

VOLUMEN 17. 1964

ENERO - MARZO. NUMERO 1

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 Acimatación. 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. 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

	<u>Página</u>
Estudio al microscopio óptico y electrónico de un virus aislado de <i>Pisum sativum</i> , por M. Rubio-Huertos	1
Caracterización del organismo lítico <i>Streptomyces</i> GM productor de strepzima, por M. D. García-López, Concepción García-Mendoza y J. R. Villanueva	15
Actividad antibacteriana de algunas asociaciones antibióticas bi y trivalentes frente a especies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , por M. ^a Teresa Pérez-Ureña y A. Portolés	29
Variación en la composición química del micelio del <i>Aspergillus terreus</i> durante la autólisis, por R. Lahoz y F. Reyes	35
Composición química de las paredes celulares de la <i>Erwinia carotovora</i> , por Genoveva Tejerina y M. Santaolalla	41
Citramalatosintasa en <i>Rhodopseudomonas palustris</i> , por J. L. Cánovas, M. Ruiz-Amil y M. Losada	55
Sobre la fisiología de la reproducción sexual de los géneros <i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> , por J. A. Leal	63
Dr. Eduardo Gallardo (†)	65
Curso sobre Bioquímica de Microorganismos	67
Asociación de Parasitólogos Españoles	67

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

ESTUDIO AL MICROSCOPIO OPTICO Y ELECTRONICO DE UN VIRUS AISLADO DE *PISUM SATIVUM* (*)

por

M. RUBIO-HUERTOS

INTRODUCCION

Durante el estudio de una serie de virus de leguminosas aislados en diversas zonas de España, nos encontramos con uno, con características muy semejantes al virus «red clover vein».

El estudio de este virus y, en especial, de su citología al microscopio electrónico constituye el tema de este trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras del virus fueron tomadas en una plantación de guisantes a pocos kilómetros de Sitges (Barcelona), en abril de 1963. Las plantas presentaban diferentes síntomas, unas tenían un fuerte mosaico y otras solamente clareamiento de las venas, pero la mayoría de las plantas infectadas, además de mosaico, presentaba lesiones necróticas, más o menos abundantes.

(*) Este trabajo ha sido realizado mediante una Ayuda (FG-Sp-121) del Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos, al que damos aquí las gracias.

Inoculaciones

Se inocularon una serie de plantas testigos con savia de las muestras, usando polvo de carborundo como abrasivo. Las plantas fueron las siguientes: *Vicia faba*, 8; *Vigna sinensis*, 4; *Pisum sativum*, 4; *Phaseolus vulgaris*, 4; *Nicotina tabacum*, 4, y *Petunia hybrida*, 40. Las reinoculaciones se realizaron sobre *V. faba* y *P. sativum*.

Microscopía

Las preparaciones para el microscopio se hicieron tiñendo con floxina al 1 por ciento en agua destilada, sin fijación previa, tiras de epidermis de las hojas y tallos de *Pisum sativum* infectado, presentando síntomas fuertes de mosaico y necrosis. Las microfotografías se hicieron con una máquina Leika, en aparato adaptable al microscopio Zeiss.

Para microscopía electrónica se tomaron trozos de hoja entera, de unos 10 mm², y se fijaron en tetróxido de osmio en tampón de acetato de veronal, a pH 6,5 (puesto que las inclusiones cristalinas no son solubles a este pH y sí lo son a pH alcalinos); los trozos fijados se deshidrataron pasándolos por una serie de alcoholes (de 50°, 70°, 80° y 96°) y dos veces en alcohol absoluto, y se pusieron en una mezcla de 2 partes de metil-metacrilato y 8 partes de butil-metacrilato con polimerizador y se seccionaron en un ultramicrotomo Reichert, empleando cuchillas de vidrio.

Las inclusiones cristalinas las extrajimos de las células infectadas bajo el pequeño aumento del microscopio, según nuestro método (6), y una vez concentradas en una pequeña zona de un portaobjetos nuevo y bien desengrasado, se cubrieron con una capa fina de carbono, en el aparato de sombreado y réplica de Siemens. Los cristales se disolvieron en hidróxido sódico en caliente y la capa de carbono con la réplica se montó en las rejillas-portaobjetos del microscopio, para su observación.

Las observaciones y las fotografías se hicieron empleando el microscopio electrónico Elmiskop I Siemens del Servicio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias del C. S. I. C.

RESULTADOS

Sintomatología y plantas susceptibles de infección

En *Pisum sativum* se producen clareamiento de venas, mosaico y, más tarde, necrosis, que se extienden por toda la planta (*figura 1*). En *Vicia faba* se producen lesiones necróticas rojizas en las hojas inoculadas, seguidas de moteado en las hojas y necrosis en el tallo. Las plantas de *Vigna sinensis* inoculadas no dieron síntomas, así como tampoco las dieron las de *Nicotiana tabacum* y *Petunia hybrida*.

Temperatura de inactivación: 55°-65 °C.

Microscopía normal

Las tiras de epidermis de las hojas infectadas teñidas con floxina muestran la existencia de dos tipos de inclusiones intracelulares: unas, amorfas, o cuerpos X, de tipo granular, poco compacto, y otras, cristalinas, muy refringentes y generalmente en forma de placas o prismas hexagonales, de tamaño variable (*figuras 2-5*). Ambos tipos de inclusiones se tiñen muy bien con floxina. Las inclusiones cristalinas no son solubles en agua, ni en ácido clorhídrico normal; son solubles en medio alcalino, de pH 8.

Microscopía electrónica

Las células de las hojas adultas poseen una zona estrecha de citoplasma, dispuesta en contacto con la pared celular; un núcleo y una gran vacuola central cruzada por estrechas tiras de citoplasma. Los cuerpos X se encuentran, o bien embebidos en el citoplasma normal, o en la vacuola central, pero unidos al citoplasma por tiras de material citoplásmico y rodeados por una membrana de la misma estructura que la citoplásmica. Los cuerpos X se encuentran formados por elementos normales del citoplasma, como mitocondrias, protoplastidios, retículo endoplásmico y ribosomas. Repartidos entre estos orgánulos se encuentran partículas alargadas, probablemente partículas de virus en haces paralelos, y otras, retorcidas o en espiral, formando anillos extracéntricos (*figuras 6-7*) y además masas densas de material vacuolado no identificado (*figura 8*). También se encuentran en los cuerpos X algunos gránulos osmiófilos, de naturaleza lipoidea.

Las inclusiones cristalinas están formadas por partículas alargadas ordenadas tridimensionalmente, como se puede apreciar en los cortes ultrafinos de 800 Å (*figuras 9-10*).

Las réplicas de carbono de los cristales extraídos de las células mostraron que tales inclusiones cristalinas, aparentemente hexagonales, están formadas por la asociación de cristales rómbicos (*figura 11*). En las réplicas de la superficie de los cristales no se puede apreciar estructura alguna, debido a estar recubiertos por una ligera membrana, probablemente de origen citoplásmico.

DISCUSION

La sintomatología de este virus, sobre todo las lesiones necróticas progresivas y necrosis de las venas en *Pisum sativum* y *Vicia faba*, y el no ser capaz de infectar *Phaseolus vulgaris* ni plantas de la familia solanáceas, junto con la formación de cristales de aspecto hexagonal vistos al microscopio normal y gran aproximación en el punto térmico de inactivación, parece ser suficiente para identificar este virus con el «red clover vein» descrito en los Estados Unidos. Sin embargo, la descripción de dicho virus en el libro de Smith (9) es muy incompleta, pues no trae ni la forma del virus, ni sus relaciones serológicas con otros virus, ni su cotología. Más recientemente, Hagedorn y colaboradores (1) han descrito este virus aislado en Holanda y mediante preparaciones obtenidas por el método de Brandes para el microscopio electrónico han demostrado que las partículas de virus son asimétricas, midiendo $600-700 \times 18 \text{ m}\mu$.

Porter y McWhorter (5) describieron las inclusiones cristalinas intracelulares del virus «red clover vein mosaic», que coinciden con las que nosotros hemos podido observar al microscopio normal en el virus que estudiamos, pero, a pesar de todas estas coincidencias, no se puede afirmar, sin un estudio serológico, que los dos virus sean el mismo o estirpes del mismo.

Las preparaciones de secciones ultrafinas observadas al microscopio electrónico presentan características muy interesantes, y por ellas hemos podido averiguar que la partícula de virus es de forma de bastoncillo flexuoso, ya que las partículas alargadas que se observan dentro de los cuerpos X son del mismo tipo que las identificadas como partículas de

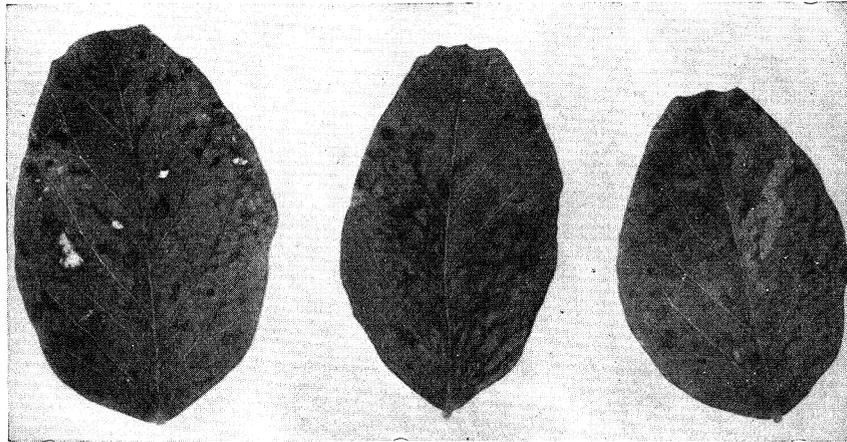
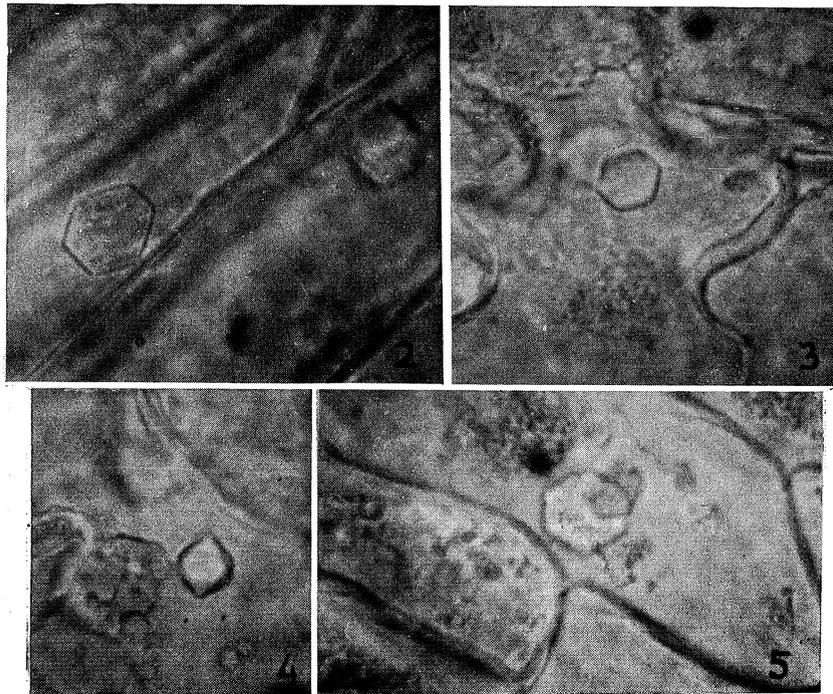


Figura 1. Síntomas necróticos sobre Pisum sativum



*Figuras 2-5. Inclusiones cristalinas en células de Pisum. Microscopio óptico.
× 1.000*

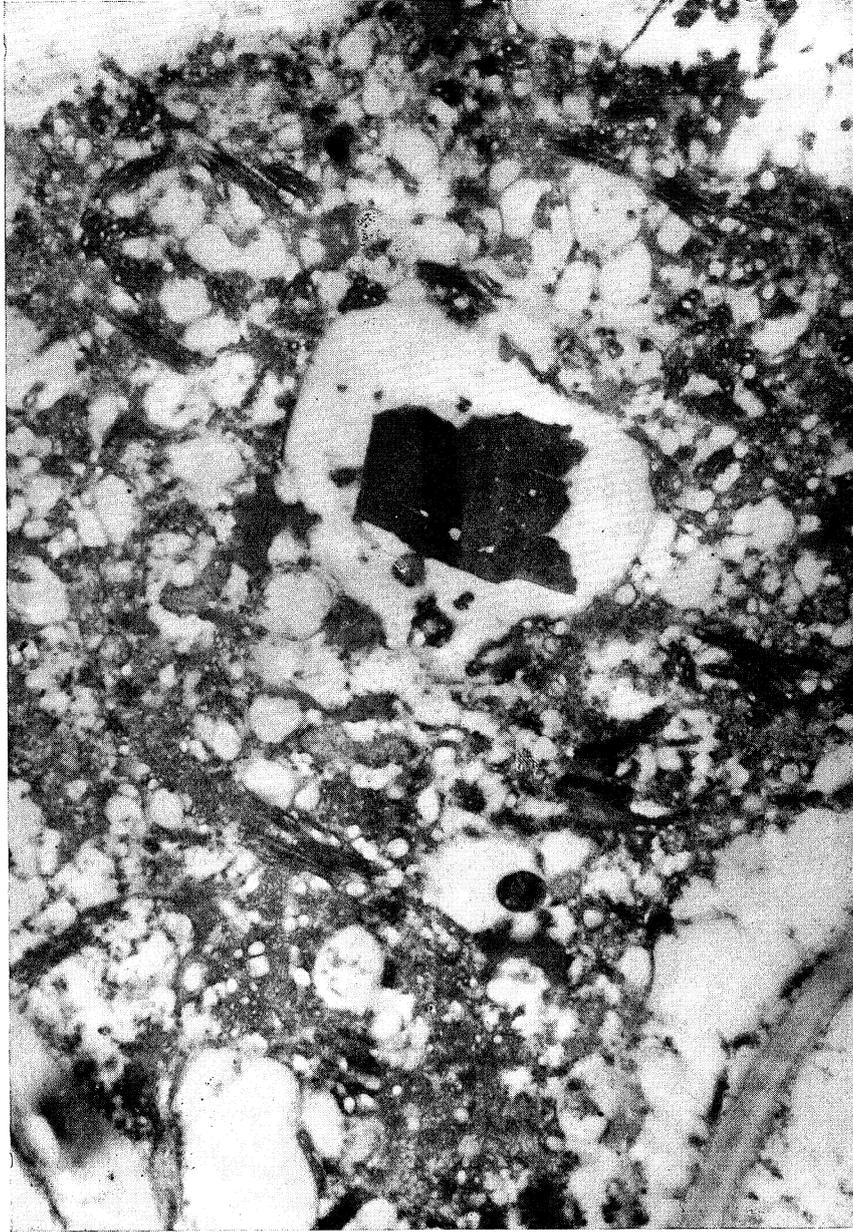


Figura 6. Corte ultrafino de un cuerpo X y un cristal dentro de una vacuola. Nótese la estructura muy diferente del citoplasma normal. Microscopio electrónico. $\times 10,000$

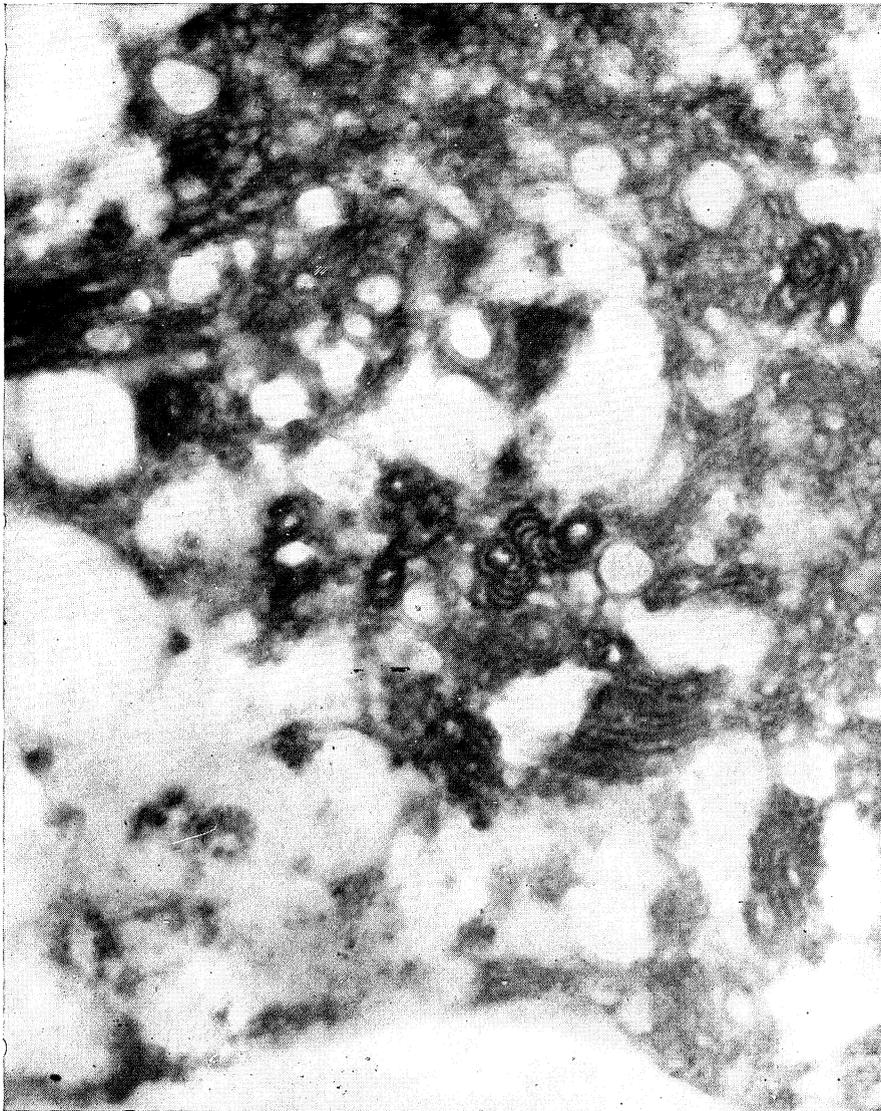


Figura 7. Corte ultrafino de un cuerpo X. Se pueden observar formas en anillo y pequeñas vacuolas menos teñidas, posiblemente de retículo endoplásmico modificado. M. electrónico. $\times 42.000$

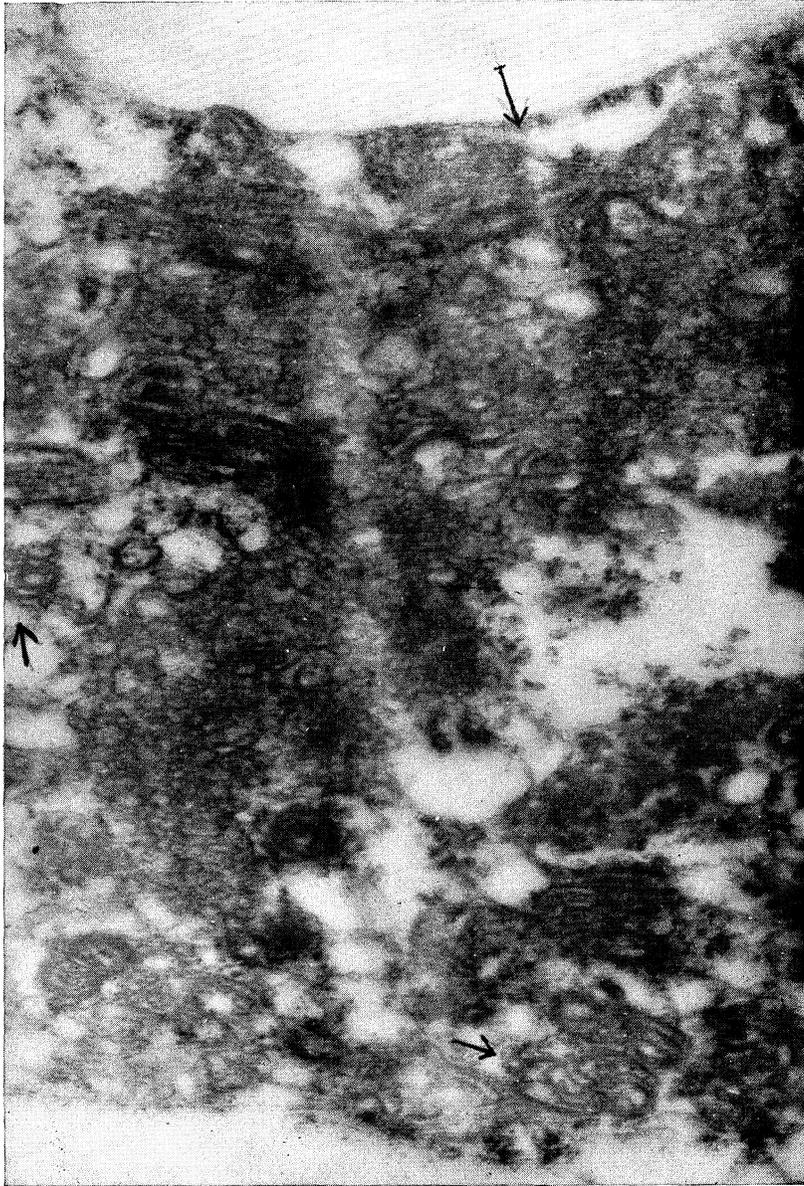


Figura 8. Semejante a la anterior. Se observa una membrana de tipo citoplásmico rodeando el cuerpo X. M. electrónico. $\times 35.000$

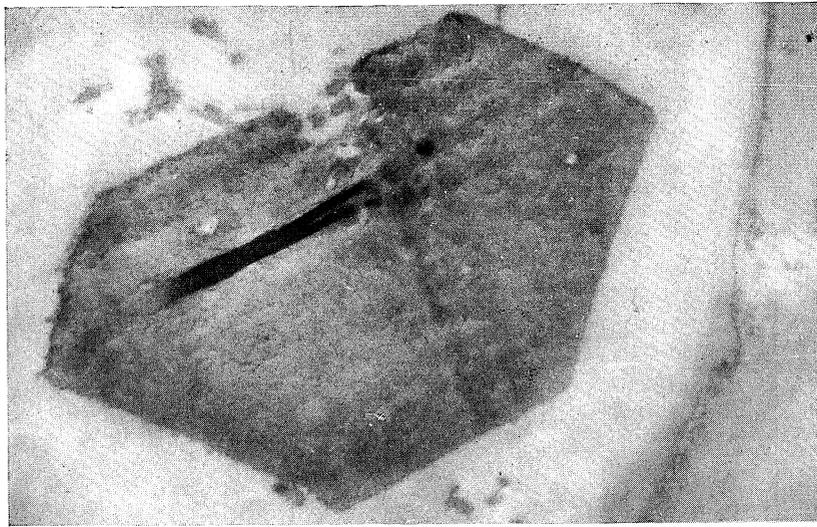


Figura 9. Corte ultrafino de un cristal hexagonal. M. electrónico. × 15.000

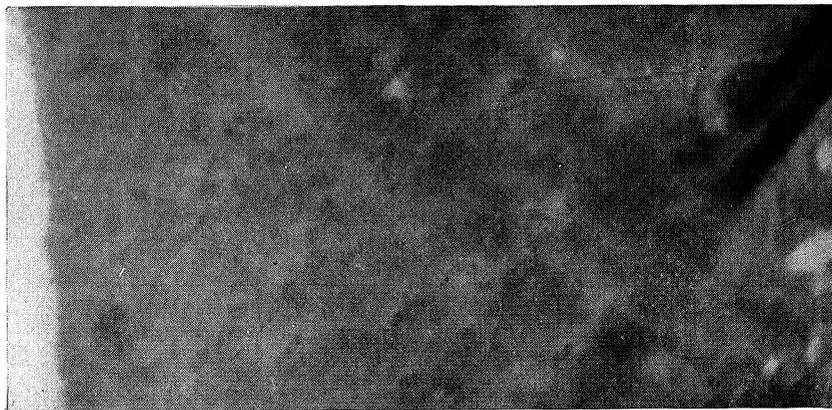


Figura 10. Detalle del cristal anterior, en el que se puede apreciar que está formado por partículas de virus. M. electrónico. × 40.000

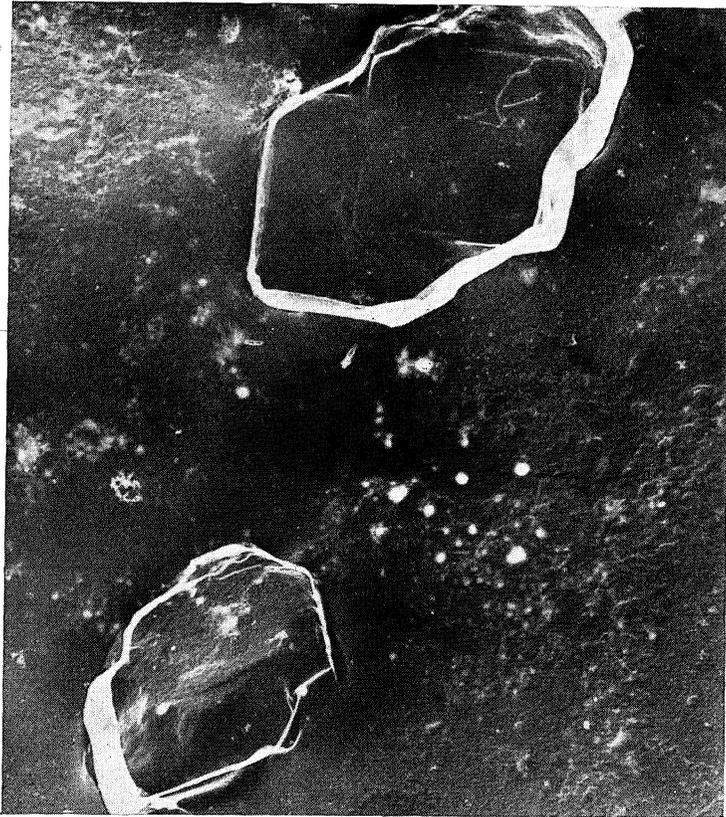


Figura 11. Inclusiones cristalinas extraídas de los células y fotografiadas por el método de réplica de carbono. M. electrónico. $\times 12.000$

virus en los estudios sobre otras diferentes virosis (2, 7, 10) y las inclusiones cristalinas poseen la estructura típica de los cristales formados por partículas asimétricas de virus y coinciden con las descritas por Hagedorn y colaboradores en el trabajo citado (1).

Las formas en espiral o anillos excéntricos que se observan dentro de los cuerpos X son, probablemente, debidos a partículas de virus que se agregan formando espirales; nosotros lo hemos podido observar en plantas de tabaco infectadas con el virus «severe etch» (8). Matsui y Yamaguchi (3) y Yamaguchi y colaboradores (10) también han descrito en otras virosis esta manera de encontrarse retorcidas en el citoplasma las partículas de virus.

Una característica especial de la estructura de los cuerpos X en esta virosis es la presencia de masas de pequeñas vacuolas rodeadas de fuerte membrana y cuya significación es difícil de interpretar. Esta masa se tiñe menos con el ácido ósmico que las partículas de virus y constituye, a veces, una especie de matriz en la que éstas están embebidas. El tamaño de las pequeñas vacuolas es variable y, desde luego, la estructura de esta masa es completamente diferente de la del citoplasma normal de la célula; que no se trata de un artefacto, debido a mala fijación o a otra causa operativa, es claramente comprobable, pues en una misma célula se encuentran estas masas con su aspecto característico y el citoplasma, que se conserva perfectamente, rodeándolas.

Es posible que estas masas, que se tiñen fuertemente con floxina, como los nucleolos dentro de los cuerpos X, estén formadas por ácido ribonucleico y proteína del virus almacenados antes de formar las partículas completas de virus, o bien se trate de una modificación del retículo endoplásmico normal, que se acumularía en ciertos sitios, donde fuera necesaria una mayor actividad enzimática.

RESUMEN

Se ha aislado un virus capaz de producir necrosis e infección generalizada en *Pisum sativum* y *Vicia faba*, cuya temperatura de inactivación por el calor se encuentra entre 55°-65 °C y que produce inclusiones amorfas y cristalinas en *P. sativum*. Este virus parece semejante al «red clover vein mosaic», que ha sido descrito en los Estados Unidos.

Secciones ultrafinas de hojas de *Pisum sativum* infectadas con este virus, estudiadas al microscopio electrónico, mostraron que las partículas elementales del virus son de tipo asimétrico, en forma de bastoncillo flexuoso. Los cuerpos X contienen estas partículas dispuestas en haces paralelos, o bien retorcidos formando espirales y anillos excéntricos, así como elementos normales del citoplasma y unas masas vacuoladas de significación desconocida. Los cuerpos X están rodeados de una membrana que se continúa con la del citoplasma y tonoplasma.

Las inclusiones cristalinas están formadas por partículas del virus agregadas en orden tridimensional.

SUMMARY

From pea plants it has been isolated a virus which resembles in its properties red-clover vein mosaic virus. It gives clearing of the veins mottle and necrotic lesions followed by general necrosis on *Pisum sativum* and *Vicia faba*; its thermal death point lies between 55° and 65 °C and it induces the formation of amorphous and crystalline inclusions in *P. sativum*.

Ultrathin sections of infected leaves show X-bodies composed by normal organelles of the cytoplasm such as mitochondria, proplastids, endoplasmic reticulum etc., bundles of elongated particles arranged in parallel and also coiled particles forming excentric rings, the X bodies are surrounded by cytoplasmic membrane. Within the X bodies dense masses of vacuolated material can be observed. The signification of these masses is discussed.

Crystalline inclusions are also shown composed by elongated particles arranged in tridimensional order.

BIBLIOGRAFIA

1. HAGEDORN, D. J.; BOS, L., y VAN DER WANT, J. P. H. 1959. The red clover vein-mosaic virus in the Netherlands. Tijdschr. Plantenziekten, 65, 13-23.
2. HEROLD, F., y WEIBEL, J. 1962. Electron microscopic demonstration of papaya ringspot virus. Virology, 18, 302-11.
3. MATSUI, Ch., y YAMAGUCHI, A. 1964. Electron microscopy of host cells infected with tobacco etch virus. I. Fine structure of leaf cells at lates stages of infection. Virology, 22, 40.

4. McWHORTER, F. P. 1941. Plant virus differentiation by trypan blue reactions within infected tissues. *Stain Technol.*, 16, 143.
5. PORTER, C. A., y McWHORTER, F. P. 1952. Crystalline inclusions produced by red clover vein mosaic virus. *Phytopathology*, 42, 518.
6. RUBIO-HUERTOS, M. 1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas. *Microbiol. Españ.*, 3, 207-32.
7. RUBIO-HUERTOS, M. 1962. Light and electron microscopy of inclusion bodies associated with petunia ringspot virus. *Virology*, 18, 337-42.
8. RUBIO-HUERTOS, M., y GARCÍA-HIDALGO, F. Ultrathin sections of intranuclear and intracytoplasmic inclusions induced by severe etch virus. *Virology* (en prensa).
9. SMITH, K. M. 1957. A textbook of plant virus diseases. 2.^a edición. J. A. Churchill, Londres.
10. YAMAGUCHI, A.; KIKUMOTO, T., y MATSUI, Ch. 1963. Electron microscopy of elongated particles associated with tulip mosaic. *Virology*, 20, 143-46.

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

CARACTERIZACION DEL ORGANISMO LITICO *STREPTOMYCES* GM PRODUCTOR DE STREPZIMA

por

M. D. GARCIA-LOPEZ, CONCEPCIÓN GARCIA-MENDOZA y J. R. VILLANUEVA (*)

INTRODUCCION

En una serie de trabajos realizados en los últimos dos años en nuestros laboratorios se ha puesto de manifiesto la marcada acción lítica sobre las paredes celulares de levaduras y hongos que presentan un conjunto de organismos pertenecientes al grupo de los Actinomicetos (2, 6, 10-11). Con estos trabajos como antecedente, y sobre la base de obtener organismos con actividades líticas sobre el inexplorado campo de las levaduras y hongos, comenzamos por aislar, a partir de muestras de suelos, microorganismos que por sus características morfológicas, fisiológicas y culturales, fueran clasificados dentro del género *Streptomyces*. De entre estos organismos cabe destacar por su manifiesta actividad lítica sobre levaduras y hongos el denominado inicialmente *Streptomyces* GM (4). Este organismo ha dado origen a un amplio trabajo que ha sido ya recogido en publicaciones recientes (1, 3, 5, 8). En esta publicación nuestro deseo es describir los resultados experimentales obtenidos a lo largo de un cuidadoso y detallado estudio, con el fin de situar al organismo en el lugar que le corresponde en la sistemática y

(*) Agradecemos a la Fundación «Juan March» y a la Comisaría de Protección Escolar del Ministerio de Educación Nacional las Ayudas concedidas para la realización de estos trabajos.

precisar los caracteres que nos han conducido a la conclusión de que el actinomiceto es una especie nueva.

MATERIAL Y METODOS

Aislamiento

Una muestra de tierra de jardín recogida en Madrid fue diluida al 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 con agua destilada estéril, y cantidades alícuotas de dichas diluciones fueron posteriormente sembradas en placas con medio GAE, medio muy apropiado para el desarrollo de los *Streptomyces*. Después de siete-diez días de incubación, la aparición de colonias con las características propias del citado género, nos llevaron a hacer resiembras de las mismas colonias sobre igual medio, para la obtención de los correspondientes cultivos puros. Después de comprobar su acción lítica frente a paredes de levaduras, según hemos expuesto anteriormente (4), quedó seleccionado el *Streptomyces* GM, por parecernos el más efectivo de todos los ensayados.

Medios de cultivo

Medio GAE

Está formado por la solución A, que consta de: glucosa, 10 g; asparagina, 1 g; extracto de levadura, 0,5 g; agua destilada, 500 ml. Se esteriliza aparte, en corriente de vapor y durante tres días, treinta minutos. La solución B, que lleva: PO_4HK_2 , 0,50 g; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; SO_4Fe , 0,01 g, y agua, 500 ml, se esteriliza a 120 °C durante treinta minutos. Una vez esterilizadas las dos soluciones, se mezclan. Cuando se desea solidificar este medio se adiciona agar al 1,5 por ciento.

Medio L

Está formado por las sales PO_4HK_2 , 1 g, y $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g, disueltas en 1.000 ml de agua destilada, y adicionándose levadura prensada, 5 g (en peso húmedo). Se esteriliza en corriente de vapor dos días, durante veinte minutos cada vez. En algunos casos se ha utilizado este medio complementado con 5 g de glucosa.

Determinación de la curva de crecimiento

La curva de crecimiento del organismo fue determinada por medio de la medida de la densidad óptica de sus cultivos en los medios GAE y L, en diferentes tiempos, en un espectrofotómetro Bausch-Lomb a 600 m μ . Como blanco para la medida de la densidad óptica de ambos cultivos se utilizó agua.

Determinación del peso seco

Para la determinación del peso seco de las células, las muestras se desecaron, hasta peso constante, a la temperatura de 105 °C.

Determinación de organismos viables

El número de células vivas fue determinado mediante recuento, por triplicado, del número de colonias que aparecen después de cuarenta y ocho horas de incubación a 28 °C en placas de medio GAE (sólido), cuando se inoculan diluciones conocidas del cultivo.

Sensibilidad a la acción de la lisozima

Se prepara una suspensión de células jóvenes de un cultivo del *Streptomyces GM* de, aproximadamente, 0,400 de densidad óptica en una solución 0,067 M de tampón de fosfato a pH 6,5, al que se adiciona ClNa en una concentración de 0,01 M. A esta suspensión se adiciona lisozima de clara de huevo (Armour) a concentraciones de 10-100 m μ /ml, incubándose seguidamente a 37 °C. Cada cinco minutos se efectúan lecturas en el espectrofotómetro, a 420 m μ .

Inóculos

Todos los inóculos utilizados para la siembra de este organismo fueron suspensiones de esporas del *Streptomyces GM* en agua destilada estéril, después de haber crecido en tubo inclinado de medio GAE a 28 °C durante siete días, y conservado luego durante unas semanas en la nevera para su total esporulación.

Mantenimiento del organismo

El *Streptomyces* GM se mantiene por medio de cultivos sucesivos, efectuados cada doce-quince días en tubos inclinados de medio GAE, que se incuban durante siete días y después se conservan en la nevera. Igualmente, sus esporas se han conservado en tubos con tierra estéril, también a baja temperatura.

RESULTADOS

Identificación

Observaciones preliminares

En todos los medios de cultivo ensayados, el microorganismo mostró ser definitivamente aerobio, con micelio vegetativo no tabicado y que permanece sin fragmentarse, incluso en cultivos de más de treinta días. En la mayoría de los medios nutritivos produjo micelio aéreo, que después de cinco-diez días originó conidios en cadena; asimismo desprendía el olor a tierra típico del género *Streptomyces*.

Estas características, a las que hay que añadir su sensibilidad a la lisozima, nos permiten considerarlo perteneciente al género *Streptomyces* (12). Esta última propiedad, relativa a la acción que ejerce la lisozima sobre el microorganismo, nos define una clara diferenciación con las especies del género *Nocardia*, no sensibles a la acción de esta enzima, pero que presentan propiedades semejantes a las del género *Streptomyces*. Las condiciones en las que fue realizado el experimento citado son las que se describen anteriormente.

Características macro y microscópicas

En placas con harina de avena-agar, glucosa-asparagina-agar (14), y almidón (9), el *Streptomyces* GM forma colonias con micelio aéreo de color crema claro, a veces algo tostado (según el manual de Ridway), que a veces presentan un anillo puntiforme alrededor, igualmente recubierto de micelio aéreo.

Los esporóforos, monopodialmente ramificados, son del grupo *rectus flexibilis*, generalmente rectos, algunas veces ondulados, con algún

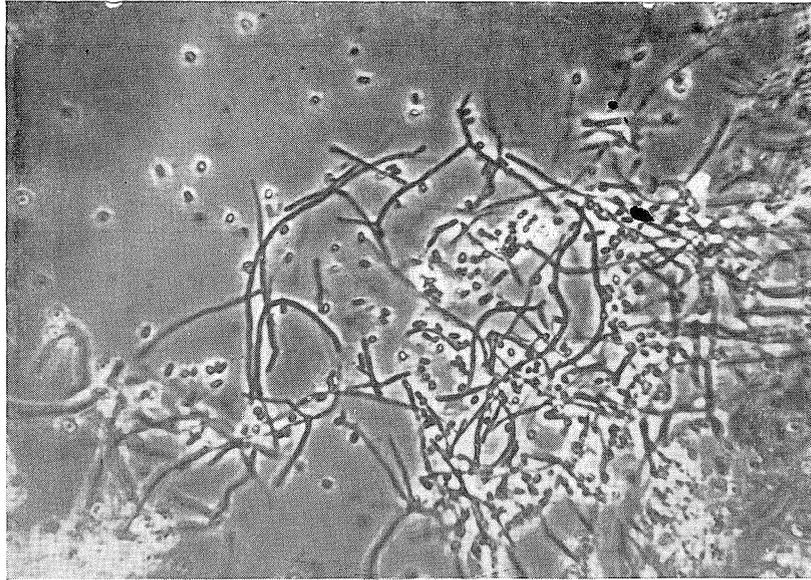


Figura 1. Microfotografía del Streptomyces GM obtenida con el microscopio de fases

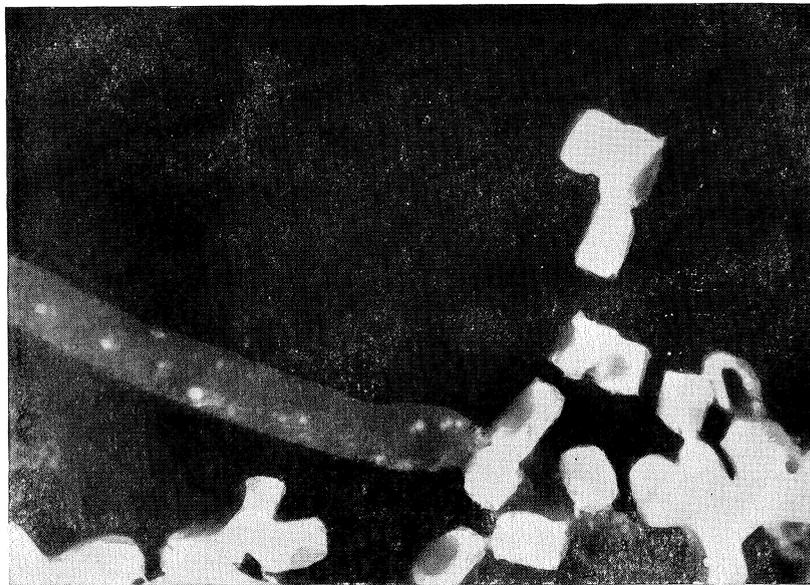


Figura 2. Microfotografía electrónica del Streptomyces GM

gancho irregular, aunque nunca se forman verdaderas espiras (*figura 1*). Las ramas secundarias nacen próximas unas de otras, formando «racimos». Todas ellas, primarias y secundarias, originan conidios esféricos algo ovalados, de 1-1,2 μ de tamaño, que al microscopio electrónico presentan superficie lisa (*figura 2*).

Todas las observaciones citadas se efectuaron a los diez y veinte días.

La madurez del micelio aéreo se comprobó poniendo un cubreobjetos levemente impregnados en vaselina, sobre una colonia. Las esporas quedan adheridas y se pueden observar microscópicamente. La mayor o menor cantidad de éstas nos indica el grado de madurez, no considerando las observaciones como definitivas si el micelio no estaba completamente desarrollado.

Formación de melanina y ácido sulfhídrico

El *Streptomyces GM* produjo coloración marrón en la mayor parte de los medios nutritivos proteicos (leche, Saboureaud + glucosa, etc.), pero en presencia de triptona y tirosina el pigmento fue amarillo o levemente marrón después de seis-ocho días.

Sembrado en peptona + hierro + agar, según Tresner y Danga (13), el organismo muestra una fuerte coloración negra a las veinte horas de crecimiento. Sobre este cultivo se colocó también una tira de papel de filtro impregnada en acetato de plomo, que a las pocas horas se ennegreció por el SPb formado.

De los citados resultados podemos concluir que el *Streptomyces GM* es cromógeno, sulfhídrico-positivo y tirosinasa-negativo.

Hidrólisis del almidón

En almidón-agar (9) tendido en placas, se sembró el organismo en el centro de las mismas por picadura, y a los veintiún días se observó el diámetro de la colonia y la hidrólisis del almidón (con lugol al 5 por ciento). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: diámetro de la colonia, 28 mm, y diámetro del halo de hidrólisis, 40 mm.

Proteólisis

Se estudió esta propiedad sembrando el organismo en caldo con gelatina, leche con púrpura de bromocresol y agar + caseína, según Gordon y Smith (7). En todos los medios, la lisis fue lenta, posterior a los diez días de incubación, y debida, por tanto, a exoenzimas.

Aprovechamiento de los nitratos

Se sembró el *Streptomyces* GM por cuadruplicado en una solución sintética de sales minerales con NO_3Na como fuente de nitrógeno, y almidón, glicerina o sacarosa como fuente carbonada. A los ocho días de incubación se investigó la presencia de nitritos en dos de las cuatro series de tubos, encontrándose en ellos reacción fuertemente positiva.

A los veinte días se efectuó de nuevo la misma reacción en el resto de los tubos, obteniéndose los siguientes resultados: reacción fuertemente positiva cuando la fuente de carbono es la glicerina; cuando la fuente carbonada es la sacarosa, reacción levemente positiva, debido a que el microorganismo ha consumido los nitritos después de producirlos.

Sensibilidad a los actinófagos

Con el fin de precisar aún más la relación del organismo en observación con otros *Streptomyces* más próximos, se llevó a cabo un estudio comparativo de la acción de los actinófagos 5, 17, 17/5 y 55L, obtenidos de la colección del «Centraalbureau voor Schimmelcultures», de Baarn, sobre todos los organismos. Los resultados se indican en el cuadro 1, viéndose cómo el *Streptomyces* GM sólo se asemeja al *Streptomyces venezuelae* por su falta total de sensibilidad a los actinófagos probados.

Cuadro 1. Estudio comparativo de la sensibilidad de varios *Streptomyces* a los actinófagos

<i>Streptomyces</i>	17	5	17/5	55L
GM	—	—	—	—
<i>S. griseus</i> 3.475	++	—	++	—
<i>S. griseus</i> 9	++	—	++	—
<i>S. coelicolor</i>	—	++	++	—
<i>S. venezuelae</i>	—	—	—	—

Cuadro 2. Estudio comparativo de la acción de varios Streptomyces sobre diferentes medios de cultivo

Medios de cultivo	S. GM	<i>S. griseus</i> 3.475	<i>S. griseus</i> 4	<i>S. griseus</i> 9	<i>S. griseus</i> 7.796	<i>S.</i> <i>coelicolor</i>	<i>S. michi-</i> <i>ganensis</i>	<i>S.</i> <i>venezuelae</i>
Almidón (hidrólisis)	++	++	++	++	+	++	+	+++
Tirosinasa	—	—	—	—	—	—	—	+++
Agar-triptona (pigmento melanoide)	—	—	—	—	—	—	—	+
Reacción de Tresner-Danga	+++	—	—	—	—	—	+	+++
Gelatina (licuefacción)	Muy lenta	+	+	+	+	+	Muy lenta	Lenta
Caseína (hidrólisis)	±			++		++	—	++
Leche (peptonización)	+	++	+	+	+	+	+	
Leche (coagulación)	±	+	—	+	+	++	++	

Cuadro 3. Comparación de las características de pigmentación del micelio de varios Streptomyces con el Streptomyces GM

Medios de cultivo	Micelio y pigmento	S. GM	S. griseus 3.475	S. griseus 4	S. griseus 9	S. griseus 7.796	S. coelicolor	S. michiganensis	S. venezuelae
Almidón	Mic. aéreo	Crema verdoso	Crema verdoso	Crema tostado pálido	Crema verdoso	Blanco amarillento	Tostado	Incoloro	Crema rosado
	Mic. veget.	Marrón amarillento	Incoloro	Tostado	Marrón amarillento	Gris amarillo verdoso	Marrón amarillento	Incoloro	Crema
	Pig. solub.	Marrón rojizo pálido	Escaso	No	No	No	Escaso	No	No
Saboureaud + glucosa	Mic. aéreo	Crema tostado	Crema claro	Blanco	Crema tostado	Crema tostado	Crema tostado	No	
	Mic. veget.	Marrón oscuro	Marrón rosado claro	Marrón claro	Marrón amarillento	Marrón oscuro	Marrón oscuro	Amarillo	
	Pig. solub.	Marrón rojizo	Tostado	Amarillo	Amarillo	Marrón amarillento	Marrón amarillento	No	
Malato cálcico	Mic. aéreo	Crema claro	Incoloro	Incoloro	Crema claro	Blanco crema	Amarillo claro	No	Incoloro
	Mic. veget.	Marrón oscuro	Amarillo claro	Amarillo claro	Marrón	Tostado	Marrón rosado	Amarillo	Incoloro
	Pig. solub.	Marrón oscuro	Amarillo claro	Amarillo claro	Marrón	Marrón	Marrón rosado	Amarillo claro	Marrón claro
Agar + patata + glucosa	Mic. aéreo	Blanco y crema	Crema tostado	Blanco amarillento	Crema claro	Crema verdoso		Gris rosado	
	Mic. veget.	Incoloro	Marrón	Incoloro	Marrón	Marrón		Incoloro	
	Pig. solub.	Marrón amarillento	Marrón claro	Amarillo claro	Marrón claro	Marrón		Amarillo	
Glucosa + nitrato	Mic. aéreo	Crema tostado claro	Incoloro	No	Amarillo claro	Amarillo verdoso	Incoloro	No	Crema claro
	Mic. veget.	Marrón	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Crema claro	Marrón, borde claro
	Pig. solub.	Marrón	No	No	Crema	Tostado	No	No	No
Patata	Mic. aéreo	Crema claro	Crema claro	Crema tostado	Crema claro	Incoloro	Gris verde claro	Amarillo	Incoloro
	Mic. veget.	Marrón rosado	Marrón rosado	Amarillo	Crema claro	Amarillo	Marrón claro	Naranja	Marrón oscuro
	Pig. solub.	Marrón rojizo	Marrón	No	Marrón rosado	No	Marrón oscuro	No	Marrón oscuro

Otras características

En casi todos los medios nutritivos, el micelio aéreo fue abundante, de aspecto pulverulento o reticulado y de color crema claro, con tonos tostados o rojizos después de los quince días de crecimiento. Estos tonos fueron debidos quizás a una influencia del pigmento soluble, marrón rosado o marrón rojizo, que estuvo presente, con mayor o menor intensidad, en medios orgánicos y sintéticos.

Se observaron igualmente los colores del micelio aéreo y vegetativo, y las conclusiones obtenidas se encuentran en los cuadros 2-3.

Conclusiones previas

A pesar de ser aparentemente cromógeno y no proteolítico, el microorganismo puede ser considerado por todas las características expuestas perteneciente a la «serie *griseus*». Para tratar de especificar aún más si el *Streptomyces GM* es una especie nueva o, por el contrario, si se trata de un organismo ya definido, creímos conveniente efectuar un estudio comparativo de las propiedades de este organismo y de las de aquellos más próximos. Elegimos, para la comparación, varias cepas de *S. griseus* y una cepa de *S. michiganensis*, muy relacionada con la «serie *griseus*»; igualmente seleccionamos el *S. coelicolor* (Muller) y una cepa de *S. venezuelae* perteneciente a la «serie *lavandulae*», que suele presentar micelio algo tostado. En conjunto, se ensayan los siguientes microorganismos:

- Streptomyces griseus* (Waksman) 3.475.
- S. griseus* (Waksman) 4.
- S. griseus* (Waksman) 9.
- S. griseus* (E. T. H.) 7.796.
- S. coelicolor* (cepa de Muller depositada en C. B. S.).
- S. michiganensis* (Corhag) E. T. H. 14.411.
- S. venezuelae* (Ehrlich) A. T. C. C. 10.595.

Los resultados obtenidos, de las comparaciones con ellos realizadas, están expuestos en los cuadros 2-3.

DISCUSION

El *Streptomyces* GM difiere del *S. venezuelae* A.T.C.C. 10.595 por su reacción tirosinasa-negativa, no formación de melanina en triptona-agar, y lenta proteólisis; se asemeja en el color del micelio aéreo, pero su aspecto no es tan compacto. Su micelio vegetativo y pigmento soluble son generalmente más coloreados.

Presenta poca semejanza con el *Streptomyces michiganensis* E.T.H. 14.411, según hemos podido observar de los resultados expuestos, a pesar de ser una cepa muy atípica, algo diferente de su descripción.

Se asemeja al *Streptomyces griseus*, especialmente a la cepa número 9 de Waksman, y al *S. coelicolor* (Muller) C.B.S., en el color y aspecto pulverulento-reticulado del micelio aéreo, en la forma concéntrica de las colonias y en el color del citado micelio vegetativo. El *S. griseus* 9 presenta un pigmento soluble de tonalidad parecida al del *Streptomyces* GM, pero este último es más intenso, sobre todo en los medios nutritivos proteicos complejos. Difiere, además, en la reacción Tresner y Danga positiva y en su lenta proteólisis. Finalmente, hemos podido observar su resistencia a los fagos ensayados, que, sin embargo, atacan al *S. griseus* del modo expuesto.

Todos estos caracteres nos han llevado a la conclusión de que el *Streptomyces* GM es efectivamente una nueva especie, como ya apuntamos al principio de este capítulo.

RESUMEN

Se ha aislado de una muestra de suelo español una especie de *Streptomyces*, que presenta marcada actividad lítica sobre levaduras y hongos, que inicialmente fue denominado *Streptomyces* GM.

Siguiendo diferentes criterios de clasificación de acuerdo con los resultados comparativos obtenidos al observar su acción sobre el almidón, gelatina, caseína, leche, tirosina y la reacción Tresner-Danga, así como la formación de pigmento melanoide sobre agar + triptona y su respuesta a una serie de actinófagos y a la lisozima, se ha podido establecer que el citado organismo es una especie nueva de *Streptomyces*, próximo por algunos de sus caracteres a la «serie *griseus*».

SUMMARY

This paper describes the isolation and characterization of a new strain of actinomycete showing lytic activity on yeast and molds, which has been named *Streptomyces GM*.

According with different criteria of classification and on the basis of results obtained when cultured on starch, gelatine, caseine, milk, tyrosine media, the reaction of Tresner-Danga as well as considering the melanoide pigment formation capacity on triptone agar and the response to various actinophages and lysozyme, it has been possible to establish that the organism is a new species of *Streptomyces* related to the «*griseus* serie».

BIBLIOGRAFIA

1. GARCÍA-ACHA, I., y VILLANUEVA, J. R. 1963. *Nature*, 200.
2. GARCÍA-ACHA, I., y VILLANUEVA, J. R. 1963. *Can. J. Microbiol.*, 9, 140.
3. GARCÍA-MENDOZA, C., y VILLANUEVA, J. R. 1962. *Nature*, 195, 1.326.
4. GARCÍA-MENDOZA, C., y VILLANUEVA, J. R. 1962. *Microbiol. Españ.*, 15, 139.
5. GARCÍA-MENDOZA, C., y VILLANUEVA, J. R. 1963. *J. Gen. Microbiol.*, 32, 1P.
6. GASCÓN, S., y VILLANUEVA, J. R. 1963. *Can. J. Microbiol.*, 9, 651.
7. GORDON, R. E., y SMITH, M. M. 1955. *J. Bacteriol.*, 69, 147.
8. NOVAES, M., y VILLANUEVA, J. R. 1963. *Biochim. Biophys. Acta*, 78, 797.
9. PRIDHAM, T. G.; HESSELTINE, G. W., y BENEDICT, R. G. 1958. *Appl. Microbiol.*, 6, 52.
10. RODRÍGUEZ-AGUIRRE, M. J.; GARCÍA-ACHA, I., y VILLANUEVA, J. R. 1963. *Experientia*, 19, 82.
11. RODRÍGUEZ-AGUIRRE, M. J.; GARCÍA-ACHA, I., y VILLANUEVA, J. R. 1964. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* (en prensa).
12. ROMANO, A. H., y SOHLER, A. 1956. *J. Bacteriol.*, 72, 865.
13. TRESNER, H. D., y DANGA, F. 1958. *J. Bacteriol.*, 76, 239.
14. WAKSMAN, S. A. 1961. *The Actinomycetes*. Williams, Wilkins Co., Baltimore.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN" DE MICROBIOLOGIA

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ALGUNAS
ASOCIACIONES ANTIBIOTICAS BI Y TRIVALENTES
FRENTE A ESPECIES DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

por

M.^a TERESA PEREZ-UREÑA y A. PORTOLES

Los aumentos en la incidencia de infecciones por *Pseudomonas*, como resultado de un tratamiento antibiótico prolongado en infecciones localizadas en órganos donde puede existir una flora bacteriana compleja (aparatos respiratorio, digestivo y urinario), y el incremento en los niveles de antibióticorresistencia de estas estirpes frente a las diferentes drogas, aconsejan la búsqueda de asociaciones antibióticas que mediante una acción sinérgica puedan impedir el desarrollo de estas especies. En el presente trabajo se comparan los resultados de 102 asociaciones antibióticas bivalentes frente a 80 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, y se estudian más detenidamente las combinaciones bivalentes y algunas trivalentes que resultaron de mayor interés.

MATERIAL Y METODOS

Las 80 diferentes estirpes sobre las que se ha trabajado fueron aisladas de productos patológicos; sus diferentes orígenes y estudio microbiológico han sido descritos previamente (4).

El examen sistemático de su antibiograma para 15 antibióticos distintos fue realizado mediante una técnica análoga al método de diluciones

sobre medio líquido (1), pero utilizando resazurina como indicador de las variaciones en el potencial redox (2).

El comportamiento frente a las 102 asociaciones binarias se midió cuantitativamente en función del porcentaje de inhibición del crecimiento, con un método personal (3).

Con los pares de antibióticos más activos, que fueron más tarde seleccionados, se realizaron estudios más detenidos acerca de su actividad frente a las distintas estirpes de *Pseudomonas*. Para ello se prepararon mezclas de antibióticos a igualdad de volumen, conteniendo cada solución una concentración de droga 32 veces mayor que la concentración mínima inhibidora (C. M. I.) previamente determinada y con ellas se seguía el procedimiento de valoración cuantitativa de Welch (5) para calcular el índice de interacción (*).

Para el estudio de cinco combinaciones antibióticas trivalentes con intervención de distintos mecanismos bioquímicos de acción, después de conocer las C. M. I. para cada antibiótico y microorganismo, utilizamos el método de ensayo establecido por Zwart y Bokma (6), pero tomando como variables estas C. M. I. en lugar de los porcentajes de droga.

En estos ensayos se tuvo en cuenta el valor de la razón de mutación y se utilizaron inóculos que permitieran obtener concentraciones bacterianas finales de 10^3 - 10^4 microorganismos /cm³.

RESULTADOS

La sensibilidad de las 80 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a los antibióticos aislados ya fue publicada precedentemente (4).

Del comportamiento frente a las 102 asociaciones antibióticas da idea el gráfico adjunto (*figura 1*). De él se deduce que las combinaciones más interesantes son las de polimixina + oxitetraciclina, neomicina + oxitetraciclina, neomicina + clorotetraciclina; y a ellas dedicamos preferente atención.

Los resultados comparativos de los distintos grados de actividad de estas tres últimas asociaciones se indican en el *cuadro 1*; estos resultados

$$(*) I_i = \frac{a}{A} + \frac{b}{B} \quad \left. \begin{array}{l} a \\ b \\ A \\ B \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{C. M. I. de las drogas asociadas;} \\ \text{C. M. I. de las drogas aisladas.} \end{array}$$

se obtuvieron sobre las bacterias, cuyas características bioquímicas fueron previamente estabilizadas por varias resiembras semanales sobre ágar común inclinado.

Cuadro 1. Índices de interacción de tres asociaciones antibióticas sobre 80 cepas de Pseudomonas aeruginosas

Agrupamientos de los índices de interacción	Polimixina + oxitetraciclina		Neomicina + oxitetraciclina		Neomicina + cloro-tetraciclina	
	Núm. de cepas	Porcentaje parcial	Núm. de cepas	Porcentaje parcial	Núm. de cepas	Porcentaje parcial
0,07-0,08					3	6,0
0,08-0,12	5	8,62	3	6,38	4	8,0
0,12-0,20	3	5,17	5	10,60	8	16,0
0,38-0,48	37	63,75	71	14,85	25	50,0
0,50-0,70	9	15,51	26	55,35	7	14,0
0,82-0,98	4	6,94	6	12,76	3	6,0
Total de sinergismos		58		47		50
1,00-1,24	8	61,53	9	45,0	9	50,00
1,32-1,49	3	23,07	7	35,0	4	22,22
1,99-2,00	2	15,39	4	20,0	5	27,78
Total de indiferencias o aditividad		13		20		18
2,60-4,00	2	22,2	3	23,05	4	33,33
5,53-7,14	6	66,6	4	30,80	7	58,33
8,02-9,10	1	11,1	3	23,05	1	8,33
10,70-14,80			3	23,05		
Total de antagonismos		9		13		12

A la vista de los datos precedentes, resulta que el mayor tanto por ciento de acciones antimicrobianas eficaces para inhibir especies de *Pseudomonas* se obtiene con asociaciones en las que intervienen sustancias como la polimixina y neomicina, cuyo uso clínico puede no estar indicado en algunos casos. Entonces ensayamos—sobre las 24 estirpes más resistentes encontradas—cinco distintas combinaciones trivalentes de antibióticos, seleccionadas entre las drogas de uso más común y haciendo coin-

cidir distintos mecanismos bioquímicos de acción. Los resultados quedan resumidos en el *cuadro 2*.

Cuadro 2. Índices de interacción obtenidos con algunas asociaciones antibióticas trivalentes frente a 24 estirpes de Pseudomonas de marcada antibióticorresistencia

Asociaciones	Frecuencia de los distintos grupos de índices de interacción		
	0,12-0,75	1,5-3	Mayor de 3
Penicilina + estreptomina + oxitetraciclina	19	5	0
Penicilina + estreptomina + clorotetraciclina	19	5	0
Estreptomina + cloranfenicol + tetraciclina	0	3	21
Penicilina + cloranfenicol + oxitetraciclina	1	6	17
Penicilina + novobiocina + oxitetraciclina	3	12	9

En los dos primeros casos, concentraciones tan bajas como 0,02 a 0,08 U. I. de penicilina + 0,024 a 0,96 μg de estreptomina con 0,4 a 1,05 μg de oxitetraciclina o clorotetraciclina, bastaron, en el 79 por ciento de los casos ensayados, para producir una intensa acción bactericida.

DISCUSION

A la vista de los resultados que preceden se puede deducir que de las 102 asociaciones bivalentes ensayadas correspondió el mayor porcentaje de eficacia a tres de ellas: polimixina + oxitetraciclina, neomicina + oxitetraciclina y neomicina + clorotetraciclina.

La actividad de estas tres últimas, estudiadas con más detalle, puede resumirse en el *cuadro 3*, que revela un mayor porcentaje de actividades sinérgicas para la polimixina + oxitetraciclina.

Cuadro 3. Porcentajes de actividad frente a especies de *Pseudomonas* de tres asociaciones bivalentes de antibióticos

Interacción	Polimixina + oxitetraciclina	Neomicina + oxitetraciclina	Neomicina + clorotetraciclina
Sinergismo	72,50	58,75	62,50
Aditividad o indiferencia	16,25	25,00	22,50
Antagonismo	11,25	16,25	15,00

Empleando el concepto de «índice de interacción» para interpretar los resultados (*cuadro 2*) es posible observar, para la mayoría de los casos, índices que oscilan entre 0,38 y 0,48, que representan un aumento de 6 a 4 veces en la potencia de las drogas, individualmente consideradas.

Las diferencias correspondientes al empleo de oxitetraciclina o clorotetraciclina pueden estar condicionadas al tratamiento antibiótico previo que hayan debido soportar las bacterias estudiadas, ya que no hay que olvidar que todas procedían de procesos infecciosos de marcada cronicidad.

Dado que estas asociaciones bivalentes pueden no estar indicadas en una administración parenteral u oral, se estudiaron algunas asociaciones trivalentes, y de ellas las más eficaces fueron las de penicilina + estreptomina con oxitetraciclina o clorotetraciclina.

RESUMEN

Se ha estudiado el comportamiento *in vitro* de 80 estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de procesos infecciosos, frente a 102 asociaciones bivalentes de antibióticos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las asociaciones más eficaces para antibioterapia tópica contra especies de *Pseudomonas* han sido: polimixina + oxitetraciclina, neomicina + oxitetraciclina y neomicina + clorotetraciclina. Para los casos infecciosos en que deba tenerse en cuenta la toxicidad de las drogas, resultaron de gran interés por su actividad bacteriana las asociaciones de penicilina + estreptomina + oxitetraciclina y penicilina + estreptomina + clorotetraciclina.

SUMMARY

At the present paper, the behaviour *in vitro* of 80 *Pseudomonas aeruginosa* strains in front of 102 bivalent antibiotic association was studied, as well as some trivalent combinations.

According to the results, the most effective antibiotic associations for the topic antibiotherapy were polimyxin + oxitetracyclin, neomycin + oxitetracyclin and neomycin + clortetracyclin. The associations of penicillin + streptomycin + oxitetracyclin or clortetracyclin were interesting in those cases in which the drug-toxicity is considered.

BIBLIOGRAFIA

1. GROVE, D. C., y RANDALL, W. A. 1955. Assay methods of antibiotics. Medical Encyclopedia Inc., Nueva York.
2. PORTOLÉS, A. 1960. La terapia antibiótica desde el laboratorio clínico. Laboratorio, 10, 21.
3. PORTOLÉS, A. 1961. Técnicas microbiológicas para estudiar el comportamiento de asociaciones antibióticas. Microbiol. Españ., 14, 16.
4. PORTOLÉS, A., y PÉREZ-UREÑA, M. T. 1964. Características culturales y antibiograma de algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de productos patológicos. Rev. Clín. Españ. (en prensa).
5. WELCH, H.; WRIGHT, W. W.; REDDY, R. J., y WINTERMERE, D. 1958. Antibiotics combinations; *in vitro* effects on selected groups of bacteria. Antibiot. Ann., 57, 738.
6. ZWART, A. J., y BOKMA, L. H. 1959. The simultaneous action of two or more antibacterial agents. Antibiot. Chemotherapy, 9, 27.

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

VARIACION EN LA COMPOSICION QUIMICA DEL MICELIO DEL *ASPERGILLUS TERREUS* DURANTE LA AUTOLISIS

por

R. LAHOZ y F. REYES

INTRODUCCION

Son relativamente abundantes los estudios sobre la variación y cambios experimentados por los materiales nitrogenados existentes en el micelio de los hongos filamentosos durante la fase autolítica del crecimiento. Sin embargo, muy poco es lo que aparece descrito en la literatura sobre sustancias no nitrogenadas y especialmente carbohidratos. Prill y colaboradores (3) estudiaron el efecto de la autólisis sobre la formación y naturaleza de la grasa producida por el *Aspergillus fischeri*. Smithies (4) estudia la autólisis de los carbohidratos del micelio del *Penicillium griseo-fulvum*, pero no la variación en la concentración de los mismos a lo largo del período de autólisis. En 1962, Tandon y Chandra (6), estudiando la fase de autólisis del *Colletotrichum gloeosporioides*, describen el comportamiento de los azúcares libres en el micelio del citado microorganismo durante la autólisis. Hacen un estudio cromatográfico de los azúcares presentes, cuyas concentraciones las obtenían únicamente por comparación visual, mientras Emiliani y Ucha de Davie (2) se limitan a caracterizar los compuestos aparecidos y entre ellos, los carbohidratos, durante la autólisis del micelio del *Asp. phoenicis* en soluciones acuosas de ácido acético al 1 por ciento.

En el presente trabajo se hace un estudio de la variación cualitativa

y cuantitativa de los azúcares libres existentes en el micelio del *Aspergillus terreus* durante la fase autolítica del crecimiento.

MATERIAL Y METODOS

El *Aspergillus terreus* se cultivó en superficie, en matrices de Erlenmeyer de 300 ml de capacidad, conteniendo cada uno 100 ml del medio de Czapek-Dox, de la siguiente composición: glucosa, 50 g; NO_3Na , 2,0 g; CLK, 0,5 g; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 1,0 g; agua destilada, 1.000 ml. Se esterilizaba a vapor fluente tres días consecutivos, durante media hora cada día.

Se inocularon los matraces con suspensión de esporas, obtenida raspando suavemente la superficie de tres inóculos del *Aspergillus terreus* de quince días en agar-malta y mezclando con agua estéril.

Los matraces, una vez inoculados con 1 ml de la anterior suspensión de esporas, se incubaron en la obscuridad a 24 °C. A los treinta días de incubación comenzaron a observarse signos inconfundibles de haber comenzado la autólisis. A partir de este instante (treinta días de edad de los cultivos) se comenzaba a tomar una muestra cada doce días. Estas muestras consistían en 5 matraces cada vez, cuyo contenido se mezclaba. A continuación se separaba el micelio del líquido de cultivo por filtración y se determinaba el pH del líquido de cultivo. El micelio se lavaba y se secaba en la estufa a 37 °C hasta peso constante.

El micelio se pulverizaba en «turmix» hasta polvo impalpable y se desengrasaba mediante extracción con éter de petróleo (p. e., 50-70 °C), primero y después con éter sulfúrico. Cantidades conocidas de las diferentes muestras de micelio desengrasado se sometían a extracciones acuosas. Para ello, 1 g del micelio se extraía con agua destilada (100 ml) a la temperatura del laboratorio, con agitación mecánica durante una hora. Esta extracción se repetía dos veces más en las mismas condiciones, empleando nuevo disolvente cada vez. Se reunían los tres extractos parciales y se identificaban los azúcares por cromatografía sobre papel.

Identificación de azúcares

Del extracto cuya obtención se acaba de describir, 50 ml se trataban por acetato básico de plomo (1) para liberar al líquido de proteínas, y el líquido claro resultante se filtraba y concentraba al vacío hasta un

volumen final de 10 ml. La muestra así preparada se cromatografiaba sobre papel (descendente), empleando como disolvente una mezcla de n-butanol + ácido acético + agua (40 : 10 : 22) y como revelador, nitrato de plata + hidróxido sódico (7).

Determinación cuantitativa de azúcares

En partes alícuotas del extracto que se describió al principio se determinaban los azúcares reductores totales por el método de Somogyi (5).

RESULTADOS

En el *cuadro 1* se agrupan el tiempo de incubación, el tiempo de autólisis, el peso del micelio, el pH y la cantidad de carbohidratos libres.

Cuadro 1

Tiempo de incubación, días	Tiempo de autólisis, días	Micelio seco, gramos	pH	Carbohidratos /micelio seco inicial, porcentaje, gramos
30	0	6,1757	8,00	1,39
42	12	5,3705	8,10	1,64
54	24	4,9400	8,20	2,05
66	36	4,5191	8,20	1,68
78	48	4,1128	8,20	1,38
90	60	3,6322	8,20	0,78

A través de los sesenta días de autólisis en que se ha seguido la presencia de azúcares libres en el micelio, se observó que la glucosa y la maltosa están presentes desde que comienza la autólisis hasta los sesenta días, mientras que la xilosa existe asimismo desde el comienzo de la autólisis, y desaparece a los treinta y seis días de iniciada la misma. La maltosa, existente desde el principio en cantidades muy pequeñas, permanece presente a través de todo el período de autólisis aquí estudiado.

El contenido de azúcares libres en el micelio aumenta durante la

fase autolítica. A los veinticuatro días de autólisis, el contenido de azúcares llega a un máximo, para después comenzar a decrecer continuamente hasta los sesenta días de autólisis.

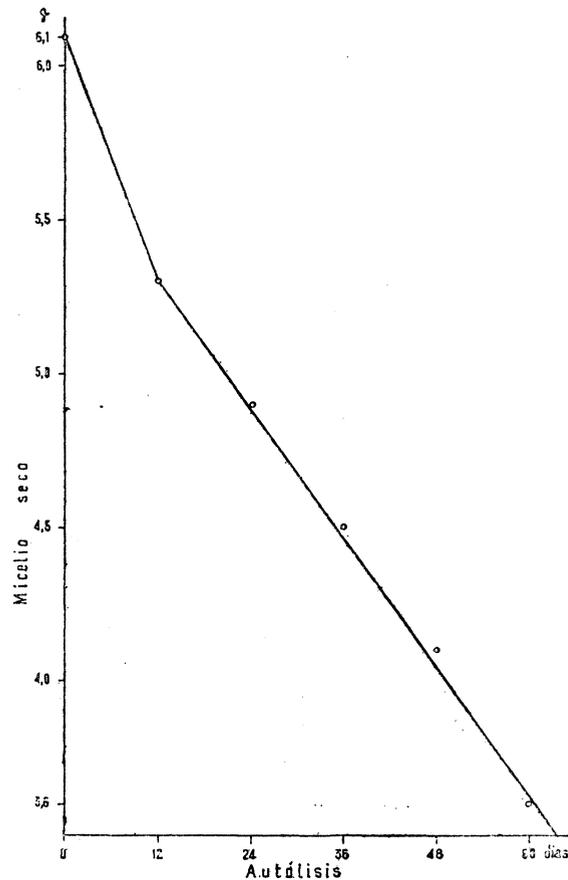


Figura 1

El peso de micelio seco experimenta una regular pérdida de peso desde la iniciación de la autólisis, continuando hasta los sesenta días.

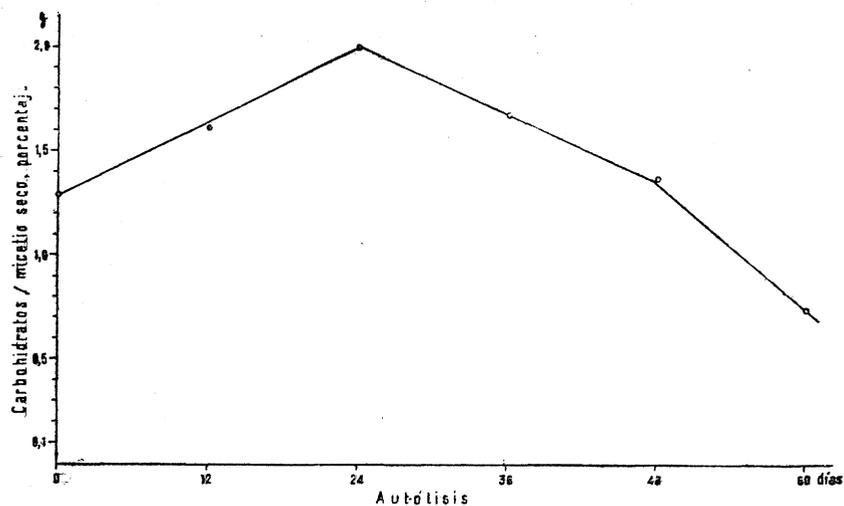


Figura 2

DISCUSION

Nuestros resultados difieren notablemente de los expuestos por Tandon y Chandra (6) trabajando con *Colletotrichum gloeosporioides*. Estos autores encuentran que al principio de la autólisis existía una gran concentración de azúcares en el micelio del citado organismo, y observan que a medida que la autólisis progresa, la concentración de los citados azúcares disminuye.

Son muy escasos en la bibliografía los datos sobre este aspecto de la autólisis en los hongos filamentosos, por lo que resulta difícil hacer un estudio comparado y mucho menos intentar establecer cualquier tipo de generalización sobre el comportamiento de los azúcares libres durante la fase autolítica del crecimiento.

RESUMEN

En el presente trabajo se hace un estudio de la variación cualitativa y cuantitativa de los azúcares libres existentes en el micelio del *Aspergillus terreus* durante la fase autolítica del crecimiento.

Hemos encontrado que la cantidad total de azúcares reductores libres aumenta continuamente, incluso durante la fase de autólisis, llegando a un máximo a los veinticuatro días de autólisis, seguido de una disminución en la cantidad de los mismos, que continúa durante todo el período de tiempo aquí estudiado.

La glucosa y la xilosa se hallaban presentes en el micelio en cantidades relativamente grandes. De maltosa solamente había indicios. La glucosa y la maltosa se hallaban presentes desde el comienzo de la autólisis, existiendo a lo largo de todo el experimento, mientras que la xilosa desaparecía a los treinta días de autólisis.

SUMMARY

In this work some chemical changes in the mycelium of *Aspergillus terreus* during the autolytic phase of growth have been studied. Attention has been directed toward the qualitative and quantitative changes in the content of free carbohydrates in mycelium during autolysis.

We have found an increase in the total amount of free reducing sugars during the autolytic phase of growth. At the 24th day of autolysis the sugar content reaches a maximum, followed by a regular decrease in their combined concentrations.

Glucose and xylose were present in autolysing mycelium in substantial concentrations. Maltose was present in traces only. Glucose and maltose were present from the beginning of autolysis throughout the whole experiment, whereas xylose disappeared at the 30th day of autolysis.

BIBLIOGRAFIA

1. EASTHAM, M. 1949. *Biochem. J.*, 45, XIII-XIV.
2. EMILIANI, S., y UCHA DE DAVIE, I. 1962. *Appl. Microbiol.*, 10, 505.
3. PRILL, E. A.; WENCK, P. R., y PETERSON, W. H. 1935. *Biochem. J.*, 29, 29-31.
4. SMITHIES, W. R. 1953. *Biochem. J.*, 55, 346-50.
5. SOMOCYI, M. 1945. *J. Biol. Chem.*, 160, 61.
6. TANDON, R. N., y CHANDRA, S. 1962. *Phyton.*, 19, 127-32.
7. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P., y HARRISON, J. S. 1950. *Nature*, 166, 444.

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

COMPOSICION QUIMICA DE LAS PAREDES CELULARES DE LA *ERWINIA CAROTOVORA*

por

GENOVEVA TEJERINA y M. SANTAOLALLA

INTRODUCCION

Continuando el análisis químico de las paredes celulares de los microorganismos patógenos de plantas, en el presente trabajo hemos obtenido las paredes celulares de la *Erwinia caratovora*. Este germen produce diversas enfermedades de tipo parenquimatoso y vascular en los vegetales, siendo tal vez la más importante la llamada podredumbre de la patata.

Intentamos establecer las diferencias fundamentales entre la composición química de las paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* estudiado anteriormente por uno de nosotros (23) y los resultados obtenidos en el presente trabajo a partir de las paredes puras de la *Erwinia carotovora*; ambos gérmenes son gram-negativos y fueron cultivados en medios y condiciones idénticas; al mismo tiempo contribuimos al estudio de su complejo lipomuceptídico.

Estudiamos las diferencias respecto a la composición de las paredes de estos gérmenes con otras estudiadas por diferentes investigadores, y la posible importancia que debe tener en la rigidez de la pared la unión del mucopéptido básico a otros compuestos, aminoácidos, glúcidos, ácidos teicoicos, grasas, etc.

MATERIALES Y METODOS

Empleamos una estirpe de *Erwinia carotovora* (b, 312, E. Hellmers 904 (1952), Dinamarca). Es un bacilo gram-negativo, móvil, provisto de flagelos peritricos, que cultiva en caldo común, originando turbidez, ligera película y sedimento blanquecino; en agar-caldo origina colonias circulares, brillantes, blanquecinas, con bordes enteros. Sus características bioquímicas son las siguientes: no produce indol, ni sulfhídrico, tampoco reduce nitratos ni utiliza urea, asimila citratos, da positiva la reacción de Voges-Prokauer, acidifica la leche tornasolada con formación de coágulo, fluidifica la gelatina, asimila albúmina y fermenta los siguientes azúcares: arabinosa, ramnosa, xilosa, glucosa, fructosa, galactosa, manosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trealosa, melibiosa, celobiosa, rafinosa, melecitosa, almidón, inulina, glucógeno, glicerina, eritrita, adonita, manita, sorbita, inosita, dulcita, salicina, esculina, dextrina y metilglucósido.

Cultivamos el microorganismo en tres matraces de Erlenmeyer de 6 l de capacidad, en caldo común, con agitación a 25 °C; a las cuarenta horas, aproximadamente, separamos los gérmenes por centrifugación y los lavamos tres veces con agua destilada estéril; comprobamos su pureza haciendo observaciones periódicas por microscopía normal y electrónica.

Obtención de paredes celulares

Se emplearon fundamentalmente los métodos de Cummis y Harris (6), y Salton y Horne (20-21), ya seguidos anteriormente por uno de nosotros (23); siendo curioso señalar que en las observaciones hechas de las paredes obtenidas, con el microscopio electrónico, no se encontró ningún germen entero en las diversas preparaciones que se hicieron. 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 Jefe del Servicio, Dr. Rubio Huertos.

Los gérmenes y las paredes de la *Erwinia carotovora* fueron lavados con agua destilada y depositada la sustancia sobre la rejilla portaobjetos para microscopía electrónica, recubierta de formvar, y posteriormente sombreada con oro-paladio.

Las paredes fueron secadas hasta peso constante a una temperatura inferior a 50 °C. Posteriormente separamos las sustancias grasas, tratándolas con una mezcla de 15 partes de éter sulfúrico y 45 de etanol, durante veinticuatro horas, a la temperatura ambiente, agitando de vez en cuando.

Análisis cromatográfico sobre papel

La glucoproteína que nos quedó después de extraer la grasa de las paredes la dividimos en dos partes aproximadamente iguales: A), para la determinación de aminoácidos, y B), para la de azúcares y aminoazúcares.

a) Precipitación de la sustancia proteica e hidrólisis posterior

Añadimos a la parte del sedimento que hemos denominado A) una solución de ácido tricloroacético, de tal concentración que la solución final queda al 5 por ciento; así precipitamos la proteína de la pared y este precipitado lo mantenemos doce horas en frigorífico, separándolo posteriormente por centrifugación; lavamos primero con agua y después con alcohol, alcohol-éter y finalmente con éter, secándolo a continuación en estufa a 50 °C hasta peso constante.

a₁) Hidrólisis ácida. 1 cg de esta proteína seca lo hidrolizamos en tubo cerrado con 6 ml de ClH 6 N calentando en estufa a 115 °C durante dieciséis horas; evaporamos el líquido hasta 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. Esta solución la empleamos para hacer el análisis cromatográfico.

a₂) Hidrólisis alcalina. Seguimos la técnica de Block (3). Pesamos unos 15 mg de proteína y la hervimos a reflujo con 10 ml de hidróxido bórico al 14 por ciento, dieciocho horas. El Ba⁺⁺ es eliminado por precipitación con ácido sulfúrico 0,1 N al estado de sulfato bórico, que se lava con agua caliente y unas gotas de ácido acético; concentramos este filtrado hasta pequeño volumen, a baja temperatura y evaporamos a sequedad en desecador de vacío. El residuo lo disolvemos en 1 ml de alcohol isopropílico al 10 por ciento. Con esta solución hacemos el análisis cromatográfico.

b) Determinación cromatográfica de los aminoácidos de la proteína

Empleamos papel Whatman núm. 1.

Desarrollo monodimensional

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

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

Desarrollo bidimensional

Disolventes: 1) fenol al 80 por ciento, en agua; 2) butanol-n, 80; ácido acético, 20; agua, 20.

Revelador: el mismo que anteriormente.

c) Hidrólisis de los glúcidos y determinación de sus componentes

0,0217 g de paredes celulares secas los hidrolizamos en tubo cerrado con 5 ml de SO_4H_2 2 N, en estufa, a 100 °C, durante dos horas; a continuación neutralizamos el exceso de ácido con hidróxido bórico sólido, separamos el sulfato bórico 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.

Hidrólisis a baja temperatura, según Salton (18): pesamos 0,0262 g y los sometemos a la hidrólisis en tubo cerrado a 37 °C, con ClH 12 N, durante veinticuatro horas. Evaporamos el ClH en desecador de vacío, con SO_4H_2 y NaOH en lentejas y volvemos a evaporar para disolver el residuo en 1 ml de agua destilada. Con esta solución hacemos la cromatografía.

Empleamos papel Whatman núm. 1.

Desarrollo monodimensional

Los disolventes empleados fueron los siguientes: 1) butanol-n, 40; ácido acético, 10; agua, hasta saturación; 2) butanol-n, 3; ácido acético, 1; agua, 1.

Reveladores: ftalato de anilina y naftoresorcina. Para aminoazúcares empleamos el reactivo de Morgan y Elson (5, 15), que consta de lo siguiente: reactivo a), 1) 0,5 ml de acetilacetona en 50 ml de butanol;

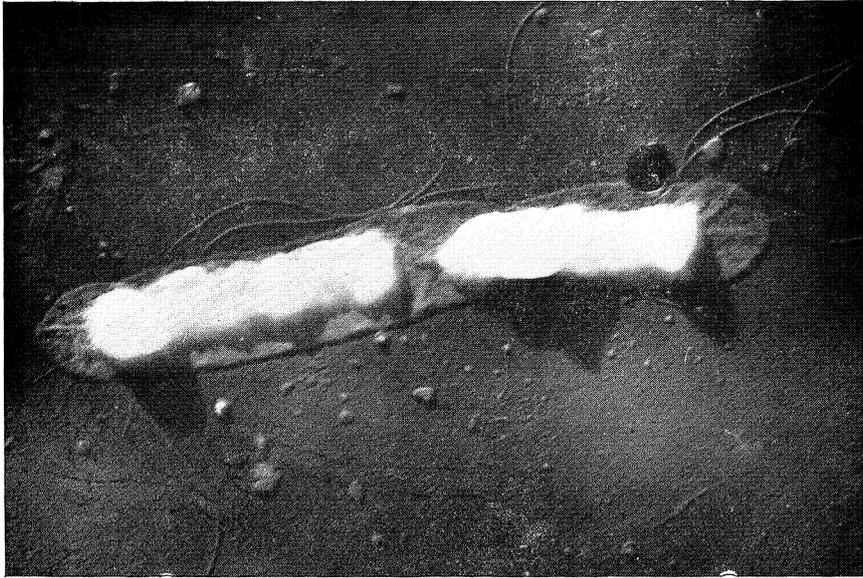


Figura 1. Microfotografía electrónica de la Erwinia carotovora. × 30.000

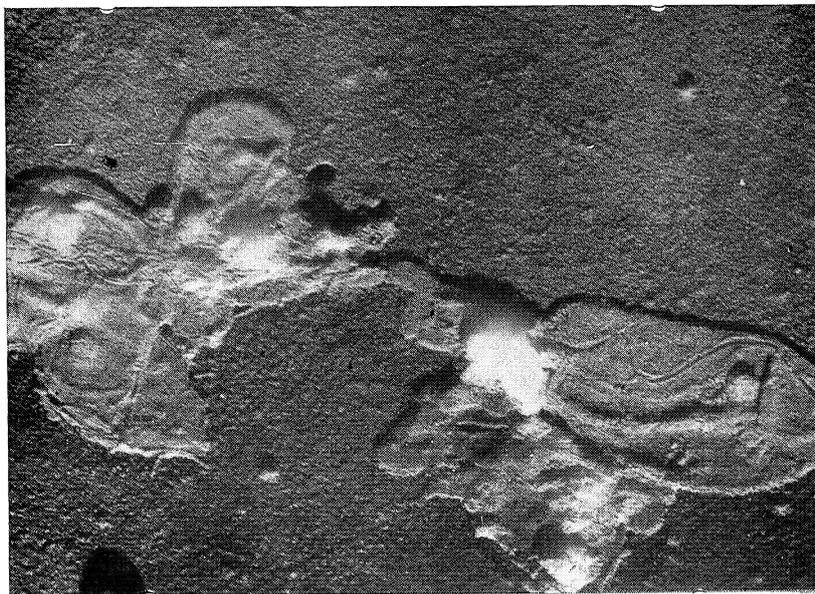


Figura 2. Paredes celulares de la E. carotovora. × 44.000

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 pulverizando inmediatamente con b) y secando a 90 °C.

Revelador, según Salton (18): 1) etanol de 95 por ciento + borato sódico, 0,05 M (v/v); 2) solución de p-dimetilaminobenzaldehído en acético glacial al 2 por ciento (p/v), 10; butanol-n, 30, y ácido clorhídrico concentrado, 0,04. Pulverícese con 1). Séquese el cromatograma con vapor fluente en autoclave, durante diez minutos; pulverícese el cromatograma con 2). Conviene preparar los reactivos diariamente, bien que a la temperatura normal suelen conservarse durante una semana.

Revelador de Hough (10); difenilamina al 2 por ciento en una mezcla a partes iguales de butanol y metanol que contenga 5 por ciento de ácido tricloroacético.

Determinación de nitrógeno

Empleamos el método corriente de micro-Kjeldahl.

RESULTADOS

Las microfotografías electrónicas (*figuras 1-2*) muestran a la *Erwinia carotovora* cultivada por nosotros en el medio y condiciones señaladas anteriormente y las paredes celulares obtenidas de ellas; en éstas no pudimos observar ninguna estructura particular.

Las paredes celulares, una vez secas hasta peso constante, dieron un peso de 0,1155 g, de los que obtuvimos 0,017 g de sustancia grasa, que corresponden a un 11,2 por ciento. Esta grasa es sólida a la temperatura ambiente y tiene un color amarillento verdoso.

La proteína separada posteriormente dio un contenido en nitrógeno equivalente a un 7,5 por ciento.

Después de la hidrólisis de esta proteína por los métodos expuestos, encontramos los aminoácidos indicados en el *cuadro 1* (el número de cruces está en relación directa con la mayor concentración encontrada).

Cuadro 1

Aminoácidos	Cantidad
Acido diaminopimélico	+
Lisina	+++
Arginina	++
Acido aspártico	+++
Glicina	++
Acido glutámico	+++
Alanina	+++
Valina	+
Fenilalanina	+
Isoleucina	++
Leucina	+++

En la investigación cromatográfica del componente glucídico encontramos los monosacáridos señalados en el *cuadro 2*.

Cuadro 2

Monosacáridos	Cantidad
Glucosa	+++
Ramnososa	+

No se encontraron glucosamina ni galactosamina, pero sí detectamos una mancha de color gris verdoso con el reactivo de Hough, que corresponde a una N-acetilglucosamina con un Rf de 0,45; ésta fue más intensa cuando hicimos la hidrólisis a 37 °C en medio clorhídrico; en dos cromatogramas también observamos una mancha más débil, que correspondería a otro derivado acetilado, con Rf de 0,64 y 0,60, respectivamente.

DISCUSION

Si comparamos en los cuadros 3-4 los resultados obtenidos después de la hidrólisis, en el complejo glucoprotéico correspondiente a las paredes de la *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens* y formas L fijas, vemos que respecto a las cantidades de ácido aspártico, ácido glu-

Cuadro 3

Aminoácidos	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Forma L
Acido diaminopimélico	+	++	+
Lisina	+++	.	+
Arginina	++	+	—
Acido aspártico	+++	+++	+++
Acido glutámico	+++	+++	+++
Treonina	—	+	+
Glicina	++	—	—
Alanina	+++	++	+++
Valina	+	.	+
Fenilalanina	+	+	+
Isoleucina	++	.	+
Leucina	+++	++	+

Cuadro 4

Monosacárido	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Forma L
Glucosa	+++	++	+++
Xilosa	—	+	—
Ribosa	—	+++	+
Ramnosa	+	+++	—
N-acetilglucosamina	+	—	—

támico, alanina y leucina no hay diferencias apreciables dentro de los límites del error analítico y tampoco existe diferencia manifiesta en cuanto a las cantidades encontradas de ácido diaminopimélico, pero sí son

notables en cuanto al contenido en lisina. En la pared de la forma normal del *A. tumefaciens* solamente se encontraron indicios de este aminoácido, mientras que en la pared correspondiente a la *E. carotovora*, el referido aminoácido se encuentra entre los más preponderantes. Señalábamos en el estudio de la composición química de las paredes celulares del *A. tumefaciens* y de sus formas L fijas, los trabajos de Work y otros autores (2, 8-9, 13-14, 24) que demostraron la presencia en extractos de *Escherichia coli* y *Aerobacter aerogenes*, de diaminopimelicodescarboxilasa y racemasa, dos enzimas que actuando sobre la forma meso del ácido diaminopimélico le transformaban en lisina y anhídrido carbónico. El encontrar en las paredes celulares de la *E. carotovora* gran cantidad de lisina hace pensar en la existencia de este tipo de enzimas en la pared del microorganismo en mayor proporción o en mejores condiciones para su actuación, análogamente a lo indicado respecto a la composición química de las paredes de la forma normal y L del *A. tumefaciens*.

Otra diferencia entre los aminoácidos originados en la hidrólisis de la proteína de la pared de ambos microorganismos es la sustitución de glicina por treonina en el *Agrobacterium tumefaciens* y su forma L fija.

Como nota característica de la composición del mucopéptido de la pared de estos microorganismos patógenos de plantas, debemos señalar la presencia, en gran proporción, de dos aminoácidos, ácido aspártico y leucina, no señalados como fundamentales en la composición del mucopéptido de la pared de otros gérmenes gram-negativos.

Respecto a los glúcidos, la simple observación del cuadro 4 nos pone de manifiesto mayores diferencias. Es notable la ausencia en la pared de la *Erwinia carotovora*, de ribosa y xilosa, que no pudieron ponerse de manifiesto ni siquiera en la hidrólisis hecha a 37 °C, en contraste sobre todo con la existencia preponderante de ribosa en la pared del *Agrobacterium tumefaciens*; también la proporción de ramnosa es muy inferior en aquellas paredes donde parece ser predominan los compuestos glucosídicos. El encontrar una mancha correspondiente a N-acetilglucosamina y ser más claramente caracterizada en el hidrolizado efectuado a 37 °C, nos hace coincidir con Perkins (16) en que la fácil hidrólisis de la N-acetilglucosamina y glucosamina sea la causa de su difícil evidencia; esta N-acetilglucosamina correspondería a un fragmento del ácido teicoico de la pared celular.

Salton (19) señala que en la pared de los organismos gram-negativos

existe menor proporción de aminoazúcares y mayor de grasa que en los gram-positivos, coincidiendo con nuestros resultados.

Perkins y Rogers (17), estudiando las paredes de las bacterias gram-positivas, señalan la existencia de un mucopéptido formado por ácido glutámico, alanina, ácido murámico, glucosamina y lisina o ácido diaminopimélico, al que hacen responsable de la rigidez de la pared; este mucopéptido siempre es atacado por la lisozima, aunque con diferente intensidad y sin guardar relación con la cantidad de aminoazúcares que contiene (22). El mismo autor señala un incremento manifiesto en la digestión por lisozima de las paredes del *Lactobacillus arabinosa* después de la eliminación de los grupos o-ésteres del ácido teicoico presente en las paredes, y apunta también la posibilidad de uniones de manera específica entre estos compuestos y posibles relaciones con el incremento en la digestión de las paredes por la lisozima; también Brumfitt y colaboradores (4) observan que la resistencia al ataque por la lisozima de un mutante del *Micrococcus lysodeikticus* era debida a la presencia de grupos o-acetilos. Allsop y Work (1) investigan la composición de las paredes de dos especies de *Propionibacterium*: éstas no son atacadas por la lisozima, contienen aminoácidos y azúcares unidos al mucopéptido, tales como ácido aspártico, treonina, serina, valina y azúcares, pero después de eliminados estos aminoácidos y glúcidos por un tratamiento con formanida, la pared es sensible a la digestión por la lisozima, demostrando el análisis que está integrada por los constituyentes básicos del mucopéptido antes señalado.

Mandelstan (11) describe un método para el aislamiento del mucopéptido de la pared de los microorganismos gram-negativos basado en sucesivas extracciones, encontrando que es semejante al de los gérmenes gram-positivos y siendo también atacado por la lisozima, pero su proporción referida a peso seco de la pared es en general de 0,2-1 por ciento, mientras que en las bacterias gram-positivas oscila de 10-20 por ciento. Mandelstan y Rogers (12), entre otros investigadores, señalan que ciertos microorganismos cultivados en diversos medios poseen otros aminoácidos, como glicina, serina, treonina y también glucosamina, unidos al mucopéptido básico, aunque en proporción no constante.

Czerkawski y colaboradores (7) mantienen que los principales constituyentes de la pared del *Micrococcus lysodeikticus* son ácido N-acetilmurámico, N-acetilglucosamina, ácido glutámico, lisina, glicina y alanina

en la proporción molecular de 0,8 : 1 : 1 : 1 : 1 : 2, y que este mucopéptido constituye el 85 por ciento de la pared, sacando la conclusión de que alrededor de la mitad de los grupos aminos de la lisina del mucopéptido están combinados posiblemente con una proporción similar de los grupos carboxílicos del ácido glutámico.

Perkins y Rogers (17) aislan del *Micrococcus lysodeikticus* un polímero de glucosa y ácido 2-acetamido-2-desoximanurónico, que no contiene aminoácidos, glucosamina ni ácido murámico.

Según algunos de los autores ya citados (11, 17) existe un mucopéptido básico común o semejante en los microorganismos gram-positivos y gram-negativos, sensible a la lisozima y compuesto de ácido glutámico, alanina, ácido murámico, glucosamina, lisina y ácido diaminopimélico (ciertos autores señalan sólo un aminoácido de estos dos últimos como responsable de la rigidez de la pared celular). Por nuestra parte, conforme a los resultados obtenidos (*cuadros 3-4*), tenemos:

1) Respecto a los aminoácidos, en las paredes del *Agrobacterium tumefaciens*, en los de su forma L fija y en la *Erwinia carotovora*, encontramos los cuatro fundamentales, predominando en general el ácido glutámico.

2) En cuanto a los azúcares y sus derivados, las diferencias con el mucopéptido generalmente admitido son grandes; solamente en la *Erwinia carotovora* hemos podido caracterizar concretamente una N-acetilglucosamina, juntamente con glucosa en mayor proporción y ramnosa, mientras que en la pared de los otros gérmenes no pudimos encontrar derivados nitrogenados de glúcidos, aunque no descartamos que por encontrarse en muy pequeña proporción fuesen destruidos durante la hidrólisis.

El que la rigidez de la pared celular sea debida al mucopéptido indicado, nos sugiere un problema. La pared de la forma L fija del *Agrobacterium tumefaciens* no es rígida y, sin embargo, en cuanto a constituyentes químicos de los denominados fundamentales del mucopéptido responsable de la rigidez y proporción de éstos, no se diferencia sensiblemente de los encontrados en la forma normal, como se observa en los *cuadros 3-4*. No conocemos la forma en que estos constituyentes se unen para formar el mucopéptido, ni el papel que juegan los otros aminoácidos encontrados, como tampoco los posibles grupos ortoésteres y teicoicos que juntamente con la gran cantidad de grasa presente en estas paredes

de microorganismos gran-negativos forman la totalidad de la pared, pero parece indudable que desempeñan una función en el entramado rígido de la misma.

El estudio del mucopéptido fundamental de la forma L fija del *Agrobacterium tumefaciens* comparado con el de otras formas normales, posiblemente nos daría la clave de la rigidez de la pared celular.

RESUMEN

Se ha realizado el análisis químico de las paredes celulares obtenidas de la *Erwinia carotovora*. Se separó un componente graso que equivale al 11,2 por ciento de su peso seco. En el análisis del mucopéptido de la pared se encontraron fundamentalmente los aminoácidos típicos de éste más ácido aspártico y leucina y, en menor proporción, glicina y arginina. Entre los monosacáridos se halló predominantemente glucosa, menores cantidades de ramnosa y se pudo poner de manifiesto la N-acetilglucosamina.

Se comparan estos resultados con los encontrados por uno de nosotros en el análisis de las paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas L fijas, indicando sus diferencias. Se señala el interés del estudio del mucopéptido de la pared de estas últimas.

SUMMARY

Erwinia carotovora cell walls were analyzed: 11.2 per cent of fatty component in dry weight was isolated. Besides the fundamental amino acid of the basic mucopeptide aspartic acid and leucine and, in less proportion, arginine and leucine, were found. Glucose was predominant in the monosaccharides together with rhamnose. N-acetyl-glucosamine was present.

The results were compared with those obtained in a previous paper on normal *Agrobacterium tumefaciens* and its fixed L form.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLSOP, J., y WORK, E. 1963. *Biochem. J.*, 87, 512.
2. ANTIA, M.; HOARE, D. S., y WORK, E. 1957. *Biochem. J.*, 65, 448.
3. BLOK, R. J. 1958. *Paper chromatography*. Academic Press Inc., Nueva York.
4. BRUMFITT, W.; WARDLAW, A. C., y PARK, J. T. 1958. *Nature*, 181, 1.783.
5. CRAMER, F. 1958. *Cromatografía sobre papel*, 3.^a edición.
6. CUMMIS, C. S., y HARRIS, H. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 173.
7. CZERKAWSK, J. W.; PERKINS, H. R., y ROGERS, J. 1963. *Biochem J.*, 86, 468.
8. DEWEY, A. L.; HOARE, D. S., y WORK, E. 1954. *Biochem. J.*, 58, 523.
9. DEWEY, D. L., y WORK, E. 1952. *Nature*, 169, 533.
10. HOUGH, L.; JONES, J. K. N., y WADMAN, W. 1950. *J. Chem. Soc.*, 1.702.
11. MANDELSTAN, J. 1962. *Biochem. J.*, 84, 294.
12. MANDELSTAN, J., y ROGERS, J. 1959. *Biochem. J.*, 72, 654.
13. MEADOW, P., y WORK, E. 1958. *Biochim. Biophys. Acta*, 28, 596.
14. MEADOW, P., y WORK, E. 1959. *Biochem. J.*, 72, 400.
15. MORGAN, W. T. J., y AMINOFF, S. 1948. *Nature*, 162, 579.
16. PERKINS, H. R. 1963. *Biochem. J.*, 86, 475.
17. PERKINS, H. R., y ROGERS, J. 1959. *Biochem. J.*, 72, 647.
18. SALTON, M. R. J. 1959. *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 308.
19. SALTON, M. R. J. 1960. *Microbial cells wall*. Wiley, Londres-Nueva York.
20. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 19.
21. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 177.
22. SALTON, M. R. J., y PAULIK, J. G. 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, 39, 398.
23. SANTAOLALLA, M. 1963. *Microbiol. Españ.*, 16, 25.
24. WORK, E. 1961. *J. Gen. Microbiol.*, 25, 167.

C. S. I. C.
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
SECCION DE BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGIA CELULAR

CITRAMALATOSINTASA EN *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* (*)

por

J. L. CANOVAS, M. RUIZ-AMIL y M. LOSADA

La citramalatosintasa, enzima que cataliza la condensación de acetilcoenzima A ($\text{Ac} \sim \text{CoA}$) y piruvato a citramalato, fue estudiada primeramente en la bacteria fotosintética *Chromatium* (1, 13) y más tarde en diferentes bacterias (3, 8, 15-16), hojas de *Bryophyllum* (4) y levadura de panadería (12).

Varios autores (1, 5, 11, 13) han sugerido que la reacción condensante catalizada por esta enzima podría ser la etapa inicial para la formación de ácido glutámico, a través de un proceso asimilatorio independiente del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y similar a la ruta degradativa de glutamato encontrada por Barker (2) en *Clostridium tetanomorphum*. En la vía de Barker, el citramalato es desdoblado en acetato y piruvato por la acción de la citramalasa en una reacción que no requiere CoA.

El presente trabajo revela la presencia de citramalatosintasa en la bacteria fotosintética *Rhodopseudomonas palustris*.

MATERIAL Y METODOS

Una cepa de *Rhodopseudomonas palustris* procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (11168), fue crecida en la luz utilizando un banco de lámparas de wolframio, a una temperatura aproximada

(*) El presente trabajo ha sido realizado con Ayudas del Instituto Nacional de Sanidad de los Estados Unidos (AM 06848-01) y de la Fundación «Juan March».

de 30 °C, en frascos de vidrio con tapón esmerilado, completamente llenos de medio de cultivo, para excluir el aire. El sobrecalentamiento de los cultivos por la radiación térmica de las lámparas fue evitado mediante un sistema de aireación con turbinas de aire. Como solución nutritiva se utilizó el medio de malato descrito por Hoare (9), incubándolo con inóculos aproximadamente del 3 por ciento. La cepa fue conservada por siembra en picadura en el medio indicado, solidificado con ágar al 2 por ciento.

Las células fueron cosechadas al cabo de treinta y seis horas de incubación por centrifugación a 8.000 g durante cinco minutos, y se lavaron con solución 0,05 M de fosfato potásico, pH 7,3. El rendimiento medio obtenido fue de 4-5 g (peso húmedo) de células/1 de cultivo. La preparación de los extractos se llevó a cabo triturando en mortero las células con alúmina y extrayendo a continuación con fosfato potásico 0,05 M, pH 7,3. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 30.000 g durante veinte minutos, fue entonces dializado durante veinte horas contra el tampón de fosfato indicado. Todas las operaciones se realizaron a 0°-4 °C. El contenido en proteína de los extractos se determinó espectrofotométricamente, según el método de Warburg y Christian (18).

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 30 °C y fueron detenidas al tiempo deseado por adición de ClH hasta una concentración final de 0,6 N. Después de separar por centrifugación la proteína precipitada, se analizaron los productos formados a partir de los diferentes compuestos radiactivos empleados, por cromatografía bidimensional (en papel Whatman núm. 41) y radioautografía. Como disolventes se utilizaron una mezcla de n-butanol + ácido acético glacial + agua (52 : 14 : 34, v/v), y otra de fenol + agua (80 : 20, p/v). Los compuestos radiactivos aislados en los cromatogramas se identificaron por cocromatografía con muestras de los compuestos auténticos y sus cantidades se calcularon midiendo su radiactividad sobre el papel seco.

El origen de los productos empleados fue el siguiente: el ácido DL-citramálico fue amablemente suministrado por el Prof. A. V. Trebst y la alúmina (A-305) por «Alcoa». El coenzima A (CoA), adenosintrifosfato (ATP) y piruvato fueron proporcionados por la «Sigma Chemical Company»; el acetato ¹⁴C-2 y el piruvato ¹⁴C-1, por el «Radiochemical Centre», de Amershan. El Ac-CoA se preparó según el método descrito por Stadtman (17).

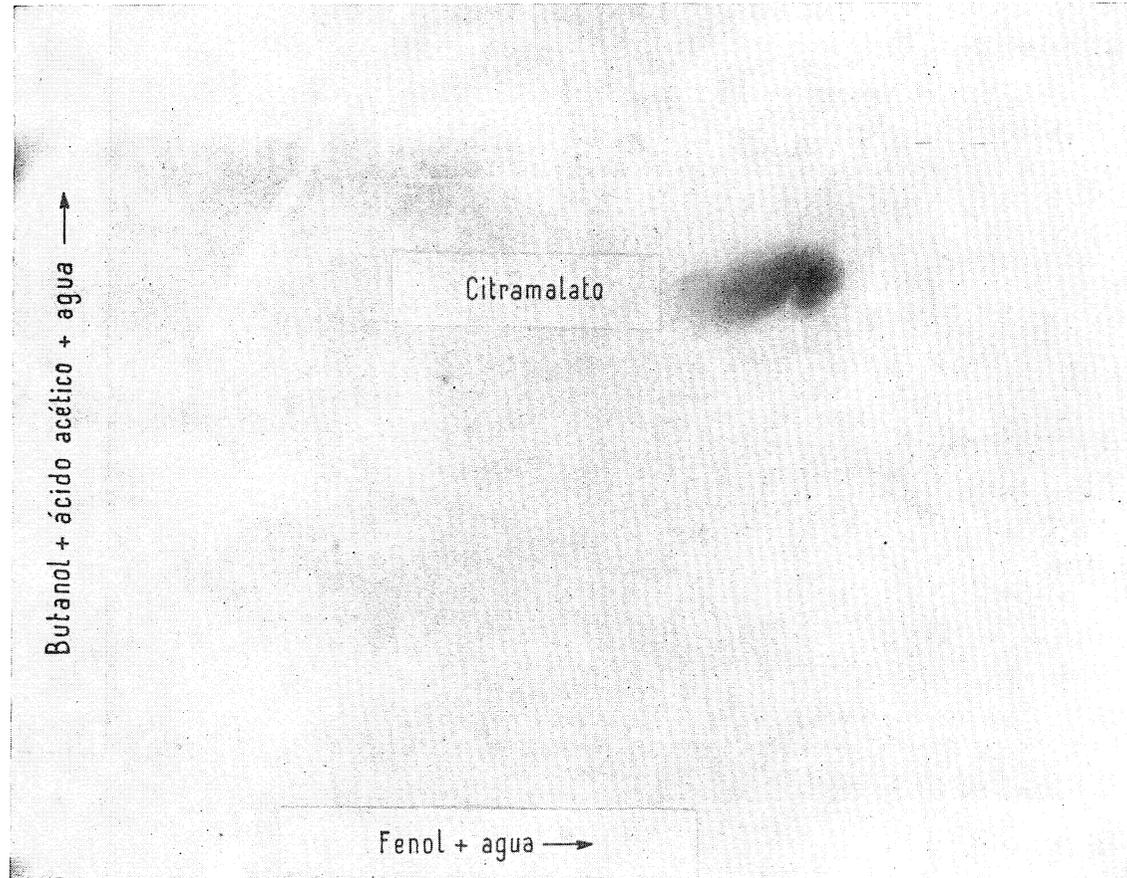


Figura 1. Radioautografía de un cromatograma mostrando los productos de la fijación de acetato ^{14}C -2 por extractos libres de células de *Rhodospseudomonas palustris*. Condiciones experimentales: como en el tratamiento 1 del cuadro 1

RESULTADOS

Los resultados recogidos en el *cuadro 1* muestran que los extractos de *Rhodopseudomonas palustris* catalizan la incorporación de acetato ^{14}C en presencia de piruvato, formando citramalato. Cuando se utilizaron extractos inactivados por el calor, desapareció la radiactividad en la zona del ácido citramálico, demostrando la naturaleza enzimática de la reacción. En ausencia de CoA y ATP, la reacción no tuvo lugar, prácticamente. Los indicios de citramalato formado cuando se omitió en los sistemas reaccionantes la adición de estos cofactores pueden explicarse por el aporte mínimo que de los mismos hacen los propios extractos.

Cuadro 1. Formación de citramalato a partir de acetato y piruvato por extractos de Rhodopseudomonas palustris ()*

Sistema	Radiactividad en citramalato, impulsos/minuto
1. Completo	23.500
2. Piruvato omitido	200
3. CoA omitido	2.000
4. ATP omitido	2.000
5. Completo, extracto hervido	0

(*) La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1,0 ml, extracto dializado de *Rh. palustris* equivalente a 10 mg de proteína, y en micromoles: tampón tris, pH 7,6, 100; cloruro magnésico, 10; cloruro amónico, 20; glutatión reducido, 10; acetato ^{14}C -2 (4 μc), 2; CoA, 0,2; piruvato, 5; ATP, 5. Tiempo de reacción, treinta minutos.

Se ha calculado una actividad específica de citramalatosintasa de 50 $\mu\text{mol/h}$ y mg de proteína en los extractos dializados de *Rh. palustris*. La *figura 1* corresponde a la radioautografía de un cromatograma, que muestra el producto de la condensación de acetato y piruvato ^{14}C -2 catalizada por los extractos de *Rh. palustris*. Como puede observarse, el único compuesto radiactivado formado en cantidades significativas fue el ácido citramálico.

Tal como ocurre en otros microorganismos, el *Rhodopseudomonas palustris* lleva a cabo la síntesis de citramalato por una condensación directa de Ac~CoA y piruvato. Esto se demostró incubando los extractos con Ac~CoA no radiactivo y piruvato ¹⁴C-1. Las condiciones experimentales y los resultados obtenidos aparecen en el cuadro 2. En la prueba testigo, en la que se suprimió la adición de Ac~CoA, la radiactividad incorporada en citramalato fue despreciable.

Cuadro 2. Condensación de Ac~CoA y piruvato por extractos de *Rhodopseudomonas palustris* (*)

Sistema	Radiactividad en citramalato, impulsos/minuto
1. Completo	21.500
2. Ac~CoA omitido	2.600

(*) Condiciones experimentales del sistema completo, como en el tratamiento 1 del cuadro 1, excepto que se omitió la adición de acetato ¹⁴C-2, CoA, ATP y piruvato, y se añadieron Ac~CoA y piruvato ¹⁴C-1 (5 µc), 2 µmol de cada.

DISCUSION

La síntesis biológica de ácidos dicarboxílicos ramificados de 5 átomos de carbono tiene lugar en los microorganismos estudiados hasta ahora por medio de dos reacciones diferentes. Bentley y Thiessen (4) y Jensen y colaboradores (10) demostraron que los extractos libres de células de *Aspergillus terreus* formaban ácido itacónico por descarboxilación del ácido cis-acotínico, mientras que Losada y colaboradores (13) encontraron que, en *Chromatium*, el precursor del ácido itacónico era el ácido citramálico formado por condensación de piruvato y Ac~CoA. La interconversión de itaconato y citramalato ha sido claramente demostrada en bacterias (6, 15). Nuestros resultados indican que en *Rhodopseudomonas*, el ácido citramálico se forma por condensación de Ac~CoA y piruvato y no a través de citrato y cis-aconitato.

Según se ha indicado, diversos autores (1, 5, 11, 13) han propuesto

la existencia en organismos fotosintéticos (*Chromatium*, hojas de *Bryophyllum* y *Chlorella*) de una ruta metabólica de síntesis de ácido glutámico, cuya fase inicial sería la formación de citramalato. Por otra parte, Hoare (9) ha demostrado que durante el fotometabolismo del acetato por *Rhodospirillum rubrum*, el primer compuesto hidrosoluble formado era ácido glutámico, concluyendo que su síntesis había de tener lugar por una ruta desconocida y distinta de lo convencional a través del ciclo del ácido cítrico, sin que sus resultados excluyan, sin embargo, el esquema propuesto por Arnon y colaboradores (1, 13). Glover y colaboradores (7) encontraron que incubando en la luz células en reposo de *Rh. rubrum* con acetato ^{14}C , el producto de la fracción soluble con mayor porcentaje de radiactividad (60 por ciento en veinticuatro segundos) era el «Compuesto X», cuyos valores de Rf en distintos disolventes eran muy parecidos a los del ácido α -cetoglutámico. Parece probable que este compuesto fuese ácido citramálico, dado por un lado su comportamiento cromatográfico y por otro el que Benedict (3) identificara como citramalato uno de los primeros compuestos formados por *Rh. rubrum* a partir del acetato.

Creemos lógico que si tanto en *Chromatium* como en *Rhodospirillum rubrum*, el citramalato y el glutamato son productos primarios y mayoritarios en la asimilación del acetato, su metabolismo puede estar íntimamente ligado. No obstante, los experimentos realizados por nosotros sobre la distribución isotópica del carbono radiactivo procedente del acetato ^{14}C incorporado por extractos de la bacteria fotosintética *Rh. palustris*, no han proporcionado evidencia alguna de síntesis de glutámico a partir de citramalato. Por lo tanto, la función fisiológica de la citramalatosintasa en el microorganismo estudiado permanece por el momento desconocida.

RESUMEN

Extractos libres de células de *Rhodopseudomonas palustris* incorporan acetato ^{14}C en citramalato en presencia de piruvato, CoA y ATP.

La fijación del acetato está catalizada por la citramalatosintasa presente en los extractos, que condensa $\text{Ac} \sim \text{CoA}$ y piruvato, formando citramalato.

Se discute la posible función fisiológica de esta reacción en la síntesis de material celular.

SUMMARY

Cell free extracts of *Rhodospseudomonas palustris* catalyze the incorporation of C¹⁴-acetate into citramalate in the presence of pyruvate, CoA and ATP.

The acetate fixation is catalyzed by the citramalate synthase present in the extracts which condenses Ac-CoA and pyruvate forming citramalate.

The possible physiological function of this reaction in the synthesis of cell material is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. ARNON, D. I.; LOSADA, M.; TREBST, A. V., y OGATA, S. 1960. Federation Proc., 19, 329.
2. BARKER, H. A. *En*: I. C. GUNSALUS y R. STANIER. 1961. The bacteria, 2, 151.
3. BENEDICT, C. R. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 56, 620.
4. BENTLEY, R., y THIESSEN, C. P. 1957. J. Biol. Chem., 226, 703.
5. CALVIN, M., y BASSHAM, J. A. 1962. The photosynthesis of carbon compounds, 35. W. A. Benjamin Inc., Publishers, Nueva York.
6. COOPER, R. A., y KORNBERG, H. L. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 62, 438.
7. GLOVER, J.; KAMEN, M. D., y VAN GENDEREN, H. 1952. Arch. Biochem. Biophys., 35, 384.
8. GRAY, C. T., y KORNBERG, H. L. 1960. Biochim. Biophys. Acta, 42, 371.
9. HOARE, D. S. 1963. Biochem. J., 87, 284.
10. JENSEN, E. B.; LARSEN, H., y ORMEROD, J. G. 1956. Acta Chem. Scand., 10, 1.047.
11. JOLCHINE, G. 1962. Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 337.
12. LOSADA, M.; CÁNOVAS, J. L., y RUIZ-AMIL, M. 1964. Biochem. Z. (en prensa).
13. LOSADA, M.; TREBST, A. V.; OGATA, S., y ARNON, D. I. 1960. Nature, 186, 753.
14. NAGAI, J. 1963. J. Biochem. (Tokyo), 53, 181.
15. NAGAI, J. 1963. J. Biochem. (Tokyo), 54, 34.
16. RUIZ-AMIL, M.; CÁNOVAS, J. L., y LOSADA, M. 1963. Microbiol. Españ., 2, 231.
17. STADTMAN, E. R. *En*: S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN. 1957. Methods in enzymology, 3, 931.
18. WARBURG, O., y CHRISTIAN, W. 1941. Biochem. Z., 310, 384.

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

SOBRE LA FISIOLOGIA DE LA REPRODUCCION
SEXUAL DE LOS GENEROS
PHYTOPHTHORA Y *PYTHIUM*(*)

por

J. A. LEAL

La mayor dificultad del estudio del género *Phytophthora* consiste en no conocer un medio sintético en el que dicho género se reproduzca. La mayoría de las especies de los géneros *Phytophthora* y *Pythium* se reproducen en extracto acuoso de avena y guisantes. Esto nos indujo a extraer mediante éter, avena y guisantes, hallando una sustancia que, purificada a través de cromatografía en columna y precipitada con digitonina, fue identificada por cromatografía en capa fina, como un esteroide. Esta sustancia es la responsable de la reproducción sexual de varias especies homotálicas y heterotálicas del género *Phytophthora*, y de algunas del género *Pythium*.

Se puso de manifiesto la actividad de esta sustancia al comprobar la formación de oosporas cuando era añadida a medios sintéticos que por sí solos carecen de la propiedad de que los géneros *Phytophthora* y *Pythium* se reproduzcan en ellos.

Los medios sintéticos empleados están compuestos de glucosa o

(*) Resumen de una conferencia desarrollada recientemente en el Centro de Investigaciones Biológicas, que expone el trabajo en curso en el Departamento de Botánica de la Universidad de Hull (Inglaterra).

sacarosa como fuente de carbono, aminoácidos, como fuente de nitrógeno, vitamina B₁ y sales. La composición es la siguiente:

A

Sacarosa	30 g
(NO ₃) ₂ Ca	0,05 g

B

L-asparagina	2 g
PO ₄ H ₂ K	0,6 g
SO ₄ Mg · 7H ₂ O	0,3 g
Vitamina B ₁	0,001 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.000 cm ³

A este medio se añade 1 cm³ de la siguiente solución:

SO ₄ Fe · 7H ₂ O	50 mg
SO ₄ Zn · 7H ₂ O	50 mg
SO ₄ CU · 5H ₂ O	2 mg
Cl ₂ Mn · 4H ₂ O	2 mg
MoO ₄ Na · 2H ₂ O	2 mg

A y B se esterilizan separadamente y después se unen. pH, 5,5.

En experimentos preliminares se comprobó que no todos los aminoácidos son favorables para la producción de oosporas.

El estigmasterol, colesterol y β-sitosterol se comportan de la misma manera que el esteroles extraído de guisantes o de avena cuando son añadidos a los medios sintéticos empleados.

SUMMARY

A substance responsible of the sexual reproduction in the genera *Phytophthora* and *Pythium* was extracted from peas and oats and purified by column chromatography. This compound was isolated and identified as a sterol.

DR. EDUARDO GALLARDO (†)

En Madrid, el 26 del pasado mes de enero, falleció D. Eduardo Gallardo Martínez, miembro del Instituto «Jaime Ferrán» y de la Directiva de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, figura destacada dentro del campo de la Virología.

Nacido en Toledo el 4 de abril de 1879, obtuvo el título en la Facultad de Medicina de la Universidad de Madrid en 1901. Ejerció la Medicina en un principio, pero, atraído por el Laboratorio, se incorporó al entonces Instituto Nacional de Higiene, como ayudante, primero, y más tarde como jefe de la Sección de Vacunación y profesor de Bacteriología. Pensionado por la Fundación «Rockefeller», permaneció en el Instituto «Rockefeller» de los Estados Unidos dedicado al estudio de las técnicas para los cultivos *in vitro*, durante los años 1933-34, y a su vuelta obtuvo una Ayuda de dicha Fundación para continuar sus trabajos en el Instituto de Sanidad. En 1939 formó parte del Comité creado para el control de la epidemia de tifus exantemático, y en 1940 fue designado profesor de Etiología y Epidemiología de las enfermedades víricas. En 1947-48 volvió nuevamente a los Estados Unidos, enviado por la Junta de Relaciones Culturales y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas; trabajó sobre aislamiento e identificación de los virus en la Universidad de California, primero, y luego, sobre fiebre amarilla y tifus exantemático, en el Laboratorio Federal de Hamilton (Montana). Desde 1950, en que fue nombrado Investigador del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, desempeñó la Jefatura del Laboratorio de Virus animales, creado por él, alternando las tareas investigadoras con las de formación de personal y dirección de tesis.

Obtuvo el premio «Ramón y Cajal», 1945, del C. S. I. C., por su trabajo «Nuevas aportaciones al conocimiento del virus vacunal». Publi-



có numerosos trabajos en revistas españolas y extranjeras, entre otros temas, acerca de neurovacuna, encefalitis, viruela, tifus exantemático y virus gripales. En las páginas de MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA se ha publicado, como ya conocen nuestros lectores, buen número de los trabajos dirigidos por él en el Consejo.

En 1961, el Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos le concedió una Ayuda de investigación por un período de cuatro años, para que, en unión del personal del Laboratorio, desarrollase el tema «Estudios sobre la técnica del cultivo de tejidos para la investigación de virus animales», tema que será continuado por sus discípulos.

Brevemente, las líneas anteriores han pretendido recoger las tareas científicas del Dr. Eduardo Gallardo. En el orden de sus nobles cualidades humanas, destacó siempre el firme concepto del deber. El Señor le habrá dado reposo cumplido, limpio final para una vida de trabajo y buen proceder.

CURSO SOBRE BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS

Durante los meses de enero-marzo se ha celebrado este curso en el Centro de Investigaciones Biológicas, bajo la dirección del Dr. Julio Rodríguez Villanueva. Las clases corrieron a cargo de miembros del Centro y otros, invitados. Por el primer grupo intervinieron los doctores Gertrudis de la Fuente, Manuel Losada, Julio Rodríguez Villanueva, Miguel Rubio, Alberto Sols (Investigadores Científicos); Carlos Asensio, Antonio Portolés y Manuel Ruiz Amil (Colaboradores Científicos). Por el segundo grupo, los doctores Federico Mayor (Granada), K. McQuillen Cambridge), J. O. Lampen (Rutgers) y M. Welsch (Lieja).

ASOCIACION DE PARASITOLOGOS ESPAÑOLES

Se ha constituido esta Asociación, que tiene como fines principales: a) promover y fomentar las relaciones entre los distintos cultivadores de la Parasitología en España; b) mantener e incrementar el interés por los problemas de la Parasitología, estimulando su estudio en nuestra Patria; c) organizar congresos y reuniones científicas de la especialidad; d) establecer y desarrollar todo tipo de intercambios culturales con las instituciones semejantes de España y del extranjero.

Ha sido elegido el Consejo directivo, que preside el Prof. Valentín Matilla Gómez, y del que es Secretario General el Dr. José González Castro. El domicilio social ha quedado instalado en el Instituto «López-Neyra», de Parasitología, de Granada. Asimismo, la «Revista Ibérica de Parasitología» ha sido designada órgano de difusión de la nueva entidad.

CURSO SOBRE BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS

Durante los meses de enero-marzo se ha celebrado este curso en el Centro de Investigaciones Biológicas, bajo la dirección del Dr. Julio Rodríguez Villanueva. Las clases corrieron a cargo de miembros del Centro y otros, invitados. Por el primer grupo intervinieron los doctores Gertrudis de la Fuente, Manuel Losada, Julio Rodríguez Villanueva, Miguel Rubio, Alberto Sols (Investigadores Científicos); Carlos Asensio, Antonio Portolés y Manuel Ruiz Amil (Colaboradores Científicos). Por el segundo grupo, los doctores Federico Mayor (Granada), K. McQuillen Cambridge), J. O. Lampen (Rutgers) y M. Welsch (Lieja).

ASOCIACION DE PARASITOLOGOS ESPAÑOLES

Se ha constituido esta Asociación, que tiene como fines principales: a) promover y fomentar las relaciones entre los distintos cultivadores de la Parasitología en España; b) mantener e incrementar el interés por los problemas de la Parasitología, estimulando su estudio en nuestra Patria; c) organizar congresos y reuniones científicas de la especialidad; d) establecer y desarrollar todo tipo de intercambios culturales con las instituciones semejantes de España y del extranjero.

Ha sido elegido el Consejo directivo, que preside el Prof. Valentín Matilla Gómez, y del que es Secretario General el Dr. José González Castro. El domicilio social ha quedado instalado en el Instituto «López-Neyra», de Parasitología, de Granada. Asimismo, la «Revista Ibérica de Parasitología» ha sido designada órgano de difusión de la nueva entidad.

Depósito Legal: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15 - Madrid