

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

ESTUDIO DE LOS EFECTOS QUE PRODUCE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LAS BACTERIAS

VI. Alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos del *Bacillus cereus*

POR

EULALIA CABEZAS DE HERRERA y PILAR AZNAR

Stuy (4), estudiando la síntesis de los ácidos nucleicos del *Bacillus cereus* irradiado, afirma que después de irradiar con luz ultravioleta no hay inhibición del crecimiento de un cultivo, ni de la síntesis del ácido desoxirribonucleico durante un período de generación (cincuenta a sesenta minutos).

El tiempo de generación de una bacteria no es suficiente para conocer el metabolismo de los ácidos nucleicos, ya que éste varía en los diferentes estadios de su ciclo de crecimiento; por tanto, también será un tiempo insuficiente para conocer las posibles alteraciones producidas por efecto de la luz ultravioleta.

En el presente trabajo estudiamos el metabolismo de los ácidos nucleicos de una estirpe de *Bacillus cereus* a lo largo de cuarenta y ocho horas de cultivo y las alteraciones que sufre este metabolismo por la acción de la luz ultravioleta.

MATERIAL Y METODOS

Estirpe

Bacillus cereus, estirpe NRS de la colección «Ruth E. Gordon», conservada en agar-caldo a 4 °C.

Sus características de cultivo y bioquímicas están detalladas en un trabajo anterior (1).

Preparación de las muestras

Cultivamos en caldo común durante diecisiete horas, cultivos sincrónicos de *Bacillus cereus*. Con estos cultivos en plena fase logarítmica de crecimiento, inoculamos caldo común fresco y cultivamos a 37 °C.

A las dos, cuatro, cinco, seis, ocho, diez, doce, dieciséis, veinticuatro, veintiocho y cuarenta y ocho horas de cultivo, enfriamos a 4 °C, centrifugamos, lavamos con agua destilada a 4 °C, recogemos el sedimento y desecamos a baño María.

Irradiación

Disponemos de una cámara de luz ultravioleta con 4 lámparas de mercurio Sylvania de 15 W, que emiten una longitud de onda de 2.537 Å.

Del cultivo sincrónico en plena fase logarítmica de crecimiento, tomamos una determinada cantidad que diluimos hasta 10^8 células/1 cm³. En cada placa de Petri de 4,5 cm de diámetro ponemos 2 cm³ de la suspensión bacteriana anteriormente preparada. Las placas las disponemos en una bandeja, a 14,5 cm del foco de emisión.

Irradiamos durante sesenta minutos. Durante la irradiación, la cámara está movida por un agitador de vaivén de 113 r/m.

Después de irradiadas las bacterias, las sembramos en caldo común y cultivamos en oscuridad y a 37 °C durante cuatro, cinco, seis, ocho, diez, doce, dieciséis, veinticuatro, veintiocho, cuarenta y ocho y cincuenta y dos horas.

Transcurrido el tiempo de cultivo, enfriamos a 4 °C, centrifugamos, lavamos con agua destilada a 4 °C, recogemos el sedimento y desecamos a baño María.

Valoración de los ácidos nucleicos

La valoración de los ácidos nucleicos la efectuamos por el método de Schmidt y Thannhauser (3), valorando el fósforo por el de Fiske y Subbarow.

Como en el desarrollo de la coloración, pueden ejercer influencia algunos factores como el pH, componentes de los extractos, etc. No empleamos una curva patrón para todas las determinaciones, sino que para que sea más exacto, operamos según Melnik y Field (2), añadiendo a una parte alícuota del líquido que se analiza una proporción

exactamente conocida de fósforo. De esta manera hallamos el valor del coeficiente de extinción, debido al derivado coloreado procedente del fósforo, en cada caso.

Empleamos el fotómetro de Pulfrich-Zeiss, eligiendo el filtro más adecuado, que en nuestro caso es el S-75, según puede verse en la *figura 1*.

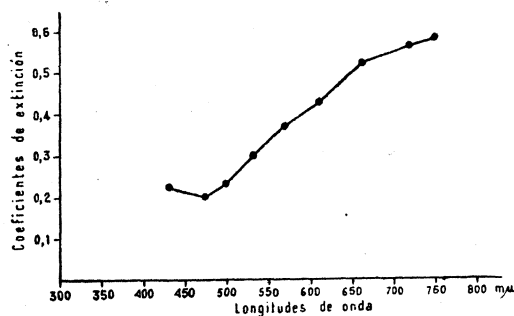


Figura 1

Comprobamos el cumplimiento de la ley de Beer, haciendo colorimetría con soluciones patrones de ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico con concentraciones que varían de 0,2-0,8 mg. En las *figuras 2-3* puede verse el satisfactorio ajuste de las rectas obtenidas entre estos límites de concentración.

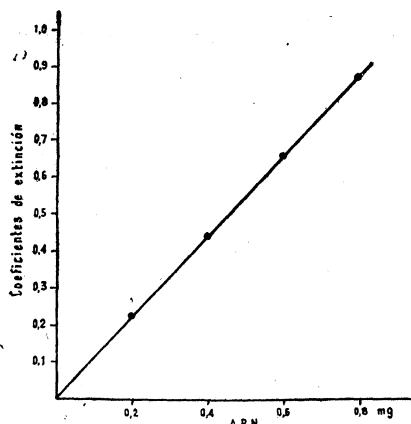


Figura 2

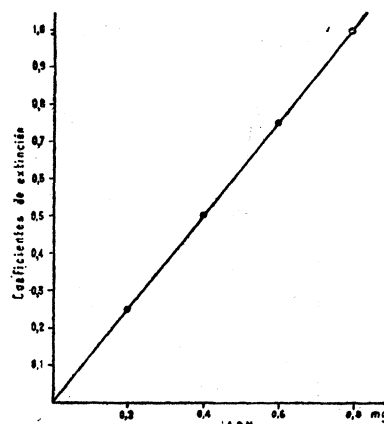


Figura 3

Hacemos determinación de materia seca de las muestras, para referir los resultados a tanto por ciento de la misma.

RESULTADOS

Si comparamos las curvas de metabolismo de los ácidos nucleicos de la estirpe normal e irradiada, vemos que en la estirpe normal (*figura 4*), el metabolismo de los dos ácidos nucleicos sigue una marcha

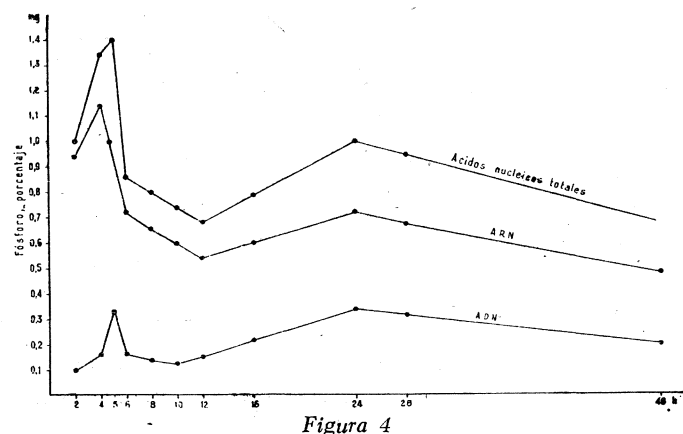


Figura 4

con los puntos máximos y mínimos de síntesis de una forma paralela entre ambos.

Sin embargo, en la estirpe irradiada (*figura 5*) el ácido ribonucleico

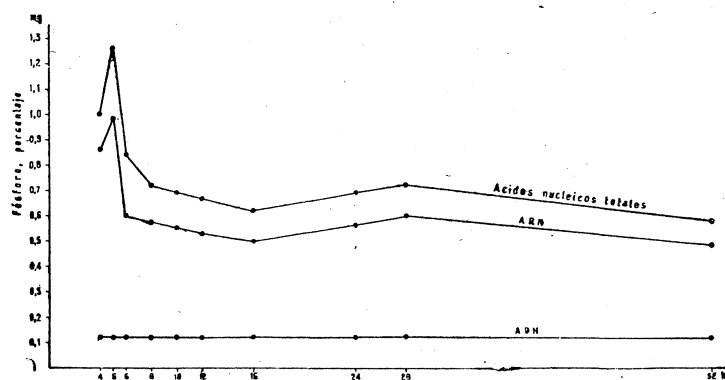


Figura 5

se comporta de una manera semejante al de la estirpe normal, mientras que la síntesis del ácido desoxirribonucleico es bloqueada casi en su totalidad desde el comienzo del crecimiento de la bacteria irradiada, por efecto de la luz ultravioleta.

RESUMEN

Estudiamos el metabolismo de los ácidos nucleicos de una estirpe de *Bacillus cereus* normal e irradiada durante cuarenta y ocho horas de cultivo.

Se observa que la luz ultravioleta empleada, de longitud de onda 2.537, Å, bloquea la síntesis del ácido desoxirribonucleico, casi en su totalidad. Continuando la síntesis del ácido ribonucleico su metabolismo normal.

SUMMARY

Irradiation with 2,537 Å UV light upon a *Bacillus cereus* strain suppressed almost completely DNA synthesis. Whereas RNA synthesis was not affected. The RNA and DNA metabolism of the normal *Bacillus* strain and the irradiated one was followed during 48 hours.

BIBLIOGRAFIA

1. CABEZAS DE HERRERA, E. 1961. Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. II. Microbiol. Españ., 14, 53-58.
2. MELNIK, D., y FIELD (Jr.), H. 1940. Determination of nicotinic acid in biological materials by means of photoelectric colorimetry. J. Biol. Chem., 134, 1-16.
3. SCHMIDT, C., y THANNHAUSER, S. J. 1945. J. Biol. Chem., 161, 83.
4. STUY, J. H. 1958. Nucleic acid synthesis in ultraviolet-irradiated *Bacillus cereus*. J. Bacteriol., 76, 668-69.

UNIVERSIDADES DE BUENOS AIRES, LA PLATA Y SUR
INSTITUTO DE BIOLOGIA MARINA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGIA

THE STUDY OF A TUBERCULOSIS-LIKE CONDITION IN NEON TETRAS (*HYPHESOBRYCON INNESI*)

I. Symptoms of the disease and preliminary description of the organism isolated

BY

D. A. CONROY

INTRODUCTION

During the course of the early months of 1962, several commercial aquaria in Buenos Aires began to experience mortalities in their stocks of neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*). Symptoms of a similar type were common to all such cases and the author was able to realise a study of the condition in an attempt to determine the cause. The present communication outlines the results of this study and gives some of the conclusions drawn therefrom.

MATERIALS AND EXPERIMENTAL METHODS

Specimens of diseased neon tetras were furnished by the «Gran Acuario Internacional» and «Casa Even S. R. L.», both of this city. On receipt in this Department, the fish were immediately placed into an aquarium whose water was maintained at a temperature of 25 °C by means of an electrically operated thermostat.

Pronounced emaciation was seen in all of the specimens and the majority showed in addition a loss of colour in the dorsal fin region, other parts of the body appearing normal. In many cases, the dorsal

fin region was notably ulcerated (*figure 1*). There was a loss of appetite and pronounced sluggishness of movement. Moderate exophthalmos was present in a few fish.

Following the death of two specimens within three days of receipt, it was decided to sacrifice one fish having typical symptoms and to perform an autopsy on the same. On opening this fish it was seen that the kidney was of a «mushy» consistency, and that the liver bore a number of whitish coloured blotches. Smears were prepared from both of these organs and stained by Gram's stain and the modified acid fast staining recommended by Bullock (3). Material was subsequently cultivated onto Lowenstein-Jensen medium, which same was incubated at room temperature (approximately 18 °C).

When suitable growth had been obtained on sub-cultures, an emulsion of the organism was prepared in sterile frog Ringer solution. In accordance with the technique used by Besse (2) 0.1 ml of this emulsion was inoculated via the intra-peritoneal route into two gouramis (*Trichogaster trichopterus*) and two goldfish (*Carassius auratus*). The former were maintained at 25 °C, and the latter at a temperature ranging from 15°-18 °C. No specimens of neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*) were obtainable for pathogenicity studies.

Duplicate cultures of the bacterium were incubated in the dark and in the light, in order to determine what effect this had upon the production of pigment. Similarly, cultures were placed in the incubator at 37 °C to find whether growth occurred at that temperature.

RESULTS

Examination of the smears from the kidney and liver showed the presence of large numbers of acid fast bacteria. The majority of these appeared as cocco-bacilli or short rods, often occurring in pairs. It was noted during the preparation of the smears from cultures that the organism was extremely «waxy».

On Lowenstein-Jensen medium, initial growth was obtained after 21 days at room temperature. With continued sub-culturing however, it has been found that an appreciable growth may be obtained after 7 days. The colour of the colonies is yellowish-orange, becoming deep orange after prolonged incubation. At first, the colonies are smooth and



Figura 1

moist, but they rapidly become dry and wrinkled. The orange pigmentation is produced both in the light and in the dark, and growth occurs at 37 °C and 25 °C.

The two gouramis inoculated with the emulsion died after 8 and 36 days respectively, both fish showing symptoms of emaciation. In the first one, some ulceration of the caudal fin area and peduncle was observed. No pathogenic action was seen with the goldfish.

Intensive studies are currently in progress, in collaboration with Dr. Valdés of this Department, to determine more precisely the characteristics of the organism isolated. It is hoped that the results of these studies will form the basis of a future publication.

DISCUSSION

In the description of fish tuberculosis given by van Duijn (4) loss of appetite, sluggishness and progressive emaciation are listed as symptoms indicative of this disease. The presence of such symptoms in all of the diseased fish examined and the subsequent isolation of an acid fast bacterium from the body organs tend to support the hypothesis that the condition herein described is of a tuberculosis-like nature.

The occurrence of tuberculosis in tropical fish has been reported in the literature on various occasions. Baker and Hagan (1) described the disease in Mexican platyfish (*Platypoecilus maculatus*), the fish showing symptoms of emaciation, sluggishness and loss of colour. Ulcers were present in some cases around the mouth and in the dorsal fin region. An acid fast bacterium was isolated from the liver, ulcer, spleen, gills and other organs, and cultivated on glycerol-egg medium at 25 °C. In the presence of light an orange pigment was produced, but the cultures remained cream-coloured in the dark. Three weeks were required for the initial production of growth. The organism failed to grow at 37 °C and was non-pathogenic to goldfish. The name *Mycobacterium platypoecilis* was given to this organism.

Besse (2) described a case of tuberculosis in paradise fish (*Macropodus opercularis*), and isolated *Mycobacterium anabanti* from the diseased fish. Whilst growth was obtained in the temperature range of 12°-33 °C, the optimum temperature was considered to be 25 °C. The

colonies were cream to orange in colour, and the organism was pathogenic to rainbow perch (*Eupomotis gibbosus*).

The first detailed description of tuberculosis in neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*) was made by Nigrelli (7) for fish maintained in the New York Aquarium. A study of the organism isolated in that case has recently been made by Ross and Brancato (11), by whom it has been classified as a strain of *Mycobacterium fortuitum*. This species has been fully characterised by Gordon and Smith (6). It is perhaps of interest to note that among the various cultures of mycobacteria studied by Gordon and Smith, and subsequently classified as *Myco. fortuitum*, were included strains isolated from different fishes, terrapins and other poikilotherms. Growth of this species is obtained at 37 °C, and it is worthy of mention that strain 9-21H (7,11) and the organism here under consideration also grow at that temperature.

It is not possible at this early stage to attempt a detailed classification of the isolate, but on a basis of the studies so far realised, it seems likely that it is a species of *Mycobacterium*.

Interest in fish tuberculosis has been stimulated in recent years by the findings of workers in North America that acid fast bacteria are of wide occurrence among salmon, trout and other commercially important salmonid coldwater fishes (5, 10, 12-13). Nigrelli (8) has also drawn attention to the fact that the incidence of tuberculosis in fish is greater than was previously believed.

The neon tetra, an attractive fish widely sought after by aquarium enthusiasts, is indigenous to the River Amazon and its basin. The diseased specimens obtained in this instance did in fact form part of a shipment received in Buenos Aires directly from Brasil, the point of origin being the Labatinga-Tabatinga region of the Amazon basin. Reports (as yet unconfirmed) which have reached the author from fish dealers recently returned from Brasil, suggest that there have been abnormal losses in neon tetras in that region during the past summer due to a disease the nature of which has not been established very clearly. Nigrelli (9) has stated that the presence of fish tuberculosis in Argentina is quite possible, but it is believed that this description is the first instance wherein the organism has been isolated in pure culture in this country. A culture has been placed in the Argentine National Type Culture of Bacteria, and further cultures have been forwarded to specialists in other countries for identification.

ACKNOWLEDGMENTS

The author wishes to express his gratitude to Prof. Dr. Luis C. Verna, of this Department, for his interest in the work described. Likewise, he wishes to thank Miss Haydée di Palma («Gran Acuario Internacional») and Mr. López («Casa Even S. R. L.») for the provision of diseased fish and information on the outbreak described herein.

Drs. S. F. Snieszko (U. S. Fish and Wildlife Service, Eastern Fish Disease Laboratory, Kearneysville, U. S. A.), R. R. Rucker (U. S. Fish and Wildlife Service, Western Fish Disease Laboratory, Washington, U. S. A.), and R. F. Nigrelli (Pathologist, New York Aquarium, New York, U. S. A.) kindly provided a number of interesting reprints which have enabled the author to appreciate the extent of fish tuberculosis in different species.

SUMMARY

A tuberculosis-like condition of neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*) is described. The diseased fish showed symptoms of emaciation, sluggishness and loss of appetite. The dorsal fin region typically showed loss of colour, and in many cases was ulcerated.

An acid fast bacterium was isolated in cultures from the liver and kidney. This organism produces a yellowish-orange pigmentation on Lowenstein-Jensen medium, and is capable of growth at 25 °C and 37 °C. It is considered possible that the organism is a species of *Mycobacterium*, and it is pathogenic to gouramis (*Trichogaster trichopterus*) but not to goldfish (*Carassius auratus*).

RESUMEN

Se describe una condición parecida a la tuberculosis en neón (*Hyphessobrycon innesi*). Los peces enfermos mostraron síntomas de enflaquecimiento, flojedad y pérdida de apetito. En la región de la aleta dorsal había una pérdida de color típica y en muchos casos estaba también ulcerada.

Se aisló en cultivos del hígado y riñón una bacteria ácidorresistente.

Este organismo produce una pigmentación amarillo-anaranjada en medio de Lowenstein-Jensen y es capaz de desarrollo a los 25 °C y 37 °C. Parece posible que el organismo sea una especie de *Mycobacterium*, y es patógeno para el gurami azul (*Trichogaster trichopterus*), pero no para el dorado (*Carassius auratus*).

REFERENCES

1. BAKER, J. A., and HAGAN, W. A. 1942. Tuberculosis of Mexican platyfish (*Piatypoecilis maculatus*). J. Infectious Diseases, 70, 248-52.
2. BESSE, P. 1949. Epizootie a bacilles acido-résistants chez de poisson exotique. Bull. Acad. Vét. France, 23, 151-54.
3. BULLOCK, G. L. 1961. A schematic outline for the presumptive identification of bacterial diseases of fish. Progressive Fish Culturist, 23, 147-51.
4. DUIJN, C. VAN. 1956. Diseases of fishes. 1st. edition, Water Life Ltd., London, 109-10.
5. EARP, B. J.; ELLIS, C. H., and ORDAL, E. S. 1953. Kidney disease in young salmon. U. S. Fish Wildlife Serv., Spec. Sci. Rept., Fisheries Ser. No. 1.
6. GORDON, R. E., and SMITH, M. M. 1955. Rapidly growing, acid fast bacteria. II. Species description of *Mycobacterium fortuitum* Cruz. J. Bacteriol., 69, 502-07.
7. NIGRELLI, R. F. 1953. Two diseases of the neon stet-tetra *Hyphessobrycon innesi* (A) Tuberculosis (B) Microsporidiosis. Aquarium J., 24, 203-08.
8. NIGRELLI, R. F. 1961. Fish Diseases. Merck Veterinary Manual, 2nd. edition, 1407-14.
9. NIGRELLI, R. F. 1962. Personal communication.
10. ROSS, A. J. 1960. *Mycobacterium salmoniphilum* sp. nov. from salmonid fishes. Am. Rev. Respiratory Diseases, 81, 241-50.
11. ROSS, A. J., and BRANCATO, F. P. 1959. *Mycobacterium fortuitum* Cruz from the tropical fish *Hyphessobrycon innesi*. J. Bacteriol., 78, 392-95.
12. ROSS, A. J.; EARP, B. J., and WOOD, J. W. 1959. Mycobacterial infections in adult salmon and steelhead trout returning to the Columbia river basin and other areas in 1957. U. S. Fish Wildlife Serv., Spec. Sci. Rept. Fisheries Ser. No. 332.
13. WOOD, J. W., and ORDAL, E. J. 1958. Tuberculosis in Pacific salmon and steelhead trout. Research Briefs, 25.

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

GIGANTISMO Y VARIACION EN LA DOTACION DE CIRROS EN *STYLONYCHIA*

POR

PILAR ALONSO y J. PEREZ-SILVA

El fenómeno del gigantismo es bastante frecuente entre los protozoos. Se ha descrito en los géneros *Oxytricha* (2) y *Blepharisma* (3, 10) relacionándolo con la aparición de formas caníbales, y en diversos suctores (7) interpretándolo como consecuencia de una nutrición deficiente. Un marcado canibalismo ha sido observado en *Tetrahymena vorax* (6) y posteriormente se ha relacionado con formas macrostómicas y microstómicas (1).

El canibalismo en *Stylonychia* ha sido descrito por Giese y Alden (4), quienes hicieron un estudio de dicho fenómeno en relación con la dieta alimenticia.

En el presente trabajo exponemos nuestras observaciones acerca de la variación del número de cirros en las formas caníbales gigantes que aparecen en cultivos clónicos de una especie de *Stylonychia*.

MATERIAL Y METODOS

La especie utilizada en este estudio fue aislada por nosotros de una muestra de agua estancada recogida cerca de Chamartín (Madrid). Desde hace dos años venimos cultivando esta especie en medio de infusión de suelo mezclado a partes iguales con medio de infusión de polvo de lechuga, o también en medio de infusión de suelo al que se añade como alimento una suspensión de células lavadas de *Spirillum*.

Para la obtención de cultivos clónicos separamos un solo individuo en una gota de medio de cultivo, colocada en un portaobjetos excavado, y después de dos o tres días de incubación en cámara húmeda, trasladamos los individuos resultantes a tazas de Boveri con medio de cultivo fresco. Realizamos estas operaciones valiéndonos de micropipetas estériles.

Para la tinción de núcleos empleamos el método de Feulgen, utilizando como fijador el líquido de Sanfelice e hidrolizando durante ocho minutos a 60 °C.

Teñimos los cirros empleando una modificación del método de Turner (8).

RESULTADOS

En los cultivos clónicos, desde los tres a los seis días, el tamaño de los individuos es bastante uniforme; varía de 80-100 μ en longitud y de 40-60 μ en anchura. Pero en cultivos más viejos comienzan a aparecer formas gigantes, que llegan a alcanzar las 175 μ de longitud por 98 μ de anchura, y formas más pequeñas, de unas 45 μ de longitud por 15 μ de anchura. Estas últimas sirven de alimento a las formas gigantes, en cuyo interior se pueden observar (*figura 1*), generalmente, de 8-15 individuos pequeños.

Este fenómeno del gigantismo no se limita a un mero aumento de volumen del citoplasma debido a la cantidad de alimento ingerido, sino que, según hemos comprobado, lleva consigo otros cambios más sustanciales, como son el aumento en el volumen del macronúcleo y el aumento en el número de cirros.

Considerando como forma tipo los individuos de las fases iniciales del cultivo (cuya longitud está comprendida entre las 80 y 100 μ), podemos establecer como dotación normal de cirros (*figura 2*) la siguiente:

- 8 c. frontales
- 5 c. ventrales
- 5 c. transversales
- 20-30 c. marginales derechos
- 15-20 c. marginales izquierdos
- 3 sedas caudales

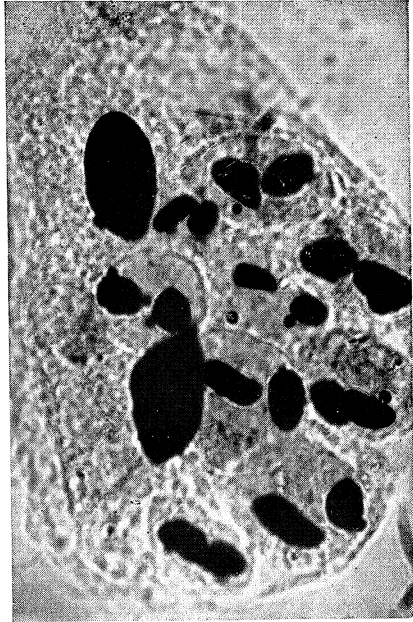


Figura 1. *Stylonychia* sp. Forma gigante con 9 individuos pequeños en su interior. Reacción nuclear de Feulgen



Figura 3. *Stylonychia* sp. Fotomicrografía del campo frontal de una forma normal. $\times 1.500$

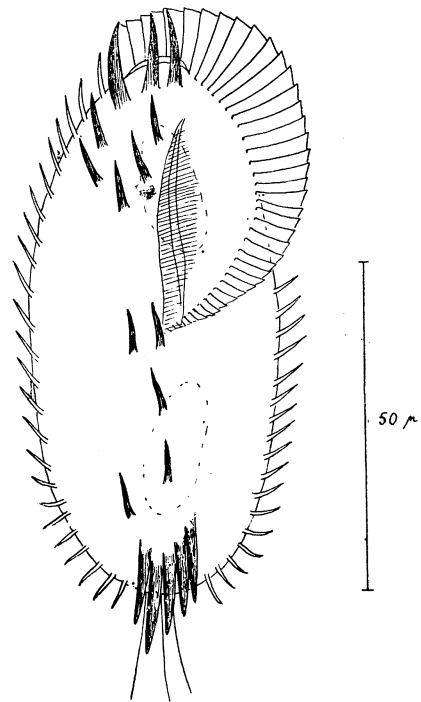


Figura 2. *Stylonychia* sp. Representación esquemática de la dotación de cirros de la forma normal



Figura 4. Stylonychia sp. Fotomicrografía de la parte posterior de una forma normal. $\times 1.500$



Figura 5. Stylonychia sp. Fotomicrografía del campo frontal de una forma gigante. $\times 1.000$



Figura 6. Stylonychia sp. Fotomicrografía de la parte posterior de una forma gigante. $\times 1.000$

Las figuras 3-4 son fotomicrografías de la parte anterior y posterior, respectivamente, de una forma normal.

En las formas más pequeñas no hemos observado variación en cuanto a la dotación de cirros, mientras que en los individuos gigantes, que aparecen en el mismo clon, se observa un aumento en el número de los cirros frontales y ventrales; éstos suelen ser siete, mientras que los frontales pueden ser, según nuestras observaciones, de nueve a trece. Las figuras 5-6 son fotomicrografías de la parte anterior y posterior, respectivamente, de una forma gigante.

En la figura 7 se representan los cirros frontales, ventrales y transversales de una forma normal (reconstruida a partir de las figuras 3-4) y de un individuo gigante (reconstruido a partir de las figuras 5-6).

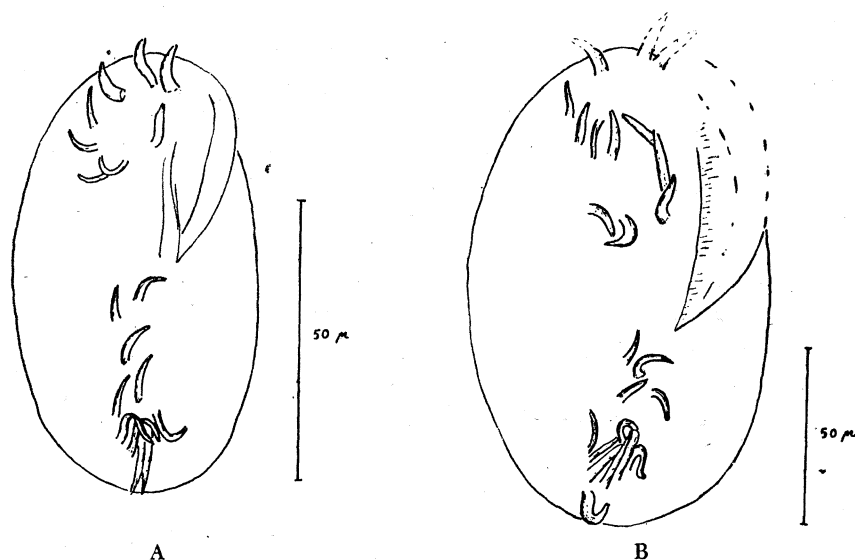


Figura 7. *Stylonychia* sp. A: Forma normal; B: Forma gigante

DISCUSION

El único estudio detenido que conocemos acerca del gigantismo en *Stylonychia* es el publicado en 1938 por Giese y Alden (4). Estos autores describen el hecho de que las formas gigantes presentan cirros de mayor tamaño que las formas normales, pero no mencionan variación alguna en el número de cirros.

Nosotros, en cambio, no hemos observado diferencias en cuanto al tamaño de estas organelas, sino que, como ya hemos señalado, hemos encontrado un aumento en el número de cirros frontales y ventrales. Para poder excluir la posibilidad de que este aumento en número sea debido a la aparición de cirros supernumerarios, que tiene lugar durante la reorganización de las organelas externas concomitante con la división celular (9), hemos hecho nuestras observaciones en individuos en los que no se aprecia ningún indicio de división celular.

No cabe duda de que esta variación en la dotación de cirros repercute en la taxonomía de los oxitríquidos. Al intentar identificar, siguiendo las claves de Kahl (5), los individuos pequeños de esta especie de *Stylonychia*, hemos visto que la especie más próxima es *St. muscorum* Kahl. Ahora bien, la forma gigante no coincide en absoluto con dicha especie, sino que se asemeja por su tamaño y dotación de cirros a *St. grandis* Maupas, concretamente a la forma que presenta sólo dos macronúcleos, citada por Kahl (5).

A la vista de nuestros resultados, sugerimos la posibilidad de que la forma que considera Kahl como una variante de *Stylonychia grandis* Maupas sea realmente una forma gigante de *St. muscorum* o de cualquier otra especie que presente el mismo fenómeno descrito por nosotros. Ello nos lleva a la consecuencia de que para el estudio taxonómico de los hipotricos es necesario el empleo de cultivos clónicos, ya que es el único modo de averiguar si la dotación de cirros de una especie dada es un carácter fijo o variable, y de establecer, en este caso, los límites de variabilidad.

RESUMEN

En cultivos clónicos de una especie de *Stylonychia* (muy parecida a *St. muscorum* Kahl) se describe la aparición de formas caníbales gigantes, cuya dotación de cirros es diferente a la de las formas de tamaño normal. Se discute este hecho en relación con la taxonomía de los ciliados hipotricos.

SUMMARY

The development of cannibal giant forms in clonic cultures of a species of *Stylonychia* (very similar to *St. muscorum* Kahl) is described. The cirri equipment of the giant forms is different to that of the normal

size forms. A discussion of this fact in relation to the taxonomy of the hypotrichous ciliates is given.

BIBLIOGRAFIA

1. CORLISS, J. O. 1953. Comparative studies on Holotrichous Ciliates in the *Colpidium-Glaucoma-Leucophris-Tetrahymena* Group. II. Morphology, life cycles and systematic status of strains in pure culture. *Parasitology*, 43, 49-87.
2. DAWSON, J. A. 1919. An experimental study of an amiconucleate *Oxytricha*. *J. Exptl. Zool.*, 29, 473-513.
3. GIESE, A. C. 1938. Cannibalism and gigantism in *Blepharisma*. *Trans. Am. Microscop. Soc.*, 57, 245-55.
4. GIESE, A. C., y ALDEN, R. H. 1938. Cannibalism and giant formation in *Stylonychia*. *J. Exptl. Zool.*, 78, 117-34.
5. KÄHL, A. 1932. Die Tierwelt Deutschlands. Urtiere oder Protozoa. I. Wimper-tiere oder Ciliata. Gustav Fischer, Jena.
6. KIDDER, G. W.; LILLY, D. M., y CLAFF, C. L. 1940. Growth studies on Ciliates. IV. The influence of food on the structure and growth of *Glaucoma vorax* sp. nov. *Biol. Bull.*, 78, 9-23.
7. LILLY, D. M. 1953. The nutrition of carnivorous protozoa. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 56, 910-20.
8. PÉREZ SILVA, J., y RAMÍREZ-MONTESINOS, P. 1962. Un método de coloración de las organelas superficiales de Ciliados Hipotricos. XXVI Congreso Luso-Español para el Progreso de las Ciencias, Oporto.
9. RAMÍREZ-MONTESINOS, P., y PÉREZ SILVA, J. 1962. División celular en *Oxytricha* sp. (Ciliados Holotricos). Reunión Científica de Microbiólogos Españoles, Madrid.
10. TULCHIN, N., y HIRSHFIELD, H. I. 1962. Nucleic acid digestion and macronuclear form in cannibal *Blepharisma*, New York University Strain. *J. Protozool.*, 9, 200-03.

UNIVERSIDADES DE BUENOS AIRES, LA PLATA Y SUR
INSTITUTO DE BIOLOGIA MARINA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGIA

OTRAS OBSERVACIONES SOBRE LA PUTREFACCION DE LA ALETA CAUDAL EN LOS PECES

POR

D. A. CONROY

INTRODUCCION

En unos trabajos anteriores, el autor describió casos experimentales y naturales de putrefacción de la aleta caudal en peces provocados por especies de *Aeromonas* (1). Posteriormente, ha sido posible ampliar este estudio para incluir otro caso de la misma enfermedad. Como los resultados obtenidos son de mucho interés en relación con los trabajos anteriores, se presentan en esta comunicación.

MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES

Como en los casos anteriores, los peces enfermos fueron dorados (*Carassius auratus*) y se recibieron tres ejemplares para su examen. Todos mostraron síntomas típicos de putrefacción de la aleta caudal y tenían, además, pequeñas Petequias sobre el cuerpo, y manchas rojas alrededor de la boca. Uno de los peces se sacrificó, y después de limpiar cuidadosamente la superficie de la aleta caudal con lugol (2), se cortó asépticamente un trozo del tejido afectado, el cual se introdujo en un tubo de caldo glucosado. Al abrir el pez, se sacó también una pequeña porción del hígado, colocándola en caldo glucosado. Los dos cultivos fueron mantenidos a la temperatura ambiente durante cuarenta y ocho horas, una vez sembrados en estrías sobre placas de agar. Las propiedades bioquímicas y otros caracteres del organismo fueron de-

terminados de acuerdo con técnicas bacteriológicas bien conocidas. Los ensayos de patogenicidad se hicieron con dorados sanos, inoculando en cada uno 0,2 ml de un cultivo en caldo nutritivo, por vía intraperitoneal.

Los peces enfermos restantes recibieron una sola inyección de kanamicina por vía intraperitoneal, a una concentración de 20 γ /1 g de peso.

RESULTADOS

Fue aislado del hígado y de la aleta caudal un sólo organismo, presentando ambos cultivos propiedades idénticas. Este organismo es un bastoncito gram-negativo y móvil, produciendo ácido (pero no gas) con la sacarosa, y sin acción con lactosa, maltosa, manitol, dextrosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y dulcitol. Licúa rápidamente la gelatina; no produce indol, y utiliza citrato como única fuente de carbono. En agar-sangre preparado con sangre humana, se observa la producción de una fuerte beta-hemólisis. Parece posible que el organismo sea un pseudomonádido, pero la identidad no se conoce todavía con gran certeza.

Los dos peces sanos inoculados con un cultivo de la bacteria presentaron manchas rojas en las aletas caudal y dorsal, y pequeñas petequias en el cuerpo. Estos síntomas desaparecieron después de cuarenta y ocho horas, sin haber desarrollado el aspecto típico de la verdadera putrefacción de las aletas.

Los peces tratados con kanamicina respondieron en forma rápida a la acción del antibiótico y todos los síntomas presentados por los animales enfermos habían desaparecido dentro de las treinta y seis horas. Las partes de la aleta caudal que mostraron putrefacción llegaron a la normalidad, regenerándose los tejidos.

DISCUSION

La presencia de hemorragias en la aleta caudal, cuerpo y alrededor de la boca, junto con el aislamiento de una bacteria de la aleta caudal e hígado en cultivo puro, es una clara indicación de que la condición aquí descrita tenía la naturaleza de una infección sistémica. Es de interés notar que las hemorragias provocadas en los peces fueron

transitorias y por eso debe buscarse alguna explicación a la intensidad de los síntomas observados en los peces enfermos. Estos componían parte de un lote recibido de un acuario comercial bonaerense y los síntomas aparecieron por primera vez unas veinticuatro horas después de haber recibido los peces. Se sabe que varios factores adversos influyen en la susceptibilidad de los peces a la putrefacción de las aletas; entre los más importantes se incluyen bajas temperaturas prolongadas, agua y acuarios sucios (3) y falta de alimento (5). Condiciones como éstas pueden ocurrir durante el transporte de grandes cantidades de peces, los cuales son mantenidos juntos, como en el presente caso, durante treinta horas, sin alimento, en condiciones propicias para el desarrollo de una infección. Así pueden desarrollarse los agentes de bajo poder patógeno (4), capaces de provocar diversos tipos de epizootia cuando las condiciones son favorables para su propagación. Se considera, pues, que el presente caso es uno en el cual un agente de bajo poder patógeno provocó una infección sistemática caracterizada por la putrefacción de la aleta caudal y petequias. La inoculación de la bacteria aislada en peces sanos, aunque produciendo síntomas, no provocó la enfermedad, debido a la falta de los factores arriba mencionados.

Por otra parte, es de gran interés notar que este caso respondió rápidamente al tratamiento con kanamicina, comprobándose que este antibiótico es un agente terapéutico muy eficaz para enfermedades de este tipo.

RESUMEN

Se describe un caso de putrefacción de la aleta caudal en dorados. Fue aislada una bacteria móvil y gram-negativa del hígado y de la aleta caudal. Los caracteres del organismo determinados hasta ahora sugieren que pueda ser un pseudomonádido. Se produjeron síntomas de petequias y manchas rojas de las aletas al inocular la bacteria en peces sanos, pero dichos síntomas fueron transitorios. Se considera que los principales factores desencadenantes fueron la falta de buena alimentación y los cambios de temperatura durante el transporte, los cuales hicieron que la bacteria actuara como patógeno. Los peces enfermos fueron curados rápidamente mediante la inyección de kanamicina por vía intraperitoneal.

AGRADECIMIENTO

El autor agradece al Prof. Dr. Luis C. Verna la ayuda prestada en este trabajo.

SUMMARY

A study of a case of tail rot in goldfish is described. A motile gram-negative bacterium was isolated in pure culture from the tail and the liver of infected fish, and the characteristics of the organism studied to date suggest that it may be a pseudomonad. Symptoms of petechiae and red spots on the fins were produced as a result of the inoculation of this bacterium into healthy goldfish, but these were of a transient nature. It is considered possible that the predisposing factors leading to the outbreak of the condition were insufficient food, overcrowding and unsuitable temperature during transport, which same permitted the organism to take on a pathogenic role in causing the disease described. The sick fish were rapidly cured by the administration of a single injection of kanamycin.

BIBLIOGRAFIA

1. CONROY, D. A. 1961. La producción de la putrefacción de la aleta caudal en los peces por la acción de *Aeromonas punctata*. Microbiol., Españ., 14, 233-38.
2. CONROY, D. A. 1961. Las causas de un brote de putrefacción de la aleta caudal en peces y su tratamiento con kanamicina. Microbiol., Españ., 14, 239-46.
3. DUIJN, C. VAN. 1956. Diseases of fishes, 95-97. Water Life Ltd., Londres.
4. JACOBS, D. L. 1955. An introduction to diseases of aquarium fishes. Southeastern Vet., 6, 16-21.
5. WOLF, L. E. 1938. Effect of amount of food on fin condition in fingerling trout. Progressive Fish Culturist, 39, 16-18.

CURSO SOBRE MICROBIOLOGIA DEL SUELO

En el Centro de Investigaciones Biológicas de la División de Ciencias del C. S. I. C., y durante los meses de enero-marzo, se ha celebrado este curso, desarrollado por el Prof. H. Johnston, de Ohio (Estados Unidos de América del Norte), con la colaboración de los Dres. Isabel García Acha y Julio Rodríguez Villanueva, de la Sección de Bioquímica y Microbiología del Suelo del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Finalizado el curso, los asistentes, titulados universitarios y de escuelas técnicas, recibieron los diplomas correspondientes de manos del Director del Instituto, Prof. Lorenzo Vilas.

CONFERENCIAS DE LOS PROFS. LEPINE Y POCHON

También en el Centro de Investigaciones Biológicas, pronunció una conferencia—organizada por el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología—, sobre «Estudio de la infección vírica en el microscopio electrónico», el Prof. Pierre Lépine, Jefe del Servicio de Virus del Instituto «Pasteur», de París, el día 13 de marzo.

Posteriormente, en los días 20-22, el Jefe del Servicio de Microbiología del Suelo del mismo Instituto, Prof. Jacques Pochon, dictó tres conferencias, con los títulos siguientes:

«Interacciones entre los microorganismos del suelo y las plantas».

«La fertilidad en relación con la humificación y la conservación del suelo».

«Estado actual del problema de la fermentación de la celulosa».

CURSO SOBRE MICROBIOLOGIA DEL SUELO

En el Centro de Investigaciones Biológicas de la División de Ciencias del C. S. I. C., y durante los meses de enero-marzo, se ha celebrado este curso, desarrollado por el Prof. H. Johnston, de Ohio (Estados Unidos de América del Norte), con la colaboración de los Dres. Isabel García Acha y Julio Rodríguez Villanueva, de la Sección de Bioquímica y Microbiología del Suelo del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Finalizado el curso, los asistentes, titulados universitarios y de escuelas técnicas, recibieron los diplomas correspondientes de manos del Director del Instituto, Prof. Lorenzo Vilas.

CONFERENCIAS DE LOS PROFS. LEPINE Y POCHON

También en el Centro de Investigaciones Biológicas, pronunció una conferencia—organizada por el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología—, sobre «Estudio de la infección vírica en el microscopio electrónico», el Prof. Pierre Lépine, Jefe del Servicio de Virus del Instituto «Pasteur», de París, el día 13 de marzo.

Posteriormente, en los días 20-22, el Jefe del Servicio de Microbiología del Suelo del mismo Instituto, Prof. Jacques Pochon, dictó tres conferencias, con los títulos siguientes:

«Interacciones entre los microorganismos del suelo y las plantas».

«La fertilidad en relación con la humificación y la conservación del suelo».

«Estado actual del problema de la fermentación de la celulosa».

CONFERENCIAS DEL DR. RUBIO

Dentro del ciclo de conferencias organizado por el Centro de Orientación Didáctica de Enseñanza Media para los Catedráticos de Ciencias Naturales, el Dr. Miguel Rubio Huertos desarrolló el tema «Progresos recientes en la biología de los virus», en el salón de actos del Instituto «Ramiro de Maeztu», de Madrid, el 23 de marzo.

El día 30, e invitado por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Murcia, el Dr. Rubio Huertos pronunció en dicho Colegio una conferencia acerca de «Importancia científica y económica de los virus causantes de las enfermedades de las plantas».

PREMIO «ALONSO DE HERRERA»

Ha sido concedido el Premio «Alonso de Herrera» 1962, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, al Dr. Román De Vicente Jordana, Investigador Científico del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, por su trabajo «Método ultrasensible para investigar las causas de adsorción en la filtración de partículas mínimas».

AYUDA DE INVESTIGACION

La Comisaría de Protección Escolar del Ministerio de Educación Nacional ha concedido al Dr. Julio Rodríguez Villanueva, Jefe de la Sección de Bioquímica y Microbiología del Suelo del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, una ayuda de investigación para realizar durante dos años un trabajo en equipo sobre actividades líticas de enzimas producidas por actinomicetos.

CONFERENCIAS DEL DR. RUBIO

Dentro del ciclo de conferencias organizado por el Centro de Orientación Didáctica de Enseñanza Media para los Catedráticos de Ciencias Naturales, el Dr. Miguel Rubio Huertos desarrolló el tema «Progresos recientes en la biología de los virus», en el salón de actos del Instituto «Ramiro de Maeztu», de Madrid, el 23 de marzo.

El día 30, e invitado por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Murcia, el Dr. Rubio Huertos pronunció en dicho Colegio una conferencia acerca de «Importancia científica y económica de los virus causantes de las enfermedades de las plantas».

PREMIO «ALONSO DE HERRERA»

Ha sido concedido el Premio «Alonso de Herrera» 1962, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, al Dr. Román De Vicente Jordana, Investigador Científico del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, por su trabajo «Método ultrasensible para investigar las causas de adsorción en la filtración de partículas mínimas».

AYUDA DE INVESTIGACION

La Comisaría de Protección Escolar del Ministerio de Educación Nacional ha concedido al Dr. Julio Rodríguez Villanueva, Jefe de la Sección de Bioquímica y Microbiología del Suelo del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, una ayuda de investigación para realizar durante dos años un trabajo en equipo sobre actividades líticas de enzimas producidas por actinomicetos.

CONFERENCIAS DEL DR. RUBIO

Dentro del ciclo de conferencias organizado por el Centro de Orientación Didáctica de Enseñanza Media para los Catedráticos de Ciencias Naturales, el Dr. Miguel Rubio Huertos desarrolló el tema «Progresos recientes en la biología de los virus», en el salón de actos del Instituto «Ramiro de Maeztu», de Madrid, el 23 de marzo.

El día 30, e invitado por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Murcia, el Dr. Rubio Huertos pronunció en dicho Colegio una conferencia acerca de «Importancia científica y económica de los virus causantes de las enfermedades de las plantas».

PREMIO «ALONSO DE HERRERA»

Ha sido concedido el Premio «Alonso de Herrera» 1962, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, al Dr. Román De Vicente Jordana, Investigador Científico del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, por su trabajo «Método ultrasensible para investigar las causas de adsorción en la filtración de partículas mínimas».

AYUDA DE INVESTIGACION

La Comisaría de Protección Escolar del Ministerio de Educación Nacional ha concedido al Dr. Julio Rodríguez Villanueva, Jefe de la Sección de Bioquímica y Microbiología del Suelo del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, una ayuda de investigación para realizar durante dos años un trabajo en equipo sobre actividades líticas de enzimas producidas por actinomicetos.

Depósito Legal: M. 702.- 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15 - Madrid