

---

VOLUMEN 19. 1966

ENERO - MARZO. NUMERO 1

# *Microbiología Española*

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



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

## MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

CALLE DE JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

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

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## CONSEJO DE REDACCION

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

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

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

---

## INDICE

	Página
Estudio comparativo del componente graso del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y de sus formas L fijas. II. Variaciones según el medio de cultivo y estudio de los fosfolípidos, por M. Santolalla ... ..	1
Estudio bacteriológico de nuevos derivados fenílicos y nitrofuránicos. I. Prospección inicial e influencia del grupo bromovinileno, por R. Parés-Farrás y J. Guinea ... ..	11
Estudio bacteriológico de nuevos derivados fenílicos y nitrofuránicos. II. Sensibilidad bacteriana y susceptibilidad de cepas urinarias, por R. Parés-Farrás y J. Guinea ... ..	33
Efecto antagónico del <i>Myxococcus xanthus</i> sobre los <i>Azotobacter</i> , por V. Callao, R. Alvarado, A. Sedano, J. Olivares y E. Montoya	45
Actividad del interferón producido por el virus de la seudopeste aviar (NDV) frente a otros mixovirus, por E. Ronda ... ..	53
Crecimiento asociado <i>Chlorella-Azotobacter</i> , por J. Morales ... ..	61
Posibilidades de conservación de levaduras apiculadas (género <i>Kloeckera</i> ) en condiciones adversas de medio ambiente (comunicación previa), por E. Feduchy ... ..	69
El Doctor Ricardo Salaya (†) ... ..	75
Premio de la Academia de Ciencias ... ..	75
Ayuda de Investigación ... ..	75

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

## ESTUDIO COMPARATIVO DEL COMPONENTE GRASO DEL *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* Y DE SUS FORMAS L FIJAS

### II. Variaciones según el medio de cultivo y estudio de los fosfolípidos.

por

M. SANTAOLALLA

#### INTRODUCCION

Anteriormente (12) hemos estudiado algunas diferencias encontradas en la sustancia grasa extraída del *Agrobacterium tumefaciens* y su forma L fija. El encontrar indicios de colesterol en la grasa correspondiente a la forma L cultivada en caldo común, nos sugiere realizar el estudio de la sustancia grasa de este microorganismo cultivado en medio sintético.

También, continuando el estudio de la fracción lipídica de estos microorganismos, realizamos un análisis comparativo de los fosfátidos hallados entre los componentes de estos lípidos microbianos; señalando que, mientras los fosfolípidos de las formas normales bacterianas han sido relativamente estudiados, no conocemos hasta el presente ningún estudio relativo a estos compuestos en las formas L.

## MATERIALES Y METODOS

Empleamos el *Agrobacterium tumefaciens* AT de la vid, que se conserva en la colección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología; las formas L fijas del *A. tumefaciens* fueron conseguidas y suministradas por los Dres. Rubio y Beltrá (11).

*Medios de cultivo*

Empleamos caldo común.

Como medio sintético empleamos el siguiente, cuya única fuente de carbono es la glucosa.

Para 1.500 cm<sup>3</sup>, se hacen por separado las siguientes soluciones:

- 1.<sup>a</sup> Glucosa, 15 g  
Agua, 1.500 cm<sup>3</sup>
- 2.<sup>a</sup> Sulfato amónico, 3 g  
Fosfato dipotásico, 1,77 g

Disolviendo en la menor cantidad de agua, queda la solución a pH 8, aproximadamente.

- 3.<sup>a</sup> Sulfato magnésico cristalizado, 0,027 g  
Sulfato de manganeso, 0,470 g  
Sulfato ferroso, 0,470 g

Se disuelve en 100 cm<sup>3</sup>.

Se esterilizan por separado las tres soluciones y en el momento del cultivo, se mezclan la primera y segunda, añadiendo 1 cm<sup>3</sup> de la tercera; el pH final debe ser de 6,5-7; en caso contrario, se acidula.

Cultivamos ambos microorganismos en los medios de cultivo indicados, en matraces de Erlenmeyer, de 6 l, con agitación, a 25 °C.

A las cuarenta y ocho horas aproximadamente, separamos los cuerpos bacterianos por centrifugación, los lavamos con agua estéril, secándolos a continuación a 50 °C, hasta peso constante.

#### *Extracción y purificación*

Hacemos dos extracciones sucesivas; la primera, con etanol absoluto + éter sulfúrico; la segunda, con cloroformo + metanol; purificamos la grasa por tratamiento con éter de petróleo (los detalles están descritos en 12-13).

#### *Obtención del insaponificable*

Cantidades de sustancia grasa las saponificamos por ebullición a reflujo con metanol potásico, evaporamos el metanol en vacío a menos de 50 °C y añadimos suficiente cantidad de agua para que la solución quede clara. Esta solución la extraemos cuatro veces con igual volumen de éter de petróleo, reunimos estos líquidos etéreos y evaporamos el éter a baja temperatura, quedándonos la sustancia insaponificable.

#### *Investigación del colesterol*

Empleamos la reacción de Liebermann que consiste en añadir anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico a la disolución clorofórmica del problema; la reacción positiva origina un color azul, que pasa al rosa y después al verde. Comprobamos precipitando el digitónido de color blanco sedoso, formado al añadir a la solución alcohólica caliente digitonina disuelta en alcohol.

#### *Fraccionamiento de los lípidos*

Empleamos el método de Hirsch y Ahrens (3), ya utilizado por nosotros en trabajos anteriores (12-13).

#### *Investigación de fosfolípidos*

Empleamos la cromatografía en capa fina, mono y bidimensional, sobre placas de vidrio de 20 × 20 cm. Depositamos una capa de sílica-gel G Merck, de 0,3 mm de espesor, que usamos como absorbente después de reactivada treinta minutos a 130 °C, en estufa. Para el desarrollo de la cromatografía bidimensional sobre placa seguimos fundamentalmente el método propuesto por Lepage (6) para la separación e identificación de fosfolípidos.

*Disolventes*

- 1) Cloroformo + metanol + agua (65: 25: 4, v/v).
- 2) Diisobutilcetona + ácido acético + agua (80: 50: 10, v/v).
- 3) Hexano + éter sulfúrico + ácido acético (90: 10: 1, v/v).

*Reveladores**Vapores de I<sub>2</sub>.*

*Acido perclórico.* Solución para pulverizar, al 20 por ciento.

*Ninhidrina.* Solución pulverizable. A 95 cm<sup>3</sup> de solución al 0,2 por ciento en butanol, se añaden 5 cm<sup>3</sup> de solución acuosa de ácido acético al 10 por ciento. Se calientan las placas en estufa por encima de 100 °C para que se hagan visibles las manchas.

*Ninhidrina.* Solución para pulverizar, al 0,2 por ciento, en butanol, con 1 por ciento de piridina. Se calientan las placas como anteriormente.

*Reactivo de Dragendorff.* Fue preparado según la fórmula de Bregoff-Delviche, ya expuesta en un trabajo anterior (13).

*Rodamina B.* Solución pulverizable, al 0,05 por ciento, en alcohol absoluto.

*Rodamina 6G.* Solución pulverizable acuosa del reactivo, al 0,8 por ciento.

## RESULTADOS

De la forma normal del *Agrobacterium tumefaciens* obtenemos una cantidad de grasa impura que equivale al 8,75 por ciento de la sustancia seca de que partimos; esta grasa, después de purificada, quedó reducida al 8,18 por ciento.

Respecto a las cantidades de sustancia grasa, aislada a partir de la forma L del *Agrobacterium tumefaciens* cultivado en los dos medios señalados, los porcentajes se exponen en el *cuadro 1*, también referidos a la sustancia seca de que partimos.

Cuadro 1

Porcentaje de grasa de la forma L del <i>A. tumefaciens</i>			
Cultivado en caldo común (*)		Cultivado en medio sintético	
Impura	Pura	Impura	Pura
10,56	6,97	6,60	5,58

(\*) Los resultados representan la media aritmética de dos series de cultivos en medios análogos y extracciones por separado.

Como señalamos en un trabajo anterior (12) al purificar la grasa extraída de las formas L mediante el éter de petróleo de bajo punto de ebullición, se separa una sustancia sólida, pulverulenta, de color amarillento, con un contenido en nitrógeno alrededor del 12 por ciento, y que analizada por cromatografía sobre papel, demostró estar compuesta por los aminoácidos siguientes: glicina, ácido glutámico, alanina, treonina, tirosina, valina, leucina, isoleucina y fenilalanina.

Identificamos el colesterol mediante la reacción de Liebermann y precipitación del digitónido en el insaponificable de la grasa correspondiente a la forma L cultivada en caldo común, y también en la fracción correspondiente al colesterol de la misma grasa. No podemos ponerlo de manifiesto en los insaponificables, como tampoco en las distintas fracciones grasas correspondientes a la forma normal del *Agrobacterium tumefaciens*, ni en aquellas procedentes de la forma L cultivada en medio sintético.

#### Fosfolípidos

La mayor proporción de estos compuestos la encontramos en la grasa de la forma normal del *Agrobacterium tumefaciens*, y la mínima corresponde a la grasa de la forma L cultivada en el medio sintético que hemos empleado.

Estudiamos comparativamente los fosfolípidos de la forma normal y L cultivadas en caldo común, no encontrando grandes diferencias cualitativas.

Por cromatografía monodimensional en capa fina de las fracciones correspondientes a los fosfátidos de la grasa de ambos microorganismos,

apreciamos cinco o seis manchas, y por cromatografía bidimensional, siempre seis, al revelar por exposición a vapores de  $I_2$ , pulverización con ácido perclórico y pulverización con solución de ninhidrina; en placas obtenidas simultáneamente y reveladas con rodamina 6G, al ser observadas bajo luz ultravioleta aparecen las manchas con fluorescencias de distintos tonos: amarillo, amarillo-anaranjado y azul. Revelando las placas con el reactivo de Dragendorff, encontramos tres manchas en las fracciones correspondientes a los fosfátidos de la forma normal y una en las procedentes de la grasa de la forma L, cuyo Rf coincide con uno de aquellos.

Teniendo en cuenta estas reacciones con los reveladores mencionados, los Rf hallados en las cromatoplasmas obtenidas con los distintos disolventes y los colores de las manchas observadas bajo luz ultravioleta, caracterizamos perfectamente la existencia de los siguientes fosfolípidos en la grasa de la forma normal y L del *Agrobacterium tumefaciens*, cultivadas ambas en caldo común; fosfatidiletanolamina predominante, que origina una mancha con fluorescencia amarillo-anaranjada, cuando el cromatograma es revelado con rodamina 6G y observado bajo luz ultravioleta; fosfatidilserina, que observada en las mismas condiciones aparece de color azul; lecitina, que observamos con color amarillo; los tres fosfolípidos dan reacción positiva con la ninhidrina después de calentar las placas; también identificamos otra fosfatidilcolina, sobre todo por su reacción positiva con el reactivo de Dragendorff y distinto Rf de la lecitina.

Apreciamos otras dos manchas correspondientes a fosfolípidos, que dan reacción positiva con la ninhidrina y con el reactivo de Dragendorff en las placas correspondientes a la grasa de la forma normal, y que no hemos podido identificar. Las otras dos manchas no identificadas, que corresponden a fosfolípidos de la forma L, dan positiva la reacción con ninhidrina, pero no reaccionan con el reactivo de Dragendorff.

## DISCUSION

En cuanto al contenido total de grasa obtenida de ambos microorganismos cultivados en caldo común y en condiciones análogas, comprobamos los resultados obtenidos en un trabajo anterior (12), donde señalábamos que mientras de la forma normal del *Agrobacterium tu-*

*mefaciens* obteníamos inicialmente una grasa casi pura, de la forma L extraemos una lipoproteína, de la cual se separa fácilmente el componente proteico al tratar de purificarle por tratamiento con éter de petróleo de bajo punto de ebullición. Esto no sucede cuando cultivamos la forma L en el medio sintético.

No podemos identificar el colesterol entre los lípidos de la forma L cultivada en medio sintético, aunque sí lo identificamos entre los componentes grasos de la misma forma L cultivada en caldo común, como señalábamos en un trabajo anterior (12). Estos resultados confirman los trabajos de Rebel y colaboradores (8-9), y Rebel y Mandel (10), quienes mantienen que las formas L del *Proteus mirabilis* (P18) son incapaces de sintetizar colesterol, pero si el medio lo contiene, lo absorben, siendo posible su identificación en la grasa del microorganismo.

No encontramos grandes diferencias entre los fosfolípidos de las formas normal y L fija del *Agrobacterium tumefaciens*; en ambas predomina la fosfatidiletanolamina, como componente fundamental de los lípidos polares. La fosfatidiletanolamina ha sido encontrada también en proporción dominante, entre los fosfolípidos de otras bacterias. Sinha y Gaby (14) la hallan, junto con pequeña cantidad de fosfatidilserina, en el componente graso del *Pseudomonas aeruginosa*; Kates y colaboradores (5) señalan alta proporción de fosfatidiletanolamina y pequeña de fosfatidilserina en los fosfolípidos de la *Serratia marcescens*; entre los fosfolípidos del *Bacillus polymyxa* y sus esporas encuentran Matches y colaboradores (7) fosfatidiletanolamina y lisofosfatidilserina y lisolecitina; Grollman y Osborn (2), estudiando el lipopolisacárido de la pared de un mutante de *S. typhimurium*, aíslan la o-fosforiletanolamina; Kaneshiro y Marr (4), en un interesante estudio sobre los fosfolípidos del *Azotobacter agilis*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*, encuentra como principal líquido de los tres microorganismos, extraíble con metanol y metanol + cloroformo, la fosfatidiletanolamina; otro fosfolípido correspondiente a la grasa del *A. tumefaciens*, señalada por Kaneshiro y Marr en el referido trabajo, es la fosfatidilcolina, encontrada por nosotros tanto en la forma normal como L fija de este microorganismo.

La lecitina, en menor proporción que la fosfatidiletanolamina que nosotros encontramos entre los fosfátidos de ambos microorganismos, tal vez tenga su origen en la fosfatidiletanolamina, por metilación total de su grupo amino, según el esquema siguiente:

Esta metilación de fosfatidiletanolamina a lecitina (fosfatidilcolina) ha sido puesta de manifiesto por Crockent y Nyc (1) en los fosfolípidos de un mutante de *Neurospora crasa*.

No hemos podido caracterizar los fosfolípidos correspondientes a las otras manchas que dan positiva la reacción con la ninhidrina, aunque pensamos que puedan corresponder a derivados del fosfatidilglicerol con distintos aminoácidos; ornitina, lisina, etc.

### RESUMEN

1. Extraemos la grasa del *Agrobacterium tumefaciens* y su forma L fija cultivados en caldo común, obteniendo 8,18 y 6,97 por ciento de grasa pura, respectivamente; en la forma L cultivada en el medio sintético mencionado, encontramos 5,88 por ciento.

2. Solamente encontramos colesterol en el insaponificable de la forma L cultivada en caldo común; no en la forma normal, ni en la L cultivada en medio sintético.

3. El porcentaje de fosfolípidos es, por lo menos, doble en la grasa correspondiente a la forma normal que en la forma L, cuando cultivamos ambos microorganismos en caldo común.

4. Estudiamos los fosfátidos de la grasa de ambos microorganismos por cromatografía en capa fina, encontrando en ambas mayor porcentaje de fosfatidiletanolamina; además, contienen en menor proporción fosfatidilserina y fosfatidilcolina. Hallamos otros fosfolípidos no identificados, dos de ellos correspondientes a la forma normal, que dan reacción positiva con la ninhidrina y con el reactivo de Dragendorff, mientras las manchas correspondientes a la forma L sólo reaccionan con la ninhidrina.

### SUMMARY

From normal *Agrobacterium tumefaciens* and its fixed L form grown in normal broth medium 8.18 and 6.97 per cent respectively of pure fat was obtained.

Only in the L form grown in normal broth cholesterol was found. In the L form grown in synthetic medium the pure total fat was 5.88 per cent and no cholesterol was found.

The amount of phospholipids was double in the fat from the normal *Agrobacterium tumefaciens* than in its L forms (both grown in normal broth).

We have found by thin layer chromatography in the fat of both microorganisms phosphatidil-etanolamine as a main component, in minor proportions phosphatidil-serine, phosphatidil-coline and other phospholipids not identified are also present. Two of them from the normal *Agrobacterium tumefaciens* gave positive reaction with ninhydrin and Dragendorff whereas the spots found in the *A. tumefaciens* L from only reacted with ninhydrin.

#### BIBLIOGRAFIA

1. CROCKENT, B. J., y NYC, J. F. 1964. Phospholipids variations in mutant strains of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem., 239, 1.727.
2. GROLLMAN, A. P., y OSBORN, M. J. 1964. O-Phosphorylethanolamine. A component of lipopolysaccharide in certain Gram-negative bacteria. Biochemistry, 3, 1.571.
3. HIRSCH, J., y AHRENS, E. H. 1958. The separation of complex lipide mixtures by the use of silicic acids chromatography. J. Biol. Chem., 233, 311.
4. KANESHIRO, T., y MARR, H. G. 1962. Phospholipids of *Azotobacter agilis*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Escherichia coli*. J. Lipid Res., 3, 184.
5. KATES, M.; ADAMS, G. A., y MARTIN, S. M. 1963. Lipids of *Serratia marcescens*. Can. J. Biochem. Physiol., 42, 461.
6. LEPAGE, M. 1963. The separation and identification of plant phospholipids and glycolipids by two-dimensional thin-layer chromatography. J. Chromatog., 13, 99.
7. MATCHES, J. R.; WALKER, H. W., y AYRES, J. C. 1963. Phospholipids in vegetative cells and spores of *Bacillus polymyxa*. J. Bacteriol., 87, 16.
8. REBEL, G.; BADER, A. M.; SENSENBRENER, M., y MANDEL, P. 1960. Etude comparée des lipides du bacille *Proteus* et d'une souche stable de formes L qui en derive. Compt. Rend., 250, 3.516.
9. REBEL, G.; BADER-HIRCH, A. M., y MANDEL, P. 1963. Recherches sur les lipides des formes L dérivées du *Proteus* P18. Présence et absorption du cholestérol. Bull. Soc. Chim. Biol., 45, 1.327.
10. REBEL, G., y MANDEL, P. 1962. Sur la présence de cholestérol dans les formes L dérivées du bacille *Proteus*. Compt. Rend., 255, 2.684.
11. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Fixed pathogenic L forms of *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, 195, 4.836.

12. SANTAOLALLA, M. 1965. Estudio comparativo del componente graso del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus forma L fijas, I. Aislamiento de las distintas fracciones lipídicas. Microbiol. Españ., 18, 13.
13. SANTAOLALLA, M. 1965. Composición química de las paredes celulares de *Erwinia carotovora*. II. Análisis del componente graso. Microbiol. Españ., 18, 227.
14. SINHA, D. B., y GABY, W. L. 1964. Structural composition of polar lipid-amino acid complex in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem., 239, 3.668.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

## ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE NUEVOS DERIVADOS FENILICOS Y NITROFURANICOS (\*)

### I. Prospección inicial e influencia del grupo bromovinileno

por

R. PARÉS-FARRÁS y J. GUINEA

#### INTRODUCCION

Este trabajo tiene su punto de partida en la exploración de las propiedades bacteriológicas de una serie de nuevos compuestos sintetizados por Pascual y colaboradores en un trabajo que fue objeto de una Ayuda «March», en 1958 (7). La mayor parte de estos compuestos tenían como característica común estructura de  $\alpha$ -butenolida o pentenolida, como muchos antibióticos naturales, tales como la nemotina, odisina, ácido penicilínico, protoanemonina, patulina, carbaína y numerosos derivados de la cumarina. Precisamente, el punto de partida de la investigación química estaba en haber encontrado unas curiosas reacciones que permitían obtener estructuras análogas a las de estas sustancias.

Los primeros resultados obtenidos fueron prometedores (1). Sin embargo, el principal estímulo para desarrollar una prospección más completa de las propiedades antibacterianas fue el haber encontrado unos pocos compuestos relacionados, extraordinariamente más activos y con una estructura próxima a la de los nitrofuranderivados (5). Precisamente,

---

(\*) Este trabajo ha sido llevado a cabo con ayuda económica de la Fundación «Juan March», de la Sociedad General de Farmacia, S. A. (Barcelona), y de los Laboratorios OM (Ginebra).

nosotros ya teníamos experiencia en estos productos (6), sospechando que existían otras estructuras más activas fuera de las señaladas como óptimas por Dodd y colaboradores (2).

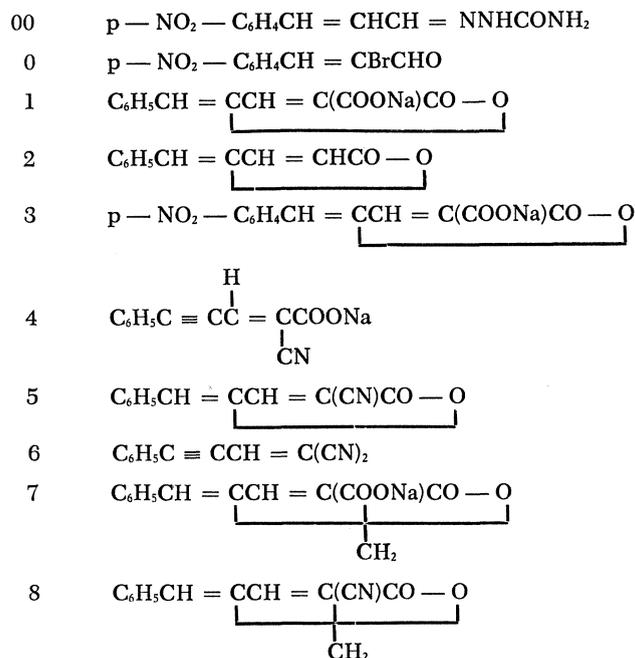
En el presente trabajo se expone la selección de los compuestos más activos y la influencia del grupo bromovinileno sobre la actividad bacteriostática.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Prospección inicial de la actividad antimicrobiana de una serie de nuevos compuestos

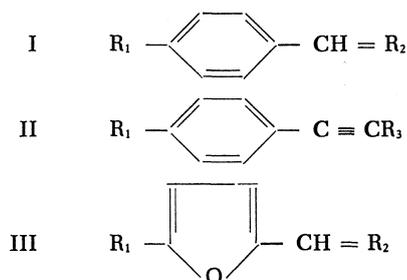
Se han elegido 31 nuevas sustancias de diferentes tipos, obtenidas en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona (5), con objeto de explorar su posible acción antimicrobiana. Simultáneamente, se han ensayado dos sustancias más, ya descritas (8), que enumeramos 00 y 0.

Los productos referidos son los siguientes:



- 9  $C_6H_5C \equiv CCH = C(COONa)_2$
- 10  $p - NO_2 - C_6H_4 \equiv \overset{H}{\underset{CN}{C}} = CCOONa$
- 11  $p - CH_3OC_6H_4CH = \underbrace{CCH = C(COONa)CO - O}$
- 12  $p - ClC_6H_4CH = \underbrace{CCH = S(COONa)CO - O}$
- 13  $p - CH_3C_6H_4CH = \underbrace{CCH = C(COONa)CO - O}$
- 14  $p - CH_3OC_6H_4CH = CBrCHO$
- 15  $p - CH_3OC_6H_4CH = CHCH = NNHCONH_2$
- 16  $p - NO_2C_6H_4C \equiv CCH = C(COONa)_2$
- 17  $p - NO_2C_6H_4C \equiv CCH = C(CN)_2$
- 18  $p - CH_3OC_6H_4CH = CBrCH = NNHCONH_2$
- 19  $p - CH_3OC_6H_4C \equiv \overset{H}{\underset{CN}{C}} = CCOONa$
- 20  $p - CH_3OC_6H_4C \equiv CCH = C(COONa)_2$
- 21  $p - CH_3OC_6H_4C \equiv CCH = C(CN)_2$
- 22  $C_6H_5C \equiv CCH = NNHCONH_2$  (*sin + anti*)
- 23  $p - CH_3OC_6H_4C \equiv CCH = NNHCONH_2$  (*sin + anti*)
- 24  $p - NO_2C_6H_4C \equiv CCH = NNHCONH_2$  (*sin + anti*)
- 25  $NO_2 - C = \underbrace{CH - CH = C(CH = CBrCHO)O}$
- 26  $p - ClC_6H_4CH = CBrCHO$
- 27  $OC(NO_2) = \underbrace{CHCH = CCH = CBrCH = NNHCONH_2}$
- 28  $p - ClC_6H_4CH = CBrCH = NNHCONH_2$
- 29  $p - ClC_6H_4C \equiv CCH = C(COONa)_2$
- 30  $p - ClC_6H_4C \equiv \overset{H}{\underset{CN}{C}} = CCOOH$
- 31  $p - ClC_6H_4C \equiv CCH = C(CN)_2$

Todas estas sustancias pueden agruparse en tres series isósteras, dos fenílicas y una nitrofuránica:



Entre los compuestos de la serie I se encuentran varios en que  $R_2$  es una butenolida, esto es, una  $\gamma$ -lactona  $\alpha, \beta$ -insaturada.

La acción de estos compuestos se ha ensayado sobre cinco microorganismos representantes de grupos muy diferentes: *Staphylococcus pyogenes aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus mesentericus*, *Penicillium digitatum* y *Saccharomyces cerevisiae*. El estudio en un campo tan diverso nos pareció aconsejable dada la escasa especificidad de la acción antimicrobiana de algunos productos relacionados, estudiados con anterioridad por otros autores (3-4).

Para las tres cepas bacterianas y la levadura se ha determinado el halo de inhibición sobre placas, respectivamente, de agar ordinario y sabouraud-agar; para el ensayo de los productos más insolubles se ha añadido un 5 por ciento de carbowax 200 (polietilenglicol) en la capa de crecimiento. De este modo, han mostrado halos de inhibición, productos que con la técnica ordinaria se mostraban inactivos.

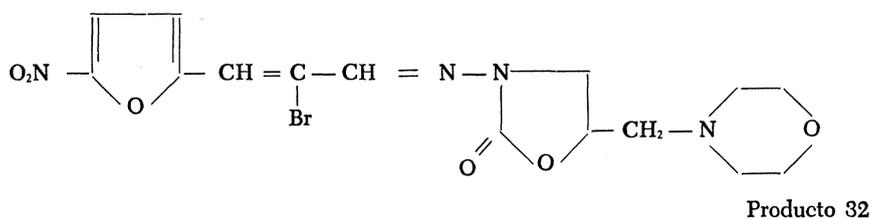
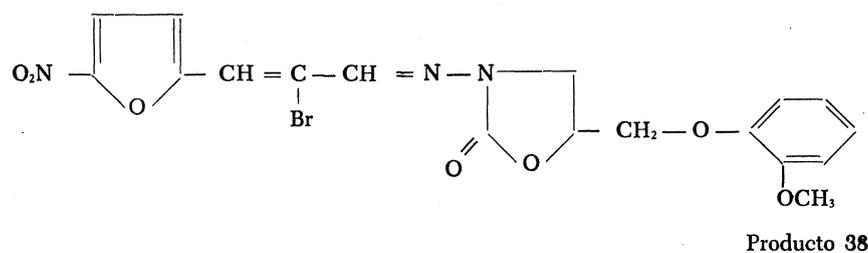
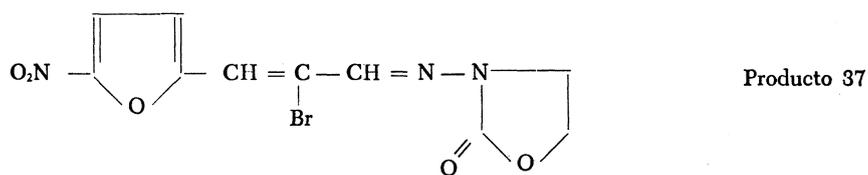
Al mismo tiempo, para las tres cepas bacterianas, se han determinado la dilución (concentración) mínima con crecimiento (dmc) y la dilución máxima inhibidora (sin crecimiento) (DMC), por el método de las diluciones sucesivas en tubos de caldo ordinario. Con *Penicillium digitatum* se han determinado dichas concentraciones por diluciones sucesivas en tubos con czapek-agar, inclinado. En ambos casos, se ha utilizado polietilenglicol 200 para los productos cuya insolubilidad no permitía preparar soluciones de 1 : 2.000 y más concentradas.

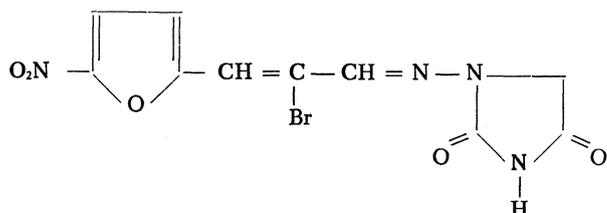
Los ensayos de las diluciones sucesivas se realizaron inicialmente esterilizando el medio con el producto a la dilución correspondiente. Luego pudo comprobarse que media hora de esterilización a 120 °C mo-

dificaba la actividad de muchos productos. La mayor parte se inactivaban, en algunos casos había poca o ninguna variación y, excepcionalmente, la actividad se aumentaba por efecto de la esterilización. Por este motivo, posteriormente se llevaron a cabo todas las determinaciones repitiendo las hechas en las anteriores condiciones, añadiendo el producto previamente disuelto en frío, sobre el medio ya esterilizado.

*2. Influencia del grupo bromovinileno en la actividad bacteriostática de compuestos nitrofuránicos*

El compuesto número 27, estudiado en la prospección inicial de actividad antimicrobiana, es una hidrazona que sólo difiere de la nitrofurazona en la presencia del grupo bromovinileno. A partir del aldehído  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-nitro-2-furil)-acrílico fueron sintetizadas las hidrazonas que a continuación se consignan, con las correspondientes bases hidrazínicas:





Producto 36

Estos productos sólo difieren por la presencia del grupo bromovini-  
leno, respectivamente, con la nitrofurantoína, furazolidona, OM-637 y  
furaltadona (5).

Los productos mencionados con el nombre genérico fueron obteni-  
dos del comercio, procedentes de «Laboratoires of the Norwich Phar-  
macal Company». El OM-637 fue suministrado por el Centro de Inves-  
tigación de la Sociedad General de Farmacia; las restantes hidrazonas  
fueron sintetizadas en el Departamento de Química Orgánica de la Fa-  
cultad de Ciencias, de la Universidad de Barcelona.

Se determinó la concentración mínima inhibidora a las veinticuatro  
horas, de todos estos productos sobre una cepa de *Staphylococcus pyoge-  
nes aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus mesentericus*. Se utilizó la téc-  
nica de las diluciones sucesivas en tubos con 1,9 ml de un medio cons-  
tituido por: extracto de carne Liebig, 5 g; peptona bacto, 10 g; cloruro  
sódico Merck, 5 g; y agua, hasta 1.000 ml, con un pH final de 7. Cada  
tubo fue inoculado con 0,1 ml de un cultivo de veinticuatro horas de la  
cepa de prueba, con una concentración final de  $10^5$  microorganismos/ml.  
Después de incubar los tubos durante veinticuatro horas a 37 °C, la con-  
centración mínima inhibidora se determina visualmente como la menor  
concentración de antibacteriano que inhibe completamente el crecimi-  
ento del organismo.

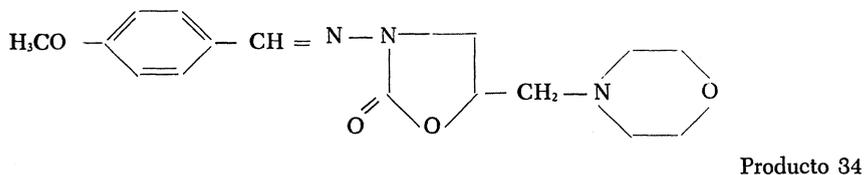
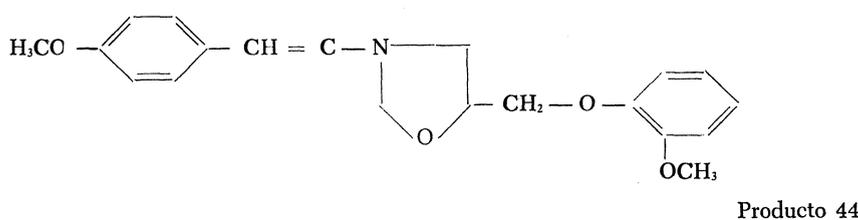
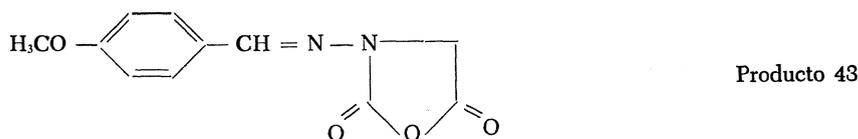
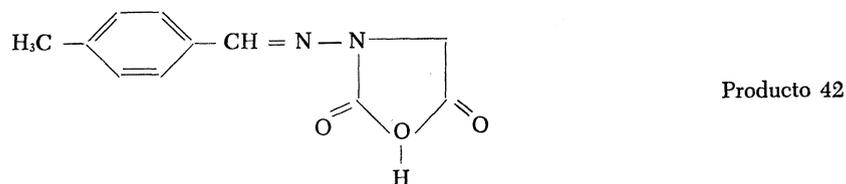
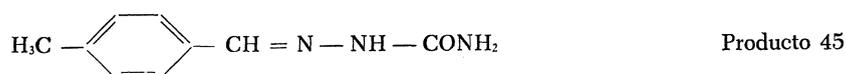
Las diluciones de los antibacterianos en el medio de cultivo se lle-  
varon a cabo partiendo de disoluciones de los mismos en carbowax 200,  
de tal modo que la concentración final de carbowax en el medio no  
resulte superior al 10 por ciento. Se ha comprobado que un 10 por ciento  
de carbowax no modifica el crecimiento de ninguna de las cepas estu-  
diadas.

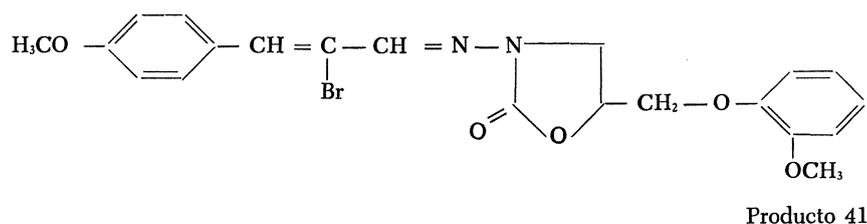
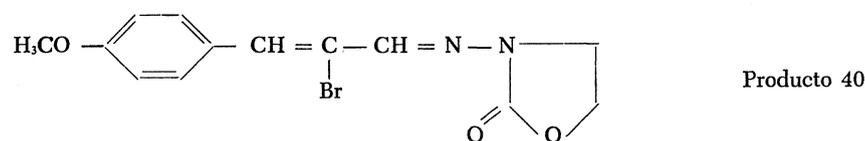
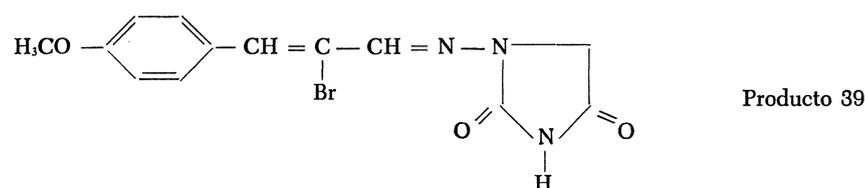
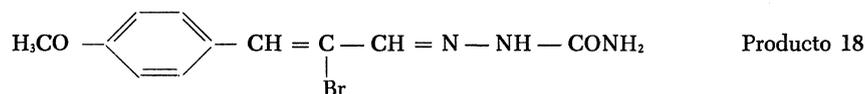
Las diluciones de antibacteriano en carbowax 200 fueron esteriliza-  
das por filtración por seitz.

El número de gérmenes del inóculo era controlado mediante determinaciones complementarias del número de células viables en placas.

3. *Influencia del grupo bromovinileno en la actividad bacteriostática de compuestos metoxifenílicos*

Con las mismas bases hidrazínicas utilizadas para la preparación de los productos nitrofuránicos, se obtuvieron las hidrazonas correspondientes con el aldehído anísico y el aldehído  $\alpha$ -bromo-p-metoxicinámico. Las fórmulas y numeración correspondientes son las que se consignan a continuación:





Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitoras sobre las mismas cepas bacterianas y con el mismo procedimiento consignado en el punto 2 de este apartado.

#### 4. Influencia del grupo bromovinileno en la sensibilidad de varias cepas de *Staphylococcus pyogenes aureus*

Se determinan las concentraciones mínimas inhibitoras de la totalidad de los productos consignados en los puntos 2 y 3 de este apartado. Se utiliza la técnica de las diluciones sucesivas en tubos como antes ha quedado consignada. Las cepas de *Staphylococcus pyogenes aureus* empleadas son las que llevan las referencias MT, G, T, 11.657 y 11.757. Todas ellas son cepas coagulopositivas, recién aisladas de forúnculos primarios.

## RESULTADOS

### *1. Prospección inicial de la actividad antimicrobiana de una serie de nuevos compuestos*

En los *cuadros* 1-3 se consignan los resultados obtenidos. Aunque ellos son concordantes en líneas generales, aparecen pequeñas diferencias de acuerdo con las distintas solubilidad, velocidad de difusión en el agar y estabilidad.

De los 31 productos examinados, la mayor parte poseen propiedades antimicrobianas y algunos las manifiestan en un grado considerable.

El producto núm. 27 es el que presenta una actividad sensiblemente mayor sobre las bacterias. Los productos 14, 25, 26 y 6 son los más activos sobre hongos.

Los compuestos de mayor actividad específica son más activos como bacteriostáticos que como fungiestáticos.

### *2. Influencia del grupo bromovinileno en la actividad bacteriostática de compuestos nitrofuránicos*

En los *cuadros* 4-6 se pone particularmente en evidencia que la presencia del grupo bromovinileno disminuye considerablemente la concentración mínima inhibidora. Este aumento de la actividad inhibidora del crecimiento de las tres cepas empleadas varía según la naturaleza de la base hidrazínica y según el microorganismo. Solamente en un caso, en los derivados de la oxozolidona, la actividad permanece inalterada al introducir el grupo bromovinileno.

Todos los compuestos referidos presentan unas concentraciones mínimas inhibitoras que alcanzan las 0,05  $\mu\text{g/ml}$  y no sobrepasan los 70  $\mu\text{g/ml}$ .

### *3. Influencia del grupo bromovinileno en la actividad bacteriológica de compuestos metoxifenílicos*

En los *cuadros* 7-9 puede observarse que los compuestos que poseen el grupo bromovinileno son en general más activos. La diferencia de actividad varía según la base hidrazínica y según el microorganismo.

Cuadro 1. Halos de inhibición de los productos, sobre placas, a las veinticuatro horas, a 37 °C (\*)

Producto añadido directamente	Polietilenglicol al 5% (a), añadido al producto	<i>Staphylococcus pyogenes aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
00		0	0	0	0
0		3	3	2	2
1		2	1	2	0
2		1	0	0	0
3		0	1	0	0
4		3	2	3	0
5		2	1	1	0
6		3	1	3	3
7		3	2	2	0
8		0	0	0	0
9		2	1	2	0
10		1	2	2	2
11		0	0	0	0
12		1	1	1	0
13		1	1	2	1
14		3	3	3	3
14	a	3	3	3	1
15		0	0	0	0
15		0	0	0	0
16		1	1	2	0
17		1	0	1	1
18		1	1	0	0
18	a	3	0	0	0
19		1	2	1	1
20		2	2	1	1
21		1	2	1	1
22	a	0	0	0	0
22	a	2	1	1	0
23		0	0	0	0
23	a	1	1	1	0
24		0	0	0	0
24	a	0	2	1	0
25	a	3	3	3	3
25		3	3	3	3
26	a	3	3	3	3
26		3	3	3	3
27		3	2	2	0
28		0	0	0	0
29		1	0	1	0
30		3	3	3	0
31		2	1	2	0

(\*) 0, nulos; 1, pequeños; 2, medianos; 3, grandes.

Cuadro 2. DMI y dmc de los productos, expresadas en los mililitros que contienen 1 mg de cada uno de ellos, después de esterilizar el medio de cultivo

Producto añadido en solución acuosa	Porcentaje de polietilenglicol 200 de la DMI más pequeña, añadido al producto	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus mesentericus</i>		<i>Penicillium digitatum</i>	
		DMI	dmc	DMI	dmc	DMI	dmc	DMI	dmc
00	6	32	64	16	32	32	64	8	16
0	3	192	384	64	128	64	128	16	32
1		24	48	24	48	12	24	3	6
2		4	8	4	8	8	16	2	4
3	6	12	24	12	24	12	24	3	6
4		16	32	8	16	8	16	0	0
5	6	32	64	16	32	64	128	2	4
6	6	26	52	26	52	26	52	16	32
7	12	8	16	16	32	8	16	4	8
8	24	3	6	6	12	6	12	3	6
9	24	6	12	3	6	3	6	0	0
10	12	8	16	16	32	16	32	2	4
11	12	16	32	16	32	26	32	0	0
12		8	16	8	16	8	16	0	0
13	12	8	16	8	16	8	16	4	8
14	3	64	128	64	128	64	128	32	64
15	12	4	8	8	16	8	16	2	4
16		16	32	4	8	8	16	0	0
17		64	128	16	32	32	64	8	16
18	12	8	16	16	32	26	32	2	4
19	12	10	20	10	20	10	20	4	8
20	3	4	8	4	8	4	8	0	0
21	6	8	16	8	16	8	16	4	8
22	12	4	8	4	8	2	4	0	0
23	3	4	8	8	16	8	16	0	0
24	12	16	32	16	32	8	16	4	8
25	3	64	128	32	64	64	128	16	32
26	3	32	64	16	32	64	128	32	64
27	3	640	1280	1280	2540	640	1280	4	8
28	6	20	40	20	40	20	40	2,5	5
29	12	8	16	8	16	8	16	4	8
30	6	32	64	8	16	16	32	4	8
31	8	16	32	16	32	32	64	8	18

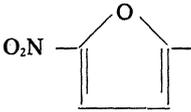
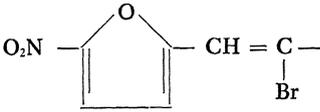
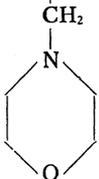
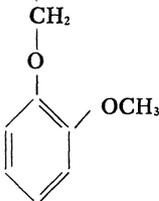
Cuadro 3. DMI y dmc de los productos, expresadas en los mililitros que contienen 1 mg de cada uno de ellos, antes de esterilizar el medio de cultivo

Producto añadido en solución acuosa	Porcentaje de polietilenglicol 200 de la DMI más pequeña, añadido	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus mesentericus</i>		<i>Penicillium digitatum</i>	
		DMI	dmc	DMI	dmc	DMI	dmc	DMI	dmc
00	6								
0	3	16	32	16	32	8	16	16	32
1		3	6	0	0	12	25	0	0
2		2	4						
3				4	8			0	0
4		4	8	8	16	1	2	0	0
5	25	2	4	2	4	2	4	2	4
6		8	16	16	32	16	32	8	16
7		0	0	0	0	0	0	0	0
8		3	6	3	12	6	12		
9		0	0	2	4	0	0	0	0
10		0	0	0	0	0	0	0	0
11		2	4	0	0	0	0	0	0
12		4	8	0	0	4	8	0	0
13		2	4	2	4	4	8	0	0
14		6	12	12	24	12	24		
15									
16		4	8	4	8	4	8	0	0
17		8	16	8	16	8	16		
18	3	24	48	24	48	24	48		
19		2	4	2	4	2	4	0	0
20		0	0	0	0	0	0	0	0
21		3	6	4	8	6	12	3	6
22	12	4	8	4	8	2	4	0	0
23	12								
24									
25	1	64	128	32	64	64	128		
26	25								
27									

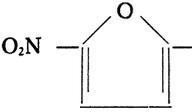
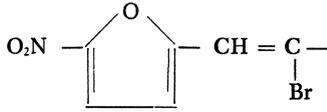
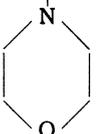
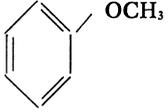
Sin embargo, para la cepa empleada de *Staphylococcus pyogenes aureus*, el derivado sin el grupo bromovinileno tiene doble actividad que el correspondiente que lo posee, cuando  $R = H$  y  $R' = NH_2$ .

Los valores absolutos de las concentraciones mínimas inhibitoras van desde 3—250  $\mu g/ml$ .

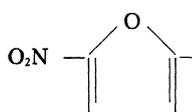
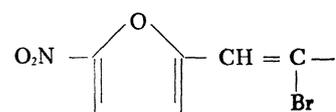
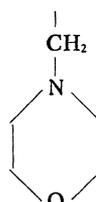
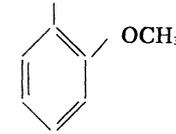
Cuadro 4. Concentraciones mínimas inhibidoras en microgramos/militro de una cepa de *S. pyogenes aureus*

$\begin{array}{c} R'' - CH = N - CO - R' \\   \\ R \end{array}$			
R	R'	R''	
			
H	NH <sub>2</sub>	3,00	0,75
CH <sub>2</sub> —CH <sub>2</sub> —O		0,50	0,50
CH <sub>2</sub> —CO—NH		12,00	0,50
CH <sub>2</sub> —CH—O		6,00	0,10
			
CH <sub>2</sub> —CH—O		0,75	0,30
			

Cuadro 5. Concentraciones mínimas inhibitoras en microgramos/militro de una cepa de *E. coli*

R'' — CH — N — N — CO — R'			
	 R		
R — R'		R''	
			
H	NH <sub>2</sub>	6,00	0,75
CH <sub>2</sub> — CH <sub>2</sub> — O		0,75	0,75
CH <sub>2</sub> — CO — NH		70,00	1,00
CH <sub>2</sub> — CH — O		25,00	0,05
 CH <sub>2</sub>   N   			
CH <sub>2</sub> — CH — O		6,00	0,5
 CH <sub>2</sub>   O   			

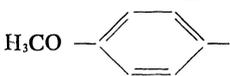
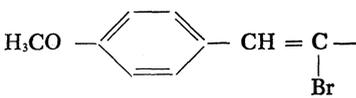
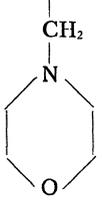
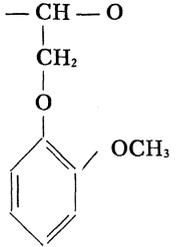
Cuadro 6. Concentraciones mínimas inhibitoras en microgramos/militro de una cepa de *B. mesentericus*

$R'' - CH - N - N - CO - R'$ $  \quad  $ $R \quad R$			
$R - R' \quad R'$			
H	NH <sub>2</sub>	3,0	0,75
CH <sub>2</sub> - CH - O		0,5	0,50
CH <sub>2</sub> - CO - NH		6,0	0,20
CH <sub>2</sub> - CH - O		25,0	0,15
			
$CH_2 - CH - O$ $ $ $CH_2$ $ $ $O$ 		6,0	3,00

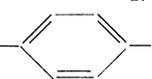
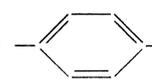
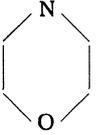
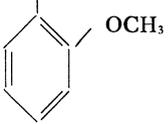
Cuadro 7. Concentraciones mínimas inhibitoras en microgramos/militro de una cepa de *S. pyogenes*

$\begin{array}{c} \text{R}'' - \text{CH} = \text{N} - \text{N} - \text{CO} - \text{R}' \\   \\ \text{R} \end{array}$			
$\begin{array}{c} \text{R} \\ \text{R} - \text{R}' \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}' \\ \text{H}_3\text{CO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{R}'' \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH} = \text{C} - \\   \\ \text{Br} \end{array}$	
H	NH <sub>2</sub>	60	120
CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - O		120	120
CH <sub>2</sub> - CO - NH		25	3
CH <sub>2</sub> - CH - O		250	25
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\   \\ \text{N} \\   \\ \text{O} \end{array}$			
CH <sub>2</sub> - CH - O		65	15
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{C}_6\text{H}_4 - \text{OCH}_3 \end{array}$			

Cuadro 8. Concentraciones mínimas inhibitoras en microgramos/militro de una cepa de E. coli

$R'' - CH = N - \underset{\substack{  \\ R}}{N} - CO - R'$			
$\begin{matrix} R & & R' \\   & &   \\ R - R' & & \end{matrix}$			
H	NH <sub>2</sub>	60	60,0
CH <sub>2</sub> - CH - O		120	120,0
CH <sub>2</sub> - CO - NH		60	7,5
CH <sub>2</sub> - CH - O		120	120,0
			
CH <sub>2</sub> - CH - O		30	15,0
			

Cuadro 9. Concentraciones mínimas inhibitoras en microgramos/militro de una cepa de *B. mesentericus*

R'' — CH — N — N — CO — R'			
	 R		
R — R'	R'	R''	
	H <sub>3</sub> CO —  —	H <sub>3</sub> CO —  —	CH = C —   Br
H	NH <sub>2</sub>	60	60
CH <sub>2</sub> — CH <sub>2</sub> — O		250	125
CH <sub>2</sub> — CO — NH		25	3
CH <sub>2</sub> — CH — O		250	12
	 CH <sub>2</sub>   N    O		
CH <sub>2</sub> — CH — O		30	3
	 CH <sub>2</sub>   O   		

4. Influencia del grupo bromovinileno en la sensibilidad de varias cepas de *Staphylococcus pyogenes*

En el cuadro 10 puede observarse la influencia del grupo bromovinileno sobre la sensibilidad de cinco cepas patógenas de *Staphylococcus pyogenes aureus*, tanto en la serie nitrofuránica como en la metoxifení-

Cuadro 10. Concentración mínima inhibidora a las veinticuatro horas, en microgramos/mililitro, de cepas de *Staphylococcus pyogenes aureus*

Producto	MT	G	T	11.697	11.757
45 ... ..	200	200	200	200	200
13 ... ..	200	200	200	200	200
43 ... ..	100	200	100	200	200
40 ... ..	200	200	100	200	200
42 ... ..	200	200	50	200	200
39 ... ..	59	100	10	200	200
34 ... ..			200		
35 ... ..	50	50	10	50	50
44 ... ..	100	100	100	200	200
41 ... ..	100	50	10	100	50
Nitrofurazona ... ..			10		
27 ... ..			1		
Furazolidona ... ..	100	100	1	100	100
37 ... ..	10	10	1	10	10
Nitrofurantoína... ..			50		
36 ... ..	1	1	1	1	1
Furaltadona... ..			10		
32 ... ..	10	10	0,1	10	10
OM-637... ..	50	50	1	50	50
38 ... ..	10	10	1	10	1

lica. En general, los de la primera son sensiblemente más activos que los de la segunda.

Se encuentra otro caso en el que el producto con el grupo bromovinileno es menos activo, el de la pareja 43-40 frente a la cepa MT.

En bastantes otros, los dos tipos de productos que se comparan presentan la misma actividad.

#### DISCUSION Y RESUMEN

Los derivados estudiados que poseen un núcleo de butenolida se muestran activos como antimicrobianos (*cuadros 1-3*), pero en ningún caso parecen alcanzar los valores más altos de las butenolidas naturales (4).

Comparando la actividad de los tres tipos de productos (series I-III), según sea  $R_1$ , resulta que H—, CH<sub>3</sub>— y Cl— parecen ser ligeramente más activos que los correspondientes con O<sub>2</sub>N—, CH<sub>3</sub>O—, dentro de un mismo orden de actividad. Cuando  $R_1 = \text{CH}_3$  se consiguen las mayores propiedades fungiestáticas.

Comparando los resultados de los *cuadros 2-3* puede concluirse que los productos 1, 3, 7, 8, 11, 12, 13, 0 y 14 son termolábiles. El producto 18 es también termolábil, pero probablemente se transforma en uno o varios productos más activos, de naturaleza desconocida.

Los productos 7 y 8 de la serie I son probablemente pentenolidas, aunque la posición del grupo CH<sub>2</sub> es todavía insegura. Presentan una actividad inferior a la correspondiente a las butenolidas, excepto para *Penicillium digitatum*.

El producto 0 tiene una actividad notable que se modifica poco al sustituir O<sub>2</sub>N— por CH<sub>3</sub>O— o Cl—. Son los compuestos más activos de la serie I.

Las semicarbazonas de la serie I son menos activas que los aldehídos y tienen un efecto antimicrobiano creciente, según  $R_1$  sea CH<sub>3</sub>O—, O<sub>2</sub>N— o Cl—.

Los derivados de la serie II tienen una actividad del mismo orden que las semicarbazonas y butenolidas del grupo I. Son menos activos que los derivados  $\alpha$ -bromados del grupo I. Se presenta actividad decreciente según  $R_1$  sea O<sub>2</sub>N—, Cl—, CH<sub>3</sub>O— y H—. A juzgar por la actividad de las semicarbazonas, 00-24 y 15-23, el triple enlace modifica poco la actividad, incluso la disminuye.

El aldehído  $\alpha$ -bromado de la serie nitrofuránica (producto 25) presenta una actividad del mismo orden que el correspondiente de la serie fenólica. La semicarbazona  $\alpha$ -bromada (producto 27) es más activa que la correspondiente de la serie fenólica (productos 18 y 28).

Los resultados expresados en los *cuadros 4-9* ponen de manifiesto que el grupo  $\alpha$ -bromovinileno intercalado entre radical cíclico y la cadena lateral carbono-nitrogenada, puede desempeñar una función importante en la potencia antimicrobiana de la hidrazona correspondiente. Este resultado es interesante, porque hasta ahora se creía que la estructura óptima era la cadena  $-C' = N - N' - C'' -$  (2 y 6-7).

Los resultados del *cuadro 10* constituyen una confirmación importante de la bromovinilenogación para la actividad antibacteriana, si bien parecen señalar que, en conjunto, las diferencias no son tan importantes como en un principio pudiera pensarse.

#### SUMMARY

The products studied which possess a nucleus of butenolids have proved to be active as antimicrobians (*Tables 1-3*), but in no case do they seem to reach the higher values of the natural butenolids (4).

On comparing the three types of products (series I-III), according to  $R_1$ , the result is that H—,  $CH_3$ — and Cl— seem to be slightly more active than those corresponding to  $O_2N$ —,  $CH_3O$ —, within the same order of activity. When  $R_1 = CH_3$ , the greatest fungistatic properties are obtained.

Comparing the results of *Tables 2-3*, it may be concluded that products 1, 3, 7, 8, 11, 12, 13, 0 and 14 are thermolabile. Product 18 is also thermolabile, but it is probably transformed into one or several more active products of unknown nature.

Products 7 and 8 of series I are probably penthenolids, although the position of the  $CH_2$  group is still uncertain. They show an activity which is inferior to that corresponding to the butenolids, except for *Penicillium digitatum*.

Product 0 has a notable activity, which is slightly modified when  $O_2N$ — is replaced by  $CH_3O$ — or Cl—. They are the most active compounds of series I.

The semicarbazones of series I are less active than the aldehydes and have an increasing antimicrobial effect which depends on whether  $R_1$  is  $CH_3O$ —,  $O_2N$ — or Cl—.

The derivatives of series II have an activity which is of the same order as that of the semicarbazones and butenolids of group I. They are

less active than the  $\alpha$ -bromate derivatives of group I. Decreasing activity is shown, depending on whether  $R_1$  is  $O_2N-$ ,  $Cl-$ ,  $CH_3O-$  or  $N-$ . To judge by the activity of the semicarbazones 00-24 and 15-23, the triple linkage modifies only slightly the activity and even diminishes it.

The  $\alpha$ -bromate of the nitrothiuronic series (product 25), shows activity of the same order as corresponds to the phenylic series. The  $\alpha$ -bromate semicarbazone (product 27) is more active than that corresponding to the phenylic series (products 18 and 28).

The results shown in *Tables 4-9* make it clear that the  $\alpha$ -bromovinylene group, interposed between the cyclic radical and the nitrogenous carbon side chain, may fulfil an important function in the antimicrobial potency of the corresponding hydrazone. This result is interesting because so far it was believed that the optimum structure was the chain  $-C' = N - N' - C'' -$  (2 and 6-7).

The results of *Table 10* constitute an important confirmation of bromovinyleneation for the antibacterial activity, though they seem to indicate that, on the whole, the differences are not so important as at first they might have been considered.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BOSCH, J.; CASTAÑER, J.; PASCUAL, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1959. Proc. V Latin Intern. Biochem. Meeting, Barcelona.
2. DODD, M. C.; CRAMER, D. L., y WARD, W. C. 1950. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 39, 313-18.
3. DODD, M. C., y STILLMAN, W. B. 1944. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 83, 11-18.
4. FLOREY, H. W.; CHAIN, E.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A.; SANDERS, A. G.; ABRAHAM, E. P., y FLOREY, M. E. 1949. Antibiotics, I, 605. Oxford University Press, Londres.
5. PARÉS-FARRÁS, R. 1963. Discurso de ingreso en la Real Academia de Farmacia, de Barcelona.
6. PARÉS-FARRÁS, R. 1963. Microbiol. Españ., 16, 97-115.
7. PASCUAL, J.; CASTELLS, J.; SERRATOSA, F., y PARÉS-FARRÁS, R. 1960. Memoria de la Fundación «Juan March», núm. 4.
8. SAIKACHI, H., y TANAKA, A. 1960. Yakugaku Zasshi, 80, 1.594.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

## ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE NUEVOS DERIVADOS FENILICOS Y NITROFURANICOS (\*)

### II. Sensibilidad bacteriana y susceptibilidad de cepas urinarias

por

R. PARÉS-FARRÁS y J. GUINEA

#### INTRODUCCION

En un trabajo anterior (5) se estudia la distribución de la actividad antimicrobiana en una serie de nuevos derivados fenílicos y nitrofuránicos. Se pone de manifiesto la importancia del grupo  $\alpha$ -bromovinileno intercalado entre el radical cíclico y la cadena lateral carbono-nitrogenada, para la actividad bacteriostática. Ahora se expone la sensibilidad bacteriana a los compuestos más activos a nivel inter e intraespecífico y la susceptibilidad de un grupo extenso de cepas patógenas aisladas del tracto urinario.

#### MATERIAL Y METODOS

##### 1. Sensibilidad de varias cepas bacterianas a los productos más activos

###### 1.1. Diluciones sucesivas, en tubos

Se han utilizado los productos 27, nitrofurantoína, 39 y 38. Las concentraciones mínimas inhibitorias se han determinado por el método de las diluciones sucesivas, utilizando las siguientes cepas bacterianas: *Pro-*

---

(\*) Este trabajo ha sido llevado a cabo con ayuda económica de la Fundación «Juan March», de la Sociedad General de Farmacia, S. A. (Barcelona), y de los Laboratorios OM (Ginebra).

*teus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* sp (hemolítico), *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus pyogenes aureus* Italia-3. Todas ellas proceden del Centro de Investigación del Hospital de Infecciosos, de Barcelona. Para *Streptococcus* y *Haemophilus* se añadió al medio de cultivo un 5 por ciento de sangre de conejo desfibrinada.

### 1.2. Diluciones sucesivas, en placas

El medio de cultivo está constituido por: extracto de carne Liebig, 10 g; peptona bacto, 20 g; cloruro sódico Merck, 10 g; agar Difco, 20 g, y agua c. s. p. 1 l. pH final, de 7. A 5 ml del citado medio se añaden 2,5 ml de agua destilada y 2,5 ml de solución del antibacteriano correspondiente. La solución del antibacteriano se hace en carbowax 200, puro o diluido. Cuando esto último no es posible, la concentración final de disolvente en el medio es del 25 por ciento. Esta concentración ha resultado inhibitoria para algunas cepas de *Proteus* y *Pseudomonas*.

Para las cepas de *Haemophilus* y *Neisseria* se utiliza medio doble concentrado de agar chocolate, en lugar del anteriormente señalado.

Se utiliza en todos los casos una placa adicional, sin quimioterápico. En ella puede llevarse el control del crecimiento, a la máxima concentración del carbowax utilizada. Si se observa un crecimiento demasiado compacto, se realiza un nuevo ensayo en el que el inóculo se ha diluido. Se considera óptimo el crecimiento sobre el trazo de siembra en colonias separadas, cuando empiezan a ser visibles (3).

Se ha utilizado una extensa colección de gérmenes procedentes en su mayor parte del archivo del Hospital de Infecciosos de Barcelona (Departamento de Investigación). Otros han sido aislados por nosotros.

En los cuadros de resultados se consignan los gérmenes y los productos antibacterianos utilizados. Estos últimos han sido seleccionados por la mayor actividad puesta de manifiesto en los ensayos anteriores.

### 2. Susceptibilidad específica de cepas urinarias patógenas

Para el estudio de la susceptibilidad específica de las cepas urinarias se ha empleado la técnica de los discos de papel de filtro impregnados de antibacteriano y colocados en la superficie de un cultivo uniforme, en placas. Los discos tenían 0,6 cm de diámetro y el antibacteriano se incorporó en un volumen de 0,01-0,02 ml, totalmente absorbible por

el papel. Los distintos productos se disolvieron en dimetilformamida y se secaron al vacío. Cada disco contenía 50 µg de producto. Los resultados se expresan como cepa sensible y resistente, según se presente halo de inhibición o no. Cuando los halos de inhibición son muy grandes, la cepa se califica de muy sensible.

Las pruebas se han llevado a cabo sobre los productos más representativos, tanto desde el punto de vista de su actividad preeminente como en cuanto a su posible aplicación en el campo de los desinfectantes urinarios. Comparativamente, se llevaron a cabo otros ensayos con discos comerciales (Difco) o preparados por nosotros con quimioterápicos utilizados como desinfectantes urinarios.

Los gérmenes se aislaron de orinas de enfermos, de acuerdo con las técnicas señaladas anteriormente (1-2 y 4). Fueron facilitados por el Servicio de Urología del Hospital Clínico, de Barcelona y por el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Investigación del Hospital de Infecciosos, de Barcelona.

## RESULTADOS

### 1. Sensibilidad de varias cepas bacterianas a los productos más activos

*Cuadro 1. Concentraciones mínimas inhibidoras, a las veinticuatro horas, en microgramos/mililitro*

Microorganismos	Producto 27		Nitrofurantoína		Producto 39		Producto 38	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>Proteus vulgaris</i>	50	100	10	100	200	>200		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	50	10	100	200	>200	10	50
<i>Streptococcus</i> sp (hemolítico)	01	1					1	10
<i>Escherichia coli</i>			10	50				
<i>Klebsiella</i>			50	50				
<i>Haemophilus influenzae</i>			1	10				
<i>Staphylococcus pyogenes</i> Italia-3	6,25	12,50	25	25	>50	>50		

Cuadro 2. Concentraciones mínimas inhibidoras, a las veinticuatro horas, en microgramos/mililitro

Microorganismos	Productos (*)												
	4	2	1	3	5	27	37	36	32	38	35	40	41
<i>Sta.</i> , cepa 1							0,1						
<i>Sta.</i> , cepa 59, Italia-3				10				10		50	50	50	10
<i>Sta.</i> , cepa OM-61, núm. 7	10	0,1	10	10	10		10	10		50	50		200
<i>Str.</i> , cepa 2						0,1							
<i>Str.</i> , sp (hemolítico)	10	1	50	10	10	5	10	1	10	30	100	200	1
<i>B. mesentericus</i>						0,1							
<i>E. coli</i>	50	1	10	100	10	10	10	10	50	200	200	200	100
<i>E. coli</i> bellapen												100	260
<i>S. typhosa</i> 901-I	50	10	50	50			50	10	50	200	50	50	260
<i>S. typhosa</i> H (hemocultivo) I	10	1	10	10			10	10	10	200	50	10	
<i>S. paratyphi</i> A-2	10	1	10	10			10	10	10	100	50	10	32,5
<i>S. paratyphi</i> B-3	10	10	10	10			10	10	10	200	50	50	260
<i>P. vulgaris</i>	200	200	100	200	100	50	100	50	200	200	100	200	100
<i>Ps. aeruginosa</i>	200	200	200	200	200	50	200	200	200	200	200	200	100
<i>Klebsiella</i> sp	50	10			50		10	50	10	50	200	200	10
<i>H. influenzae</i>	10			50	100			10		100	50	50	10
<i>Neiss.</i> , cepa Lis-2	0,1	10			10							10	

(\*) 4, nitrofurazona; 2, furazolidona; 1, nitrofurantoina; 3, furaltadona; 5, OM-637.

Cuadro 3. Concentraciones mínimas inhibidoras, a las veinticuatro horas, en microgramos/mililitro

Microorganismos	Productos (*)						
	1	2	3	27	32	37	41
<i>Sta. pyogenes aureus</i>							
Italia-3	16	4	4	2	4	2	64
OM-61	16	4	8	2	4	2	64
S.G.F.-1	8	4	8	1	2	1	64
Italia-5	16	8	8	2	4	2	64
11.701	8	4	8	1	4	2	64
534	8	2	4	2	4	2	64
<i>Str. pyogenes</i>							
H.H.d.	32			2		4	
N.C.	16			4		4	
Henneberger-2	8			1/8		4	
<i>Str. viridans</i>							
C.N.T.C.	4			2		2	
<i>Str. faecalis</i>							
M.R.	16			4		8	
Lab. Gen.	8			2		4	
Gares	32			8		8	
<i>Diplococcus pneumoniae</i>							
L.L.	8			2		8	
CI TM-I	8			2		8	
CI TM-I-b	8			2		8	
<i>Neisseria catarrhalis</i>							
Lis-1	1/8			1/8		1/32	
Lis-2	1			1/16		1/4	
Londres	1/2			1/8		1/4	
<i>S. albus</i>							
N.C.T.C.	16			2		2	
N.W.	8			1		4	
86-N.C.T.C.	8			4		4	
<i>Salmonella typhosa</i>							
Tipo O Ty-20	8			2			
Tipo O C. 901	8			2			
Tipo HO N-901	1/2			1/4			

(\*) 1, nitrofurantoina; 2, furazolidona; 3, furaltadona.

Los resultados consignados en el *cuadro 1* muestran que los cocos gram-positivos son más sensibles que los cocos gram-negativos. La cepa de *Haemophilus* también es de las más sensibles.

El producto 39 resulta bastante menos activo que los restantes.

El *cuadro 2* confirma lo que acabamos de señalar. Además, pone en evidencia que la variación de sensibilidad de la bacteria respecto a la presencia del grupo bromovinileno, es bastante importante.

El producto 37 resulta en conjunto muy parecido a la furazolidona. El 36 es más activo que la nitrofurantoína. El 32 es poco más activo que la furaltadona. El 27 es claramente más activo que la nitrofurazona. El 38 es menos activo que el OM-637.

Los tres productos de la serie metoxifenílica, 35, 40 y 41 son menos activos que los nitrofuranos.

En el *cuadro 3* puede observarse que los productos 27 y 37 presentan las concentraciones mínimas inhibitoras más pequeñas. Las cepas de *Neisseria*, *Diplococcus* y *Salmonella* son relativamente muy sensibles.

## 2. Susceptibilidad específica de cepas urinarias patógenas

En el *cuadro 4* puede verse que las distintas cepas urinarias aisladas no son prácticamente susceptibles a los productos 38 y 41. El producto 37 es probablemente el que presenta un cuadro de sensibilidad más favorable.

En general, las sensibilidades a la nitrofurantoína, producto 27 y producto 37 presentan correlación. Sin embargo, las cepas *Klebsiella* (401-A), (282-A) y (347-B) son resistentes a la nitrofurantoína y sensibles al 27 y al 37; *Klebsiella* (384) es resistente al 27 y sensible al 37 y a la nitrofurantoína; *P. mirabilis* (437-B) es sensible a la nitrofurantoína y resistente a los productos 27 y 37; y *P. mirabilis* (438-B) es sensible al 37 y resistente a la nitrofurantoína y al 27.

En el *cuadro 5* puede observarse que las cepas referidas son todas ellas resistentes a las sulfamidas. Es muy frecuente la resistencia a la tetraciclina, penicilina G, estreptomycin y eritromicina. La mandelamina ha dado un resultado muy favorable, pero probablemente se debe al simple efecto de la acidificación. El cloranfenicol y la colimicina han dado un resultado francamente favorable. Todas las cepas han resultado muy sensibles a la kanamicina y a la neomicina.

El producto 37 presenta comparativamente un cuadro de suscep-

Cuadro 4. Susceptibilidad de varias cepas urinarias patógenas recién aisladas frente a varios nitrofuranos

Cepas (*)	Productos (**)							
	27	37	41	38	1	2	3	32
<i>Klebsiella</i> (306)	S	S					S	
<i>E. coli</i> (359)	MS	S					S	
<i>P.morganii</i> (333-B)	S	S					S	
<i>P. mirabilis</i> (328)	R	R					R	
<i>Klebsiella</i> (334)	R	R					R	
<i>E. coli</i> (296-A)	MS	MS					MS	
<i>Staphylococcus</i> (284)	MS	MS	R				MS	
<i>E. coli</i> (347-A)	S	S					S	
<i>Klebsiella</i> (282-A)	S	S					R	
<i>Klebsiella</i> (347-B)	S	S					R	
<i>Staphylococcus</i> (284-A)	MS	MS					MS	
<i>E. coli</i> (291)	S	S					S	
<i>Klebsiella</i> (383-B)	S	S	R					
<i>Klebsiella</i> (384)	R	S	R				S	
<i>E. coli</i> (400)	S	S						
<i>P. mirabilis</i> (404-A)	R	R					R	
<i>E. coli</i> (404-B)	S	S					S	
<i>Klebsiella</i> (401-A)	S	S					R	
<i>E. coli</i> (401-B)	S	S					S	
<i>E. coli</i> (431)	S	S						
<i>P. rettgeri</i> (423)	R	R						
<i>P. mirabilis</i> (426)	R	R						
<i>P. mirabilis</i> (431-A)	S	S	R					
(429-A)	R	R						
<i>P. mirabilis</i> (429-B)	R	R						
<i>Proteus</i> (427-A)	R	R					R	
<i>Klebsiella</i> (424-B)	S	S					S	
(435-A)	S	S					S	
<i>Klebsiella</i> (434-A)	S	S					S	
<i>Klebsiella</i> (410)	S	S					S	
(414)	R	R					R	
(405)	S	S					S	
<i>Staphylococcus</i> (437-A)	R	R		R	R	S	R	R
<i>P. mirabilis</i> (437-B)	R	R		R		S	S	R
<i>P. mirabilis</i> (438-A)	S	S		S	S	S	S	S
<i>P. mirabilis</i> (438-B)	R	S		R	R	S	R	R
<i>E. coli</i> (440)	S	S		R	S	S	S	S
<i>E. coli</i> (442)	S	S			S	S	S	
<i>Klebsiella</i> (444)	S	S		R	S	S	S	S
<i>P. inconstans</i> (445)	S	S		S	S	S	S	S
<i>Ps. aeruginosa</i> (447)	R	R		R	R	R	R	R
(448)	S	S		R	S	S	S	S
<i>Klebsiella</i> (453-B)	S	S		R	S	S	S	R
<i>Klebsiella</i> (453-A)	S	S		R	S	S	S	S
<i>E. coli</i> (455)	S	S		R	S	S	S	S
<i>E. coli</i> (448)	S	S		R	S	S	S	S

(\*) R, resistente; S, sensible; MS, muy sensible  
(\*\*) 1, furaltadona; 2, furazolidona; 3, nitrofurantoína.

Cuadro 5. Antibiogramas correspondientes a algunas de las cepas bacterianas referidas en el cuadro 4

Productos	Cepas (*)									
	359	333-B	328	334	347-A	347-B	291	383-B	384	400
Cloranfenicol	MS		MS	MS	R	R	LS	R	R	MS
Colimicina	S		R	MS	S	MS	S	MS	S	MS
Eritromicina	R	R	R	R	LS	LS	LS	R	R	MS
Estreptomicina	R	R	S	R	S	R	R	R	R	MS
Kanamicina	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Neomicina	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Novobiocina	LS	LS	MS	R	R	R	R	R	R	R
Penicilina G	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	R
Tetraciclina	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R
Mandelamina	MS	MS	LS	MS	LS	S	S	S	S	R
Sulfadimetoxina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Sulfametoxipiridacina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	LS
Sulfisoxazol	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Triple-sulfa	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Producto 37	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S

(\*) R, resistente; S, sensible; MS, muy sensible; LS, ligeramente sensible.

tibilidad muy favorable. En conjunto, sólo es superado por la colimicina, la neomicina y la kanamicina. Teniendo en cuenta que las cepas de comparación son relativamente pocas, la diferencia puede ser realmente poco importante.

## DISCUSION Y RESUMEN

Los resultados expresados en los cuadros 1-3 permiten llegar a una estimación bastante comprensiva de la sensibilidad bacteriana frente a este tipo de compuestos, tanto a nivel inter como intraespecífico. Todos estos compuestos pueden clasificarse como de espectro amplio, con una tendencia más acusada sobre los cocos gram-positivos. Los bacilos gram-negativos son generalmente más resistentes. La importancia del grupo bromovinileno para la actividad antibacteriana varía mucho de un microorganismo a otro y aun dentro de las cepas de una misma especie.

Los productos de la serie nitrofuránica son sistemáticamente más activos que los de la serie metoxifenólica. Dentro de los de la primera destacan los productos 37, 27 y 32; dentro de los de la segunda, el 41 y el 39.

El cuadro 4 presenta ante todo una singularidad muy digna de mención. Si se distribuyen los distintos gérmenes hallados en las muestras de orina, como ya señalamos en otra ocasión (4), en los seis grupos *Staphylococcus*, *coli-aerogenes*, *Strepto-entero*, *Proteus*, *Pseudomonas* y otros gérmenes, encontramos la distribución respectiva de frecuencia, en porcentaje, siguiente: 6, 48, 0, 24, 2 y 12. Comparándolas con otras estadísticas (4) puede observarse una disminución significativa de la frecuencia de cocos gram-positivos, lo cual es probablemente consecuencia de mayor sensibilidad a los quimioterápicos actualmente en uso. El grupo *coli-aerogenes* mantiene la primacía con una frecuencia del 50 por ciento. Sin embargo, la frecuencia de *Klebsiella* es mucho más grande que en las estadísticas anteriores. *Klebsiella* constituye el 50 por ciento de este grupo. También aquí, este resultado puede considerarse indicio de una mayor resistencia de *Klebsiella* a los agentes quimioterápicos. Los cuadros 4-5 ilustran bien esta conclusión.

Es significativo el aumento de la frecuencia de *Proteus*, que se encuentra actualmente en segundo lugar. La frecuencia de *Pseudomonas* es también probablemente mayor.

En los cuadros 4-5 se encuentran consignados una serie de resultados que permiten concluir que las cepas urinarias presentan una gran susceptibilidad a los compuestos nitrofuránicos más activos, sólo parangonable a la colimicina, kanamicina y neomicina. Esto sugiere que su aplicación terapéutica en el campo de las infecciones urinarias es más recomendable, sobre todo cuando se consiguen niveles urinarios muy altos y bien tolerados, como sucede con la nitrofurantoina.

De los resultados de los cuadros 4-5 también puede deducirse que la introducción del grupo bromovinileno y aun otros tipos de modificaciones estructurales de los nitrofuranos, permite obtener compuestos que no manifiestan fenómenos de resistencia cruzada o, por lo menos, con un grado muy diferente de sensibilidad. Este hecho es de gran interés para alentar la búsqueda de nuevos quimioterápicos en este campo.

De los resultados referidos no se puede deducir una evaluación precisa de las posibilidades terapéuticas de los nuevos compuestos. Aun-

que la toxicidad de los mismos parece ser muy baja, faltará todavía conocer su estabilidad en el organismo superior y los niveles útiles que se alcanzan en la sangre y en los distintos órganos. Al parecer, una limitación importante para este tipo de compuestos, en este sentido, está constituida por su fácil degradación metabólica en el organismo superior (3-4).

### SUMMARY

The results show in *Tables 1-3* permit us to arrive at a fairly comprehensive estimation of bacterial sensitivity to this type of compounds, whether at inter level of intraspecific. All these compounds may be classified as being of broad spectrum with a more noticeable tendency on the Gram positive cocci. The Gram negative bacili are generally more resistant. The importance of the bromovinylene group for the antibacterial activity varies from one microorganism to another, even within strains of the same species.

The products of the nitrothuranic series are systematically more active than those of the metoxyphenilic series. Among those of the first mentioned, the more important are products 37, 27 and 32. Among those of the second, 41 and 39.

*Table 4* presents, first of all, a very noteworthy singularity. If we are to distribute the various germs found in the urine samples, as we stated on a previous paper (4), into the six groups of *Staphylococcus*, *coli-aerogenes*, *Strepto-entero*, *Proteus*, *Pseudomonas* and other germs, we shall find that the respective distribution of frequencies, in percentages, is as follows: 6, 48, 0, 24 and 12. Comparing them with other statistics (4) we may observe a significant diminution in the frequency of Gram positive cocci, which is probably a consequence of their greater sensitivity to the chemotherapics being used at present. The *coli-aerogenes* group comes first, with a frequency of 50 per cent the frequency of *Klebsiella* is much greater than in the previous statistics. *Klebsiella* constitutes 50 per cent of the cocci placed in this group. Here also this result may be considered as an indication of greater resistance to chemotherapics agents on the part of *Klebsiella*. *Tables 4-5* illustrate this conclusion well.

Also significant is the increase in frequency of *Proteus*, which is

at present in second place. The frequency of *Pseudomonas* is probably also greater.

In *Tables 4-5* we find a series of results which permit us to conclude that the urinary strains show great susceptibility to the more active nitrofuranic compounds, only comparable to colimycin, kanamycin and neomycin. This suggests that their therapeutic application in the field of urinary infections is highly recommendable, above all when very high and easily tolerated urinary levels are obtained, as is the case with nitrofurantoin.

From the results of *Tables 4-5* it may also be deduced that the introduction of the bromovinylene group, and even of other types of structural modifications of the nitrofuranes, makes it possible to obtain compounds which do not show phenomena of crossed resistance or, at least with a very different degree of sensitivity. This fact is of great interest in encouraging the search for new chemotherapies in this field.

From the results we have quoted it is impossible to deduce a precise evaluation of the therapeutic possibilities of the new compounds. Though their toxicity seems to be very low, we have yet to know their stability in the higher organism and the practical levels reached in the blood and in the various organs. Apparently, an important limitation for this type of compounds, in this sense, is that constituted by their easy metabolic degradation in the higher organism (3-4).

#### BIBLIOGRAFIA

1. EWING, W. H.; DAVIS, B. R., y EDWARDS, P. R. 1960. Public Health Rept., 18, 77-83.
2. FOZ, A.; ROY, C., y LLORENS, J. 1962. 10.<sup>as</sup> Jornadas de la Asociación Nacional de Médicos especialistas de Análisis Clínicos. Barcelona.
3. PARÉS-FARRÁS, R. 1963. Discurso de ingreso en la Real Academia de Farmacia, de Barcelona.
4. PARÉS-FARRÁS, R. 1963. Microbiol. Españ., 16, 97-115.
5. PARÉS-FARRÁS, R., y GUINEA, J. 1966. Microbiol. Españ., 19, 11-32.

C. S. I. C.  
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN. GRANADA

## EFFECTO ANTAGONICO DEL *MYXOCOCCUS* *XANTHUS* SOBRE LOS *AZOTOBACTER*

por

V. CALLAO, R. ALVARADO (\*), A. SEDANO, J. OLIVARES y E. MONTOYA

### INTRODUCCION

En el transcurso de una serie de experiencias sobre *Azotobacter* pudimos comprobar en repetidas ocasiones, sobre placas inoculadas con dichas bacterias, la aparición de unos halos de lisis que, aumentando progresivamente en el tamaño, llegaban a destruir el crecimiento del *Azotobacter* en la casi totalidad de la placa. El agente casual de esta lisis resultó ser el *Myxococcus xanthus*. Aunque el efecto bacteriolítico de las especies del género *Myxococcus* ha sido bastante estudiado (2 y 5-6) sobre gran número de bacterias, existían muy pocos datos en relación con los *Azotobacter* y éstos indicaban, en contra de nuestras observaciones, que los *Myxococcus* no eran capaces de lisar células vivas de *Azotobacter* (4). Por esta razón consideramos interesante efectuar un estudio detallado de los fenómenos de lisis antes descritos y con tal objeto hemos realizado una serie de experiencias encaminadas a observar la capacidad lítica del citado *M. xanthus* frente a distintas especies de *Azotobacter* y su influencia sobre la supervivencia y desarrollo de los *Azotobacter* en el suelo.

---

(\*) Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. San Salvador.

## MATERIAL Y METODOS

### *Microorganismo*

*Myxococcus xanthus*. En todas las experiencias que se describen ha sido utilizada una raza, aislada en nuestro laboratorio a partir de un suelo de huerta y caracterizada de acuerdo con la obra de Bergey (3). *Azotobacter*. Se han utilizado razas tipo de *A. chroococcum*, *A. vine-landii* y *A. beijerinckii* suministradas por el «Centre International de distribution de souches et d'informations sur les types microbiens», de Lausana (Suiza), así como dos razas de *A. chroococcum* (núms. 17 y 55) y dos de *A. beijerinckii* (núms. 11 y 12), aisladas en nuestros laboratorios a partir de suelos de la vega de Granada.

### *Medios de cultivo*

Para la conservación y propagación del *Myxococcus xanthus* se empleó el medio descrito por Bender (2), que permite la obtención de una buena cantidad de cuerpos fructificantes.

Para el cultivo de *Azotobacter* se empleó el medio «77» de Allen (1).

### *Comprobación de la capacidad lítica del Myxococcus xanthus sobre células en reposo de Azotobacter*

Se llevó a cabo en medio sólido. Se utilizaron placas de Petri de 10 cm de diámetro, con una capa base de 2 mm de espesor de agar al 2 por ciento en agua destilada. Sobre esta capa base se dispuso otra de 1 mm de espesor de agar al 1 por ciento, conteniendo aproximadamente unos 10.000 millones/ml de células lavadas de *Azotobacter*. Una vez solidificadas, se inocularon las placas, en el centro, con cuerpos fructificantes de *Myxococcus xanthus* procedentes de un cultivo de una semana de edad. Las placas se incubaron a 30 °C y se observó la aparición y tamaño de los halos de lisis cada veinticuatro horas.

### *Comprobación de la capacidad lítica del Myxococcus xanthus sobre células de Azotobacter en crecimiento*

Se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el caso anterior, sustituyendo el agar + agua destilada, por el medio «77» sólido y

utilizando una suspensión de *Azotobacter* con una concentración diez veces menor.

*Estudio de la influencia del Myxococcus xanthus sobre el contenido en Azotobacter de un suelo*

Tierra de jardín rica en *Azotobacter* se inoculó con 1/10 de su peso de una suspensión conteniendo aproximadamente 1.000 millones/ml de células vegetativas y cuerpos fructificantes de *Myxococcus xanthus*. Después de añadir agua hasta conseguir una humedad de alrededor del 20 por ciento, la tierra se pasó a través de un tamiz de 2 mm para disgregarla en pequeños fragmentos y se dispuso en lotes de 20 g, en matraces de Erlenmeyer de 200 ml de capacidad, que se taparon con un plástico de polietileno, galga 100. Los matraces se incubaron a 30 °C y el número de *Azotobacter* fue determinado a las veinticuatro, cuarenta y ocho, setenta y dos y noventa y seis horas por el método de McCrady, según la técnica de Tchan (7). Los resultados se expresaron como número de *Azotobacter*/gramo de tierra seca, a 105 °C.

Simultáneamente se efectuaron las mismas determinaciones sobre tierra sin inocular con *Myxococcus xanthus* y manipulada en las mismas condiciones.

*Estudio de la influencia del Myxococcus xanthus sobre el desarrollo de los Azotobacter en el suelo*

Se realizó sobre una tierra pobre en *Azotobacter* (300-500/g) a la que se adicionó el 1 por ciento de manita, para favorecer el desarrollo de estos gérmenes. La tierra fue inoculada con *Myxococcus xanthus* y manipulada de la manera antes descrita. Se determinó el número de *Azotobacter* a las veinticuatro, cuarenta y ocho, setenta y dos, noventa y seis, ciento veinte y ciento cuarenta y cuatro horas de incubación, a 30 °C. Las mismas determinaciones se efectuaron en tierra sin inocular.

## RESULTADOS

El cuadro 1 muestra la sensibilidad de las razas de *Azotobacter* ensayadas frente a la acción lítica del *Myxococcus xanthus*. Como puede

observarse, este microorganismo fue capaz de lisar la totalidad de las razas ensayadas, tanto en estado de reposo como en pleno crecimiento.

Cuadro 1. Efecto del *M. xanthus* sobre células de *Azotobacter* en reposo y en crecimiento

Azotobacter ensayado	Células en crecimiento			Células en reposo		
	Horas de incubación					
	48	72	96	48	72	96
<i>A. chroococcum</i> , tipo	+	+	+	—	+	+
<i>A. chroococcum</i> , raza 17	+	+	+	—	+	+
<i>A. chroococcum</i> , raza 55	+	+	+	—	+	+
<i>A. vinelandii</i> , raza tipo	+	++	+++	+	+	+++
<i>A. beijerinckii</i> , raza tipo	+	++	+++	+	++	+++
<i>A. beijerinckii</i> , raza 11	+	++	+++	+	++	+++
<i>A. beijerinckii</i> , raza 12	+	++	+++	+	++	+++

-- = ausencia de lisis. + = halo de lisis, de 1-5 mm de diámetro. ++ = halo de lisis, de 5-10 mm de diámetro. +++ = halo de lisis de > 10 mm de diámetro.

Las razas de *Azotobacter* más sensibles fueron las de *A. beijerinckii* y las más resistentes las de *A. chroococcum*; el *A. vinelandii* ocupó una posición intermedia.

Simultáneamente con la aparición de las zonas de lisis, se pudo comprobar un abundante crecimiento de *Myxococcus xanthus*, con aparición de abundantes cuerpos fructificantes.

En cuanto al efecto del *Myxococcus xanthus* sobre los *Azotobacter*, en suelos, el cuadro 2 muestra que la inoculación de un suelo con *Myxococcus* originó, entre las cuarenta y ocho y setenta y dos horas de incubación, una rápida disminución del número de *Azotobacter*.

Cuadro 2. Influencia del *M. xanthus* sobre el número de *Azotobacter* de un suelo

Horas de incubación	Contenido en <i>Azotobacter</i> (*)	
	Suelo testigo	Suelo inoculado con <i>M. xanthus</i>
0	1.840	1.840
24	1.800	1.670
48	1.910	890
72	2.200	65
96	2.040	48

(\*) Número de *Azotobacter*/gramo de suelo seco, a 105 °C.

En suelos enriquecidos en manita y aptos, por tanto, para el crecimiento de los *Azotobacter*, la inoculación con *Myxococcus xanthus* originó, como puede observarse en el cuadro 3, una inhibición casi total del crecimiento.

Cuadro 3. Influencia del *M. xanthus* sobre el desarrollo de los *Azotobacter* en un suelo (\*)

Horas de incubación	Número de <i>Azotobacter</i> (**)	
	Suelo testigo	Suelo inoculado con <i>M. xanthus</i>
0	352	352
24	326	294
48	1.079	182
72	30.280	14
96	53.740	1.310
120	$11.974 \times 10^3$	7.080
144	$2.000 \times 10^3$	1.280

(\*) Suelos enriquecidos con manita. Humedad mantenida entre el 20 y 22 por ciento, a lo largo de la experiencia.

(\*\*) Por gramo de suelo seco, a 105 °C.

## DISCUSION

Es evidente, de acuerdo con los resultados obtenidos, que el *Myxococcus xanthus* es capaz de actuar sobre los *Azotobacter* vivos a pesar de tratarse de bacterias con cápsula mucosa, originando su lisis y creciendo a expensas de los productos liberados. Este efecto lítico no se realiza exclusivamente en medios artificiales, sino también en suelos, donde la adición de *M. xanthus* no solamente inhibe todo nuevo desarrollo de los *Azotobacter*, sino que origina una disminución radical del número de estos gérmenes. Es necesario, por tanto, llegar a la conclusión de que el *M. xanthus*, merced a su acción lítica, es un poderoso antagonista de los *Azotobacter* y que su presencia en el suelo influirá poderosamente sobre el equilibrio de la flora fijadora de nitrógeno.

## RESUMEN

Se ha comprobado que el *Myxococcus xanthus* es capaz de provocar la lisis de los *Azotobacter* y crecer a expensas de los productos liberados. El efecto lítico es igualmente intenso, tanto sobre células en reposo como en crecimiento. En el suelo, el *M. xanthus* se comporta como un poderoso antagonista de los *Azotobacter*, ya que su presencia origina una rápida disminución del número de *Azotobacter* e inhibe casi totalmente el desarrollo de estos gérmenes.

## SUMMARY

*Myxococcus xanthus* has a great lithic effect on resting and growing cells of *Azotobacter*. In soils, *M. xanthus* behaves like a powerful antagonist, since it causes a rapid decrease of *Azotobacter* soil content and inhibits nearly all the development of these bacteria.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, O. N. 1951. Experiments in Soil Bacteriology. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Min.
2. BENDER, H. 1962. Arch. Mikrobiol., 43, 262.

3. BERGEY's Manual of determinative Bacteriology, 1957. 7.<sup>a</sup> edición. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
4. IMSHENETSKII, A. A., y KUZURINA, L. A. 1951. Mikrobiologiya, 20, 3.
5. OXFORD, A. E., y SINGH, B. N. 1946. Nature, 158, 745.
6. SINGH, B. N. 1947. J. Gen. Microbiol., 1, 1.
7. TCHIAN, Y. T. 1952. Proc. Linnean Soc. N. S. Wales, 77, 89. En J. POCHÓN y H. BARJAC. 1958. Traité de Microbiologie des Sols. Dunod, París.

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

## ACTIVIDAD DEL INTERFERON PRODUCIDO POR EL VIRUS DE LA SEUDOPESTE AVIAR (NDV) FRENTE A OTROS MIXOVIRUS (\*)

por

E. RONDA

Son muy numerosas las publicaciones referentes al interferón producido en diferentes sistemas celulares por diversos virus, pero existen muy pocos datos sobre la inducción del interferón por el virus de la seudopeste aviar («Newcastle disease virus»-NDV).

Únicamente los trabajos de Burke e Isaacs (2) hacen mención del interferón obtenido *in vitro* en membrana corialantoidea a partir de este virus, inactivado por rayos ultravioletas, midiendo su actividad frente al virus de la influenza.

Los estudios de Gifford y colaboradores (4), Isaacs (5), Levine (8) y Ruiz-Gómez e Isaacs (9) se refieren al interferón inducido por el NDV y lo evalúan por medio de la reducción del poder formador de placas por arborvirus (encefalitis equina Oeste y Chikungunya).

Se ha considerado de interés el estudio de la producción de interferón en huevo embrionado por el NDV, midiendo su actividad frente al mismo virus productor y a otros mixovirus. Se utiliza el método que evalúa la reducción del poder hemaglutinante de los virus testigos; este método está basado en la relación lineal entre el grado de inhibición vírico logrado y la concentración del interferón utilizado, y que siendo

---

(\*) Trabajo presentado al III Congreso Latinoamericano y I Colombiano de Microbiología. Bogotá, diciembre de 1964, y realizado gracias a una pensión de estudios en el extranjero concedida por la Comisaría General de Protección Escolar, del Ministerio de Educación Nacional.

usado por primera vez por Isaacs y Lindemann (6) ha sido considerado como de suficiente precisión en el estudio comparativo de titulaciones del interferón por Balducci y colaboradores (1).

## MATERIAL Y METODOS

### *Virus*

Influenza A, cepa Australia-57 y parainfluenza, tipo 1, cepa Sendai; procedentes del «Istituto Superiore di Sanità», de Roma. NDV, cepa Italia y virus de la peste aviar clásica («Fowl plague virus»-FPV), cepa Rostock; procedentes ambos del «Max Planck Institut für Virusforschung», de Tubinga.

Todos estos virus han sido mantenidos por pase en saco alantoideo en huevos embrionados de once días. De cada virus se ha obtenido un depósito fresco de líquido alantoideo infectado, que es conservado a -20 °C durante toda la experiencia.

### *Hemaglutinación (HA)*

Para la determinación de los títulos HA se ha seguido la técnica sobre placa de plástico excavada. Los elementos reaccionantes han sido: 0,25 ml de virus, en diluciones al doble, en solución de veronal (1/5 en agua bidestilada) y 0,25 ml de suspensión de hematíes de gallina, al 0,5 por ciento, en solución de veronal. Lectura de resultados después de una hora, a temperatura ambiente.

### *Producción del interferón*

El interferón ha sido obtenido por inoculación en saco alantoideo de  $10^4$  dosis letales para embrión ( $ELD_{50}$ ) de NDV, en huevos embrionados de once días. El líquido alantoideo infectado fue recogido después de setenta y dos horas de incubación\* de los huevos, a 37 °C y dializado frente a solución tampón de ácido cítrico + fosfatos, de pH 2, durante veinticuatro horas, a 4 °C; más tarde, dializado dos veces, frente a solución de Earle salina, a pH 7,8, y finalmente centrifugado a 13.000 g, durante cuarenta minutos. El sobrenadante es utilizado como interferón y se conserva a -20 °C, después de añadir suero de ternera.

### Titulación del interferón

Se ha seguido la técnica de Fulton y Armitage (3), con piezas de membrana corialantoidea procedentes de huevos de once a trece días de incubación, a 39 °C.

Se ha ensayado el interferón en diluciones 1/3, 1/5, 1/10, 1/30, 1/50 y 1/100, en solución de Earle salina. Para cada dilución del interferón se han utilizado seis tubos de cultivo, más un grupo de seis tubos con earle salina, para control del virus. En cada uno de los tubos, con y sin interferón, se introduce una pieza de membrana corialantoidea. El total (42 tubos) se mantiene en rueda giratoria durante veinticuatro horas a 37 °C; al cabo de este tiempo, se elimina el medio y se sustituye por  $10^6$  ELD<sub>50</sub> del virus que se ensaya, en 1 ml de earle salina. Después de un nuevo período de incubación en rueda giratoria, durante cuarenta y ocho horas, a la misma temperatura, se hace toma del medio de cada tubo y se efectúa la hemaglutinación individualmente.

Para cada dilución de interferón se ha calculado por el método de Kärber, la media geométrica de los títulos HA de los seis tubos, expresados en logarismos de base 2. El título de la actividad del interferón se obtiene porcentualmente con la media aritmética de los títulos HA de los virus ensayados.

Para cada virus se han efectuado dos pruebas, *a* y *b*, lo cual hace un total de doce tubos para cada dilución de interferón, hallándose la media aritmética entre los resultados de las dos determinaciones.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las pruebas de titulación del interferón por reducción del poder hemaglutinante del virus interferido, vienen expresados en el *cuadro 1*, para el virus Australia-57; en el *cuadro 2*, para NDV; en el *cuadro 3*, para el virus Sendai, y en el *cuadro 4*, para FPV.

*Cuadro 1. Poder interferente frente al virus Australia-57*

Dilución del interferón	Titulación		
	<i>a</i>	<i>b</i>	Media aritmética de <i>a</i> y <i>b</i> (*)
1/3	3	5	4
1/5	6	10	8
1/10	15	12	14
1/30	20	22	21
1/50	24	27	26
1/100	95	87	91

(\*) Relación porcentual, obtenida en los dos experimentos, entre la media geométrica de los títulos HA en los seis tubos de cada dilución del interferón y la media geométrica de los títulos HA en los seis tubos del virus testigo.

*Cuadro 2. Poder interferente frente a NDV*

Dilución del interferón	Titulación		
	<i>a</i>	<i>b</i>	Media aritmética de <i>a</i> y <i>b</i>
1/3	4	6	5
1/5	8	7	8
1/10	12	14	13
1/30	19	21	20
1/50	26	22	24
1/100	92	90	91

Cuadro 3. Poder interferente frente al virus Sendai

Dilución del interferón	Titulación		
	<i>a</i>	<i>b</i>	Media aritmética de <i>a</i> y <i>b</i>
1/3	3	4	4
1/5	8	11	10
1/10	16	18	17
1/30	24	28	26
1/50	58	64	61
1/100	100	98	99

Cuadro 4. Poder interferente frente a FPV

Dilución del interferón	Titulación		
	<i>a</i>	<i>b</i>	Media aritmética de <i>a</i> y <i>b</i>
1/3	7	5	6
1/5	10	8	9
1/10	19	15	17
1/30	27	22	25
1/50	80	76	78
1/100	100	98	99

## DISCUSION

Continúa siendo un problema la definición de unidad interferón y según Larín y colaboradores (7), aún no se puede expresar una unidad en términos patrón que permita hacer comparaciones cuantitativas de las propiedades biológicas y fisicoquímicas de las diversas muestras de interferón obtenidas en diferentes laboratorios. Por ello, en este trabajo nos hemos inclinado a seguir el parecer de Isaacs y Lindemann (6), los cuales consideran como unidad interferón la dilución capaz de reducir dos unidades logarítmicas de base 2 el título HA del virus interferido, lo que viene a ser al 25 por ciento del título HA del virus testigo (75 por ciento de reducción).

Se confirma la inespecificidad de actuación del interferón al interferir frente a cuatro virus diferentes, que aunque incluidos en un mismo grupo presentan pocas relaciones antigénicas entre sí. Las diluciones consideradas como unidad interferón (1/50 para el virus influenza A y NDV, y 1/30 para el virus Sendai y FPV) frente a los cuatro virus ensayados, son tan próximas que pueden considerarse superponibles.

## RESUMEN

Se obtiene interferón a partir de líquido alantoideo de huevos embrionados inoculados con NDV, cepa Italia.

Este interferón es titulado frente a varios mixovirus: influenza A, cepa Australia -57; parainfluenza tipo 1, cepa Sendai; FPV, cepa Rostock, y NDV, cepa Italia. La titulación se efectúa valorando la reducción del poder hemaglutinante del virus interferido por diversas diluciones del interferón. El interferón obtenido produjo, en la dilución 1/50 para NDV e influenza A y en la dilución 1/30 para FPV y Sendai, la reducción del 75 por ciento del poder hemaglutinante de cada virus.

## SUMMARY

An interferon is obtained from allantoic fluid of embryonated eggs inoculated with NDV, Italy strain.

This interferon is titled against several myxovirus: influenza A, Australia-57 strain; parainfluenza 1, Sendai; FPV, Rostoc strain, and

NDV, Italy strain. The titling is got by determining the reduction of the haemagglutinant power of the interfered virus by various dilutions of the interferon.

The interferon produced the reduction of 75 per cent in the haemagglutinant power of each virus when the dilution 1/50 for NDV and influenza A and when the dilution 1/30 for FPV and Sendai were used.

### BIBLIOGRAFIA

1. BALDUCCI, M.; VERANI, P., y BALDUCCI, C. 1963. Assay of interferon activity. *Appl. Microbiol.*, 11, 310-15.
2. BURKE, D. C., e ISAACS, A. 1958. Some factors affecting the production of interferon. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 39, 452-58.
3. FULTON, F., y ARMITAGE, P. 1951. Surviving tissue suspensions for influenza virus titration. *J. Hyg.*, 49, 247-51.
4. GIFFORD, G. E.; MUSSETT, M. V., y HELLER, E. 1964. Comparative studies on the production and assay of interferon. *J. Gen. Microbiol.*, 34, 475-81.
5. ISAACS, A. 1962. Induction and action of interferon. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: Basic Mechanisms in Animal Virus Biology, 343-49.
6. ISAACS, A., y LINDEMANN, J. 1957. Virus interference I. The interferon. *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B*, 147, 258-67.
7. LARIN, N. M.; HOLNESS, M. C.; JENNINGS, J. F.; STADDON, A. G., y TREEBY, K. 1962. Assay of interferon in tissue culture. *Proc. Intern. Congr. Microbiol. Std.* 7th London 1961, 465-66.
8. LEVINE, S. 1962. Some characteristics of an interferon derived from embryonated eggs infected with Newcastle disease virus. *Virology*, 17, 593-95.
9. RUIZ-GÓMEZ, J., e ISAACS, A. 1963. Interferon production by different viruses. *Virology*, 19, 8-12.

## CRECIMIENTO ASOCIADO *CHLORELLA-AZOTOBACTER*

por

J. MORALES

### ANTECEDENTES

Sobre crecimiento asociado entre *Chlorella* y algunas bacterias podemos citar en primer lugar los trabajos de Ruschmann (17), divididos en tres partes, que estudia las relaciones alga-bacteria en general y algunos procedimientos para determinar la proporción en que se encuentra cada microorganismo. En el trabajo de Schröder (19) se estudian también cultivos asociados de *Chlorella* con diversas bacterias, entre ellas el *Azotobacter*; determina el aumento de nitrógeno por el crecimiento de esta bacteria, pero no averigua la influencia sobre *Chlorella*. Sandrak (18) ha mencionado la liberación de aminoácidos al medio por *Azotobacter* y anteriormente, Winogradsky (24) observó la producción de amoníaco libre en el medio durante el crecimiento del mismo; ambas sustancias pueden ser utilizadas por *Chlorella*. Nosotros (12) observamos mayor abundancia de *Azotobacter* en las aguas donde existía gran desarrollo de algas. En este sentido podíamos citar numerosa bibliografía, recopilada en gran parte en el trabajo de Schröder (19).

Son de interés para nuestro trabajo los estudios sobre el metabolismo del nitrógeno por *Chlorella* y también la utilización de la glucosa y producción de grasa. No ha sido estudiado de forma cuantitativa el proceso de crecimiento asociado (6, 8-10, 13-16, 20-23, etc.) y no se puede precisar por tanto la verdadera importancia del mismo, por lo que consideramos de interés determinarlo.

## MATERIAL Y METODOS

Los cultivos los realizamos con el aparato de Frift-Kniese, en tubos con 300 cm<sup>3</sup> de medio, una intensidad de iluminación de 5.000 a 7.000 LUX, 27 °C de temperatura y haciendo burbujear aire con 2,5 por ciento de anhídrido carbónico.

El medio de cultivo tenía la composición siguiente:

Sales	Concentración en moles/litro
KNO <sub>3</sub>	1,10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	4,5 · 10 <sup>-3</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,5 · 10 <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,10 <sup>-3</sup>
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,10 <sup>-4</sup>
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,5 · 10 <sup>-5</sup>
HBO <sub>3</sub>	1,10 <sup>-6</sup>
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,10 <sup>-6</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,10 <sup>-6</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1,10 <sup>-8</sup>
(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,10 <sup>-8</sup>

El hierro se agregaba en forma de complejo con titriplex III.

En algunos casos, a este medio le suprimíamos los nitratos y le agregábamos glucosa al 1 por ciento.

Para las determinaciones de nitrógeno utilizábamos el micro-kjeldahl con catalizador de Merck, según Wieninger.

Para separar las algas de las bacterias y del medio empleábamos la centrifugación fraccionada a 500 y 4.000 r/m. Con este método, aunque no se consiga separar las algas y bacterias perfectamente, sirve para determinar la proporción relativa de cada uno de los microorganismos.

## PARTE EXPERIMENTAL

Realizamos una serie de experimentos previos para averiguar las mejores condiciones de crecimiento asociado entre *Chlorella* y *Azotobacter* y estudiar su influencia mutua. Los cultivos de ambos microorganismos sin sales nitrogenadas y sin sustancias energéticas para *Azotobacter* apenas si daban crecimiento apreciable de los mismos. Si empleábamos sales amónicas, se desarrollaba bien *Chlorella*, pero el medio se acidificaba por el consumo de la base amoniacal y no era apto para el desarrollo de *Azotobacter*. Sólo dos procedimientos nos resultaron utilizables:

a) Medios con glucosa al 1 por ciento, sin sales nitrogenadas, en los cuales sembrábamos primero el *Azotobacter* y cultivábamos hasta agotar prácticamente la glucosa y después sembrábamos *Chlorella*.

b) Medios con nitratos y sin glucosa, cuya composición hemos indicado en los métodos, en los cuales sembrábamos en primer lugar *Chlorella* y cultivábamos hasta agotar los nitratos y después sembrábamos *Azotobacter*.

Es conveniente realizar los experimentos en la forma que se describen en los procedimientos a) y b), pues en el primer caso, si sembramos *Chlorella* en un medio con glucosa y sin sales nitrogenadas, se desvía el metabolismo hacia la producción de grasa y los rendimientos son menores; en el segundo procedimiento, el b), si sembramos *Azotobacter* en un medio con nitratos, no fija nitrógeno y se convierte en un competidor de *Chlorella*.

Todos los cultivos se sembraban con células de *Azotobacter* o de *Chlorella*, que se encontraban en fase logarítmica de crecimiento y en cada caso, se calculaba la cantidad de nitrógeno y materia seca del inóculo.

El tiempo de cultivo fue de diez, veinte o treinta días, según se indica en el *cuadro 1*; después de este tiempo se procedía a la centrifugación fraccionada, y en las fracciones se determinaba la cantidad de nitrógeno y de materia seca.

Los valores medios de tres o más cultivos para cada caso son los que se consignan en el cuadro y en la *figura 1*; en los que D significa días de cultivo, N miligramos de nitrógeno amónico/100 cm<sup>3</sup> de

Cuadro 1

Cultivo tipo	Azotobacter	Chlorella	Cantidades iniciales (inóculo)				Cantidades finales						Veces que aumentó el inóculo			
			Azotobacter		Chlorella		Azotobacter		Chlorella		Aumento total		Azotobacter		Chlorella	
			N	MS	N	MS	N	MS	N	MS	N	MS	N	MS	N	MS
1	20		0,02	0,21			6,36	51,20			6,08	49,99	317,0	242,8		
2		20			0,68	5,8			0,91	8,02	0,25	2,40			0,3	0,3
3	20	10	0,02	0,20	0,68	5,7	4,21	42,20	1,83	38,41	5,34	80,61	209,5	210,0	1,6	5,7
4		20			0,30	2,6			12,30	293,00	12,00	290,40			40,0	111,6
5	10	20	0,02	0,25	0,30	2,5	0,68	4,70	13,03	360,00	13,39	362,40	33,0	17,8	42,0	143,0
6	20	30	0,02	0,25	0,30	2,5	0,75	5,80	15,01	381,00	15,44	384,50	36,5	22,2	49,0	151,4

cultivo y MS miligramos de materia seca/100 cm<sup>3</sup> de cultivo. Los cultivos tipos 1, 2 y 3 se realizaron por el procedimiento a), y los cultivos 4, 5 y 6, por el procedimiento b). La figura corresponde a la representación gráfica de los aumentos totales, que son la suma de las cantidades finales de cada cultivo, menos la cantidad que se aportó en el inóculo. También calculamos las veces que aumentó el inóculo en cada caso, restando a la cantidad final, la del inóculo, y dividiendo el resto por esta última.

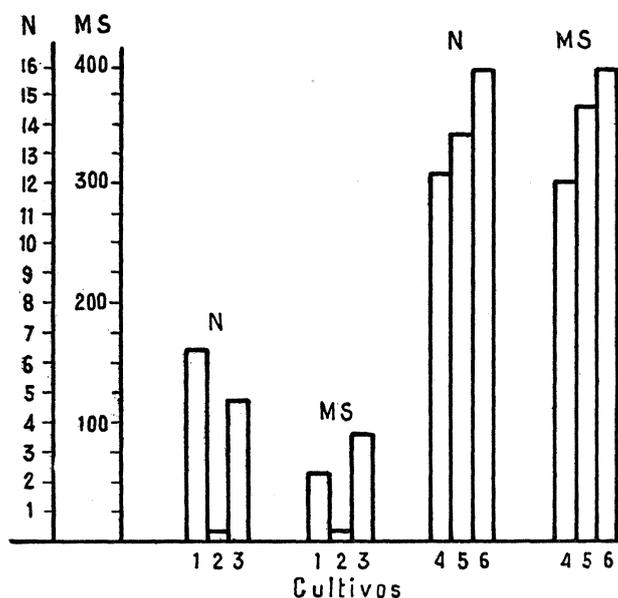


Figura 1

En el cuadro y en la figura se puede apreciar comprobando los cultivos tipo 3 con respecto al tipo 2, que por influencia del crecimiento de *Azotobacter* ha aumentado la cantidad de nitrógeno y de materia seca en el alga; comparando los cultivos tipo 3 con los tipo 1 se aprecia que ha habido menos fijación de nitrógeno en 3 que en 1, donde ha crecido el *Azotobacter* solo, pero la cantidad total de materia seca ha aumentado. El incremento de nitrógeno en los cultivos tipo 2, con respecto al inóculo, estimamos puede ser debido a impurezas del medio o nitrógeno del inóculo no detectado por el kjeldahl. En los cultivos

según el procedimiento b), si comparamos los resultados de los tipos 4 y 5, apreciaremos que el cultivo previo de *Chlorella* permite un desarrollo de *Azotobacter*, aumentando la cantidad de nitrógeno amínico por fijación y la cantidad de materia seca total; comparando los cultivos 5 y 6, en este último, el aumento es mayor por haber estado más días de crecimiento asociado.

### RESUMEN

Estudiamos el crecimiento asociado de *Chlorella* y *Azotobacter*. Encontramos que los cultivos vigorosos de *Azotobacter* pueden dar lugar a un crecimiento moderado de *Chlorella*, si ésta es posteriormente sembrada, y a la inversa, un crecimiento abundante de *Chlorella* origina un cierto desarrollo de *Azotobacter* y fijación de nitrógeno. El crecimiento inducido de un microorganismo por el otro no es muy intenso, pero consideramos puede ser de interés en la Naturaleza, pues el crecimiento de uno de los microorganismos puede provocar el desarrollo del otro.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundación «Juan March» y al Instituto de Fisiología Vegetal, de Gotinga la ayuda recibida para la realización de este trabajo.

### SUMMARY

In this paper the associated growth of *Azotobacter* and *Chlorella* has been studied. It has been showed that vigorous cultures of *Azotobacter* stimulate a moderate growth of *Chlorella* and viceversa, i. e., an abundant growth of *Chlorella* favours the development of *Azotobacter*.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALLISON, F. E.; LOVE, K. S.; PINCK, L. A., y GADDY, V. L. 1948. Gaseous losses of nitrogen from green plants. I. Studies with *Chlorella* and *Lema*. II. Studies with excised leaves in nutrient media. *Plant. Physiol.*, 23, 496-504 y 601-8.
2. BARINOVA, S. A. 1962. On carbon nutrition sources for nitrogen-fixing bacteria of the genus *Clostridium*. *Mikrobiologiya*, XXXI, 18-24.
3. CHU, S. P. 1943. I. The influence of the mineral compositions of the medium on the growth of planktonic algae. II. The influences of the concentration of inorganic nitrogen and phosphate phosphorus. *J. Ecol.*, 31, 109-48.
4. CRAMER, M., y MYERS, J. 1948. Nitrate reduction and assimilation in *Chlorella*. *J. Gen. Physiol.*, 32, 93-102.
5. GUMMERT, F. 1950. Fettgewinnung aus der Massenzucht von Grünalgen. *Fette, Seifen Anstrichmittel*, 52, 453-54.
6. HARDER, R., y WITSCH, H. von. 1942. Bericht über Versuche zur Fettsynthese mittels autotropher Mikroorganismen. *Forschungsdienst*, 16, 270-75.
7. JENSEN, H. L. 1954. The Azotobacteriaceae. *Bacteriol. Rev.*, 18, 195-213.
8. KETCHUM, B. H. 1939. The absorption of phosphate and nitrate by illuminated cultures of *Nitzschia closterium*. *Am. J. Botany*, 26, 399-430.
9. LUDWIG, C. A. 1938. The availability of different forms of nitrogen to a green alga. *Am. J. Botany*, 25, 448-58.
10. MILNER, H. W. 1948. The fatty acids of *Chlorella*. *J. Biol. Chem.*, 176, 813-17.
11. MILNER, H. W. 1951. Possibilities in photosynthetic methods for productions of oils and proteins. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 28, 363-67.
12. MORALES, J. 1960. Nuevo estudio biológico del género *Azotobacter*. *Microbiol. Españ.*, 13, 59-92 y 111-68.
13. MYERS, J., y JOHNTON, J. A. 1949. Carbon and nitrogen balance of *Chlorella* during growth. *Plant Physiol.*, 24, 111-19.
14. PEARSALL, W. H., y BENGRY, R. P. 1940. The growth of *Chlorella* in darkness and in glucose solutions. *Ann. Botany*, 4, 365-77.
15. PIRSON, A. 1940. Stoffwechzellphysiologische analyse des mineral Salz mangels mit einzelligen Algen. *Ernaehr. Pflanze*, 36, 25-31.
16. PIRSON, A.; TICHY, C., y WILHOLMI, G. 1942. Stoffwechsel und Mineralsalzer-nährung einzelliger Grünalgen. I. Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von *Ankistrodesmus*. *Planta*, 40, 199-253.
17. RUSCHMANN, G. 1956. Beiträge zur Mikrobiologie der *Chlorella*. I. Mitteilung: *Chlorella* Rein- und Rohkulturen. II. Mitteilung: Mikroskopische Untersuchungen der Mikroflora. III. Mitteilung: Kulturelle Untersuchung der Mikroflora. *Biol. Zentr.*, 75, 129-49, 476-99 y 576-96.

18. SANDRAK, N. A. 1960. Chemical compositions of extracellular nitrogenous excretions of *Azotobacter* and this availability as a nitrogen source for microorganism and higher plants. De una conferencia de Timrigazer Misococo en la Academia de Agricultura de Gotinga (Alemania).
19. SCHRÖDER, M. 1932. Du Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II, 85, 177-212.
20. SPOEHR, H. A., y MILNER, H. W. 1949. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. Plant Physiol., 24, 120-49.
21. TREALASE, S. F., y TREALASE, H. M. 1935. Changes in hydrogenion concentrations of culture solutions containing nitrate and ammonium nitrogen. Am. J. Botany, 22, 520-42.
22. URHIAN, O. 1931. Beiträge zur Kenntnis der Stickstoffassimilation von *Chlorella* und *Scenedesmus*. Jahrb. Wiss. Botan., 75, 1-44.
23. VIRTANEN, A. I., y MIETTINEN, J. K. 1949. Different nitrogen fractions in normal and low-nitrogen cells of microorganisms. Acta Chem. Scand., 3, 1.437-39.
24. WINOGRADSKY, S. 1949. Obras completas. Masson et Cie., Paris.

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

POSIBILIDAD DE CONSERVACION  
DE LEVADURAS APICULADAS (GENERO  
*KLOECKERA*) EN CONDICIONES ADVERSAS DE  
MEDIO AMBIENTE (COMUNICACION PREVIA)

por

E. FEDUCHY

Al comenzar el estudio de la flora microbiana existente en hojas frescas de la vid, con el fin de encontrar bacterias malolácticas, que, según exponen Ribereau-Gayón y Peynaud en su tratado de Enología (2), fueron aisladas por Radler (1) de las hojas de la viña, pudimos observar entre la flora microbiana existente, levaduras apiculadas del género *Kloeckera*, observación que realizada la primera vez en época anterior a la madurez de la uva, y tratándose de levaduras no esporógenas, ni capaces de adoptar formas durables, se consideró de interés; por lo que se continuaron estas observaciones en distintas épocas del año, con el fin de conocer los momentos de aparición y desaparición de esta flora de levaduras en las hojas de la vid.

Durante dos años se han realizado estas observaciones, haciendo preparaciones de los depósitos de centrifugación, de aguas de infusión de hojas de la viña en diferentes fechas, y también siembras de estos centrifugados en medios de cultivo y aislamiento, para destacar la presencia de las levaduras que perseguíamos observar.

En el mes de septiembre hacían ya su aparición las primeras levaduras apiculadas del género *Kloeckera* y continuaban observándose en las hojas después de la vendimia y hasta mediados de noviembre, ya las hojas de la viña bastante secas.

Esta resistencia inesperada, en condiciones tan adversas de medio,

habiendo sido siempre consideradas como de las levaduras más débiles, pues, en efecto, así se comportan frente a la acción del alcohol y del anhídrido sulfuroso en las elaboraciones vónicas, dio origen a la idea de comprobar la duración de su vitalidad en un medio, el más adverso de los empleados para las pruebas de esporulación, que es el cultivo sobre placa de yeso.

Se hicieron varias pruebas depositando sobre placas de yeso, pequeñas masas de levaduras apiculadas tomadas de cultivo joven en estría sobre agar-malta. Las placas de yeso fueron humedecidas (según técnica) antes de sembrar con agua estéril, y un pequeño exceso de ésta quedó en la caja de Petri donde estaban colocadas.

Posteriormente, se fue comprobando la vitalidad de las levaduras, a partir de la pequeña mancha correspondiente a la superficie del yeso donde fue depositado el cultivo, sembrando con la aguja o asa en estría sobre agar-malta solidificado en caja de Petri.

Estas siembras, que fueron realizadas sucesivamente a los siete, quince, treinta, cuarenta y cinco y sesenta días posteriores a la realizada sobre el yeso, se desarrollaron, apareciendo francamente la estría a las cuarenta y ocho horas. Siendo tanto más interesante este desarrollo cuanto más inesperado, pues el aspecto del cultivo sobre yeso era en las últimas tomas casi inapreciable, y la placa de yeso estaba ya seca desde que pasaron los primeros días, lo que obligaba, para tomar de la superficie del yeso algo del cultivo, a mojar asépticamente el asa en agua estéril, y aplicarla llevando un menisco en el rizo.

Era también necesario algunas veces realizar la siembra arrastrando por la superficie del agar-malta fresco, laminillas de levadura aglutinada con yeso, lo que explica la superficie irregular de las estrías (*figura 1*). En la *figura 2* se ve un aspecto de las levaduras en yeso, a los sesenta días, y en la *figura 3*, el de preparación tomada de las anteriores desarrolladas en estría sobre el agar-malta.

Estas posibilidades de conservación de las levaduras apiculadas en condiciones adversas de medio ambiente y las de poder también encontrar otras más favorables en el transcurso del año (en flores, frutos, etc.), explican su conservación en estado vegetativo hasta el momento de la madurez de la uva, aclarando, en parte, la aparición en número dominante en la primera fase de la fermentación de los mostos.

### RESUMEN

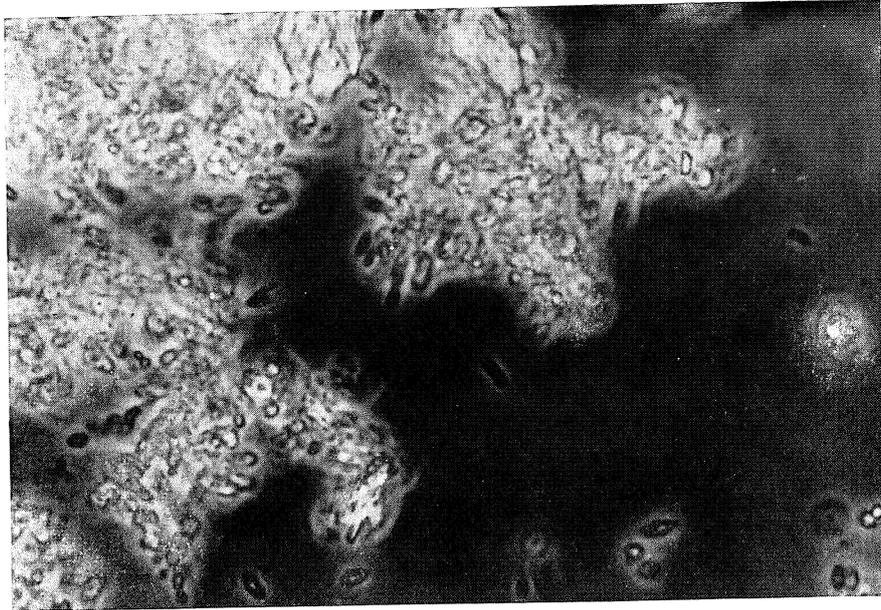
Se ha comprobado la conservación de la vitalidad de una levadura apiculada del género *Kloeckera* en condiciones adversas del medio, condiciones que se creía eran capaces de resistir solamente las levaduras esporógenas.

### SUMMARY

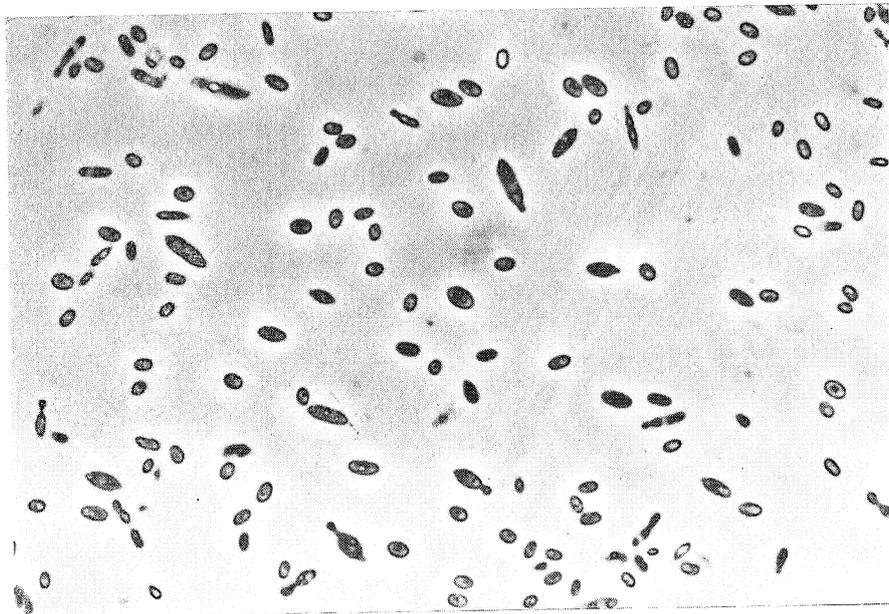
It has been proved the viability of an apiculate yeast (genus *Kloeckera*) in adverse ambiental conditions. Until the present time the sporogenous yeasts were believe the only ones able to survive in such conditions.

### BIBLIOGRAFIA

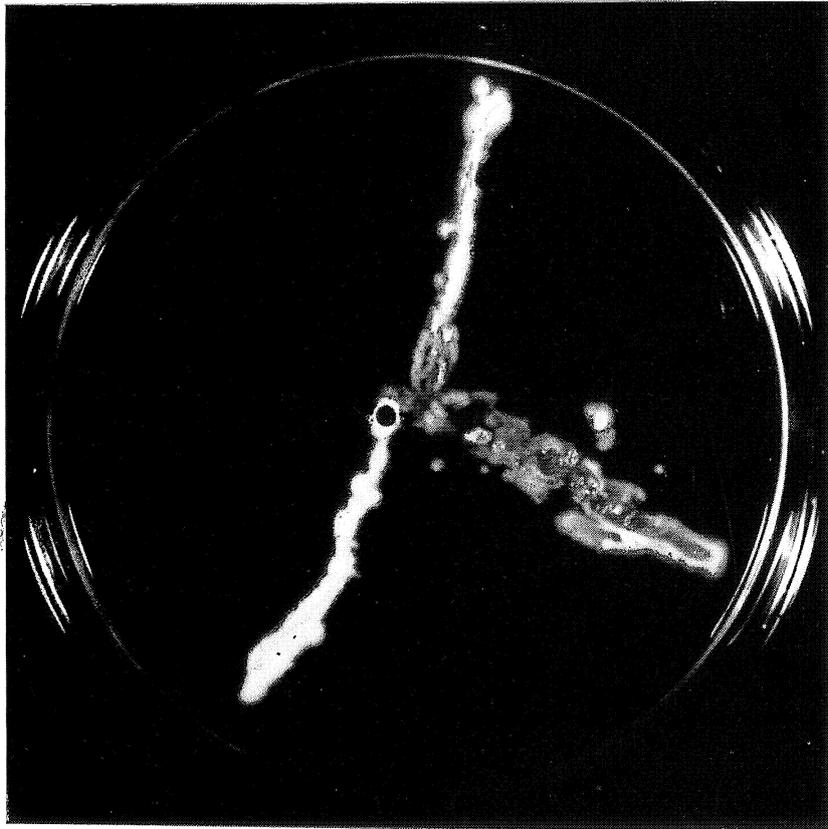
1. RADLER, F. 1958. Arch. Mikrobiol., 3a, 64.
2. RIBEREAU-GAYON, J., y PEYNAUD, E. 1961. Traité d'Oenologie, II, 468.



*Figura 1. Observación al microscopio de una preparación tomada de la siembra sobre yeso, de levadura apiculada (género Kloeckera) a los sesenta días de sembrada, apreciándose células aglutinadas con el yeso y algunas sueltas típicas. × 800*



*Figura 3. Levadura procedente del rejuvenecimiento sobre agar-malta, del cultivo tomado del bloque de yeso de sesenta días. Se aprecia el aspecto típico del género Kloeckera. × 800*



*Figura 2. Estrias sobre agar-malta, procedentes de la siembra tomada del cultivo de la levadura depositado sobre bloque de yeso, sesenta días antes. Se aprecian las rugosidades de las estrias por lo irregular de la siembra*

## EL DOCTOR RICARDO SALAYA (†)

En el pasado mes de enero, ha fallecido en Madrid D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario y miembro fundador de la Sociedad de Microbiólogos Españoles. El Dr. Salaya, que asimismo formaba parte del Consejo de Redacción de esta Revista, poseía los títulos de Doctor en Farmacia y Licenciado en Ciencias Naturales y era profesor del Laboratorio Municipal de Madrid, en el que ocupaba la Jefatura de la Sección de Aguas al ser jubilado, en fecha reciente.

La Sociedad de Microbiólogos Españoles lamenta profundamente la pérdida de quien, y junto a sus nobles cualidades humanas, fue técnico seguro y competente en el campo de la Microbiología sanitaria.

## PREMIO DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS

En el concurso científico del curso 1964-65, de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales ha obtenido el accésit correspondiente al grupo de Ciencias Naturales el Dr. Manuel Santaolalla Cerezo, Colaborador Científico del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología por su trabajo «Composición química y estructura de las paredes bacterianas».

## AYUDA DE INVESTIGACION

La Fundación «Juan March» ha concedido la Ayuda de investigación de Ciencias Naturales, 1965, al Dr. Román de Vicente Jordana, Investigador Científico del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, para que realice, en un período de dos años, un trabajo acerca del tema «Investigaciones para precisar la naturaleza del agente y continuar el estudio de los factores que intervienen en los procesos de citoarjesis».

## EL DOCTOR RICARDO SALAYA (†)

En el pasado mes de enero, ha fallecido en Madrid D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario y miembro fundador de la Sociedad de Microbiólogos Españoles. El Dr. Salaya, que asimismo formaba parte del Consejo de Redacción de esta Revista, poseía los títulos de Doctor en Farmacia y Licenciado en Ciencias Naturales y era profesor del Laboratorio Municipal de Madrid, en el que ocupaba la Jefatura de la Sección de Aguas al ser jubilado, en fecha reciente.

La Sociedad de Microbiólogos Españoles lamenta profundamente la pérdida de quien, y junto a sus nobles cualidades humanas, fue técnico seguro y competente en el campo de la Microbiología sanitaria.

## PREMIO DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS

En el concurso científico del curso 1964-65, de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales ha obtenido el accésit correspondiente al grupo de Ciencias Naturales el Dr. Manuel Santaolalla Cerezo, Colaborador Científico del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología por su trabajo «Composición química y estructura de las paredes bacterianas».

## AYUDA DE INVESTIGACION

La Fundación «Juan March» ha concedido la Ayuda de investigación de Ciencias Naturales, 1965, al Dr. Román de Vicente Jordana, Investigador Científico del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, para que realice, en un período de dos años, un trabajo acerca del tema «Investigaciones para precisar la naturaleza del agente y continuar el estudio de los factores que intervienen en los procesos de citoarjesis».

## EL DOCTOR RICARDO SALAYA (†)

En el pasado mes de enero, ha fallecido en Madrid D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario y miembro fundador de la Sociedad de Microbiólogos Españoles. El Dr. Salaya, que asimismo formaba parte del Consejo de Redacción de esta Revista, poseía los títulos de Doctor en Farmacia y Licenciado en Ciencias Naturales y era profesor del Laboratorio Municipal de Madrid, en el que ocupaba la Jefatura de la Sección de Aguas al ser jubilado, en fecha reciente.

La Sociedad de Microbiólogos Españoles lamenta profundamente la pérdida de quien, y junto a sus nobles cualidades humanas, fue técnico seguro y competente en el campo de la Microbiología sanitaria.

## PREMIO DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS

En el concurso científico del curso 1964-65, de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales ha obtenido el accésit correspondiente al grupo de Ciencias Naturales el Dr. Manuel Santaolalla Cerezo, Colaborador Científico del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología por su trabajo «Composición química y estructura de las paredes bacterianas».

## AYUDA DE INVESTIGACION

La Fundación «Juan March» ha concedido la Ayuda de investigación de Ciencias Naturales, 1965, al Dr. Román de Vicente Jordana, Investigador Científico del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, para que realice, en un período de dos años, un trabajo acerca del tema «Investigaciones para precisar la naturaleza del agente y continuar el estudio de los factores que intervienen en los procesos de citoarjesis».

Depósito legal: M. 702 - 1958

---

Art. Gráf. REYES.—Jerónima Lorente, 15.—MADRID.