
VOLUMEN 19. 1966

ABRIL - JUNIO. NUMERO 2

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, 200 PTA; extranjero, 300 PTA

Número: España, 60 PTA; extranjero, 90 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, «José María Albareda». Madrid). Mensual. Suscripción: España, 430 PTA; extranjero, 540 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 50 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, 60 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 200 PTA; extranjero, 250 PTA. Número: España, 220 PTA; extranjero, 270 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA. Número: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA.

ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 60 PTA; extranjero, 75 PTA. Número: España, 75 PTA; extranjero, 100 PTA.

ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 200 PTA; extranjero, 480 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 180 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, 70 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 80 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, 150 PTA; extranjero, 210 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.

GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 100 PTA; países restantes, 160 PTA. Número: España y Portugal, 30 PTA; países restantes, 45 PTA.

PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 200 PTA; extranjero, 300 PTA. Número: España, 75 PTA; extranjero, 100 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
Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas, por <i>M. Rubio-Huertos</i> y <i>D. López-Abella</i>	77
Identificación de esteroides en la grasa neutra del <i>Clostridium tetani</i> y sus formas L fijas, por <i>M. Santaolalla</i>	87
Observaciones sobre casos espontáneos de tuberculosis íctica, por <i>D. A. Conroy</i>	93
Una nota referente a las reacciones del <i>Mycobacterium anabanti</i> frente a los carbohidratos, por <i>D. A. Conroy</i> , <i>I. E. Valdez</i> y <i>A. J. Ross</i>	115
Resistencia térmica de lactobacilos y levaduras. II, por <i>M. J. Fernández-Díez</i> y <i>F. González-Cancho</i>	119
Observaciones relativas a los procedimientos y técnicas seguidas en el estudio de la «flora» de levaduras vínicas de localidades españolas, por <i>E. Feduchy</i>	131
Actividad antibacteriana del ácido nalidíxico (WIN 18320) frente a diversas estirpes de gram-negativos, por <i>V. Callao</i> y <i>A. Ramos</i>	173
<i>Salmonella dublin</i> y <i>S. bredeney</i> en colecistos de vacuno de abasto, por <i>M. Rodríguez-Rebollo</i>	183
Prof. José María Albareda (†)	191
El Primer Congreso Latinoamericano de Parasitología	191

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

ULTRAESTRUCTURA DE CELULAS DE PIMIENTO INFECTADAS CON UN VIRUS Y SU LOCALIZACION EN LAS MISMAS

por

M. RUBIO-HUERTOS y D. LÓPEZ-ABELLA

INTRODUCCION

El estudio por medio de la microscopía electrónica de la ultraestructura de las células de plantas infectadas por virus, ha demostrado ser de gran interés en la identificación y localización de las partículas de virus en la célula huésped y, en algunos casos, ha permitido observar fases correspondientes al desarrollo y formación de las partículas de virus, especialmente en el virus Mosaico del tabaco (2-3 y 10) y en el virus «Petunia ringspot» (5-7), así como su relación con los diversos orgánulos celulares.

En el presente trabajo hemos empleado las técnicas de secciones ultrafinas y observación al microscopio electrónico, para el estudio de la ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus encontrado en España y que parece ser de considerable importancia económica por su gran extensión en los cultivos de estas plantas.

MATERIALES Y METODOS

Virus

El virus procede de unas plantaciones de pimientos en Talavera de la Reina (Toledo), en donde una gran mayoría de las plantas se encontraba infectada, presentando mosaico y deformación de las hojas jóvenes y enanismo (*figura 1*).

Microscopía electrónica

Piezas de 2 mm de las hojas de pimiento, mostrando síntomas claros de la infección, fueron fijadas en una solución de tetraóxido de osmio al 1 por ciento, en amortiguador de acetato de veronal, a pH 6,9, durante dos horas, a 4 °C; después se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona y se incluyeron en durcupan, endureciéndose en estufa a 55 °C, durante treinta y seis horas.

Las secciones se realizaron con ultramicrotomo LKB, con cuchilla de vidrio, obteniéndose frecuentemente series de más de quince cortes; éstos se estiraron con vapores de cloroformo y se montaron en rejillas cubiertas de formvar. Generalmente, los cortes se tiñeron, una vez montados, con citrato de plomo.

Para el examen de los cortes se utilizó el microscopio electrónico Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica, de la División de Ciencias, del C. S. I. C., de Madrid, operando a 60 y 80 kV.

RESULTADOS

Las células del mesofilo de hojas infectadas revelaron diversos tipos de inclusiones en el citoplasma de las mismas. Siendo las más corrientes las inclusiones en roseta, en anillos y formando placas irregulares.

Las rosetas y los anillos excéntricos, los habíamos encontrado en infecciones con virus de leguminosas, como, por ejemplo, el virus «red clover vein mosaic» y han sido descritos también por otros autores en otras virosis, aunque nunca se ha encontrado su correspondencia tridimensional, o si están formadas por partículas de virus u otras sustancias. Gracias a la obtención de cortes seriados hemos podido seguir en profundidad algunas de estas inclusiones, de manera que ha sido posible el reconstruir o visualizar el cómo están estas inclusiones dentro del citoplasma de una manera tridimensional. Así hemos podido comprobar que las secciones de una roseta se continúan en profundidad en más de diez cortes seriados, lo que da una longitud a la roseta de aproximadamente 750 m μ , cambiando algo el aspecto de la inclusión al profundizar, debido a su irregularidad en el plano longitudinal (*figuras 4-7*).

Las rosetas, como indica su nombre (*figuras 3 y 8*), y vistas sola-



Figura 1. Planta de pimiento mostrando síntomas de virosis en las hojas superiores



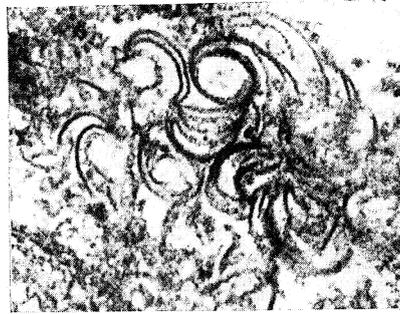
Figura 2. Túbulos en el citoplasma de una célula infectada, posiblemente aparato de Golgi modificado. × 30.000



Figura 3. Vista de las inclusiones en el citoplasma, cortadas en diferentes planos. Rosetas y placas. × 48.000



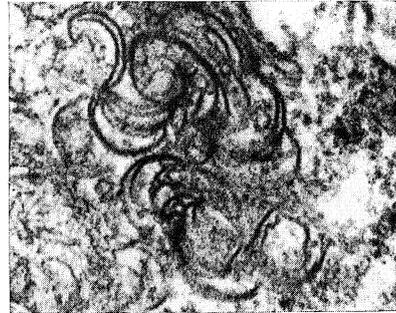
4



5



6



7

Figuras 4-7. Microfotografías de la misma inclusión en roseta, de una sucesión de cortes seriados. $\times 48.000$



Figura 8. Detalle de una inclusión en roseta. $\times 140.000$

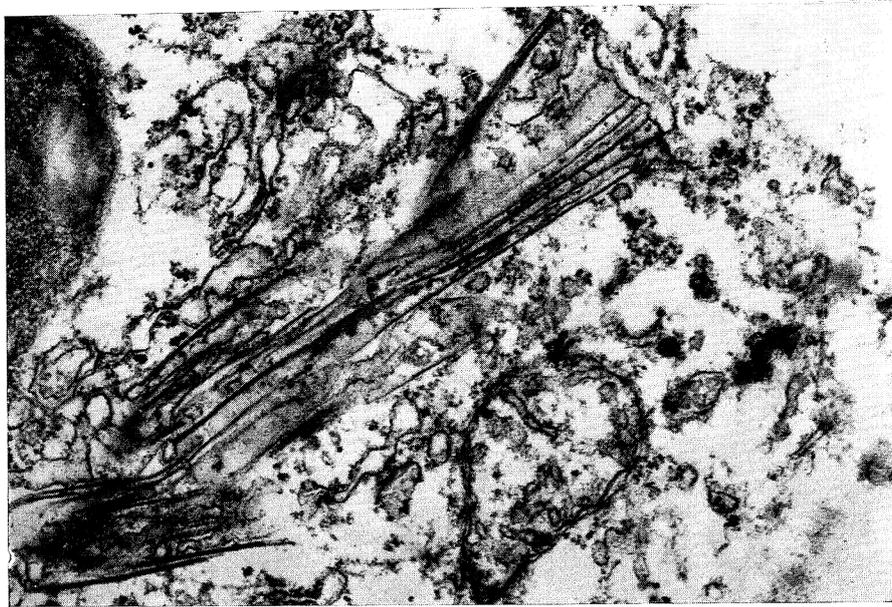


Figura 9. Inclusión en placa arrugada. × 43.000



Figura 10. Detalle de inclusión en placa. × 68.000

mente en un corte transversal, son formaciones irregulares en las que se advierte cierto orden helicoidal, incluso algunas de ellas (*figura 8*) parecen completamente regulares, aunque siguiendo las secciones seriadas se ve que no es así: su forma es una hélice con un número de brazos que varían de 6 a 10, partiendo de un punto central; las hélices o rosetas son indiferentemente dextró o levógiras; el grosor de los brazos es aproximadamente de 20-25 m μ .

Los anillos se encuentran a veces junto con las rosetas y su grosor es variable.

Las inclusiones formando placas son muy numerosas y presentan unos bordes y unas líneas bien definidas, y todas estas líneas están unidas por una sustancia gris, suave, aparentemente homogénea, que se diferencia bien del citoplasma, teniendo la apariencia general de una placa o sábana fina de forma rectangular y que estuviera retorcida y arrugada, formando además largos pliegues longitudinales (*figuras 3 y 9-10*). Observando las secciones seriadas de las rosetas y de las otras inclusiones hemos podido establecer que se trata del mismo tipo de inclusiones, unas veces cortadas transversalmente y otras, longitudinalmente, según las *figuras 11-12*.

Dentro de los cloroplastos, mitocondrias y núcleos de las plantas infectadas, no hemos encontrado inclusiones de ningún tipo. Los cloroplastos y las mitocondrias presentan un aspecto normal, igual a los de la planta sana; sin embargo, hemos podido observar la formación en el citoplasma de una serie de túbulos que se acumulan en determinadas regiones del mismo, de una manera parecida a lo observado en la infección con el virus «*Petunia ringspot*», en donde estas formaciones parecen proceder de una hipertrofia del aparato de Golgi (7). Pero en el caso del virus del pimiento que estudiamos, no nos ha sido posible establecer que provengan de una modificación de dicho aparato (*figura 2*).

No hemos encontrado partículas de virus aisladas en el citoplasma de las plantas infectadas.

DISCUSION

La presencia de inclusiones en las células de plantas infectadas, así como su ausencia en aquellas pertenecientes a plantas sanas es evidencia de que tienen su origen en la infección vírica. En cuanto a la

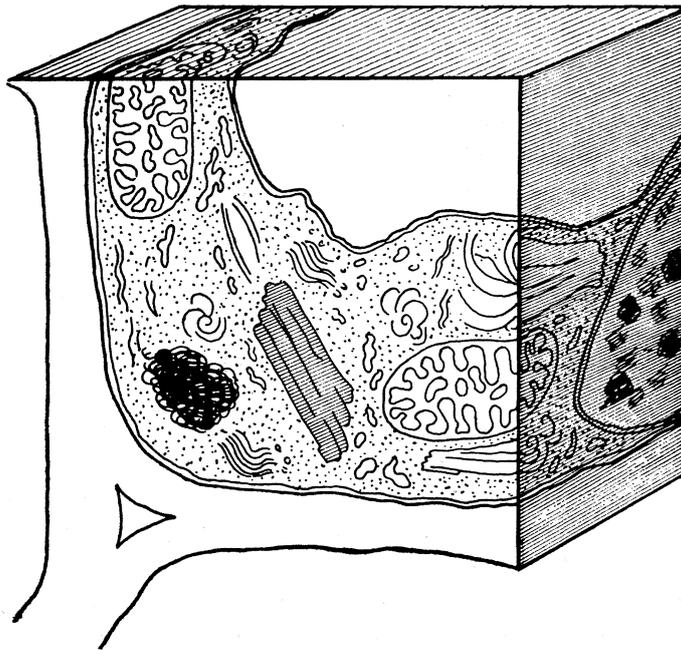


Figura 11

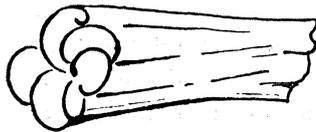


Figura 12



Figura 13

naturaleza de estas inclusiones, en este caso, es difícil de establecer: en las plantas han sido observados al microscopio electrónico numerosos tipos de inclusiones producidas por virus; en algunas de ellas, como en el virus Mosaico del tabaco o virus del *Amaranthus* (9), es posible el ver las partículas individuales del virus formando las inclusiones. También en otro tipo de virosis, como es el virus «severe etch»,

las inclusiones intranucleares en forma cristalina se ha visto que están formadas por partículas de virus (8), así como las formadas en el citoplasma y que también forman rosetas más irregulares que las del virus que estudiamos aquí. Sin embargo, en virus que forman este tipo de rosetas como el virus del pimiento, el virus «red clover vein» (6), el «grey disease», del narciso (1) y el «wheat streak mosaic» (4); aunque se sabe que el virus que causa la infección tiene partículas en forma de bastoncillos en los tres casos y midiendo en todos ellos $18 \times 650 \text{ m}\mu$ aproximadamente, en las rosetas no se pueden ver dichas partículas, ni tampoco en las inclusiones en forma de placas o planchas finas.

Dada la tendencia de muchos virus a formar agrupaciones cristalinas o paracristalinas es posible que estas inclusiones, que longitudinalmente aparecen como placas y transversalmente como rosetas, estén formadas por partículas de virus, tan íntimamente unidas entre sí que sea difícil su observación directa al microscopio electrónico. En este supuesto, las partículas estarían dispuestas según la *figura 13*.

Cremer y colaboradores, en 1960 (1), presentaron la hipótesis de que las inclusiones formadas por el virus «grey disease», del narciso estarían formadas por una especie de sábana, como una hoja de papel arrugado y plegado de manera irregular. Nuestro trabajo confirma esta hipótesis, aunque es posible que además formen, no una sola hoja o capa, sino varias, partiendo de un punto común, para dar lugar a las rosetas más regulares. En el caso de las inclusiones en anillo, éste estaría formado por la sección transversal de una capa u hoja de forma tubular, como se puede observar en cortes longitudinales ligeramente transversales, dando los típicos aspectos de corte de tubos en pico de flauta, que hemos observado frecuentemente.

RESUMEN

Se ha estudiado la ultraestructura al microscopio electrónico de células de pimiento infectadas con un virus, por medio de secciones ultrafinas seriadas de las hojas infectadas, habiendo podido observarse inclusiones en el citoplasma, producidas por el virus en forma de rosetas, de anillos y de capas irregulares. Se presenta un esquema tridimensional de la manera que estas inclusiones se encuentran en la célula y su posible composición de partículas de virus.

SUMMARY

Virus inclusions in the form of rosettes, rings and mat-shaped or plate-shaped have been found in the cytoplasm of virus infected cells of pepper (*Capsicum annuum*). Serial ultrathin sections of the cells were studied in order to get a tridimensional picture of the inclusions. No inclusions were found in healthy leaves.

BIBLIOGRAFIA

1. CREMER, M. C.; VAN SLOGTEREN, D. H. M., y VAN DER WANT, J. A. 1961. Intracellular virus inclusions in leaves of grey-diseased *Narcissus*. Proc. European Regional Conf. Electron Microscopy Delft 1960, II, 974-77.
2. GOLDIN, M. 1960. Investigation of Tobacco mosaic virus in ultrathin sections. *Virology*, 10, 538-42.
3. KOLEMAINEN, L.; ZECH, H., y VON WETTSTEIN, D. 1965. The structure of cells during Tobacco mosaics virus. *Phytopathology*, 55, 458-61.
4. LEE, P. 1965. Electron microscopy of inclusions associated with Wheat streak mosaic virus. *J. Ultrastruct. Res.*, 359-66.
5. RUBIO-HUERTOS, M. 1962. Light and electron microscopy of inclusion bodies associated with Petunia ringspot virus. *Virology*, 18, 337-42.
6. RUBIO-HUERTOS, M. 1964. Estudio al microscopio óptico y electrónico de un virus aislado de *Pisum sativum*. *Microbiol. Españ.*, 17, 1-14.
7. RUBIO-HUERTOS, M. 1965. Golgi apparatus hypertrophy associated with Petunia ringspot virus infection (Previous communication). *Microbiol. Españ.*, 18, 195-202.
8. RUBIO-HUERTOS, M., y GARCÍA-HIDALGO, F. 1964. Ultrathin section of intranuclear and intracytoplasmic inclusions induced by Severe etch virus. *Virology*, 24, 84-90.
9. RUBIO-HUERTOS, M., y VELA, A. Light and electron microscopy of virus inclusions in *Amaranthus lividus* cells. *Protoplasma*, pendiente de publicación.
10. SHALLA, T. A. 1964. Assembly and aggregation of Tobacco mosaic virus in tomato leaflets. *J. Cell Biol.*, 21, 253-64.

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

IDENTIFICACION DE ESTEROLES EN LA GRASA NEUTRA DEL *CLOSTRIDIUM TETANI* Y SUS FORMAS L FIJAS

por

M. SANTAOLALLA

INTRODUCCION

En trabajos anteriores (7-9), hemos realizado el estudio de los lípidos del *Agrobacterium tumefaciens*, formas normal y L y de la *Erwinia carotovora*, ambos gérmenes gram-negativos y patógenos de plantas. En la forma L del *A. tumefaciens* señalábamos la presencia de esteroides.

Aplicando técnicas idénticas y la cromatografía en capa fina, estudiamos la fracción insaponificable de la grasa neutra de un microorganismo gram-positivo, el *Clostridium tetani* y su forma L fija obtenida por inducción con glicocola.

MATERIALES Y METODOS

Empleamos la forma normal del *Clostridium tetani*, procedente del Instituto IBYS, de Madrid, conservada en este Centro por la Dra. C. González. La forma L fija fue amablemente suministrada por los Dres. C. González y M. Rubio, quienes la obtuvieron a partir del *C. tetani* por inducción con glicocola (2).

Como medio de cultivo usamos el medio VF de Prevot, glucosado; después de unas cuarenta horas en estufa, le añadimos cantidad sufi-

ciente de formol hasta conseguir una concentración del 8 por ciento y a los cinco días, separamos los cuerpos bacterianos por centrifugación, lavándolos a continuación tres veces con agua destilada estéril y secándolos en estufa hasta peso constante.

Extracción y purificación de la grasa

Extraemos la grasa neutra con una mezcla de alcohol absoluto + éter sulfúrico (3:1, v/v). A continuación, la purificamos por tratamiento con éter de petróleo de p. e. 40°-60 °C. Evaporamos el éter a temperatura inferior a 50 °C y pesamos la grasa.

Investigación de esteroides

Separamos los ácidos grasos correspondientes a los glicéridos, y en el insaponificable identificamos los esteroides por los métodos que se indican seguidamente.

Reacción de Liebermann

Consiste en añadir anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado a la disolución clorofórmica del problema; la reacción positiva origina un color rojizo, que va pasando después a tonalidades rosáceas y, finalmente, verdosas.

Cromatografía en capa fina

Como absorbente empleamos silicagel G, y usamos como disolvente, hexano + éter sulfúrico + ácido acético (50:50:2, v/v). Los reveladores usados fueron:

Acido perclórico. Solución al 2 por ciento; después de la pulverización se calentaron las placas a 150 °C durante diez minutos.

Tricloruro de antimonio. Solución a partes iguales, en peso, de tricloruro de antimonio y ácido acético; después de pulverizar, calentamos las placas a 95 °C, durante cinco minutos.

Solución de vainillina al 1 por ciento en ácido fosfórico al 50 por ciento. Después de pulverizar, calentamos las placas a 120 °C, de diez-veinte minutos.

RESULTADOS Y DISCUSION

De la forma normal sin esporas (para lo cual empleamos un cultivo joven, de unas veinticuatro horas, aproximadamente), obtuvimos 15,6 mg de grasa neutra pura, que representan el 0,22 por ciento referido al peso seco de que partimos. A partir de cultivos más viejos, de cuarenta y ocho horas, obtenemos formas normales, juntamente con un 30 a 40 por ciento de formas esporuladas o en comienzo de esporulación; la cantidad de grasa neutra extraída de estos cultivos es de 45,3 mg, equivalentes al 0,60 por ciento. De las formas L obtenemos 54 mg, que representan un 1,09 por ciento.

Estos resultados de porcentajes de grasa obtenidos, coinciden con resultados anteriores encontrados por nosotros (7 y 9) en estudios comparativos de grasas procedentes de formas normales y L del *Agrobacterium tumefaciens*, y también con los hallados por Rebel y colaboradores (4-6) y Nesbitt y Lennars (3), quienes, estudiando comparativamente la grasa de la forma bacilar y L del *Proteus* P 18, encuentran mayor proporción de grasa en la forma L.

El insaponificable de la grasa correspondiente a la forma normal con esporas y el procedente de la forma L dan positiva la reacción de Liebermann.

Por análisis cromatográfico en capa fina, a partir de ambos insaponificables, caracterizamos, revelando con ácido perclórico, dos manchas con Rf. de 0,50 y 0,63, correspondientes a cada uno de ellos; el colesterol que empleamos como tipo dio un Rf de 0,54 e idéntica tonalidad de color. Placas idénticas obtenidas simultáneamente y reveladas con solución de vainillina denotaron también dos manchas con idénticos Rf y del mismo color que la mancha correspondiente al colesterol tipo. Revelando las placas con tricloruro de antimonio aparece una sola mancha de color violeta en cada problema, con el mismo Rf del colesterol tipo.

No pudimos caracterizar esteroides en el insaponificable de la grasa correspondiente a la forma normal sin esporas, aunque hemos de tener en cuenta que operamos con una cantidad de grasa total de 15 mg, tres o cuatro veces inferior a la obtenida de los otros microorganismos.

En trabajos anteriores ya reseñados (7 y 9), estudiando las grasas de la forma L del *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria gram-negativa,

identificábamos el colesterol como fracción de aquélla, cuando eran cultivadas en un medio que lo contenía, no encontrándolo si eran cultivadas en medio sintético exento de este compuesto. Ahora, el análisis del componente graso de la forma L de un microorganismo grampositivo, el *Clostridium tetani*, también nos permite identificar esteroides en su composición, cuando es cultivada en un medio que los contiene; además, los encontramos en la grasa de la forma normal con un determinado porcentaje de formas esporuladas. De los dos esteroides identificados en la grasa de ambos microorganismos, el correspondiente a un Rf de 0,54 coincide en Rf y color producido con los distintos reveladores, con el colesterol empleado como tipo; la otra mancha, con un Rf de 0,63, origina al ser revelada idéntica tonalidad y hasta el momento no ha sido identificada.

Dichos trabajos anteriores coinciden plenamente con los también citados de Rebel y colaboradores (4-6), quienes trabajando con la grasa de la forma L del *Proteus* P18 aislan colesterol, cuando es cultivada en un medio que lo contiene.

Argaman y Razin (1) encuentran colesterol y colesterol esterificado entre los lípidos de diversas especies saprófitas y parásitas del género *Mycoplasma*, y también señalan, como nosotros, que pueden incorporar estos compuestos del medio, pero no sintetizarlos, y ni siquiera en el caso de los ésteres del colesterol, hidrolizarlos, sino que son incorporados como tales ésteres.

RESUMEN

Se identifican dos esteroides, uno de ellos, el colesterol, mediante la reacción de Liebermann y cromatografía en capa fina sobre silicagel G, en la grasa neutra del *Clostridium tetani*, con un 30-40 por ciento de formas esporuladas; y también en las formas L de este microorganismo, obtenidas a partir de la forma normal por inducción con glicocola. Ambos fueron cultivados en un medio que contenía esteroides.

SUMMARY

Two sterols, one of them cholesterol, were identified by thin layer chromatography in the neutral fat of *Clostridium tetani* with a 30-40 per cent of sporulate forms and also in the fixed L forms of this micro-

organism obtained by glycine. Both forms were grown in a medium with steroids.

BIBLIOGRAFIA

1. ARGAMAN, M., y RAZIN, S. 1964. Cholesterol and cholesterol esteres in *Mycoplasma*. J. Gen. Microbiol., 38, 153-68.
2. GONZÁLEZ, C., y RUBIO, M. 1959. Obtención de las formas L de *C. tetani* inducidas por glicocola. Microbiol. Españ., 12, 339-52.
3. NESBITT, J. A., y LENNARZ, W. J. 1965. Comparison of lipids and lipopolysaccharides from the bacillary and L forms of *Proteus* P18. J. Bacteriol., 80, 1.020-25.
4. REBEL, G.; BADER-HIRSCH, A. M., y MANDEL, P. 1963. Recherches sur les lipides des formes L dérivées du *Proteus* P18. I. Presence et absorption du cholesterol. Bull. Soc. Chim. Biol., 45, 1.327-43.
5. REBEL, G.; BADER-HIRSCH, A. M.; SENSEBRENNER, M., y MANDEL, P. 1960. Etude comparée des lipides du bacille *Proteus* et d'une souche stable de formes L qui en dérive. Compt. Rend., 250, 3.516-17.
6. REBEL, G., y MANDEL, P. 1962. Sur la présence de cholesterol dans les formes L dérivées du bacille *Proteus*. Compt. Rend., 255, 2.684-88.
7. SANTAOLALLA, M. 1965. Estudio comparativo del componente graso del *A. tumefaciens* y de sus formas L fijas. I. Aislamiento de las distintas fracciones lipídicas. Microbiol. Españ., 18, 13-21.
8. SANTAOLALLA, M. 1965. Composición química de las paredes de *Erwinia carotovora*. II. Análisis del componente graso. Microbiol. Españ., 18, 227-34.
9. SANTAOLALLA, M. 1966. Estudio comparativo del componente graso del *A. tumefaciens* y sus formas L fijas. II. Variaciones según el medio de cultivo y estudio de los fosfolípidos. Microbiol. Españ., 19, 1-10.

OBSERVACIONES SOBRE CASOS ESPONTANEOS DE TUBERCULOSIS ICTICA

por

D. A. CONROY (*)

INTRODUCCION

En una serie de comunicaciones anteriores (6, 8-9, 11-12 y 17) se ha señalado el hallazgo de enfermedades motivadas por bacterias ácido-resistentes en los peces tropicales de acuario y otros, en la Argentina. Las especies de peces de las cuales se han descrito dichas enfermedades incluyen el neón (*Hyphessobrycon innesi*), los guramis perla y de tres puntos (*Trichogaster leeri* y *T. trichopterus*) y la cinolebia o pez perla argentino (*Cynolebias bellottii*). Otras investigaciones sobre la distribución de la tuberculosis íctica en este país han llevado a su observación en el plati mejicano (*Platypoecilus maculatus*) y en el pez siamés (*Betta splendens*).

Los platis se mantuvieron junto con algunos *Lebistes* (*Lebistes reticulatus*) y peces espadas (*Xiphophorus helleri*) en un acuario comercial, en la ciudad de Mar del Plata (Argentina). Los peces siameses se colocaron en un acuario especial, subdividido en el interior para evitar las actividades agresivas propias de esta especie.

La presente comunicación tiene por objeto el describir los síntomas demostrados por los peces enfermos y presentar una serie de observaciones y conclusiones derivadas de un estudio de los mismos.

(*) Dirección actual: Marine Bacteriology Group, Unilever Research Laboratory, Aberdeen (Escocia).

MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES

1) *Síntomas*

Para evitar, en cuanto sea posible, alguna confusión innecesaria de los síntomas presentados por ambas especies, se describirán por separado.

a) *Platypoecilus maculatus*

Los platis enfermos mostraron un marcado enflaquecimiento del cuerpo, el cual fue en muchos casos acompañado por una pérdida de color y ojos de aspecto «hundido». Algunos de ellos presentaron también pequeñas zonas ulceradas en la cabeza y, o, en el cuerpo. El aspecto característico de esos síntomas se ve en la *figura 1*. Todos los platis así afectados se ubicaban en un rincón del acuario, demostrando la mayoría de ellos una marcada pérdida del apetito.

Uno de los ejemplares recibidos para su examen era una hembra grávida, en la cual se observó al efectuarse la autopsia siete embriones bien desarrollados en el ovario. Estos embriones fueron sacados del cuerpo de la hembra, y se estudiaron con mayor detalle, tal como se indicará a continuación.

b) *Betta splendens*

Se observó un total de cinco machos durante el curso del trabajo, todos ellos con una sintomatología parecida. Hubo una pérdida total del color normal, una lepidortosis bien pronunciada, y en dos casos, una marcada ulceración de la cabeza y de la boca. Las aletas se mantuvieron pegadas al cuerpo, y hubo falta de movimiento.

2) *Métodos diagnósticos*

Un diagnóstico previo de la infección como posible tuberculosis íctica se hizo a base de la sintomatología y del examen de las heces. Los peces se colocaron individualmente en vasos de precipitación, limpios, mantenidos a 25 °C, y se sacó una pequeña cantidad de la materia fecal, mediante una pipeta de Pasteur. Dicho material se trató por el método de concentración de Petroff, centrifugando el depósito a 3.000 r/m, des-

pués de neutralizar y lavar con agua destilada estéril. Posteriormente, los frotis se colorearon por el método aconsejado por Bullock (5) para bacterias ácido-resistentes.

Dos platis (un macho y una hembra) y un pez siamés fueron sacrificados, y se prepararon inmediatamente una serie de frotis de las partes ulceradas. Después de eso, cada pez se mojó con alcohol al 70 por ciento y se flameó ligeramente para destruir la flora bacteriana de la superficie. Seguidamente fueron transferidos cada uno a una cápsula de Petri estéril y se practicó la autopsia. Se prepararon frotis de todos los órganos internos principales, los cuales se colorearon por el método arriba citado.

3) *Aislamiento de bacterias ácido-resistentes*

Después de haberse terminado la autopsia, se trató de aislar en cultivo puro a las bacterias ácido-resistentes a partir de aquellos órganos en los cuales se les había observado. En cada caso se eligió el riñón, el cual fue sometido en su totalidad al método de concentración de Petroff. Después de la digestión y neutralización correspondientes, el material se lavó cuidadosamente con agua destilada estéril a la que se habían agregado unas gotas de alcohol ácido al 1 por ciento.

El total se centrifugó a 3.000 r/m durante quince minutos, después de lo cual se sembró en estría el depósito sobre medio de Lowenstein-Jensen. Los medios se incubaron a la temperatura ambiente (alrededor de 18 °C). En el caso de los peces siameses, se aplicó también el mismo procedimiento con las heces.

Se consideró de interés la investigación de algunas de las propiedades bioquímicas de los organismos aislados, y con este objeto se preparó una cantidad suficiente de tubos con medio mineral sintético de Gordon y Smith (13), conteniendo el carbohidrato en estudio. Los tubos se inocularon por punción a partir de una emulsión acuosa de las bacterias, tomándose las lecturas a los siete, catorce y veintiocho días, respectivamente.

4) *Estudios sobre los embriones de platis*

De especial interés fue el hallazgo de embriones maduros dentro del ovario de la hembra grávida de plati examinado. Al extraerse del ovario, los embriones se lavaron con sumo cuidado con agua destilada

estéril, antes de la conservación de seis de ellos en formol al 4 por ciento. El séptimo ejemplar se maceró entre dos portaobjetos, los cuales se colorearon para determinar si había bacterias ácido-resistentes.

Posteriormente se examinaron con más detalle dos embriones, por lo que hubieron de ser montados en parafina. De cada uno de ellos, se prepararon cortes seriados de un espesor de 3μ , utilizando un embrión para los cortes transversales y el otro para los cortes longitudinales. La técnica de coloración empleada fue la de Kinyoun (4) para bacterias ácido-resistentes en tejidos, y el examen de los preparados, debidamente montados en bálsamo de Canadá, se llevó a cabo con un microscopio Wild M 20, empleando un ocular de 15 aumentos.

5) Estudios quimioterápicos

Habiéndose observado la presencia de bacterias ácido-resistentes tanto en los platis como en los peces siameses, y habiéndose asimismo aislado los organismos en cultivo puro a partir de ambas especies de pez, se procedió al estudio de la acción del sulfato de kanamicina sobre las dos cepas. Se lavó cuidadosamente el cultivo en medio de Lowenstein-Jensen, con agua destilada estéril, se extrajo mediante una pipeta de Pasteur y se colocó en un tubo de hemólisis. Por comparación con una serie de tubos de nefelometría preparados en este laboratorio con cloruro bórico y ácido sulfúrico en solución acuosa al 1 por ciento, respectivamente, se ajustó la concentración de células a alrededor de 500 millones/ml, siendo éstas utilizadas como suspensión patrón de cada organismo.

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo con el medio mineral sintético de Gordon y Smith (13) conteniendo glucosa, de acuerdo con la técnica señalada al respecto por Conroy y Solarolo (10). Se empleó un testigo positivo (inoculado) y otro negativo (no inoculado), efectuándose las lecturas a los siete y catorce días, respectivamente. Los tubos se mantuvieron a 22°C en un baño María «Astell», de temperatura constante.

Al conocerse los resultados de los estudios *in vitro*, se hizo un ensayo con el objeto de aplicarlos *in vivo*. Se creyó que podría obtenerse un juicio más exacto de la acción del antibiótico aplicándolo en condiciones de uso corriente, más que en condiciones de laboratorio. Se idearon, por lo tanto, dos fórmulas experimentales, Alimento experimen-

tal A y Alimento experimental B, respectivamente. La composición de estos alimentos se detalla a continuación:

	Porcentaje
Alimento experimental A	
Harina de maíz (Maizena)	10,00
Levadura en polvo (Zimasa)	40,00
Arroz en polvo	20,00
Leche en polvo (Nestlé)	9,99
Agar agar (Difco)	10,00
«Farex» (Glaxb)	10,00
Sulfato de kanamicina (Bristol Laboratories Inc.)	0,01
	100,00
Alimento experimental B	
Levadura en polvo (Zimasa)	50,00
Hígado en polvo (Difco)	30,00
Leche en polvo (Nestlé)	19,99
Sulfato de kanamicina (Bristol Laboratories Inc.)	0,01
	100,00

Los componentes se mezclaron en un mortero, y los alimentos preparados, conservados en frascos cerrados herméticamente.

Durante el curso de los estudios *in vivo*, los peces de ensayo fueron aquellos de donde se habían obtenido los ejemplares enfermos originales. Se empleó un total de diez platis y cuatro peces siameses, todos los cuales mostraron una sintomatología típica de la enfermedad, tal como se ha señalado arriba. Los platis se colocaron en un acuario limpio conteniendo 10 l de agua, mientras los peces siameses se introdujeron en otro igual con 5 l de agua, el cual fue subdividido interiormente mediante placas de vidrio. El sistema empleado fue el de suministrar el alimento un día sí y otro no, alternando con larvas de mosquito y *Artemia* sp. Todos los peces fueron privados de alimento durante un período de tres días antes de comenzar el experimento. Después de haberse suministrado el alimento experimental cinco veces con-

secutivas, se prosiguió con alimento normal hasta completar treinta días. Se efectuaron exámenes muy cuidadosos del aspecto general de los peces y de frotis de las heces, para detectar la presencia de bacterias ácido-resistentes. La dosis del sulfato de kanamicina se calculó a base de la suposición de que si no fuera aceptado el alimento por los peces, la cantidad de antibiótico alcanzaría en el agua una concentración de 100 γ /ml, aproximadamente. Se consideró de gran importancia la observación de que en el ser humano, la kanamicina se libera rápidamente por vía renal. Por lo tanto, para evitar en todo lo posible un estímulo artificial de la actividad renal en los peces por un alto contenido proteico, el Alimento experimental A se calculó de manera que tuviera un contenido muy reducido de proteínas y un porcentaje mayor de carbohidratos para inhibir la proteólisis durante los primeros pasos de la digestión en el pez. Sin embargo, se observó que mientras fue aceptado por los platis, no inspiró gran interés en los peces siameses, razón por la cual tuvo que substituirse en estos peces por el Alimento experimental B a partir de la primera toma.

RESULTADOS

a) *Platypoecilus maculatus*

Se observaron bacterias ácido-resistentes en frotis de la úlcera externa (*figura 2*), de las heces, del hígado (*figura 3*) y del riñón y ovario de la hembra grávida (*figura 4*).

b) *Betta splendens*

Fueron detectadas bacterias ácido-resistentes en frotis de la úlcera de la cabeza (*figura 5*), del riñón (*figura 6*) y de las heces (*figura 7*). La presencia de dichas bacterias en las heces, tanto de los platis como de los peces siameses, fue estrechamente asociada en una sintomatología típica de la tuberculosis íctica.

Organismos aislados

Se aislaron en cultivo puro bacterias ácido-resistentes de los platis y de los peces siameses, siendo designados los organismos Cepa M/A-4 y Cepa M/A-5, respectivamente.



Figura 1. Platypoecilus maculatus. Aspecto de un macho adulto con síntomas de la tuberculosis

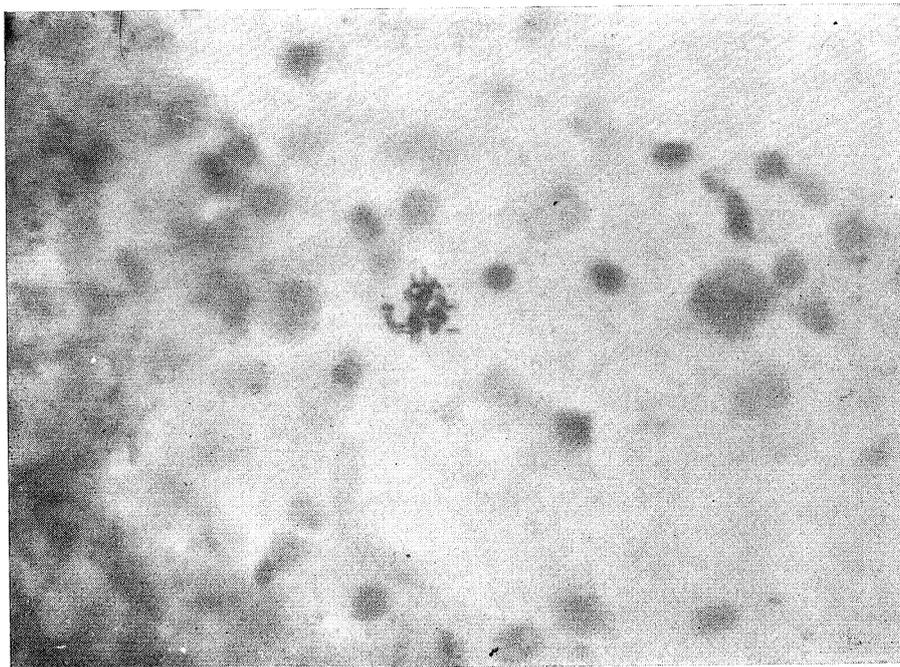


Figura 2. P. maculatus. Frotis de la úlcera cefálica, con grupo de bacterias ácido-resistentes. × 1.000

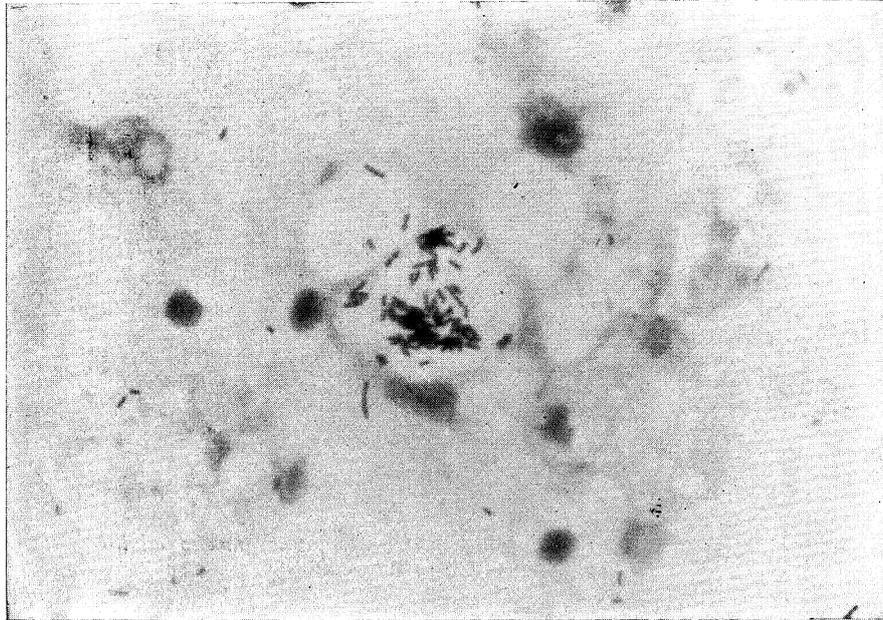


Figura 3. P. maculatus. Frotis del hígado con grupo de bacterias ácido - resistentes. × 1.000

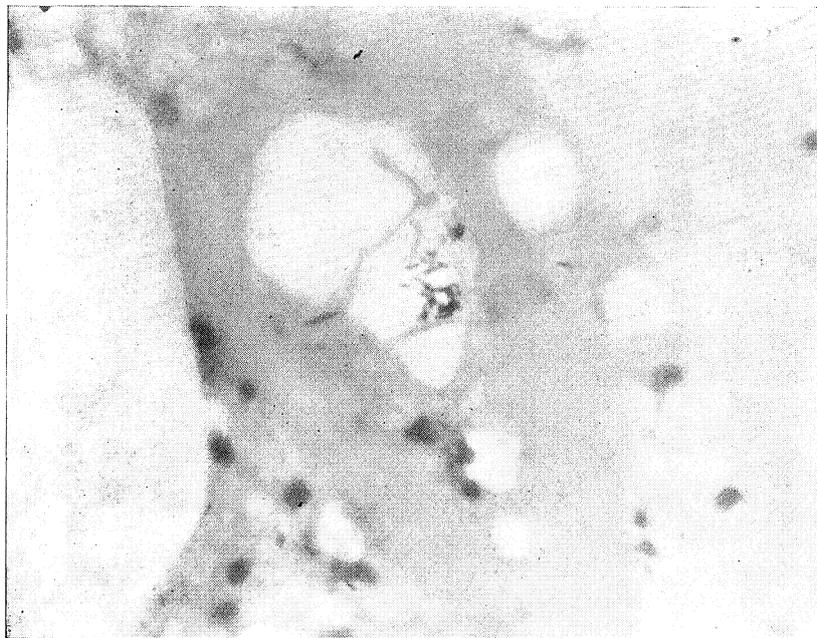


Figura 4. P. maculatus. Frotis del ovario de la hembra grávida, con grupos de bacterias ácido-resistentes. × 1.000

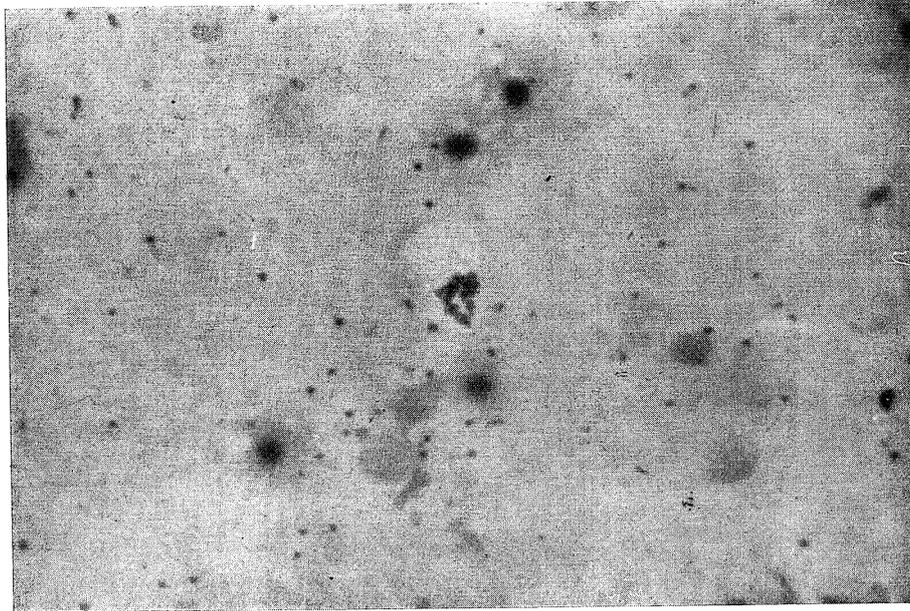


Figura 5. Betta splendens. Frotis de la úlcera cefálica, con numerosas bacterias ácido-resistentes. × 1.000

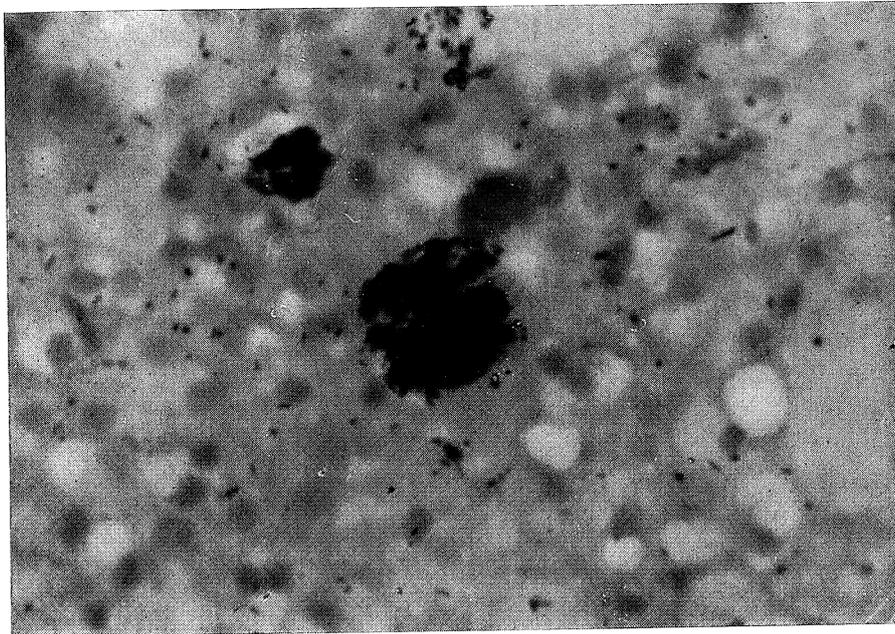


Figura 6. B. splendens. Frotis del riñón, con varios grupos de bacterias ácido-resistentes. × 1.000



Figura 7. B. splendens. Frctis de las heces de un ejemplar enfermo, con numerosas bacterias ácido-resistentes. × 1.000

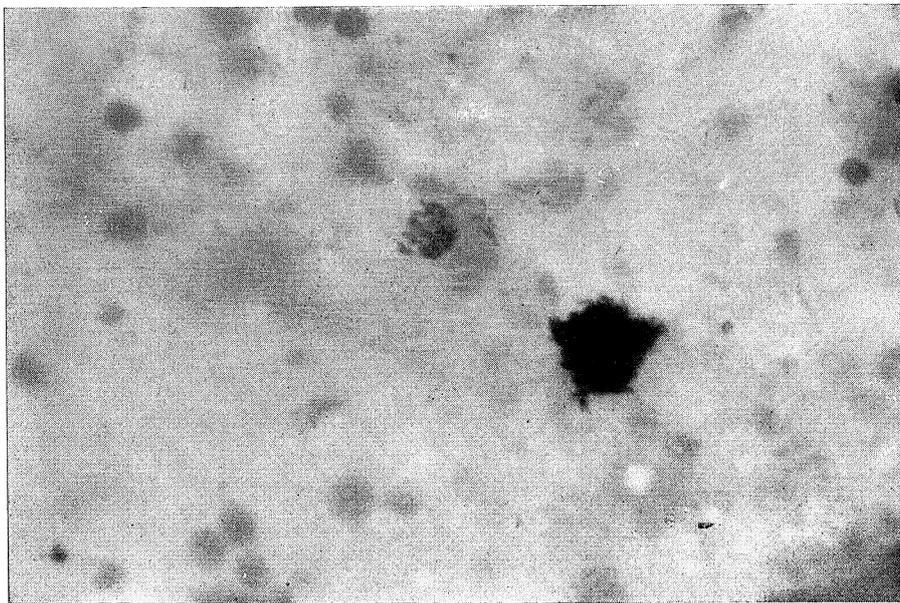


Figura 8. P. maculatus. Macerado del embrión prenatal, con grupos de bacterias ácido-resistentes. La foto corresponde al cuerpo. × 1.000

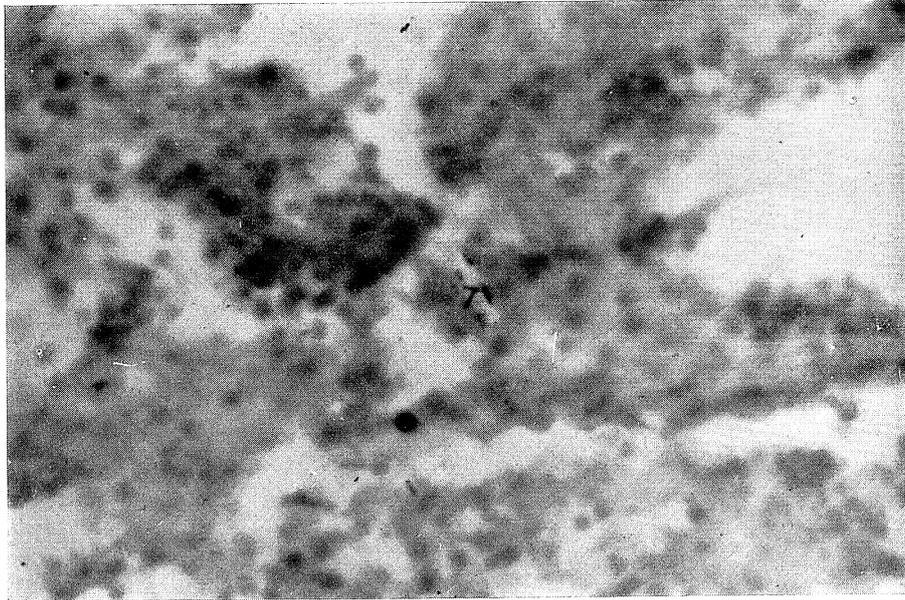


Figura 9. P. maculatus. Corte longitudinal del embrión prenatal, con grupo de bacterias ácido-resistentes en la región esofágica. × 1.000

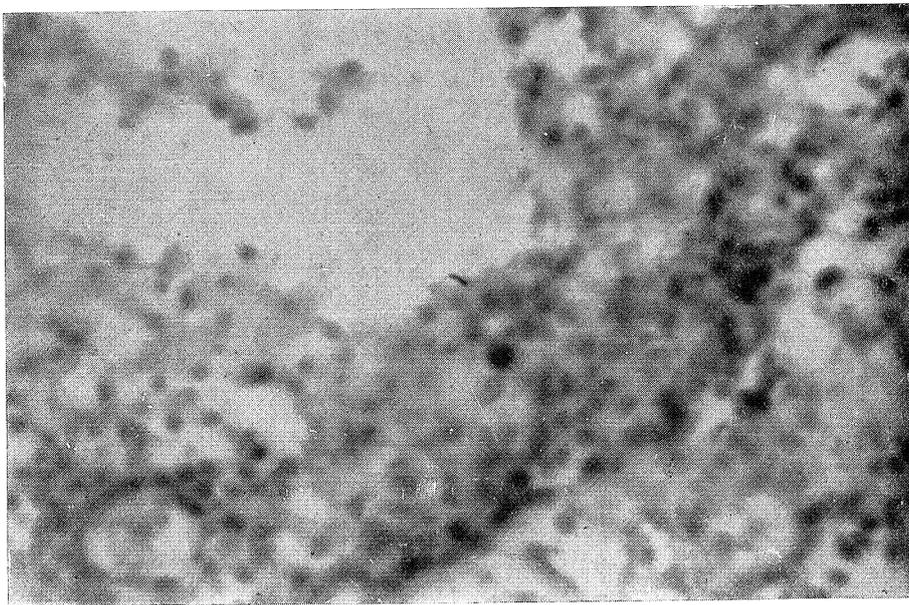


Figura 10. P. maculatus. Corte longitudinal del embrión prenatal, con una sola bacteria ácido-resistente en la región esofágica. × 1.000

La Cepa M/A-4 tardó en desarrollarse en las primeras resiembras, dando lugar a una pigmentación amarillento-cremosa en el medio de Lowenstein-Jensen. En los cultivos viejos sobre el mismo medio se observa una pigmentación más oscura. La forma de la colonia es lisa y al principio, tiene aspecto de una cabeza de alfiler. Inicialmente tardó cinco semanas en desarrollarse, pero después de varias resiembras se observa desarrollo a partir de los diez o doce días.

La Cepa M/A-5 dio lugar a un tipo de desarrollo mucho más rugoso, parecido al del *Mycobacterium bovis*. Se produce una fuerte pigmentación amarillo-anaranjada, tanto en la presencia como en ausencia de luz. Las colonias son sumamente tenaces y es difícil emulsionar el organismo en un vehículo acuoso.

Se detallan algunas de las reacciones bioquímicas de estos dos organismos en el *cuadro 1*, y se están llevando a cabo en la actualidad estudios intensivos con el objeto de establecer con mayor precisión la identificación taxonómica de los mismos.

Estudio de los embriones

Los embriones del plati demostraron la presencia de bacterias ácido-resistentes al examinarse microscópicamente. En el embrión que se maceró entre dos portaobjetos, se observaron varios grupos de estas bacterias (*figura 8*).

Un examen minucioso de los cortes transversales de un embrión no reveló la presencia de dichas bacterias dentro del cuerpo mismo, aunque algunas fueron observadas en la superficie externa protegidas por pequeñas arrugas epidérmicas. Sin embargo, con respecto a los cortes longitudinales, es de gran interés señalar la observación de bacterias ácido-resistentes en los tejidos del cuerpo, a veces en forma de pequeños grupos, a veces, solas (*figuras 9-10*). Mediante la preparación de cortes seriados, es posible establecer muy aproximadamente que la región en la cual se encontraron dichas bacterias estaba a una profundidad de 150-200 μ con respecto a la superficie dorsal. Es de pensar que la localización de las bacterias (*figuras 9-10*) corresponde a la región faringo-esofágica. El estudio óptico de la zona muestra que los organismos estaban situados dentro de los tejidos embrionarios.

Cuadro 1

Microorganismo Carbohidrato	Cepa M/A — 4	Cepa M/A — 5
Glucosa	+ (siete días)	+ (siete días)
Lactosa	—	—
Manitol	—	—
Maltosa	—	+ (siete días)
Sacarosa	—	—
Arabinosa	—	—
L-xilosa	—	—
Galactosa	—	—
D-levulosa	—	—
Glicerol	—	—
Dulcitol	—	—
Inulina	—	—
Almidón	—	—

+ = positivo (ácido). — = negativo.

Estudios quimioterápicos

Las cepas M/A-4 y M/A-5 demostraron poseer *in vitro* una concentración inhibitoria mínima de 1,6 γ /ml y 50 γ /ml, respectivamente, con el sulfato de kanamicina. Los resultados de los estudios *in vivo* con este antibiótico se detallan en el cuadro 2.

De todos los peces tratados con kanamicina, solamente uno se perdió: un pez siamés que antes del tratamiento había presentado una sintomatología tan marcada que dio lugar a dudas de que el pez pudiera ser trasladado de un acuario a otro. No obstante, al morir, el mismo pez había recuperado su coloración normal, y asimismo habían desaparecido por completo los síntomas de lepidortosis. Se presentaron señales de ulceración cefálica, y las manifestaciones clínicas de la tuberculosis íctica estuvieron ausentes. Al efectuarse la autopsia, se observó que el riñón estaba casi destruido, por cuya razón se supuso que la infección pudiera estar tan avanzada al iniciarse el tratamiento como para no permitir la curación completa del pez. Se prepararon frotis

Cuadro 2

Días de tratamiento	Síntomas		Heces	
	<i>P. maculatus</i>	<i>B. splendens</i>	<i>P. maculatus</i>	<i>B. splendens</i>
1	Ti típica	Ti típica	Muchas bacterias ácido-resistentes	
2	Ti típica	Ti típica	Muchas bacterias ácido-resistentes	
3	Mejoría	Mayor actividad	Muy pocas bacterias ácido-resistentes	
4	Mejor aspecto	Gran mejoría en tres peces	No se observaron bacterias ácido-resistentes	
5	Todos los peces, bien	Tres peces, bien; uno, decaído	No se observaron bacterias ácido-resistentes	
6	Todos los peces, bien	Tres peces, bien; uno, muerto	No se observaron bacterias ácido-resistentes	
7	Todos los peces, bien	Tres peces, bien	No se observaron bacterias ácido-resistentes	
8	Todos los peces, bien	Todos los peces, bien	No se observaron bacterias ácido-resistentes	
9	Todos los peces, bien	Todos los peces, bien	No se observaron bacterias ácido-resistentes	
10	Todos los peces, bien	Todos los peces, bien	No se observaron bacterias ácido-resistentes	
20	Todos los peces, normales		No se observaron bacterias ácido-resistentes	
30	Todos los peces, normales		No se observaron bacterias ácido-resistentes	
60	Todos los peces, normales		No se observaron bacterias ácido-resistentes	

Ti = tuberculosis íctica.

de todos los órganos internos (incluso el riñón) y debe hacerse constar que no se observó ninguna bacteria ácido-resistente en ellos.

Los demás peces volvieron a un estado de salud completamente normal, siendo interesante anotar que los platis tratados han mostrado fecundación y cría normales. No se presentó señal alguna de efecto adverso o tóxico motivado por el sulfato de kanamicina.

DISCUSION

Las observaciones aquí expuestas de nuevos casos espontáneos de la tuberculosis íctica en la Argentina son de interés por dos razones principales. La primera de ellas es que tanto los platis como los peces siameses se habían criado desde hacía varias generaciones en el país y, por lo tanto, se puede eliminar la posibilidad de una accidental y previa «importación» de la enfermedad desde el extranjero. La segunda razón es que por esta causa puede suponerse que la enfermedad es endémica en la zona de la Provincia de Buenos Aires, hecho confirmado posteriormente por el hallazgo de casos de tuberculosis íctica en la cinolebia (*Cynolebias bellottii*), especie indígena de las aguas de dicha provincia, y el aislamiento de un organismo ácido-resistente a partir de ejemplares de la misma (9).

La sintomatología presentada por los platis enfermos se asemeja estrechamente a la descrita para la misma especie por Baker y Hagan (2) y Besse (3). Los primeros de estos investigadores observaron que los platis estaban enflaquecidos y con poco color. Algunos de ellos poseían una ulceración en la cabeza y en el cuerpo. Se observaron bacterias ácido-resistentes al hacer frotis de las úlceras y de los órganos internos, obteniéndose el organismo en cultivo puro e identificándose como *Mycobacterium platypoecilis*. Besse consideró que los síntomas clínicos de la tuberculosis en miembros de la familia Poeciliidae fueron lo suficientemente característicos como para constituir una variedad de la enfermedad, a la que denominó «marasmo». También observó que los animales sufrieron un enflaquecimiento progresivo y pérdida de apetito.

En el caso de los peces siameses, los síntomas son también parecidos a los descritos por Besse (3) para la misma especie, salvo que el autor de este trabajo no observó las manifestaciones ascíticas señaladas por aquél.

Las dos cepas de bacterias aisladas se están estudiando con mayor detalle en la actualidad y es de esperar que los resultados podrán ser objeto de una futura comunicación.

En la presente investigación se ha dado especial importancia a la observación de bacterias ácido-resistentes en las heces de los platis y de los peces siameses y a la presencia de una sintomatología típica

de la enfermedad en los peces infectados. El número de dichas bacterias parece estar relacionado con el progreso de la infección, por cuya razón el autor piensa que un examen sistemático de las heces puede utilizarse para el diagnóstico previo de casos de tuberculosis íctica. Aunque puede argumentarse que tal examen no permite distinguir entre micobacterias patógenas y saprofitas, en la experiencia del autor durante los últimos cuatro años, ha constituido un método muy digno de confianza, no solamente porque no requiere el sacrificio del pez, sino también porque permite diagnosticar la enfermedad aún cuando no se observan síntomas clínicos bien marcados. En los casos en los que las micobacterias son escasas, puede aplicarse la técnica de Schaub y colaboradores (16), en la que las heces son emulsionadas con agua destilada estéril (1 : 4 ó 1 : 6), y se agrega suficiente cloruro sódico como para hacer una solución saturada. Después de dejar reposar durante unos treinta minutos, se separa la capa de bacterias que se ha formado en la superficie, y se procede según el método de concentración de Petroff, indicado anteriormente. Una técnica como ésta es de gran interés en los casos en que es necesario mantener en cuarentena a los peces, como, por ejemplo, en los jardines zoológicos y acuarios públicos.

Debe tenerse en cuenta también que Baker y Hagan (2) demostraron que el plati es una especie que puede infectarse fácilmente con *Mycobacterium platypoecilis*, cuando se administran cultivos de la bacteria *per os*. Por esta razón es importante tomar en consideración la posibilidad de una infección continua de los peces sanos por uno o más portadores *aparentemente* sanos, cuyas heces pueden transmitir el patógeno. Al buscar alimento en el fondo, hay buenas oportunidades para que los peces sanos puedan ingerir material contaminado por las bacterias ácido-resistentes evacuadas de los intestinos de los portadores aparentemente sanos y de individuos enfermos de una tuberculosis crónica y asintomática. Un procedimiento sencillo como el señalado aquí sería de gran valor para el mantenimiento de una vigilancia sanitaria de los peces, tanto desde el punto de vista profiláctico como del terapéutico. Además, para los organismos estatales interesados en el comercio internacional de peces podría ser una técnica de fácil aplicación en la determinación de la salubridad de las partidas de peces vivos.

Quizás uno de los aspectos más interesantes de este trabajo es la observación de bacterias ácido-resistentes en los embriones de platis

antes de nacer. Este hallazgo se destaca especialmente en relación con la sugerencia formulada por Nigrelli y Vogel (15) en cuanto a la posibilidad de la transmisión transovárica de la tuberculosis íctica en los pecílidos, como *Lebistes* sp. y *Platypoecilus* sp. En los pecílidos, el desarrollo del embrión tiene lugar dentro del ovario hasta que ocurre la partición. El plati es una especie que posee un desarrollo intrafolicular, y los intercambios respiratorios y nutritivos se producen dentro del espacio ovárico. Mientras el ovario está sujeto a poca modificación por sí mismo, la pared folicular está altamente vascularizada y en estrecha asociación con el saco pericárdico del embrión (14). Como se ha dicho previamente, la situación de las micobacterias en el embrión parece ser la región faringo-esofágica y por lo tanto es probable que la infección se haya originado por el líquido intraovárico contaminado en el ovario materno. Los resultados obtenidos hasta el presente indican que es ésta una fuerte probabilidad.

Otro hecho interesante es que se obtuvieron excelentes resultados en el tratamiento de la tuberculosis íctica mediante la aplicación por vía bucal del sulfato de kanamicina. Hay poca información disponible sobre la sensibilidad *in vitro* e *in vivo* a los antibióticos, de las micobacterias de origen íctico, si bien Conroy y Solarolo (10) demostraron en un estudio experimental que varias cepas de micobacterias ictiopatógenas fueron inhibidas por la acción del sulfato de kanamicina. Debido a esta carencia de datos al respecto, la mayoría de los métodos destinados al tratamiento de la tuberculosis en los peces se basan sobre consideraciones profilácticas más que terapéuticas (1). Los resultados aquí expuestos se obtuvieron mediante el empleo de dos alimentos experimentales y tuvieron por objeto determinar principalmente si la concentración del antibiótico era suficiente como para controlar la infección, así como también restablecer la salud de los peces. Hace falta una sola clase de alimento que sea aceptable totalmente para diversas variedades de peces tropicales y asimismo para peces de agua fría; es posible que cuando se obtengan más datos sobre la sensibilidad a la kanamicina de las micobacterias aisladas de peces, incluso podrá tratarse la enfermedad mediante un baño de antibiótico. No obstante estas consideraciones teóricas, debe destacarse el hecho de que el sulfato de kanamicina se ha mostrado sumamente capaz de curar casos espontáneos de la tuberculosis íctica, como se ha demostrado anteriormente con algunas otras enfermedades de los peces, de origen bacteriano (7).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo constituye una contribución al estudio de las enfermedades bacterianas de los peces, de acuerdo con los términos de un contrato entre el autor y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

El autor desea expresar su gratitud al Dr. Leo H. Dickison (Bristol Laboratories Inc., Syracuse, Estados Unidos de América del Norte) por el sulfato de kanamicina, la gelatina, el agar-agar, y otros productos empleados en este estudio; a los señores de Fraquelli (Tropiquarium S. R. L., Mar del Plata, Argentina) por su amable colaboración en los ensayos experimentales con los alimentos; y al señor J. L. Rodríguez, de la Fundación Hematológica, de Mar del Plata, por su valiosa ayuda técnica y por las fotografías que figuran en el texto.

RESUMEN

Se describen casos espontáneos de tuberculosis íctica observados en ejemplares de plati mejicano (*Platypoecilus maculatus*) y pez siamés (*Betta splendens*) criados desde hace varias generaciones en un establecimiento piscícola de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). Dos cepas de bacterias ácido-resistentes fueron aisladas de dichos peces, designándose M/A-4 (plati) y M/A-5 (pez siamés), respectivamente. Se comprobó que los organismos fueron sensibles *in vitro* a la acción del sulfato de kanamicina, y pudo tratarse *in vivo* la enfermedad en ambas especies de peces mediante la aplicación de un alimento que contiene dicho antibiótico. Se describe, además, una sencilla técnica diagnóstica de la enfermedad basada en el examen de frotis coloreados de las heces para comprobar la presencia o no de micobacterias, aun en casos en los que no se observan síntomas clínicos. Asimismo se considera que la tuberculosis de los peces es una enfermedad endémica en la Provincia de Buenos Aires. En el caso de los platis mejicanos, pudo observarse la presencia de bacterias ácido-resistentes en cortes longitudinales de embriones próximos a nacer, encontrándose bacterias en la región faringo-esofágica del embrión. Este último hallazgo está considerado desde el punto de vista de la teoría de la transmisión transovárica de la tuberculosis íctica en los peces vivíparos.

SUMMARY

A description is given of spontaneous cases of piscine tuberculosis observed in the Mexican platyfish (*Platypoecilus maculatus*) and Siamese fighting fish (*Betta splendens*), specimens of which had been raised through several successive generations at a piscicultural establishment in the Province of Buenos Aires, Argentina. Two strains of acid-fast bacteria were isolated from these fish, being designated strain M/A-4 (platy) and strain M/A-5 (Siamese fighting fish) respectively. It was shown that these bacteria were sensitive *in vitro* to the action of kanamycin sulphate, and the disease was successfully treated in both species by means of a feed containing the antibiotic. Furthermore, a simple diagnostic technique is described by means of which the presence or absence of acid-fast bacteria in the faeces may be determined, even in the absence of clinical symptoms of the disease. It is also considered that piscine tuberculosis is a disease endemic to the Province of Buenos Aires. In the case of the Mexican platys, the presence of acid-fast bacteria was observed in longitudinal sections of embryos prior to their birth, the bacteria being seen in the pharyngo-oesophageal region of the body of the embryo. This latter finding is considered from the point of view of the theory of transovarian transmission of piscine tuberculosis in viviparous fishes.

BIBLIOGRAFIA

1. AMLACHER, E. (traductor: D. Jordano). 1964. Manual de enfermedades de los peces, 115, Editorial Acribia, Zaragoza.
2. BAKER, J. A., y HAGAN, W. A. 1942. Tuberculosis of the Mexican platyfish (*Platypoecilus maculatus*). J. Infect. Diseases, 70, 248.
3. BESSE, P. 1952. La tuberculose des poissons. Bull. Franç. Pisciculture, 164, 99.
4. BRAY, W. E. 1942. Métodos bioquímicos de laboratorio, 409, UTEHA, México.
5. BULLOCK, G. L. 1961. A schematic outline for the presumptive identification of bacterial diseases of fish. Progressive Fish Culturist, 23, 147.
6. CONROY, D. A. 1963. The study of a tuberculosis-like condition in neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*). I. Symptoms of the disease and preliminary description of the organism isolated. Microbiol. Españ., 16, 47.
7. CONROY, D. A. 1963. Studies on the application of kanamycin to the control and treatment of some bacterial fish diseases. J. Appl. Bacteriol., 26, 182.

8. CONROY, D. A. 1964. Nocardiosis as a disease of tropical fish. *Vet. Record*, 26, 182.
9. CONROY, D. A. 1965. Tuberculosis in pearl fish. *Aquarium J.*, 36, 22.
10. CONROY, D. A., y SOLAROLO, E. B. 1965. Sensitivity of some acid-fast bacteria of piscine origin to certain chemotherapeutic substances. *J. Fisheries Res. Board Can.*, 22, 243.
11. CONROY, D. A., y VALDÉZ, I. E. 1962. Un caso de tuberculosis en peces tropicales. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 5, 9.
12. CONROY, D. A., y VALDÉZ, I. E. 1964. Una contribución al estudio de la tuberculosis pisciaria. *Gac. Vet.*, 26, 169.
13. GORDON, R. E., y SMITH, M. M. 1953. Rapidly growing acid-fast bacteria. I. Species description of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *J. Bacteriol.*, 66, 41.
14. HOAR, W. 1957. Gonads and reproduction. En M. E. BROWN. *The physiology of fishes*, 1, 315. Academic Press Inc., Nueva York.
15. NIGRELLI, R. F., y VOGEL, H. 1963. Spontaneous tuberculosis in fishes and other cold-blooded vertebrates, with special reference to *Mycobacterium fortuitum* Cruz from fish and human lesions. *Zoologica*, 48, 181.
16. SCHAUB, I. G.; FOLEY, M. K.; SCOTT, E. G., y BAILEY, W. R. 1958. *Diagnostic bacteriology*, 103, 5.^a edición. Henry Kimpton, Londres.
17. VALDÉZ, I. E., y CONROY, D. A. 1963. The study of a tuberculosis-like condition in neon tetras (*Hyphessobrycon innesi*). II. Characteristics of the bacterium isolated. *Microbiol. Españ.*, 16, 249.

UNA NOTA REFERENTE A LAS REACCIONES DEL *MYCOBACTERIUM ANABANTI* FRENTE A LOS CARBOHIDRATOS

por

D. A. CONROY (*), I. E. VALDEZ (**) y A. J. ROSS (***)

Mycobacterium anabanti es una bacteria ácido-resistente que fue aislada por Besse (1) a partir de una epizootia de tuberculosis que se presentó en el pez paraíso (*Macropodus opercularis*). Sin embargo, esta designación específica jamás fue aceptada como término válido por el manual de Bergey, y salvo los caracteres del organismo en diferentes medios de cultivo, dados en el trabajo citado de Besse, parece que no existen datos sobre las demás reacciones de la bacteria. Por esta razón, los autores han llevado a cabo en forma independiente un estudio sobre las reacciones de *My. anabanti* frente a diversos carbohidratos, los resultados del cual se incluyen en la presente nota.

Se empleó un sub-cultivo de la cepa original aislada por Besse, manteniéndola en el laboratorio mediante resiembras regulares en el medio de Löwenstein-Jensen. Los estudios con los carbohidratos se realizaron de acuerdo con la técnica descrita por Gordon y Smith (4), utilizando el medio mineral sintético propuesto por estos investigadores, prepa-

(*) Dirección actual: Marine Bacteriology Group, Unilever Research Laboratory, Aberdeen (Escocia).

(**) Cátedra de Microbiología Especial, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Buenos Aires. Buenos Aires (Argentina).

(***) Western Fish Disease Laboratory, U. S. Department of the Interior, Seattle (Estados Unidos de América del Norte).

rado según la fórmula original. Los resultados obtenidos por cada uno de los autores de esta nota se detallan en el *cuadro 1*.

Es de interés notar que las reacciones dadas por *Mycobacterium anabanti* se diferencian algo de las de algunas otras cepas de bacterias ácido-resistentes aisladas a partir de peces anabántidos, en la Argentina.

De esta manera, la Cepa M/A-2 aislada de una epizootia de la tuberculosis íctica en el gurami de tres puntos y el gurami perla (*Trichogaster trichopterus* y *T. leeri*), produce ácido exclusivamente a partir de la dextrosa (3). Asimismo, la Cepa M/A-5 aislada del pez siamés (*Betta splendens*) forma ácido solamente a partir de la dextrosa y de la maltosa, y no de los demás carbohidratos (2).

Como conclusión de la investigación aquí detallada, se supone que debe existir una gran variación metabólica entre las cepas de bacterias ácido-resistentes asociadas con casos de la tuberculosis en los diferentes

Cuadro 1

Carbohidrato	Conroy	Valdéz	Ross
Dextrosa	A	A	A
Manosa	(—)	A	—
Trehalosa	(—)	(—)	A
Levulosa	A	A	A
Manitol	A	A	A
Xilosa	—	(—)	—
Sorbitol	—	—	—
Sacarosa	—	—	—
Ramnosa	—	—	—
Dulcitol	—	—	—
Arabinosa	—	—	—
Galactosa	—	—	—
Rafinosa	(—)	—	—
Inositol	—	—	—
Lactosa	—	—	—
Maltosa	A	A	A

A = ácido sin gas. — = negativo. (—) = reacción no estudiada.

peces anabántidos, y que dichos organismos no se asemejan necesariamente a *Mycobacterium anabanti* en cuanto a sus reacciones frente a los carbohidratos. Dado que el mismo *My. anabanti* se aisló de una sola especie de pez perteneciente a la familia Anabantidae, dicha observación es de tener muy en cuenta a los efectos de evitar confusiones taxonómicas derivadas del aislamiento de micobacterias a partir de otros peces de la misma familia.

RESUMEN

Se describen las reacciones de *Mycobacterium anabanti* frente a diferentes carbohidratos, observándose que el organismo produce ácido a partir de dextrosa, manosa, trehalosa, levulosa, maltosa y manitol. Estos resultados se presentan a los efectos de brindar una descripción más completa de la bacteria en estudio.

SUMMARY

The reactions of *Mycobacterium anabanti* with various carbohydrates are described, and it was observed that the organism produced acid from dextrose, mannose, trehalose, laevulose, maltose and mannitol. These results are published with the object of offering a more complete description of the bacterium under study.

BIBLIOGRAFIA

1. BESSE, P. 1949. Epizootie à bacilles acido-résistants chez des poissons exotiques. Bul. Acad. Vét. France, 23, 151.
2. CONROY, D. A. 1966. Observaciones sobre casos espontáneos de la tuberculosis íctica. Microbiol. Españ., 19, 93.
3. CONROY, D. A., y VALDÉZ, I. E. 1964. Una contribución al estudio de la tuberculosis pisciaria. Gac. Vet., 26, 169.
4. GORDON, R. E., y SMITH, M. M. 1953. Rapidly growing acid-fast bacteria. I. Species description of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. J. Bacteriol., 66, 41.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA Y MICROBIOLOGIA

RESISTENCIA TERMICA DE LACTOBACILOS Y LEVADURAS. II

por

M. J. FERNANDEZ-DIEZ y F. GONZALEZ-CANCHO

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (1) se realizó un estudio preliminar sobre la resistencia térmica de lactobacilos y levaduras. En él se determinaron las líneas de supervivencia, en primera aproximación, para 4 cepas diferentes de *Lactobacillus plantarum* y 17 especies de levaduras, aisladas de salmueras de aceitunas fermentadas, definiéndose los parámetros fundamentales U , $P_{.56}$ y Z , para cada una de ellas.

Según se puede observar en dicho trabajo, existe una gran diferencia de valores en la termorresistencia de los distintos géneros y especies. De ellos se deduce la necesidad de realizar investigaciones más completas, antes de emplear la pasterización como medio de conservación en aquellos productos en que se desarrollan dichos microorganismos.

En consecuencia y por ser de indudable utilidad, se ha continuado con el estudio de la resistencia térmica de aquellas especies de levaduras que por encontrarse con relativa frecuencia se consideran como más representativas en dicho producto fermentado.

En esta comunicación se dan los resultados obtenidos con 21 especies de levaduras aisladas de aceitunas aderezadas de diferentes variedades, campañas y fases de fermentación. Finalmente, para una mejor comparación, se incluyen en un resumen todos los datos experimentales correspondientes a todas las especies estudiadas.

PARTE EXPERIMENTAL

A) *Materiales y métodos*

En este estudio se han empleado las siguientes especies de levaduras:

Candida guilliermondi
C. melibiosi
C. melinii
C. pelliculosa
C. solani
C. zeylanoides
Cryptococcus diffluens
Cr. neoformans
Debaryomyces kloeckeri
Hansenula schneggii
Pichia membranaefaciens
Saccharomyces bisporus
Sacch. heterogenicus
Sacch. rosei
Torulopsis colliculosa
T. dattila
T. famata
T. glabrata
T. sphaerica
T. stellata
T. versatilis

La sistemática se ha seguido según el tratado de Lodder (2).

Los métodos de trabajo (medio de cultivo, pH del mismo, técnica de pasterización, construcción de líneas de supervivencia y estimación de los parámetros fundamentales) son los mismos utilizados en la comunicación anterior (1).

B) *Resultados*

En las figuras 1-7 damos los resultados obtenidos con las diferentes especies que se citan anteriormente. En abscisas (escala aritmética) se representan las temperaturas de pasterización en grados centígrados y

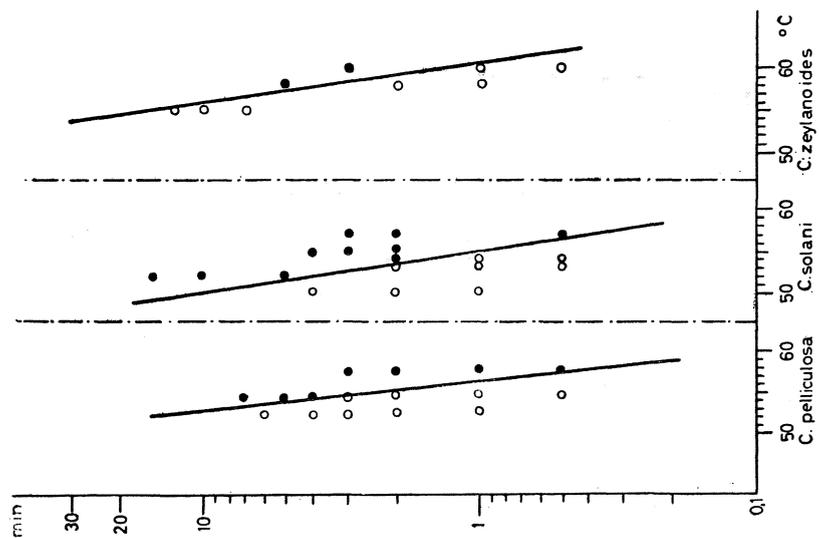


Figura 2

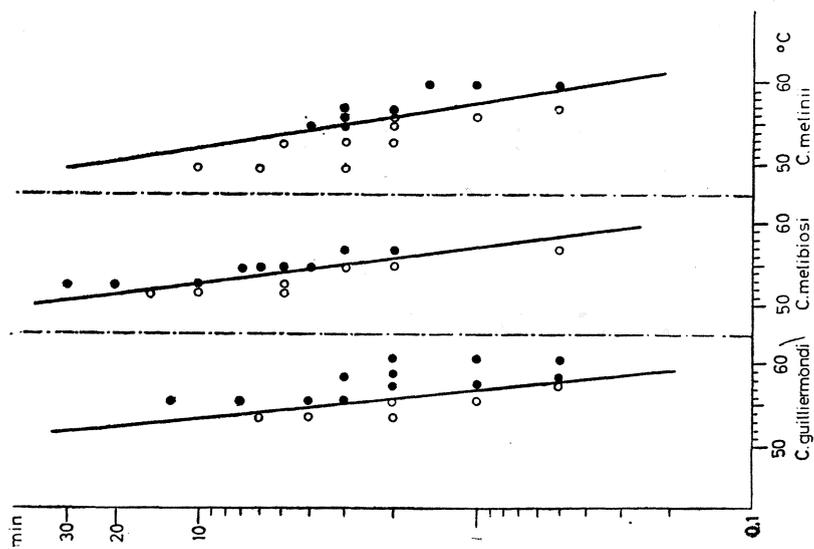


Figura 1

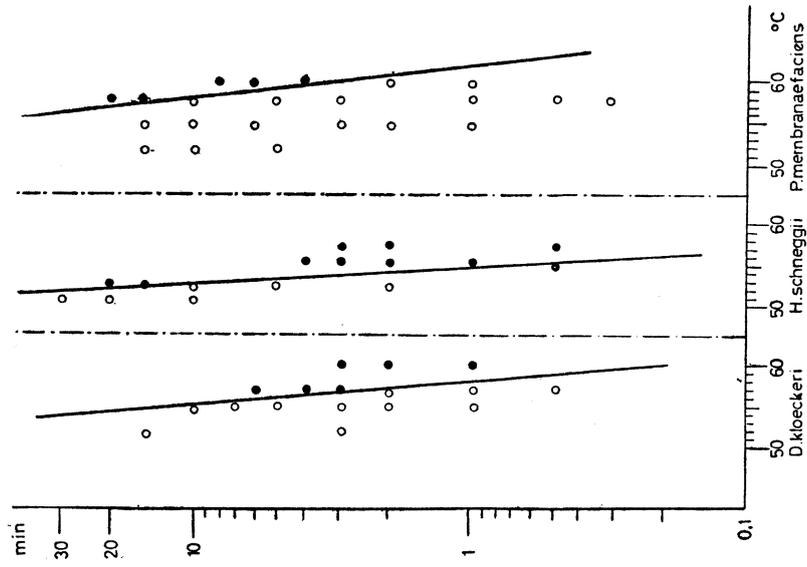


Figura 4

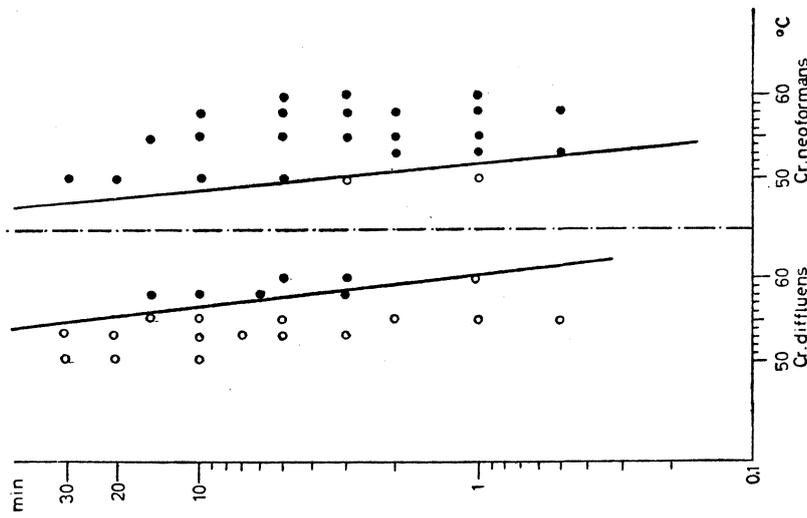


Figura 3

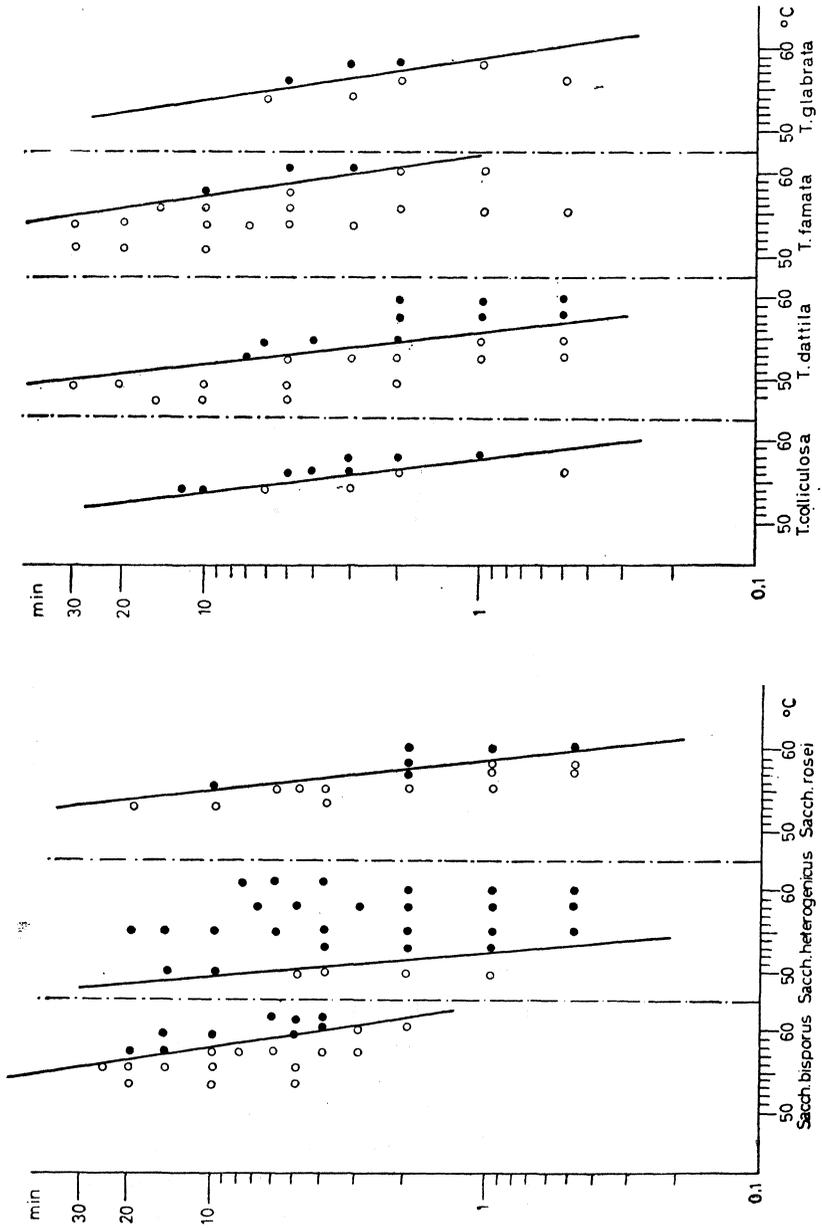


Figura 6

Figura 5

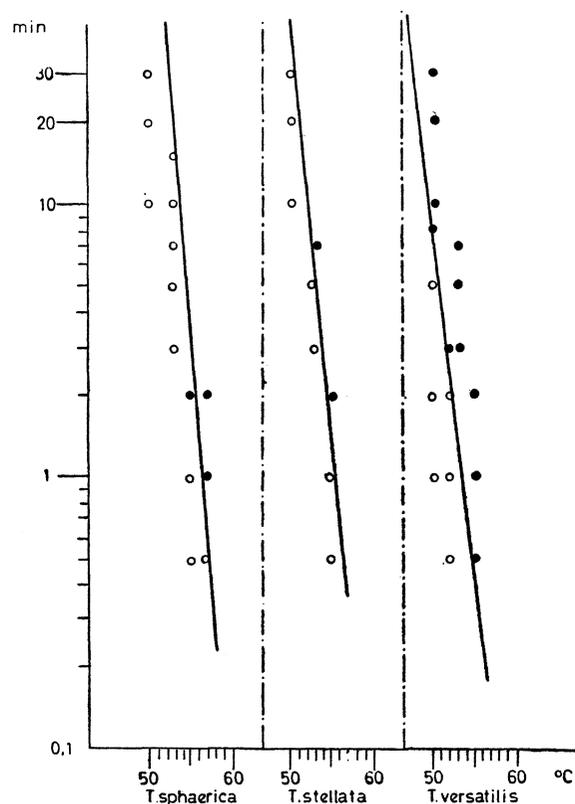


Figura 7

en ordenadas (escala logarítmica), el tiempo de calentamiento, en minutos. El criterio seguido para el trazado de las líneas de supervivencia ha sido el de Townsend y colaboradores (3), empleado en el trabajo anterior.

En el *cuadro 1* se incluyen los valores de los parámetros fundamentales (UP_{56} y Z) correspondientes a cada especie. Recordemos que Z representa el número de grados centígrados necesario para que la línea de supervivencia atravesase un ciclo logarítmico en el papel y UP_{56} es la ordenada de la línea que corresponde a la abscisa de 56 °C.

Cuadro 1

Género	Especie	UP ₅₆ Minutos	Z Grados centígrados
<i>Candida</i>	<i>guilliermondi</i>	1,20	4
	<i>melibiosi</i>	2,00	4
	<i>melinii</i>	2,00	5
	<i>pelliculosa</i>	1,60	4
	<i>solani</i>	0,70	5
	<i>zeylanoides</i>	9,50	5
<i>Cryptococcus</i>	<i>diffluens</i>	12,50	4
	<i>neoformans</i>	0,06	4
<i>Debaryomyces</i>	<i>kloeckeri</i>	6,00	3
<i>Hansenula</i>	<i>schneggii</i>	0,20	2
<i>Pichia</i>	<i>membranaefaciens</i>	35,00	4
<i>Saccharomyces</i>	<i>bisporus</i>	20,00	5
	<i>heterogenicus</i>	0,06	4
	<i>rosei</i>	4,60	4
<i>Torulopsis</i>	<i>colliculosa</i>	2,40	5
	<i>dattila</i>	0,90	4
	<i>famata</i>	17,00	5
	<i>glabrata</i>	3,50	5
	<i>sphaerica</i>	1,10	3
	<i>stellata</i>	0,60	4
	<i>versatilis</i>	0,30	4

C) *Discusión y Conclusiones*

Con objeto de establecer una comparación entre las diferentes especies que se han estudiado y que, como decíamos en la introducción, son las más representativas del producto fermentado, se incluyen en el cuadro 2 los resultados obtenidos en ambos trabajos.

Cuadro 2

Número de orden	Diagnóstico	UP ₅₆ Minutos	Z Grados centígrados
Esporigenas	1 <i>Debaryomyces hansenii</i>	6,00	3
	2 <i>D. nicotianae</i>		
	3 <i>Hansenula anomala</i>	3,30	5
	4 <i>H. mrakii</i>		5
	5 <i>H. schneggii</i>	10,50	2
	6 <i>H. subpelliculosa</i>	0,90	7
	7 <i>Pichia fermentans</i>	1,70	5
	8 <i>P. membranaefaciens</i>	35,00	4
	9 <i>Saccharomyces bisporus</i>	20,00	5
	10 <i>Sacch. cerevisiae</i>	4,40	6
	11 <i>Sacch. chevalieri</i>	10,00	3
	12 <i>Sacch. fructuum</i>	2,00	3
	13 <i>Sacch. heterogenicus</i>	0,06	4
	14 <i>Sacch. italicus</i>	2,00	3
	15 <i>Sacch. rosei</i>	4,60	4
	16 <i>Sacch. veronae</i>	3,50	5
No esporigenas	17 <i>Candida guilliermondi</i>	1,20	4
	18 <i>C. krusei</i>	51,00	5
	19 <i>C. melibiosi</i>	2,00	4
	20 <i>C. melinii</i>	2,00	5
	21 <i>C. mycoderma</i>	16,00	4
	22 <i>C. parapsilosis</i> v. i.	7,80	7
	23 <i>C. pelliculosa</i>	1,60	4
	24 <i>C. pseudotropicalis</i>	2,50	5
	25 <i>C. rugosa</i>	7,00	5
	26 <i>C. solani</i>	0,70	5
	27 <i>C. tropicalis</i>	4,40	5
	28 <i>C. zeylanoides</i>	9,50	5
	29 <i>Cryptococcus diffluens</i>	12,50	4
	30 <i>Cr. neoformans</i>	0,06	4
	31 <i>Torulopsis colliculosa</i>	2,40	5
	32 <i>T. dattila</i>	0,90	4
	33 <i>T. famata</i>	17,00	5
	34 <i>T. glabrata</i>	3,50	5
	35 <i>T. holmii</i>	2,00	5
	36 <i>T. sphaerica</i>	1,10	3
	37 <i>T. stellata</i>	0,60	4
	38 <i>T. versatilis</i>	0,30	4

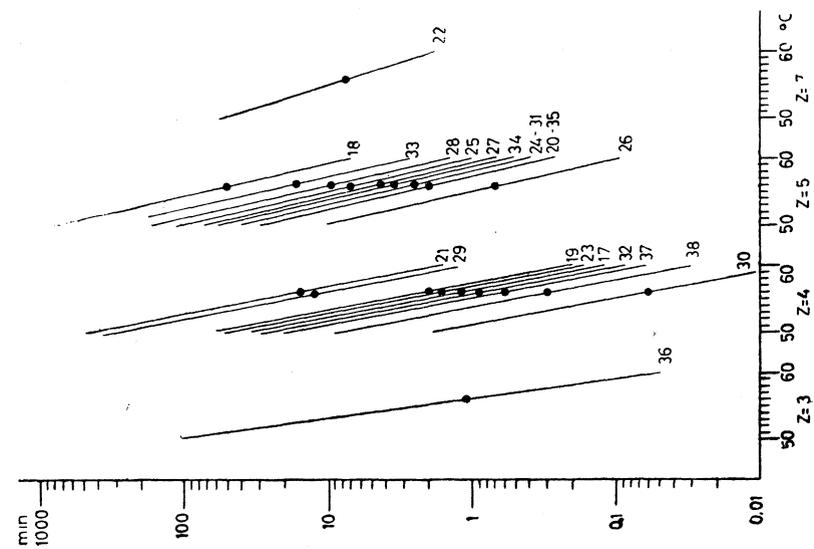


Figura 9

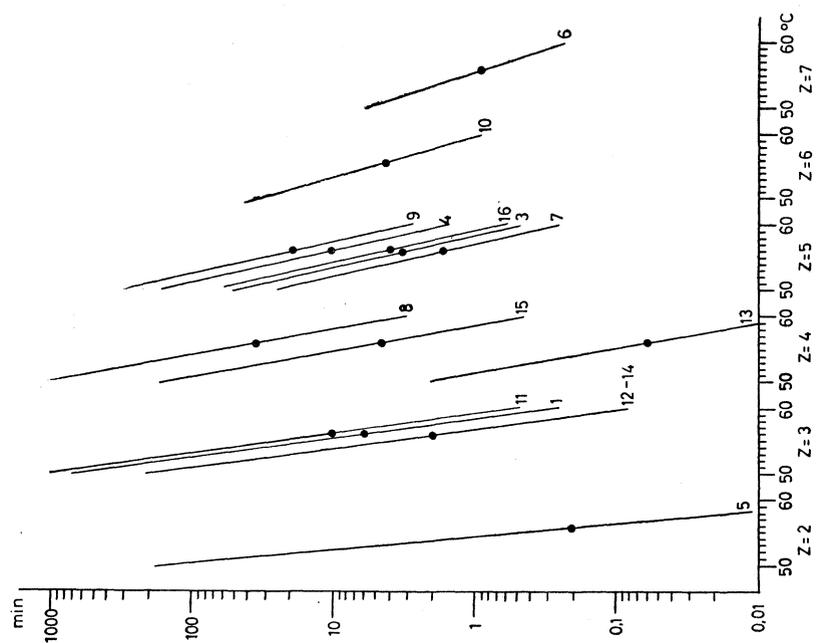


Figura 8

Igualmente, en las figuras 8-9 se representan, esquemáticamente, todas las líneas de supervivencia agrupadas según los diferentes valores de Z , e indicándose en las mismas el valor correspondiente para UP_{56} .

De la observación del cuadro 2 se puede deducir lo siguiente:

1º) La gran variabilidad que se ha encontrado en la resistencia térmica de las diferentes especies aisladas del producto fermentado, demuestra, como ya se ha indicado anteriormente, la absoluta necesidad de un estudio detenido de la flora presente en un producto determinado, antes de poder aplicar unas normas adecuadas de pasterización.

2º) Entre las especies más resistentes, para las condiciones estudiadas, debemos destacar a *Candida krusei* ($UP_{56} = 51,0$), seguida de *Pichia membranaefaciens* (35,0), *Saccharomyces bisporus* (20,0), *Torulopsis famata* (17,0), *C. mycoderma* (16,0), *Cryptococcus diffluens* (12,5), *Hansenula mrakii* (10,5) y *Sacch. chevalieri* (10,0).

3º) Como menos resistentes encontramos: *Debaryomyces nicotianae* (—), *Saccharomyces heterogenicus* (0,06), *Cryptococcus neoformans* (0,06), *Hansenula schneegii* (0,2), *Torulopsis versatilis* (0,3), *T. stellata* (0,6), *Candida solani* (0,7), *T. dattila* (0,9) y *H. subpelliculosa* (0,9).

4º) Si bien para la pendiente Z se encuentran valores que oscilan de 2º-7 ºC, un 87 por ciento de las especies estudiadas presentan un intervalo de valores de 3º-5 ºC.

AGRADECIMIENTOS

Esta comunicación forma parte de las «Investigaciones para mejorar la calidad de las aceitunas aderezadas en verde, estilo español o sevillano, destinadas a la exportación, con especial atención al producto envasado», para la realización de las cuales le fue concedida al Dr. José María Rodríguez de la Borbolla y Alcalá la Ayuda del Grupo de Aplicaciones Técnicas e Industriales, 1964, de la Fundación «Juan March».

Nuestro agradecimiento, en primer lugar, a la Fundación «Juan March»; al Dr. Rodríguez de la Borbolla, Director de la investigación, por su valiosa ayuda y consejo en la realización de este trabajo; y a las Srtas. M^a Josefa Revillas Martínez y Mercedes Bodineau Bada, por la eficaz colaboración en el desarrollo de las experiencias de laboratorio.

RESUMEN

Se ha continuado el estudio de la termorresistencia de diferentes especies de levaduras, aisladas de salmueras de aceitunas fermentadas.

Se incluyen los resultados obtenidos de las 38 especies estudiadas, de las que el 21 por ciento presentan valores de UP^{56} superiores a diez minutos, destacando *Candida krusei* (51,0) y *Pichia membranaefaciens* (35,0); el 56 por ciento, valores comprendidos entre uno y diez minutos y el 23 por ciento restante, valores inferiores a un minuto.

Las pendientes de mayor frecuencia (87,0 por ciento) se encuentran comprendidas de 3°-5 °C.

SUMMARY

The thermal resistance of several species of yeasts, isolated from the brines of pickled green olives, was studied. The results, obtained from 38 different strains, were included.

About a 21 per cent of them showed PU^{56} values above 10 minutes; *Candida krusei* (51.0) and *Pichia membranaefaciens* (35.0) were the most resistant. A 56 per cent of the strains gave values between 1 and 10 minutes and the rest (23 per cent) presented values below 1 minute.

The slopes of higher frequency were included between 3° and 5 °C.

BIBLIOGRAFIA

1. FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J., y GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1964. Microbiol. Españ., 17, 225.
2. LODDER, J., y KREGER-VAN RIJ, N. J. W. 1952. The Yeasts. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
3. TOWNSEND, C. T.; ESTY, J. R., y BASELT, F. C. 1938. Food Res., 3, 323.

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

OBSERVACIONES RELATIVAS A LOS
PROCEDIMIENTOS Y TECNICAS SEGUIDAS EN EL
ESTUDIO DE LA «FLORA» DE LEVADURAS
VINICAS DE LOCALIDADES ESPAÑOLAS

por

E. FEDUCHY

ANTECEDENTES

En los estudios que realizamos en la Sección de Enología del Centro de Ampelografía y Viticultura, dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, de Madrid, referentes a características de los vinos y «flora» de levaduras, de las zonas vinícolas más típicas de nuestro país, se han podido comprobar las dificultades que para reflejar fielmente la «flora» de levaduras del mosto y vino es necesario vencer.

En primer lugar, la toma de un número suficiente de muestras y suficientemente variadas para satisfacer el fin perseguido; después, el estudio de la «flora» de levaduras que en ellas exista y en la *fase deseada*, antes de su *variación*, y finalmente las innumerables clasificaciones y recuentos para conocer géneros y especies, y la proporción en que se encuentran. Todo esto y para una localidad relativamente pequeña, supone ya una labor penosamente asequible, y cuando se aspira al estudio de una región, son años los que serían necesarios, no sólo por el mayor número de muestras suficientes para reflejar las variaciones de la zona y por el mayor número de cepas para el estudio posterior, sino que también será necesario repetir el estudio en varios años sucesivos, para reflejar la diferente influencia del medio ambiente.

En la Sección de Levaduras del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología hemos realizado gran parte de los trabajos de clasificación de las cepas de levaduras aisladas para los anteriores estudios, y entre las de su colección se conservan, con el fin de seguir junto con las demás, los estudios correspondientes de las que presenten alguna particularidad de interés, para su aplicación práctica, aparte de los que con carácter principalmente enológico se llevan en la Sección de Enología antes aludida.

Se ha fijado especial interés en el estudio de la flora de dos localidades: La Nava del Rey (Valladolid) y Montánchez (Cáceres). El motivo ha sido la característica de presentarse en estas localidades levaduras de «flor», las que forman velo después de haber fermentado el mosto, y conservados después estos velos sobre el vino, lo mejoran durante su actuación en fase denominada de «crianza».

El estudio de estas levaduras de «flor» y de las elaboraciones típicas con ellas realizadas, y evolución del producto (vino) durante dicha «crianza» fue tema de estudio que seguimos con D. Juan Marcilla y D. Genaro Alas, en 1936 (4), sobre el de «Levaduras que forman velos sobre vinos de elevado grado de alcohol, pertenecientes a la zona típica de los mismos, de Andalucía occidental», tema que despertó profundo interés y que después ha sido también objeto de apreciados trabajos.

FIN PERSEGUIDO EN EL PRESENTE ESTUDIO

El fin perseguido en esta memoria es hacer una exposición comentada de la marcha seguida y de las técnicas empleadas en los aludidos estudios referentes a la «flora» de levaduras, señalando las causas de posibles errores en algunos resultados, dificultades de técnicas empleadas y manera de poder evitar las primeras y mejorar las segundas.

Siguiendo un camino dirigido a este fin, se exponen a continuación las distintas fases de los trabajos aludidos y su comentario.

TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras, de las que han de aislarse las diferentes cepas de levaduras para su caracterización y recuento, con el fin de conocer su naturaleza y proporción en el medio, es una fase del estudio, de impor-

tancia fundamental para reflejar con fidelidad la flora existente, exigiendo un número de cepas suficiente para tener un resultado significativo.

Las muestras se tomarán primero de mosto o jugo de uva inicial, procedente de la uva estrujada y después, en diferentes fases de la fermentación alcohólica del mismo.

En la «flora» del mosto inicial, aún sin trazas de fermentación, se encontrará representada la correspondiente a la «flora» de levaduras de la localidad existente en el medio ambiente. Pero en el momento en el que la microflora de dicho medio, y en especial la referente a la de levaduras, se encuentra en contacto con el mosto, comienza su desarrollo y multiplicación, la que dará lugar con seguridad a una proporción muy distinta entre los números de células correspondientes a los géneros y especies existentes en la fase inicial, y esto sucederá, no sólo a los microorganismos existentes, en general, de los que algunos probablemente no se desarrollarán, sino en lo referente a las levaduras, las que acusan velocidades de desarrollo muy diferentes, según la fase en que se encuentren, células durables, células esporuladas, células en estado activo más o menos avanzado, y estas diferencias, acentuadas por las propias de los géneros y especies a las que corresponden. En el caso de levaduras apiculadas, hemos observado y tratamos de comprobar que en esta primera fase del medio a que nos referimos, en la que aún está sin presencia de alcohol, y en la que se inicia su aparición, el desarrollo de levaduras apiculadas es en una proporción relativamente mayor que la de otros géneros. Siendo esto causa de la primera variación en la proporción de los diferentes tipos de levaduras correspondientes a la flora inicial, y después, en el momento en el que el alcohol inicia su presencia y ésta va en aumento, la proporción de la flora sufre una variación cada vez más sensible, por la selección que aquél impone.

Por otra parte, no se ha hecho alusión a posible sulfitación inicial, ni a la influencia de la acidez del medio, práctica la primera que puede con seguridad haber sido realizada en elaboraciones medianamente cuidadosas, así como la de corregir la segunda, si se cree necesario, pues con ello se persigue principalmente la selección de la flora microbiana espontánea.

Por estas razones hay que recurrir a tiempo para la toma de muestra inicial y asegurarse de que no se realizaron aún ninguna de estas prácticas.

Cuando se trata de un estudio enológico, pero de carácter pura-

mente práctico, en el que se persigue conocer las razas de levaduras más activas y de mejor rendimiento en la fermentación, podrá seguirse este estudio haciendo cultivos de aislamiento, tomados del medio, aún con presencia de gas sulfuroso, en dosis corrientemente empleada en la elaboración seguida en la localidad, e incluso esta adición de sulfuroso será conveniente para una primera selección de la flora, y después se continuarán las siembras de aislamiento, en muestras tomadas en fases sucesivas de la fermentación, para conseguir por la selección que el grado alcohólico impone, cada vez mayor probabilidad de realizar el aislamiento de las razas de levaduras más convenientes para una buena fermentación.

Transporte y conservación de muestras

Dadas las características del clima de nuestras regiones vinícolas, en el que generalmente los otoños son templados, por lo que la multiplicación de las levaduras y el comienzo de la fermentación son rápidos, no puede contarse, en la mayoría de los casos, con un transporte de las muestras tomadas para estudio en condiciones suficientemente satisfactorias de refrigeración, y aunque ésta puede conseguirse en el Centro en donde se trabaja habitualmente, la llegada de las muestras es con características de su flora ya alterada, especialmente las de las muestras correspondientes a la fase inicial e inmediatas; habiendo podido comprobarse que aun a temperaturas de 3°-4 °C de la cámara frigorífica, las muestras que se depositaron, en espera de su turno para ser estudiadas, habían evolucionado lentamente, pero de manera sensible.

Por estos motivos es práctica conveniente y generalmente necesaria, hacer los cultivos de aislamiento y los recuentos de células y de aspectos morfológicos en la misma localidad donde se tomaron las muestras, lo que exige un desplazamiento de personal suficiente y del correspondiente material necesario, no disponiéndose en la mayoría de los casos de asepsia conveniente, ni menos de medios de esterilización, exigiendo material de más difícil desplazamiento y adaptación.

Hemos ensayado el transporte de la flora microbiana, sembrada en varias estrías sobre agar ácido de mosto, solidificado en cajas de Petri, para evitar la influencia de la fermentación, que amenaza en los medios líquidos.

Después se proyectaba hacer una suspensión, tomando de cada

estría, en un tubo correspondiente, con suero fisiológico (agua con el 9 por mil de ClNa) y observar la proporción en la que aparecen las diferentes cepas, y su estudio complementario, mediante siembras de aislamiento en colonias, su recuento y observación, y después, el posterior de clasificación de las consideradas como diferentes; pero esto no fue posible realizarlo, por comprobarse que el desarrollo de las levaduras en estría era con velocidad diferente, especialmente el de las levaduras apiculadas, que se acusó sensiblemente más rápido, análogamente a lo observado en medios líquidos, manifestándose esto por un halo que partiendo del contorno de la estría avanzaba sobre la superficie del agar, comprobando con la observación al microscopio de preparación tomada de la misma, que se trataba de dichas levaduras apiculadas (*figura 1*).

Esta sensible variación de las proporciones de la flora inicial fue la causa de no considerar tampoco este procedimiento como de garantía.

OBSERVACION Y AISLAMIENTO DE LA «FLORA» NATURAL DE CADA FASE

Para una primera impresión relativa a la «flora» existente en una fase determinada, una preparación en fresco para el microscopio, tomada del mosto sin fermentar, o en fases posteriores, es muy elocuente, especialmente en las primeras fases, por apreciarse en el medio una variedad mayor de formas y características en las células presentes, de las que interesa aislar y conservar un número conveniente de ejemplares para su posterior clasificación, pues sólo con el aspecto morfológico se está muy lejos de formar un juicio de la proporción de las distintas variedades de cepas existentes.

Es necesario por lo tanto, realizar después una serie de cultivos de aislamiento en colonias en medio solidificable favorable para el desarrollo de todas las razas y variedades de cepas de levaduras, y que estas colonias puedan tomar aspectos característicos. Aquí se tropieza con el rápido desarrollo de los mohos, que invaden la superficie de los medios solidificables en donde se hizo el aislamiento, antes de que toda la flora existente de levaduras haya podido hacer su aparición, y más aún, del momento en el que por alcanzar suficiente desarrollo sus colonias, puedan éstas presentar aspectos característicos.

Con el fin de dificultar y retrasar el desarrollo de los mohos y bacterias, Castelli (1) recomienda el empleo de *gelatina ácida* de mosto, dando los detalles referentes a su preparación, que exponemos más adelante.

En efecto, la reacción ácida del medio le defiende bastante contra la invasión de los mohos y bacterias, pero es probable que la fidelidad en el reflejo de la flora inicial de levaduras también se altere, pues hay levaduras que en algunas fases de su vida presentan aspectos miceliares muy similares a los mohos, pero en el estudio con miras a la flora «enológica» no tienen interés, y por esta razón en dicho estudio no fue motivo de entorpecimiento sensible en su marcha.

La gelatina ha sido elegida con preferencia al agar por desarrollarse sobre ella las colonias con aspectos más característicos de algunos géneros, aunque en otros casos no hay tan sensible diferencia. A la ventaja expuesta, que es evidentemente importante, se opone el inconveniente (frecuente en nuestras zonas) de la temperatura, la que con gran frecuencia es suficientemente elevada para reblandecer la gelatina hasta un punto suficiente para que en el transporte se altere el cultivo.

También y como se ha indicado, en las primeras fases el desarrollo de levaduras apiculadas es grande, y por liquidar, aunque lentamente, la gelatina, sus numerosas colonias son también causa de reblandecimientos suficientes para alterar también el cultivo al transportarlo.

Este peligro puede considerarse descontado en los primeros días, por lo que respecto al transporte puede no llegar a influir perjudicialmente, pero sí después de la espera, para observar en fase más avanzada el aspecto de las otras colonias.

Para asegurarse contra posible alteración en el transporte, se hicieron también simultáneos aislamientos en agar ácido de mosto.

TOMA DE MUESTRAS CORRESPONDIENTES A DIFERENTES FASES DE LA FERMENTACION

Ya se ha indicado el interés de conocer la flora de levaduras en distintas fases del mosto en fermentación, en las que irá aumentando el grado alcohólico del medio.

En los sucesivos aislamientos correspondientes a estas fases, se podrán ir señalando cuáles son las razas de levaduras poco resistentes

al grado alcohólico, el que las irá eliminando, y por otra parte, también se destacarán las más vigorosas, que son las que llegarán en actividad hasta el final de la fermentación.

La toma de muestras correspondientes a estas diferentes fases se realiza en el mismo local de la elaboración, tomando de diferentes envases y correspondientes a diferentes días de fermentación.

Estas muestras tienen el valor de ser tomadas en su ambiente real, que es en el que se ha de operar cuando se haga la aplicación práctica y en gran escala, de los cultivos seleccionados en el laboratorio. Pero para un estudio, más o menos científico, se necesita una mayor garantía de los días que lleva en fermentación la muestra correspondiente en estudio, y simultáneamente un conocimiento de la riqueza en azúcar y alcohol del mosto más o menos fermentado, que confirme la fase en que nos encontramos.

Esta seguridad no puede conseguirse en una elaboración industrial, en la que sería necesaria una atención que no puede exigirse en los agitados momentos de vendimia y primeras elaboraciones. Por ello y para poder contar con datos comprobatorios y seguros, tomábamos un volumen de unos 10-12 l en una garrafa de una arroba, y en ella se seguía la marcha de la fermentación, analizando grado de alcohol y azúcar y realizando una serie de aislamientos de flora de levaduras correspondientes a las diferentes fases caracterizadas según las dosis presentes de grado alcohólico o de azúcar sin fermentar.

OBSERVACION Y RECUESTO DE LAS COLONIAS Y DISPOSICIONES PARA UNA SEGUNDA SELECCION

El aspecto de las colonias, como ya se ha indicado, especialmente en los cultivos a base de gelatina, presenta formas características bastante diferentes, principalmente si la observación se realiza después de un cierto número de días desde la aparición de la colonia, habiendo también mantenido una temperatura favorable, que será de unos 18 °C, cuidando que no pase de 20 °C, para evitar la liquidación de la gelatina. Por otra parte, este período de observación está limitado por el aludido peligro del desarrollo de mohos, invadiendo sus micelios la superficie del cultivo, y muchas veces dando lugar a la liquidación de la gelatina, lo que también se realiza por varias especies de levaduras.

No siendo suficiente para formar juicio medianamente aceptable la sola observación del aspecto morfológico de la colonia, se complementa en parte, con una observación al microscopio de preparaciones tomadas de la misma. Como para estas observaciones se requiere cierto tiempo, al ser numerosas las que hay que realizar, se hace difícil la conservación de las cajas, pues aun disponiendo de un frigorífico corriente, no hay seguridad de impedir el avance del desarrollo miceliar de algunos mohos.

Con el fin de conseguir observaciones lo más completamente posible, se ha recurrido a diferentes procedimientos. Castelli e Iñigo (1), en los estudios realizados sobre «flora» de levaduras de regiones españolas e italianas, recurren al procedimiento para rápida observación microscópica de las colonias, a la aplicación de un cubreobjetos sobre una fracción de la masa de colonias que recubre la superficie de la gelatina, y haciendo leve presión sobre el mismo, consiguen la adhesión a la cara del cubreobjetos aplicada, de una serie de fracciones de colonias, dislaceradas, las que después son observadas al microscopio, depositando el cubreobjetos sobre un portaobjetos.

Este procedimiento es, en efecto, rápido, pero requiere cuidado y práctica para su realización y posterior interpretación de lo observado con juicio próximo a la realidad; por lo que no se puede garantizar el éxito de su resultado, si no es, por persona que disponga de cierta práctica y habilidad.

En nuestro laboratorio recurrimos al procedimiento que se expone seguidamente.

Primero se realiza una atenta observación de las cajas que presentan colonias, observación que ha de repetirse en días sucesivos mientras lo permita la conservación del cultivo.

Después de observados los diferentes aspectos de las colonias, se hacen los recuentos de las correspondientes a cada aspecto.

El número de colonias conviene sea elevado, siempre que no pase de cierto límite, que diera lugar a superposiciones de las colonias y a que por lo elevado de su número, no sea posible que su desarrollo individual alcance unas proporciones convenientes, para diferenciar unas de otras con alguna garantía de seguridad.

Con el fin de realizar el recuento de las que pertenecen a cada aspecto, se divide la caja en sectores, señalados con lápiz graso en el cristal de la cara externa de la base de la caja.

Se numeran los sectores señalados y se hace el recuento de las diferentes colonias correspondientes a cada aspecto y sector, calculando los tantos por ciento de las de cada aspecto con respecto al total.

Para no detenerse en la observación al microscopio del aspecto de las células de las colonias señaladas como diferentes y poder continuar rápidamente y sin interrupción su recuento, se siembra uno o varios ejemplares de cada aspecto de colonias, tomando una partícula con la aguja de siembras y llevándola en estrías sobre la superficie de agar de mosto, solidificado en caja de Petri. Estas siembras se realizan trazando la estría del borde al centro, en sentido radial, como los radios de una rueda, y numerando cada estría, que en número de unas diez caben en una misma caja (*figura 2*); se anota la referencia, y después, con tiempo suficiente, se hacen preparaciones de cada estría para su observación al microscopio, sin el apremio de la amenaza de su pérdida por invasión de moho. Generalmente, el aspecto de la estría, también muy elocuente, y la preparación al microscopio confirman repeticiones, que son eliminadas del posterior estudio de clasificación.

Aspecto morfológico de las colonias elegidas como tipo

Los aspectos morfológicos de las colonias de diferentes géneros y especies de levaduras, procedentes de los mostos de uva que se llevan en estudio, suelen estar representadas por un número limitado de formas, no siendo siempre exclusivas de un solo género y menos de una sola especie.

En el trabajo aludido de Castelli e Iñigo (1) se fijan una serie de aspectos que se designan por letras para facilitar la referencia y que coinciden con varias de las observaciones por nosotros realizadas. Estos aspectos son los siguientes:

M: Colonia redonda gibosa con márgenes netos, color blanco o blanco amarillento, no licúa la gelatina.

T: Colonia en forma de cuernecillo, de color blanco, no licúa la gelatina.

F: Colonia redonda, de color blanco grisáceo, que licúa la gelatina.

P: Colonia blanca, gibosa, perfectamente redonda, que a veces presenta una veta rosácea, no licúa la gelatina.

M. T.: Colonias intermedias entre *M* y *T*.

En los aspectos de las formas *M* añadiremos ciertas diferenciaciones

en los tonos del color blanco y aspecto, que calificamos, unas de blancas jugosas, blancas compactas; éstas se desprenden enteras, adheridas a la aguja de siembra y con facilidad. A otras las denominamos «blanco yeso», por el aspecto del blanco, que recuerda al del yeso y por lo seco de la colonia.

En los tonos amarillentos diferenciamos el que denominamos «blanco marfil».

A estos aspectos de colonia corresponde casi siempre las del género *Saccharomyces* que estudiamos.

También son frecuentes las correspondientes a tómulas, especialmente entre las colonias de aspecto blanco-jugoso y también algunas blanco-yeso; éstas suelen corresponder frecuentemente a la *Candida pulcherrima*, pero en presencia de hierro, las colonias de esta especie de levadura suelen colorearse de rosa rojizo en forma de veta o mancha.

El grupo de colonias designado por la letra *T* tiene la particularidad de tomar un aspecto alargado en forma de cuernecillo o velita, cuando está desarrollada. Corrientemente son *Saccharomyces* las células que las forman.

Las colonias del grupo *F* presentan aspecto blanco grisáceo y licúan la gelatina, aunque lentamente, sumergiéndose la colonia formando hoyitos; es aspecto muy característico de colonias en gelatina de mosto o malta, de levaduras del género *Kloeckera*, pero también hemos encontrado colonias de este género con aspecto de color pardo oscuro, y otras muy pequeñas; ambas presentaban al microscopio levaduras apiculadas y también típicas. Las colonias pequeñas aludidas no prosperaban en días sucesivos, manteniéndose casi inapreciables a simple vista, por lo que las denominamos de «punta de alfiler», y son motivo de siembras impuras por pasar inadvertidas unidas a otra colonia mayor.

En las colonias del grupo *P* se incluyen las de aspecto color rosa, rosa pálido, rosa salmón y rosa vivo, generalmente pertenecientes al género *Rhodotorula*.

Colonias gigantes

Estas colonias como se sabe se forman depositando cuidadosamente con pipeta de Pasteur una gota de suspensión de levadura joven, sobre capa de gelatina de malta solidificada en caja de Petri, dejándola

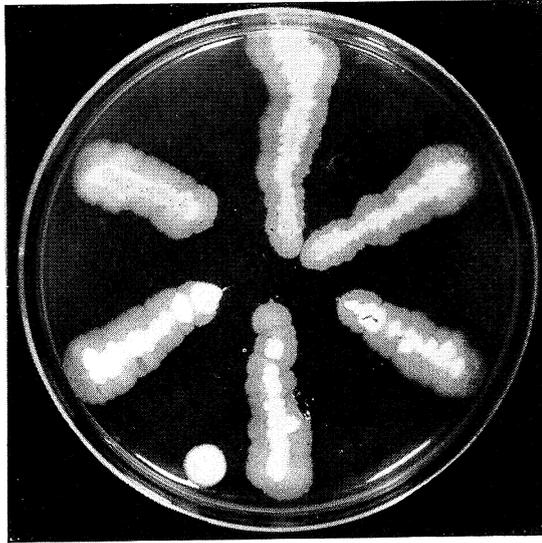


Figura 1. Estrías sobre agar ácido de mosto, sembradas del mosto inicial con mezcla de levaduras, acusándose dominio destacado del desarrollo de apiculadas formando halo en el contorno

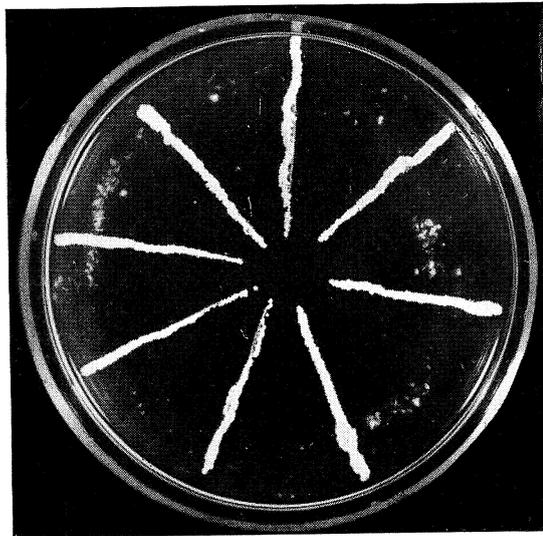


Figura 2. Estrías sobre agar mosto, correspondiendo cada una a colonia de aspecto diferente para su posterior observación y estudio, sin peligro de perderse por invasión de moho, probable en la caja original

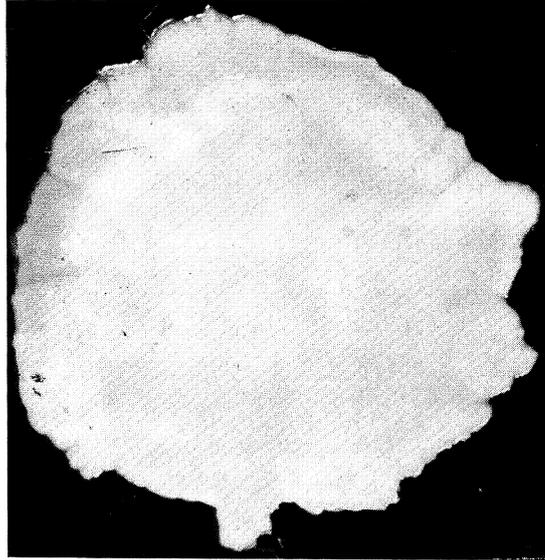


Figura 3. Colonia gigante sobre gelatina de malta de Kloeckera apiculata, antes de iniciar la licuación de la gelatina

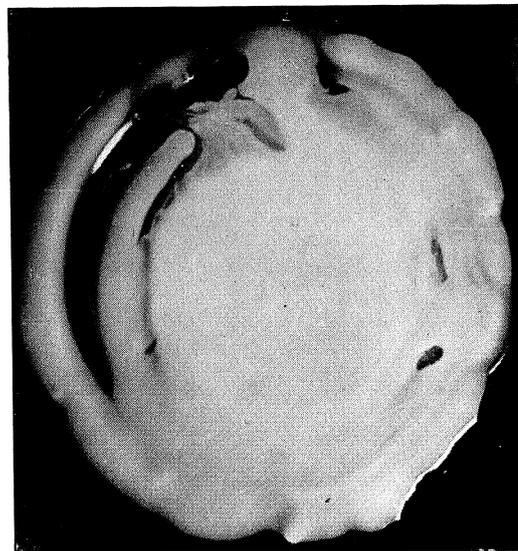
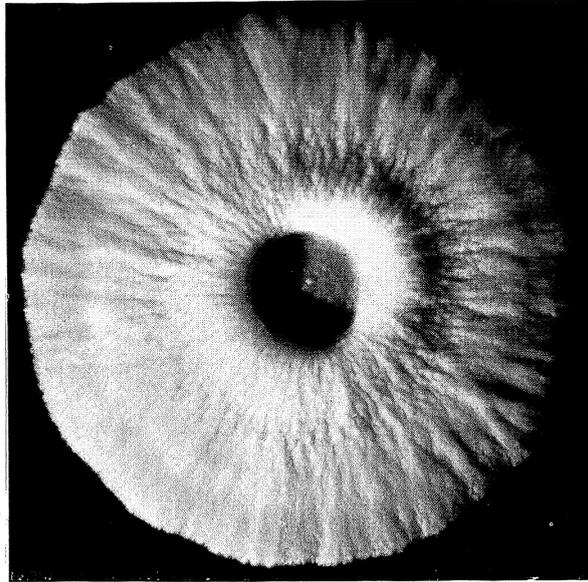


Figura 4. Colonia gigante sobre gelatina de malta, de K. apiculata, iniciando la licuación de la gelatina



*Figura 5. Colonia gigante de Saccharomyces ellipsoideus.
Aspecto crateriforme y finamente estriado*

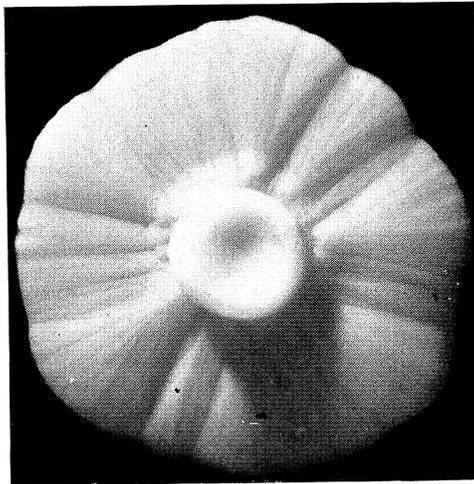


Figura 6. Colonia gigante de S. carlsbergensis

en el centro en forma de menisco convexo y no moviendo la caja hasta el día siguiente, en que se transportará con cuidado a estufa a menos de 20 °C y ambiente húmedo, donde permanecerá un mes. Su desarrollo en la superficie de la gelatina será característico y en la mayoría de los casos, de curioso aspecto (*figuras 3-6*); aunque no hay un aspecto riguroso correspondiente a géneros y especies, es un dato complementario bastante elocuente, pero esta práctica, por su larga duración hasta llegar a la forma estable de la colonia, no es en estos momentos de oportuna aplicación.

Observaciones al microscopio, de la «flora» de levaduras en cada una de las diferentes fases del medio, y de la que integra las diferentes colonias, correspondientes a siembras procedentes de las mismas fases del medio

Como ya se comentó anteriormente, el aspecto morfológico de las levaduras, solamente como una orientación más o menos próxima a la realidad, podrá darnos idea del género a que pertenecen, sin poder pretender más, y esto con ciertas exigencias de constancia de medio, tiempo transcurrido y temperatura de desarrollo, para poder establecer comparaciones con alguna garantía. Por ello observaciones realizadas al microscopio, del aspecto morfológico de las levaduras de la «flora» del mosto, ya sea en la fase inicial sin fermentar o en las posteriores en distintos momentos de la fermentación, será su aspecto de menor garantía para la identificación, al tratar de compararle con el que presenta en el medio patrón de extracto de malta empleado en la clasificación, y observado a las cuarenta y ocho-setenta y dos horas, a 25 °C, según normas.

Esta dificultad de caracterización por el aspecto morfológico, es aún mayor en las muestras observadas y correspondientes a la fase verdaderamente *inicial*, o sea, cuando recién estrujada la uva pasa al mosto la «flora» del hollejo y raspón, y antes de que inicie en el mosto su desarrollo y multiplicación.

En esta fase habrá posiblemente levaduras esporuladas, otras, en forma durable, otras, por alguna circunstancia favorable, ya en forma vegetativa como sucede con las apiculadas, pero éstas seguramente, en la fase que presentan un aspecto inidentificable, pues suelen presen-

tarse en ellas formas elípticas diminutas, muy diferentes a la típica de limón que toman en fase de pleno desarrollo y multiplicación. Además, aparecerán conidias y células miceliales, procedentes de mohos, y de formas intermedias entre levaduras y mohos.

Por los motivos expuestos de confusión de aspectos, es por lo que es de interés el complemento de una siembra (prudentemente abundante) en medio solidificable, como la gelatina o el agar de mosto, con el fin de obtener un número de colonias suficientemente abundante para reflejar el conjunto de la «flora».

Respecto al medio solidificable empleado para el aislamiento, ya sea a base de gelatina o de agar, es de interés, como ya se ha indicado, conservar la reacción ácida del mosto empleado, pues con ello se dificulta el desarrollo de mohos y bacterias, favoreciendo el de levaduras.

Con el fin expuesto, en el aludido trabajo, Castelli, emplea un agar al agua de doble concentración, entubando un volumen constante en cada tubo. Al mismo tiempo, se prepara una serie de tubos con el mismo volumen de mosto en cada uno, conservando su acidez. En el tubo de mosto se realiza la siembra, se vierte su contenido en la caja de Petri y sobre él el agar fundido, agitando suavemente la caja para mezclar bien antes de que solidifique la mezcla.

Con el mismo resultado, de obtener agar solidificable ácido, lo hemos realizado en nuestro laboratorio, empleando agar de mosto de concentración conocida y previamente neutralizado, pero en el momento de su empleo, se añaden unas gotas de solución en agua de ácido tártrico, ensayando previamente en uno de los tubos de agar, el número de gotas que será necesario añadir para llevarle al pH deseado.

En las fases posteriores, los aspectos de las células son más característicos, apreciándose más diferencia en las formas elípticas más o menos alargadas, formas redondas, apiculadas grandes y pequeñas, y las formas francamente alargadas y algunas miceliales.

Las formas redondeadas y elípticas tienen fases en las que pueden ser confundidas, por deformación más o menos duradera de las primeras.

La observación de las colonias procedentes de las siembras simultáneas al momento de la observación y recuento de las preparaciones en fresco del medio en estudio, es una comprobación más estable y los aspectos de las células ya multiplicadas, más característicos para poder diferenciarlas.

Recuento de células y de colonias de levaduras observadas correspondientes a cada aspecto, para establecer la proporción aproximada en que se encuentran en el medio en estudio

El recuento de células correspondientes a cada forma, realizado observando al microscopio preparación en fresco tomada del medio, fue hecho empleando el hematímetro, repitiendo las observaciones y recuentos en otra preparación diferente y realizando cada una en 100 cuadrículas. Con ello se verificó el recuento de las formas indicadas y se calculó el porcentaje en el que cada una aparecía respecto al total de células.

Las colonias fueron observadas días después, realizando su recuento en la forma antes indicada, dividiendo la caja en sectores. Si la conservación de la caja lo permitía, se complementaba la observación morfológica de colonias con otra observación al microscopio de preparaciones tomadas de varias de ellas correspondientes a cada tipo, para confirmar, con más fundamento, que, en efecto, son similares las colonias elegidas para cada grupo.

Cuando hay amenaza de invasión micelar de moho o bien de licuación de la gelatina, o falta de tiempo para la observación rápida, se aseguran, como también se ha expuesto, varios ejemplares de colonias correspondientes a cada grupo sembrándolas en estría, en distribución radiada sobre la superficie del agar de mosto o malta, solidificado en caja de Patri (*figura 2*).

A continuación y a modo de ejemplo de la aplicación en la práctica de lo expuesto, se cita la referente al estudio de la flora anteriormente citada de las localidades La Nava del Rey (Valladolid) (2) y Montanchez (Cáceres).

MARCHA SEGUIDA PARA EL ESTUDIO DE LA «FLORA» DE LEVADURAS DE LA NAVA DEL REY

Toma de muestras en distintas fases

Se tomó la primera del mosto que escurrió de la uva recién estrujada en el lagar; la segunda, a las veinticuatro-treinta horas, en las que se inició desarrollo y fermentación; y otra muestra, a los cinco-ocho días de iniciarse la fermentación.

Como las observaciones realizadas en bodega no pueden garantizar como las del laboratorio, el verdadero momento de iniciarse cada fase, se hizo también un ensayo de comprobación transportando al laboratorio muestras de uva fresca y estrujada en el mismo, se siguieron una serie de observaciones en las distintas fases inicial y de fermentación durante varios días sucesivos.

Transporte de las muestras

El mismo día en que fueron tomadas, se llevaron al laboratorio de Madrid y se depositaron en cámaras frigorífica a unos 2 °C de temperatura, para su observación al siguiente día.

En la misma localidad de origen, se hicieron también unas siembras de aislamiento en agar ácido de mosto, para asegurar la conservación de la flora típicamente inicial.

En un cuadro se expone una media de los datos referentes a varias muestras seleccionadas como de mayor garantía. Este cuadro fue publicado en el estudio aludido (2), en el transcurso del cual se realizaron las observaciones indicadas relativas a la aplicación de las técnicas, sus dificultades y reformas correspondientes.

Como ejemplo de muestras y recuentos de formas, considerados como erróneos y por ello eliminados, señalaremos el de muestras de mosto en fase inicial, el que conservado para su observación correspondiente en frigorífico a 3 °C, y a pesar del cambio brusco de temperatura sufrido, se apreció una iniciación de actividad y multiplicación de células, que falseó el porcentaje inicial.

En esta observación se apreció (sin comprobación aún suficiente para su generalización) que a esta temperatura baja, dominaron en el desarrollo las formas no apiculadas, y que, por el contrario, los cultivos simultáneos en agar y gelatina de mosto de la misma fase inicial, acusaron un dominio de levaduras apiculadas, que obligaron a desechar algunas cajas por lo intocable del número de sus pequeñas colonias que invadían el campo, licuando el medio cuando éste era a base de gelatina.

Teniendo presentes las causas que influyeron erróneamente en el anterior estudio, se trató de evitarlas en el que se realizó posteriormente referente a la localidad de Montánchez (Cáceres), cuya marcha expone-mos a continuación.

MARCHA SEGUIDA EN LA OBSERVACION Y ESTUDIO DE LA «FLORA» DE LEVADURAS DE MONTANCHEZ (CACERES)

Toma de muestras

No fiando de que la conservación de la «flora» presente en las muestras tomadas sea sin alteración de la proporción en que se encuentran los diferentes géneros y especies, a pesar de la rapidez del transporte y de ser depositadas en frigorífico, según experiencia con lo sucedido en el anterior estudio, se practicaron varios aislamientos en agar ácido de mosto en la misma localidad, tomando muestras para los primeros realizados, del mosto recién escurrido de la estrujadora.

Después se tomaron otras muestras correspondientes a envases con mosto en fermentación en distintas fases, practicando también en la localidad los correspondientes aislamientos y transportando después todos estos cultivos para realizar su estudio detenido al nacer las colonias.

Para tener mayor garantía de los días de desarrollo y fermentación correspondientes a cada fase, se transportaron siete muestras de mosto inicial, de las que una de ellas era de 10 l y las restantes de 1 l y de 200 ml, pudiendo ser observadas en el laboratorio en el que se procedió al aislamiento de su flora, correspondiente a días sucesivos, con garantía del conocimiento de la fase de fermentación del mosto.

Observación y estudio de la «flora» de levaduras

La marcha seguida en este estudio fue dirigida desde un principio a la observación macro y microscópica de colonias y a un recuento, con preferencia a las observaciones de formas de las células en medio líquido, realizadas en el anterior estudio, aunque también se hicieron algunas de estas observaciones, especialmente en las primeras muestras.

El material para este estudio de la «flora» a partir de las colonias, fue el procedente de las siembras en agar ácido de mosto, practicado en la misma localidad y correspondiente al mosto inicial y a otros con diferente número de días en fermentación.

Además, y con más garantía, se siguió también la observación y estudio de las colonias obtenidas en el laboratorio, procedentes de siem-

bras en gelatina ácida de mosto, de las muestras de mosto inicial transportado y correspondientes a distintas fases de la fermentación; estas fases fueron fijadas de la manera siguiente: en vez de tener en cuenta las horas o días de fermentación, se tuvo por norma las riquezas en azúcar que sucesivamente fue teniendo el mosto, fijándose con arreglo a ello las siguientes fases, según las cantidades de azúcar que contiene el medio:

Fase	Azúcar Gramos
1 ^a	250-200
2 ^a	200-120
3 ^a	120-90
4 ^a	90-50
5 ^a	50-10
6 ^a	10-1

Esta disminución del azúcar correspondiente a cada fase será simultánea a otra creciente del grado alcohólico, y éste irá seleccionando la flora de levaduras.

Esta forma de fijar las fases en las que se han de hacer las siembras de aislamiento, es más exacta que la basada en el tiempo, pues puede haber influencias del medio que retrasen o aceleren la fermentación y no sería justa la apreciación de las condiciones del medio, ni la de su influencia en la flora del mismo.

Siembras de aislamiento y observación de colonias correspondientes a cada fase

De cada una de las fases del mosto en fermentación antes fijadas, se realizaron siembras de aislamiento en gelatina ácida de mosto, y mantenidas a temperatura próxima, pero no inferior, a 20 °C, se esperó el desarrollo de las colonias, teniendo presentes las precauciones expuestas para cuando se observaba licuación de la gelatina o amenaza de moho, anticipando entonces el recuento de las colonias, agrupándolas según un aspecto aparentemente diferente y sembrando después, como antes se expuso, una o varias de las pertenecientes a cada grupo en

estrías radiadas y numeradas, sobre la superficie de agar de mosto solidificado en caja de Petri, y se continuó después su estudio, en momento oportuno.

Las observaciones del aspecto morfológico de las colonias se complementaron con las de preparaciones tomadas de las mismas, para observar al microscopio el de las células que las componían. Al calificar estos aspectos y su agrupación con respecto a tipos de referencia, se ha considerado conveniente considerar primero dos grupos diferentes; el de *levaduras apiculadas*, y el de *levaduras no apiculadas*, entendiéndose por las primeras las que generalmente son típicamente consideradas como tales, o sea, las del género *Kloeckera*, que por la importancia de su número y actuación en las primeras fases de la vinificación, son objeto de especial atención.

El aspecto morfológico de estas cepas no es siempre el típico de limón, por el que se las califica, sino que también presentan aspectos de células elípticas pequeñas, que pueden dar lugar a confusiones con otras células jóvenes de distinto género, en las observaciones de aspectos. Por esta razón, son especialmente necesarias las comprobaciones de las observaciones referentes a las levaduras apiculadas en cuestión, con la de colonias de cultivos simultáneos de la misma muestra, especialmente en gelatina de mosto, en la que además de apreciar un aspecto macro y microscópico, suelen acusar licuación del medio.

Las levaduras *no apiculadas*, en el sentido expuesto (pues hay géneros como los *Saccharomyces*, *Nadsonia*, *Hanseniaspora*, que tienen forma apiculada, pero de aspecto y propiedades muy diferentes), se agruparon por su aspecto morfológico, en diez grupos, según diez muestras tipo de referencia, que se presentan en la *figura 7*, tomada de Lodder y Kreger-Van Rij (3).

Su descripción es la siguiente:

Tipo 1. Células elípticas, elíptico-redondeadas y redondas esporógenas. Con estos aspectos se señalaba principalmente a las similares al *Saccharomyces cerevisiae* y variedad *elipsoideus*, diferenciando las formas redondas de las tómulas, por apreciar entre ellas algunas francamente esporuladas. Esto se referirá a las observaciones de colonias, pero en las de mosto, el tamaño de las células redondas de *S. cerevisiae*, es, por regla general, bastante mayor que el de las tómulas.

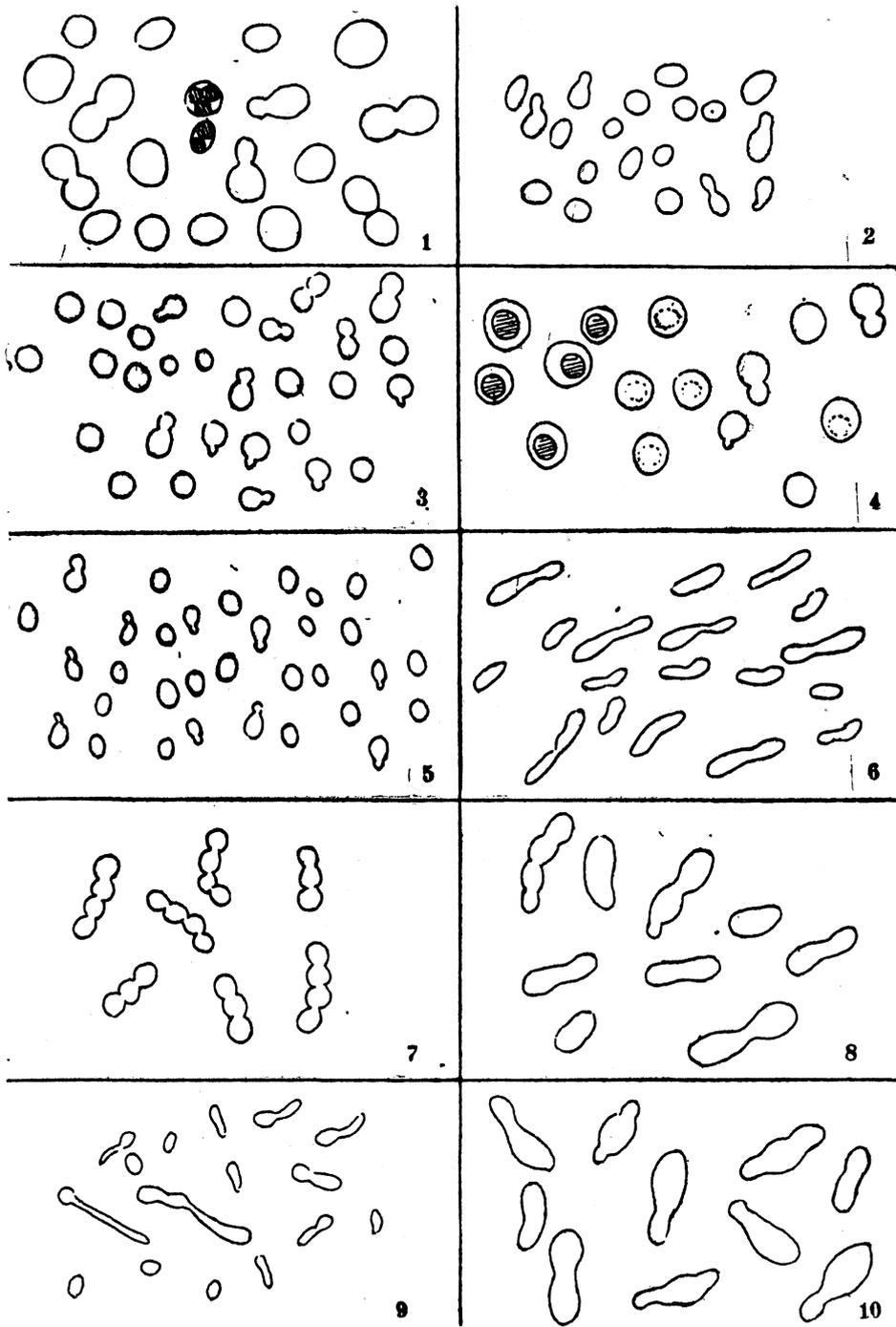


Figura 7

Tipo 2. Células elíptico-ovales, de menor tamaño que las del tipo 1, similares al *Saccharomyces chevalieri*.

Tipo 3. Células típicamente redondas, algunas con gránulos con aspecto de grasa. Similares a varias tórulas.

Tipo 4. Con formas que se destacan por su mayor tamaño (gigantes), redondas y con corpúsculo graso grande y arco como de membrana, desprendido.

Tipo 5. Formas elípticas pequeñas, asimilables a *Torulopsis molischiana*.

Tipo 6. Formas marcadamente alargadas, sin ser miceliar. Asimilable a alguna *Candida*, como la *C. rugosa*.

Tipo 7. Redondas y con tendencia a agruparse formando rosarios. Asimilable a *Torulopsis stellata*.

Tipo 8. Formas mazudas, algunas extrañas. Asimilables a la *Candida seudotropicalis* y a formas del género *Trichosporon*.

Tipo 9. Pequeñas y con gemación semejante a forma miceliar. Asimilables a *Candida tenuis*.

Tipo 10. Alargadas, grandes y con forma de limón. Asimilables a *Saccharomyces* y *Nadsonia*.

A continuación se presenta en una serie de cuadros, la impresión conjunta de los resultados finales del estudio aludido, en los que se reflejan, lo más fielmente posible, la flora de levaduras de una localidad vinícola y su evolución en las distintas fases de la elaboración.

En el *cuadro 1*, se exponen los porcentajes correspondientes a la proporción con que aparecen las levaduras apiculadas y las no apiculadas correspondientes a cada muestra y fases respectivas.

En el *cuadro 2* se reúnen los datos que figuran en el anterior, presentando la media de los porcentajes correspondientes al conjunto de muestras de cada fase. Con ello se aprecia, de manera más aproximada a la realidad, la evolución de las proporciones observadas en las diferentes fases.

En esta observación se comprueba, una vez más, el descenso de la proporción en que aparecen las levaduras apiculadas a medida que

avanza la fermentación y con ello el crecimiento en alcohol del medio.

El porcentaje expuesto en la primera fase, aunque alto, pudo comprobarse que en las últimas revisiones de las cajas observadas, aún pudo apreciarse, en algunas de ellas, más colonias de levaduras apiculadas, colonias que por la pequeñez de su tamaño (denominadas de punta de alfiler) pasaron desapercibidas en una primera impresión, por haber sido confundidas con cristales de bitartrato, que aparecen también en agar o gelatina de mosto, con parecido tamaño; aunque se hicieron las correcciones oportunas, cabe la posibilidad de que aún no fueran generales a todas las cajas, lo que quiere decir que el porcentaje de apiculadas pudo ser mayor en estas primeras fases.

Cuadro 1. Proporción en que aparecen las levaduras apiculadas y las no apiculadas en las diferentes fases de la fermentación del mosto, fijadas por las riquezas en azúcar que presentan

Fases del consumo de azúcar Gramos/litro	Porcentaje medio de levaduras apiculadas	Porcentaje medio de levaduras no apiculadas	Observaciones
Fase primera (250-200)	52,70	47,30	Estos porcentajes son la media de los correspondientes a 7 muestras
Fase segunda (200-120)	34,00	66,00	Al final del estudio pudo observarse que muy pequeñas colonias, casi perceptibles, eran también apiculadas
Fase tercera (120-90)	21,33	78,67	En esta fase tercera, una de las muestras presentó elevada acidez volátil y se apreció un desarrollo anormal de apiculadas
Fase cuarta (90-50)	3,00	97,00	
Fase quinta (50-10)		100,00	
Fase sexta (10-1)			

En el *cuadro 3* se detallan los porcentajes correspondientes a las proporciones en que aparecen las cepas de levaduras no apiculadas referentes a cada uno de los diferentes tipos, que por el aspecto morfológico, se han definido anteriormente.

Las cifras correspondientes a estos porcentajes son, a su vez, valores medios relativos a las siete muestras estudiadas.

Clasificación de cepas de levaduras correspondientes a los diferentes grupos

De los grupos de cepas de levaduras formados, se tomó un número de éstas aproximadamente proporcional al que integra cada grupo, con el fin de realizar su clasificación.

En los *cuadros 4-8*, figuran en la segunda columna los porcentajes del número de cepas que en cada fase corresponden a cada una de las formas de células elegidas como tipo. En la tercera columna figuran los números de especies correspondientes a las cepas clasificadas de cada grupo, pudiendo apreciarse que hay variedad entre ellas a pesar de corresponder a un mismo tipo o aspecto, pero también hay varias especies iguales, y otras que no pueden tener fases de desarrollo de mayor semejanza.

Después, con el fin de conocer la proporción que representan con respecto al número total de células observadas las cifras correspondientes al número de cepas de cada especie y grupo, se dividió la cifra de los porcentajes que con respecto al total de cepas corresponde a cada tipo (columna segunda), en partes proporcionales a los números correspondientes a cada especie.

En la cuarta columna figuraban dichas cifras.

Finalmente, en el *cuadro 9* se da una impresión conjunta de la flora de levaduras, presentando los porcentajes con que aparecen en cada fase cada una de las especies que en ella figuran (*).

(*) En las formas correspondientes a los últimos tipos y, en especial, en las últimas fases, quedaban aún varias cepas por clasificar cuando se hizo el presente resumen con el fin de presentar el método de estudio seguido.

Cuadro 2. Proporciones en que aparecen las levaduras

Fase 1. ^a 250-200 g/l, de azúcar			Fase 2. ^a 200-120 g/l, de azúcar			Fase 3. ^a 120-90 g/l, de azúcar		
Mues- tra	Levaduras Porcentaje		Mues- tra	Levaduras Porcentaje		Mues- tra	Levaduras Porcentaje	
	Apicu- ladas	No apicu- ladas		Apicu- ladas	No apicu- ladas		Apicu- ladas	No api- lada
1	48	52	1	38	62	1	13	
2	65	35	2	46	54	2		
3			3			3		
4			4	11	89	4	8	92
5	41	59	5			5	43	57
6	85	15	6			6		
7	24	76	7	41	59	7	(*)	
Porcentaje medio	52,7	47,3		34	66		21,33	78,6'

(*) El vino se picó en esta fase y el número de levaduras apiculadas se elevó

apiculadas y las no apiculadas en las diferentes fases

Fase 4. ^a 90-50 g/l, de azúcar			Fase 5. ^a 50-10 g/l, de azúcar			Fase 6. ^a 10-1 g/l, de azúcar		
Mues- tra	Levaduras Porcentaje		Mues- tra	Levaduras Porcentaje		Mues- tra	Levaduras Porcentaje	
	Apicu- ladas	No apicu- ladas		Apicu- ladas	No apicu- ladas		Apicu- ladas	No apicu- ladas
1		100	1		100	1		
2	3	97	2			2		
3			3			3		
4			4			4		
5			5			5		
6			6			6		
7			7			7		
	3	97						

en 76 por ciento.

Cuadro 3. Proporción en porcentaje en que aparecen las cepas de levaduras correspondientes a cada tipo, con respecto al total y proporción correspondiente a cada especie, de un grupo de cepas clasificadas del mismo tipo. Fase 1ª

Tipo	Porcentaje correspondiente a cada tipo	Especies clasificadas	Proporción correspondiente del porcentaje de cada especie	
1	34,90	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	16,62
		<i>S. ellipsoideus</i>	2	3,32
		<i>S. oviformis</i>	4	6,66
		<i>S. veronae</i>	1	1,66
		<i>S. chevalieri</i>	1	1,66
		<i>S. carlsbergensis</i>	1	1,66
		<i>S. heterogenicus</i>	1	1,66
		<i>S. rosei</i>	1	1,66
		2	32,33	<i>S. heterogenicus</i>
<i>S. ellipsoideus</i>	1			8,08
<i>S. cerevisiae</i>	1			8,08
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	1			8,08
3	25,40	<i>S. veronae</i>	25,9 (*)	29,90
		<i>S. veronae</i> (?)		
4	1,95			
5	0,27			
6	1,30			
7	1,10	<i>Torulopsis candida</i>		1,10
8	1,10			
9	0,37			
10	0,87	<i>S. steineri</i>		0,87

(*) Por ser el *Saccharomyces veronae* de forma redondeada, pero más pequeña que el *S. cerevisiae*, es posible que células jóvenes de esta especie fueran confundidas con formas de *S. veronae*.

Cuadro 4. Proporción en porcentaje en que aparecen las cepas de levaduras correspondientes a cada tipo, con respecto al total y proporción correspondiente a cada especie, de un grupo de cepas clasificadas del mismo tipo. Fase 2ª

Tipo	Porcentaje correspondiente a cada tipo	Especies clasificadas		Proporción correspondiente del porcentaje de cada especie
1	38,95	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	29,21
		<i>S. ellipsoideus</i>	1	4,87
		<i>S. steineri</i>	1	4,87
2	11,60	<i>S. ellipsoideus</i>	1	1,29
		<i>S. cerevisiae</i>	2	2,50
		<i>S. acidifaciens</i>	1	1,29
		<i>S. microellipsodes</i>	1	1,29
		<i>S. uvarum</i>	1	1,29
		<i>Candida solani</i>	2	2,56
		<i>C. krusei</i>	1	1,29
3	28,05	<i>S. veronae</i>	1	5,61
		<i>S. cerevisiae</i>	1	5,61
		<i>S. rosei</i>	2	11,22
		<i>S. fermentati</i>	1	5,61
4	4,78			
5	0,37			
6	2,33			
7	0,00			
8	5,81	<i>C. pulcherrima</i>	2,90	2,90
		<i>C. intermedia</i>	2,90	2,90
9	6,80			
10	1,30			

Cuadro 5. Proporción en porcentaje en que aparecen las cepas de levaduras correspondientes a cada tipo, con respecto al total y proporción correspondiente a cada especie, de un grupo de cepas clasificadas del mismo tipo. Fase 3ª

Tipo	Porcentaje correspondiente a cada tipo	Especies clasificadas	Proporción correspondiente del porcentaje de cada especie	
1	32,32	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	18,40
		<i>S. ellipsoideus</i>	1	4,60
		<i>S. steineri</i>	1	4,60
		<i>S. fructuum</i>	1	4,60
2	21,02	<i>S. fructuum</i>	1	10,51
		<i>S. veronae</i>	1	10,51
3	13,10	<i>S. rosei</i>	13,10	13,10
4	5,72	<i>S. heterogenicus</i>	5,72	5,72
5	5,10	<i>Candida krusei</i>	5,10	5,10
6	1,46	<i>S. veronae</i>	3,63	3,63
7	3,63			
8	2,30	<i>S. florentinus</i>		2,30
9	0,50	<i>S. rosei</i>		0,50
10	3,72	<i>C. krusei</i>		3,72

Cuadro 6. Proporción en porcentaje en que aparecen las cepas de levaduras correspondientes a cada tipo, con respecto al total y proporción correspondiente a cada especie, de un grupo de cepas clasificadas del mismo tipo. Fase 4ª

Tipo	Porcentaje correspondiente a cada tipo	Especies clasificadas		Proporción correspondiente del porcentaje de cada especie
1	49,25	<i>Saccharomyces oviformis</i>	4	28,74
		<i>S. cerevisiae</i>	1	7,036
		<i>S. ellipsoideus</i>	1	7,036
		<i>S. italicus</i>	1	7,036
2	35,45	<i>S. italicus</i>	2	10,13
		<i>S. elegans</i>	1	5,06
		<i>S. veronae</i>	1	5,06
		<i>S. fructuum</i>	1	5,06
		<i>S. chevalieri</i>	2	10,13
3	3,63	<i>S. veronae</i>	3,63	3,63
4				
5	1,46			
6	3,63	<i>S. veronae</i>	3,63	3,63
7				
8	2,30	<i>S. florentinus</i>	2,30	2,30
9	0,50	<i>S. rosei</i>	0,50	0,50
10	3,72	<i>Candida krusei</i>	3,72	3,72

Cuadro 7. Proporción en porcentaje en que aparecen las cepas de levaduras correspondientes a cada tipo, con respecto al total y proporción correspondiente a cada especie, de un grupo de cepas clasificadas del mismo tipo. Fase 5ª

Tipo	Porcentaje correspondiente a cada tipo	Especies clasificadas	Proporción correspondiente del porcentaje de cada especie
1	51,85	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	1 8,64
		<i>S. steineri</i>	2 17,29
		<i>S. oviformis</i>	1 8,64
		<i>S. rosei</i>	1 8,64
		<i>S. cerevisiae</i>	1 8,64
2			
3			
4			
5			
6	6,50		
7	2,50		
8	6,25		
9			
10	5,00		

Cuadro 8. Proporción en porcentaje en que aparecen las cepas de levaduras correspondientes a cada tipo, con respecto al total y proporción correspondiente a cada especie, de un grupo de cepas clasificadas del mismo tipo. Fase 6ª

Tipo	Porcentaje correspondiente a cada tipo	Especies clasificadas	Proporción correspondiente del porcentaje de cada especie
1	43,640	<i>Saccharomyces veronae</i>	1 3,63
		<i>S. cerevisiae</i>	5 18,20
		<i>S. oviformis</i>	4 14,55
		<i>S. ellipsoideus</i>	1 3,63
		<i>S. montanchez</i>	1 (*) 3,63
2	11,450		
3	22,030		
4	1,590		
5	1,720		
6	5,570		
7	0,400		
8	12,600		
9	0,000		
10	0,977		

(*) *Saccharomyces montanchez* presenta características de especie nueva, por lo que hasta su confirmación se la designa con este nombre.

Cuadro 9. Cuadro conjunto de los porcentajes correspondientes a cada especie de levaduras en cada una de las fases

Especies	Fase 1 ^a	Fase 2 ^a	Fase 3 ^a	Fase 4 ^a	Fase 5 ^a	Fase 6 ^a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24,7	36,11	18,40	7,04	8,64	18,11
<i>S. ellipsoideus</i>	11,5	6,10	4,60	7,03		3,60
<i>S. oviformis</i>	6,7			28,14	8,64	14,55
<i>S. veronae</i>	27,1	5,61	10,51	8,69		3,64
<i>S. chevalieri</i>	1,7			10,13		
<i>S. carlsbergensis</i>	1,7		5,72		8,64	
<i>S. heterogenicus</i>	9,8		13,10	0,50		
<i>S. rosei</i>	1,7	11,22	4,60		8,64	
<i>S. steineri</i>		4,87			17,30	
<i>S. acidifaciens</i>		2,56				
<i>S. microellipsodes</i>		1,29				
<i>S. uvarum</i>		1,29				
<i>S. fermentatis</i>		5,61				
<i>S. fructuum</i>			15,11	5,06		
<i>S. italicus</i>				17,16		
<i>S. elegans</i>				5,06		
<i>S. florentinus</i>				2,30		
<i>S. montanhez</i>						
No identificadas	7,0	15,58	22,88	1,96		3,64
<i>Candida krusei</i>		1,29	5,10	3,72	51,86	56,33
<i>C. pulcherrima</i>		5,81				
<i>C. solani</i>	8,1	2,56				
<i>Hansenula subpelliculosa</i>						
<i>T. stellata</i>				3,70		

Se destaca la elevada cifra del porcentaje del *Saccharomyces veronae* en la primera fase, la que no es probablemente tan frecuente. Si se observa que fueron elegidas solamente tres cepas del tipo 3 y pudieron ser casualmente *S. veronae*, pero lo más probable, por ser las formas del tipo 3 más pequeñas y redondeadas, pudieron ser confundidas con *S. cerevisiae* jóvenes. Lo que destaca un fallo evidente de los juicios basados en aspectos morfológicos.

En la segunda fase se aprecia la hipótesis anterior, quedando el *Saccharomyces veronae* en proporción muy inferior y el *S. cerevisiae* junto con su variedad *S. ellipsoideus* en un porcentaje más real.

Observaciones relativas a los métodos y técnicas empleados en este estudio

Con el método últimamente seguido en el estudio correspondiente a la localidad de Montánchez (Cáceres), se ha conseguido una mayor seguridad de la realidad de los resultados, referentes a la «flora» de levaduras existentes en las diferentes fases de la elaboración vínica de esta localidad. A pesar de ello, aún se aprecian causas de posible error, las que se tendrán presentes en otros estudios, para su corrección; lo que evidentemente se destaca es la necesidad de clasificar un número mayor de cepas de levaduras para llegar a resultados más seguros, pues aunque el estudio se reduce al de la localidad solamente, y que se han clasificado más de cien cepas de levaduras, correspondientes, a su vez, a diferentes grupos, integrado cada uno por numerosas cepas de un aspecto homogéneo, calificado por aún mayor número de observaciones y recuentos, los resultados no ofrecen aún suficiente seguridad, siendo necesario seguir el estudio en más años sucesivos, para llegar a resultados que, sin satisfacer por completo a las exigencias de un estudio correctamente estadístico, puedan ser satisfactorios para un juicio aceptable de la «flora» de levaduras de una localidad.

Observaciones relativas a las técnicas seguidas para la clasificación

La clasificación requiere tiempo y atención con conocimiento técnico del asunto, por lo que cuando el número de cepas es numeroso, aunque los estudios en serie pueden simplificarse en algunas fases, es una labor larga y penosa, que no siempre se resuelve con aumento de personal dedicado a ella; siendo esto también una de las principales causas que limitan el número de cepas a clasificar.

Las técnicas empleadas en este estudio han sido las de Lodder y Kreger-Van Rij (3).

Respecto a la asimilación de azúcares, no siempre nos dió resultados satisfactorios el método auxanográfico expuesto, pues no acusó suficiente precisión en varios casos, unas veces por falta de desarrollo bien acusado, a pesar de tratarse de azúcar que debía ser asimilado, y otras, excesivo desarrollo del campo correspondiente a uno de ellos, invadiendo el de otro vecino, en el que no pudo apreciarse el suyo correspondiente.

El método es delicado y exige un punto óptimo de humedad del agar, que permita el desarrollo del cultivo sin exceso de agua en la superficie. La técnica de Lodder da detalles para conseguirlo y también se aplicaron algunos otros complementarios con el mismo objeto, sin conseguirlo siempre con seguridad.

Con el fin de evitar esta posible interferencia de unos azúcares con respecto a otros, se ensayó el procedimiento que sigue.

Se prepararon una serie de cajas de Petri estériles, en número igual al de azúcares a ensayar, y una más para testigo. En cada caja se vertió el contenido de un tubo de agar fundido ya a una temperatura de unos 40 °C; este agar fue del empleado por Lodder en los ensayos de asimilación de azúcares. Antes de verter el agar fundido en la caja de Petri, se realiza la adición del azúcar correspondiente, tomándole asépticamente con la punta de una pequeña espátula, de la caja de Petri, en la que se conserva estéril. La esterilización se había realizado empapando (sin exceso) el azúcar en alcohol de 96° y evaporándole después en estufa a 30 °C, donde se coloca semiabierta la caja con el azúcar. Esta operación se repite tres veces sucesivas, dando por suficientemente estériles los azúcares que en esta práctica se van a emplear.

También se añaden unas tres gotas de solución de extracto de levadura (esterilizado por filtración micróbica), como fuente de vitaminas. Después de solidificado el agar, y mantener la caja de Petri entreabierta en estufa a 25-30 °C, durante unas tres horas, se procedió a la siembra en estrías de las levaduras a ensayar. En cada caja se sembraron solamente 4-5 estrías, cada una correspondiente a una cepa diferente. Se lleva la caja a estufa a 25 °C, y a las cuarenta y ochosetenta y dos horas, ya suelen acusarse diferencias marcadas entre las estrías de las cajas correspondientes a los azúcares asimilados y las de la caja testigo (sin azúcares), en la que sólo suelen presentarse indicios de desarrollo.

En la *figura 8* se destaca claramente la estría de una levadura que asimila el azúcar correspondiente, junto con otras que no lo asimilan.

Este procedimiento, aunque da muchas veces resultados satisfactorios, presenta en algunos casos posible error, y esto sucede cuando el desarrollo es más vigoroso, debido a la naturaleza de las células de levadura que integran la estría, y no sólo será mayor el desarrollo, sino el correspondiente consumo de azúcar y demás materias nutritivas del medio, que perjudicará o anulará el desarrollo de las otras estrías de

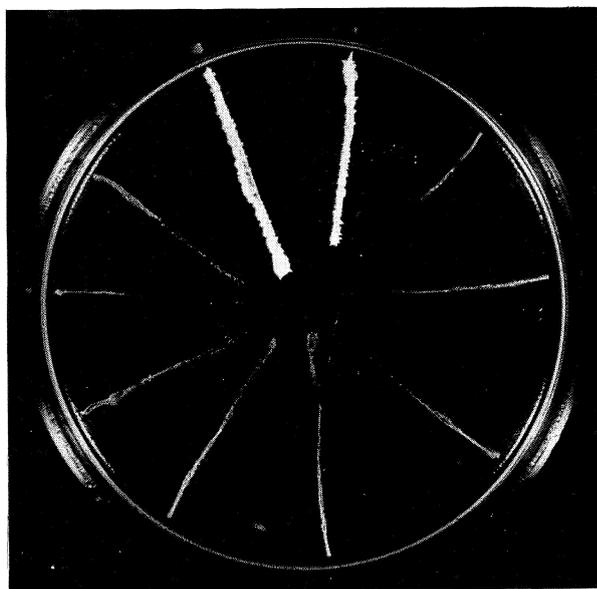


Figura 8. Estrias correspondientes a diferentes levaduras, para comprobar las que asimilan un determinado azúcar añadido al agar (de ensayo de asimilación), sobre el que están sembradas las estrias, acusándose francamente las dos levaduras que lo asimilan en este caso

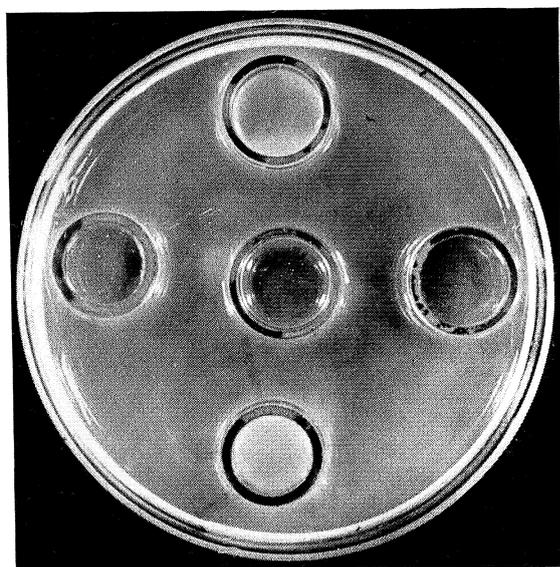


Figura 9. Modificación del método auxanográfico de ensayo de asimilación de azúcares, limitando con anillos de vidrio los campos de difusión de los azúcares depositados sobre el agar del método, previamente sembrado con una de las levaduras en estudio. Se aprecia franca opalescencia en los campos de los anillos correspondientes a los azúcares asimilados

menos vigor. Estas no podrán llegar ya a un buen desarrollo, aunque pudieran haberlo alcanzado en ausencia de las otras.

Simultáneamente a los citados ensayos, tuvimos noticia del método empleado en Italia por Capriotti, que había sido adoptado en España por Iñigo. En este método, con el mismo fin que en el nuestro, se trata de evitar los inconvenientes del auxanográfico, pero en vez de realizar la siembra de las estrías en una caja de Petri, realiza la de cada una en un tubo con agar en pico de flauta, teniendo cada serie de tubos el azúcar correspondiente.

Este método exige más material y tiempo que el ensayado por nosotros, pero es de resultados bastante satisfactorios. La modificación por este autor del medio de cultivo, también es práctica, pues emplea el extracto de levaduras como fuente de vitaminas, en vez de la numerosa serie necesaria y de delicada preparación que se indica en el método auxanográfico de Lodder y Kreger-Van Rij, por lo que fue adoptado también por nosotros.

Método últimamente empleado

Con satisfactorios resultados hemos ensayado una modificación del método, que a continuación se describe. En una caja de Petri, se vierte asépticamente un tubo de agar del preparado por Capriotti, sin sembrar; una vez solidificado, se vierte sobre él otro sembrado con la levadura a ensayar. Cuando, a su vez, este segundo agar está bien solidificado, se colocan también asépticamente cinco anillos de cristal de unos 1,5 cm de altura y 2 cm de diámetro. Estos anillos se disponen, uno, en el centro y los otros cuatro, simétricamente, sin llegar a la pared de la caja. Después se incrustan en el agar, procurando tocar el fondo de la caja. Se lograba fácilmente esta operación, presionando los anillos con la base de un tubo de ensayo (flameado) de diámetro superior al de ellos.

Conseguido con esta disposición de los anillos aislar cinco círculos del agar sembrado, se colocan después sobre cada uno de ellos unos cristales del azúcar a ensayar, como se realiza en el método auxanográfico. Se lleva la caja a estufa de 20°-25 °C, y a las veinticuatro-cuarenta y ocho horas, suelen ya apreciarse los desarrollos de la levadura en los discos que contienen los azúcares asimilados. En la *figura 9* se apre-

cian claramente los dos discos con desarrollo y otros dos, en los que ya no aparecen, o sólo indicios poco sensibles.

Respecto a otras determinaciones, también se ha tratado de simplificarlas, ensayando modificaciones aún no satisfactorias o pendientes de nuevas modificaciones.

AGRADECIMIENTO

Deseamos destacar la eficaz colaboración de la Srta. Pilar Marcilla, Auxiliar del Consejo, que lleva más de diez años en este laboratorio, actuando con eficacia y entusiasmo.

RESUMEN

De lo expuesto se deduce que para el estudio de la «flora» de levaduras de una localidad vinícola, y mucho más para una región, se requiere un largo y penoso estudio, partiendo de numerosas muestras rigurosamente controladas, de las que se aislen cepas de levaduras en número suficiente para reflejar las características del conjunto, aplicar después un rápido y eficaz método para una primera apreciación de sus diferencias, y larga y concienzuda clasificación posterior para conocer la proporción en que aparecen las diferentes especies, lo más aproximadamente posible, a la existencia en la localidad.

Se han expuesto métodos y normas para la realización de lo expuesto, apreciando los puntos en que pudo haber fallos, y encontrando siempre, como consecuencia, que las muestras, cepas aisladas de las mismas y cepas clasificadas deben ser aún más abundantes que las del trabajo realizado.

Resaltando, además, que si esto se ha observado en lo que al estudio de la «flora» de una localidad se refiere, acusa la magnitud requerida cuando el estudio se refiere a una región entera.

SUMMARY

The applied rules in the study of the spontaneous flora of yeasts from two Spanish vine-growing villages are set out and commented on. Several causes, which can wrongly influence this kind of study are

stressed, and a few modifications are proposed in several rules and techniques commonly employed.

BIBLIOGRAFIA

1. CASTELLI, T., e IÑIGO, B. 1958. Los agentes de la fermentación vínica en la región manchega y zonas limítrofes. Cuadernos Dept. Ferment. Industriales, núm. 13.
2. FEDUCHY, E., y SANDOVAL, J. A. 1960. Contribución al estudio de los vinos típicos españoles y de la «flora» de levaduras con ellos relacionada (vinos de La Nava del Rey y de Rueda). Bol. Inst. Nacl. Invest. Agron. (Madrid), 42, 1.
3. LODDER, J., y KREGER-VAN RIJ, N. J. W. 1952. The Yeasts. A taxonomic study. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
4. MARCILLA, J.; ALAS, G., y FEDUCHY, E. 1936. Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico. Anales Centro Invest. Vinícolas, 1, 1.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACIDO NALIDIXICO (WIN 18320) FRENTE A DIVERSAS ESTIRPES DE GRAM-NEGATIVOS

por

V. CALLAO y A. RAMOS

INTRODUCCION

Desde que Leshner (5) sintetizó este nuevo agente, el 1-etil-7-metil-1, 8-naftiridin-4-ona-3-carboxílico, han sido muchas las publicaciones que respecto al mismo se han efectuado, continuando en la actualidad realizándose trabajos de investigación sobre este producto (3 y 12), que parece ser ha influido mucho en el tratamiento de las infecciones producidas por gérmenes gram-negativos.

La mayor parte de los autores consideran que su principal indicación clínica son las infecciones urinarias, pero no desechan la posibilidad de actuación sobre flora gram-negativa de otros procesos, e incluso su aplicación frente a algunos gram-positivos, como el estafilococo (10).

El producto une a su poder antibacteriano su poca toxicidad (4), lo que incrementa su valor clínico, pues por regla general el mayor inconveniente en los buenos agentes quimioterápicos es el de su aplicación terapéutica, por los procesos secundarios que pueda ocasionar.

Nuestro interés en este trabajo se centra en comprobar la efectividad de este producto frente a diversas cepas bacterianas conservadas en el laboratorio de la Cátedra, pues los problemas que representan las infecciones por *Proteus* y *Pseudomonas* (2) podrían ser resueltos.

MATERIAL Y METODO

Hemos realizado un estudio del valor antibacteriano *in vitro* del ácido nalidíxico, frente a 494 estirpes de gérmenes gram-negativos, de las cuales, 493 procedían de orinas infectadas, y la una restante fue aislada de un proceso supurativo en el oído. Para la clasificación de estirpes nos valimos de los datos obtenidos por Sedlak y Rische (9), de acuerdo en todo momento con la sistemática de Bergey (1).

La descripción detallada de los gérmenes ensayados es la siguiente:

Gérmenes causales de infecciones urinarias

<i>Escherichia coli</i>	200
<i>Paracolobactrum</i>	95
<i>Escherichia freundii</i>	49
<i>Klebsiella</i>	43
<i>Aerobacter</i>	17
<i>Proteus mirabilis</i>	33
<i>P. vulgaris</i>	12
<i>P. rettgeri</i>	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
	493

Germen causal de supuración en el oído

<i>Proteus mirabilis</i>	1
	1

Total de gérmenes ensayados = 494

La técnica que hemos utilizado en las pruebas de sensibilidad, está basada en la siembra radial en línea (5), que tiene la enorme ventaja de que con un solo disco del agente quimioterápico se pueden ensayar unos siete u ocho gérmenes diferentes, por lo que el procedimiento es más rápido y menos costoso.

En realidad, lo que hicimos fue modificar la anterior técnica, preparando unas bandas o tiras de papel de filtro impregnadas con el agente antibacteriano. La concentración utilizada fue de 10 μ g, dando como sensibles los gérmenes en los que se observaba zona de inhibición, y

como resistentes, cuando no se producía la mencionada zona. También preparamos discos y tiras a la concentración de 30 μg , con el fin de comparar nuestros discos con los preparados en las casas comerciales; en todos los casos, los resultados hallados en esta comparación fueron idénticos, con lo que tuvimos la seguridad de operar a la concentración apetecida.

En la *figura 1* queda explicada de forma más clara la manera de proceder en la siembra. Concretamente, puede observarse que todos los gérmenes allí probados fueron sensibles al ácido nalidíxico, apreciándose claras diferencias en el tamaño de los halos de inhibición.

Este procedimiento de la siembra con bandas tiene la ventaja respecto al procedimiento de la siembra radial con discos, de que el número de gérmenes objeto de prueba es muy superior, pues fácilmente pueden ensayarse unos cuarenta gérmenes en la misma placa, y con el mismo medio de cultivo.

RESULTADOS

En el *cuadro 1* se presentan los resultados obtenidos, agrupados los gérmenes en dos grupos: sensibles y resistentes.

Para los fines estadísticos generales hemos agrupado todas las especies de *Proteus*, aunque separadamente indiquemos que los casos de resistencia correspondieron todos ellos (tres razas en total) con la especie *Proteus mirabilis*, aislados en orinas infectadas.

Cuadro 1. Sensibilidad de 494 estirpes de gérmenes gram-negativos para el ácido nalidíxico (WIN 18320)

Microorganismo	Número de razas probadas	Sensibles Porcentaje	Resistentes Porcentaje
<i>E. coli</i>	200	100,00	0,00
<i>Paracolobactrum</i>	95	100,00	0,00
<i>E. freundii</i>	49	100,00	0,00
<i>Klebsiella</i>	43	97,68	2,32
<i>Aerobacter</i>	17	100,00	0,00
<i>Proteus</i>	50	94,00	6,00
<i>Pseudomonas</i>	40	90,00	10,00
Total (gram-negativos)	494	98,39	1,61

Con las estirpes resistentes hicimos un estudio más completo frente a otros agentes quimioterápicos, operación que también realizamos con otros gérmenes y que no incluimos en el presente trabajo; sin embargo, debemos resaltar el hecho de que más del 30 por ciento de los gérmenes probados únicamente fueron sensibles para el ácido nalidíxico, como nos muestran las fotografías que acompañan al trabajo (figuras 2-3).

En el cuadro 2 especificamos el comportamiento de las estirpes resistentes, que por regla general fueron muy poco sensibles a los demás agentes, si cabe, con la excepción del *Klebsiella*.

Cuadro 2. Sensibilidad in vitro de las razas resistentes al ácido nalidíxico

Agente quimioterápico	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>			<i>Pseudomonas</i>			
	1	1	2	3	1	2	3	4
Alfafenoxietilpenicilina	—	—	—	—	—	—	—	—
Penicilina	—	—	—	—	—	—	—	—
Dimetilisoalicilpenicilina	—	—	—	—	—	—	—	—
Metasulfonato de colimicina	—	—	—	—	—	—	—	—
Novobiocina	—	—	—	—	—	—	—	—
Eritromicina	—	—	—	—	—	—	—	—
Pantotenato de cloranfenicol	—	—	—	—	—	—	—	—
Cloranfenicol	+	—	—	+	—	—	—	—
Tetraciclina	—	—	—	—	—	—	—	—
Clorotetraciclina	—	—	—	—	—	—	—	—
Oxitetraciclina	+	—	—	—	—	—	—	—
Kanamicina	+	+	+	+	—	—	—	—
Estreptomina	+	—	—	—	—	—	—	—
Sulfameracina	—	—	—	—	—	—	—	—
Sulfametoxipiridoxina	—	—	—	—	—	—	—	—
Sulfadiacina	+	—	—	—	—	—	—	—
Sulfatiazol	+	—	—	—	—	—	—	—
Sulfametacina	—	—	—	—	—	—	—	—

Podemos, pues, de acuerdo con este cuadro, comprobar que las estirpes de *Pseudomonas* resistentes al ácido nalidíxico también lo fueron a los restantes agentes ensayados, lo que confirma nuestro

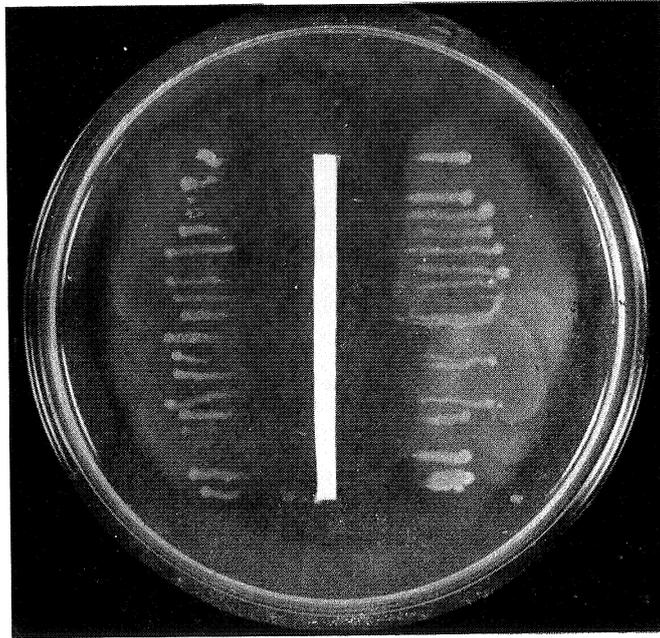


Figura 1

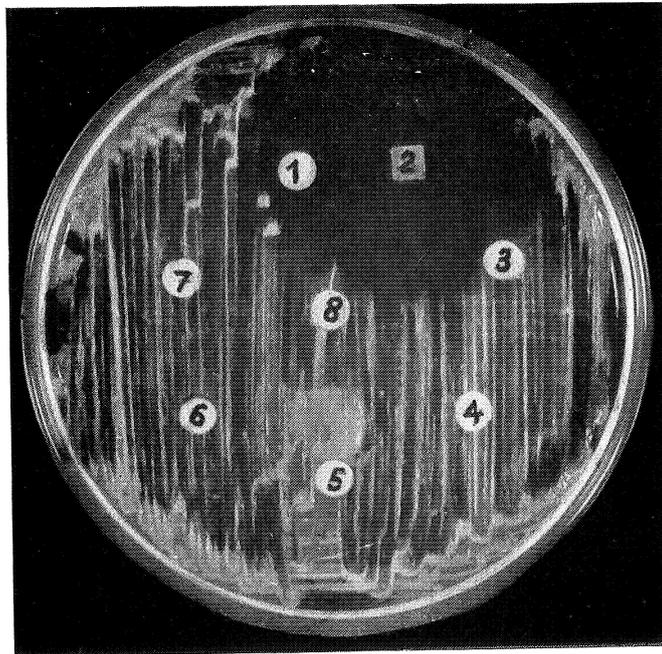


Figura 2. Espectro de una estirpe de *Pseudomonas*. 1: penicilina; 2: ácido nalidíxico; 3: metansulfonato de colimicina; 4: novobiocina; 5: oxitetraciclina; 6: clorotetraciclina; 7: estreptomomicina; 8: cloranfenicol

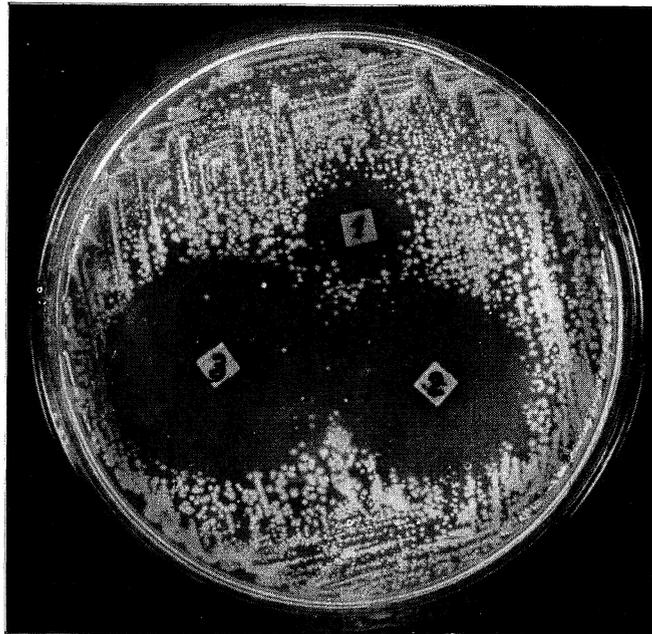


Figura 3. Sensibilidad in vitro de una estirpe de E. freundii, resistente a los demás agentes ensayados. 1-3: ácido nalidixico

criterio de que es éste el género más resistente, dentro de los gérmenes gram-negativos; problema en el tratamiento de infecciones urinarias, aun admitiendo que el número de infecciones por ellos ocasionadas sea relativamente bajo. Con el género *Proteus* se dio el hecho curioso de que las estirpes resistentes al ácido nalidíxico fueron sensibles todas ellas a la kanamicina (dándose también el hecho inverso, es decir, las estirpes de *Proteus*, resistentes a la kanamicina fueron todas ellas sensibles al ácido nalidíxico) y una fue sensible para el cloranfenicol. La única estirpe del género *Klebsiella* resistente al ácido nalidíxico fue sensible para un número relativamente elevado de agentes quimioterápicos (cloranfenicol, oxitetraciclina, kanamicina, estreptomycin, sulfadiazol y sulfatiazol).

COMENTARIOS

Con arreglo a los resultados obtenidos encontramos una proporción global de gérmenes sensibles del orden del 98,39 por ciento, quedando tan sólo el 1,61 por ciento resistentes al ácido nalidíxico. Esas cifras que demuestran su gran actividad *in vitro*, nos hacen suponer también una positiva aplicación clínica, sobre todo considerando los resultados obtenidos por Sleet y colaboradores (10).

Sin embargo, esa actividad teórica para los gérmenes gram-negativos, no es aplicable totalmente, ya que depende del lugar, ciudad o país en el que se realicen las pruebas. Concretamente, nosotros encontramos cifras idénticas a las halladas por Lishman y Swiney (7) con los gérmenes *Escherichia coli* (100 por ciento de sensibles), *Aerobacter aerogenes* (100 por ciento de sensibles), pero no así con los *Proteus* y *Pseudomonas*, para los que los mencionados autores encuentran cifras del 100 por ciento de sensibles, mientras que nosotros sólo las encontramos del 94 y 90 por ciento, respectivamente. Merecen destacarse a este respecto las investigaciones realizadas por Reiman-Hunziker (8), en las que describe las sensibilidades para los gérmenes *E. coli*, *Proteus* y *Pseudomonas* en diferentes países, encontrando claras diferencias, algunas de ellas enormes, como la relativa poca sensibilidad del *Pseudomonas aeruginosa* en Innsbruck (46 por ciento), y la elevada en New York (92 por ciento) y New Castle (100 por ciento). Pero incluso para el *E. coli*, germen descrito con sensibilidades del 100 por ciento en

casi todos los países, se encontró en Basilea que la cifra de sensibles era del 90 por ciento. Esto nos indica la necesidad de hacer un estudio de la sensibilidad en diferentes países, por lo que en el *cuadro 3* ampliamos los datos expuestos por Reiman-Hunziker (8), incluyendo la localidad de Granada, pues creemos que el número de gérmenes probados es suficiente para tal inclusión.

Cuadro 3. Estudio comparativo de la sensibilidad al ácido nalidíxico de diferentes gérmenes gram-negativos, en diferentes países (sensibilidades en porcentajes)

Lugar	<i>E. coli</i>	Coliformes	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i>
New York, N. Y.	100	98	97	92
Innsbruck	100	100	84	46
Basilea	90	100	93	91
Missouri	100	100	95	95
Ressenlaer, N. Y.	98	100	99	100
Granada	100	98	94	90
New Castle	100	80	100	100

CONCLUSIONES

Consideramos al ácido nalidíxico como uno de los agentes antibacterianos más activos *in vitro* para los gérmenes gram-negativos causales de infecciones urinarias (u otros procesos).

Aproximadamente un 30 por ciento de estirpes resistentes a una gran diversidad de agentes antibacterianos fueron sensibles al ácido nalidíxico.

El género *Pseudomonas* fue el menos sensible, encontrándose que las estirpes resistentes a este producto también lo fueron respecto a los demás agentes. *Proteus* (*P. mirabilis*) y *Klebsiella* fueron proporcionalmente algo resistentes a este producto, aunque existiese sensibilidad para otros agentes:

Creemos conveniente obtener el espectro antibacteriano del germen causal antes de iniciar el tratamiento.

RESUMEN

Hemos realizado pruebas de sensibilidad *in vitro* con el ácido nalidíxico, frente a un total de 494 estirpes diferentes de gérmenes gram-negativos, según técnica original.

Los resultados muestran una gran actividad de este agente antibacteriano. El *Pseudomonas* fue el germen menos sensible.

SUMMARY

We have made resistance test with nalidixic acid, on 494 Gram negative organisms, by an original technique.

The results shown the great activity of this antibacterial agent: 98.39 per cent were sensitives.

Pseudomonas was less sensitive.

BIBLIOGRAFIA

1. BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 1957. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. CALLAO, V., y RAMOS, A. 1965. Efecto *in vitro* de los quimioterápicos de más frecuente uso en el tratamiento de las infecciones de las vías urinarias producidas por gérmenes gram-negativos, Actualidad Med., 408-25.
3. HOLLANO, J. T., y MONTGOMERIE, J. Z. 1964. Treatment of urinary tract infection with nalidixic acid. New Zealand Med. J., 63, 498-501.
4. JAMESON, R. M., y SWINNEY, J. 1963. A clinical trial of the treatment of Gram negative urinary infections with nalidixic acid. Brit. J. Urol., 35, 122-24.
5. KANAZAWA, Y. 1961. Clinical use of the disc sensitivity test. Antimicrobial Agents Chemotherapy 921-42. American Society for Microbiology.
6. LESHNER, G. Y. 1961. A summary of laboratory and clinical tolerance of WIN 18320. A new urinary antiseptic and chemotherapeutic agent for treatment of Gram negative infection. Sterling-Winthrop Research Institute Rensselaer, Nueva York.
7. LISHMAN, I. V., y SWINNEY, J. 1963. Studies of a new antibacterial agent, nalidixic acid (WIN 18320). Brit. J. Urol., 35, 116-21.
8. REIMAN-HUNZIKER, G. J. 1964. Erfahrungen mit dem neuen Chemotherapeuticum Nalidixinsäure (Negram) gegen Gram negative Erreger. Helv. Chim. Acta, 31, 403-7.

9. SEDLAK, J., y RISCHE, H. 1962. Enterobacteriaceae-Infektionen. Georg Thieme, Leipzig.
10. SLEET, R. A.; GRAY, W.; CALDER, M., y MURDOCH, J. McG. 1964. Treatment of urinary tract infection with nalidixic acid. A clinical trial. *Chemoterapia*, 8, 137-41.
11. TOVIA, F. A., y RAMÍREZ, A. V. 1963. Acido nalidíxico. Ensayo terapéutico y actividad microbiana *in vitro*. *Prensa Med. Mex.*, 28, 47-53.
12. WARRES, H. L. 1964. Use of nalidixic acid in the treatment of urinary tract infections. *Missouri Med.*, 61, 27-9.

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

SALMONELLA DUBLIN Y S. BREDENEY EN COLECISTOS DE VACUNO DE ABASTO (*)

por

M. RODRIGUEZ-REBOLLO

La creciente importancia de la investigación de *Salmonella* en ganado de abasto queda plenamente justificada por ser el consumo de carnes y sus productos causa frecuente de toxiinfecciones.

Los estudios realizados en España por Ortiz y otros (20) señalan un 2,9 por ciento de *Salmonella* en muestras de heces humanas y, probablemente, si se diagnosticasen etiológicamente las enteritis de nuestra población se alcanzaría una mayor frecuencia.

Aunque las salmonelosis han sido denunciadas clínicamente en el bovino nacional (3), sus agentes causales no se han investigado sistemáticamente en vacuno de abasto. Por tal motivo, se consideraba interesante conocer la frecuencia de estas enterobacterias en reses vacunas.

PARTE EXPERIMENTAL

Material

Todas las muestras de colecistos procedían del Matadero Municipal de Madrid y las canales correspondientes, en un total de 202, fueron declaradas aptas para el consumo por la inspección veterinaria. El 55,9

(*) Este trabajo forma parte de la Memoria presentada por el autor en la Escuela de Bromatología (Universidad de Madrid) para la obtención del título de Técnico Bromatólogo.

por ciento de las reses eran menores de dos años (terneros) y el 44,1 por ciento superior a esta edad.

Métodos

Se emplearon los medios de aislamiento por siembra directa y mediante enriquecimiento. Se utilizó la modificación de Kauffman (16), del caldo-tetrionato (7), con soluciones de verde brillante y lugol, a concentraciones finales de 1/100.000 y 2/100, respectivamente, sin adición de bilis estéril. El caldo-selenito, de Leifson (26), fue el preparado por Oxoid (21). A cada dos matraces de caldos de enriquecimiento se añadían 1,5 ml de bilis problema y trozos aproximadamente de 9 cm² de las paredes vesiculares. Después de dieciocho horas de incubación, a 37 °C, se sembraban de selenito en agar *Salmonella-Shigella* (SS, 21) y del tetrionato en agar verde brillante (VB, 7 y 16) y Mac Conkey (MC, 7). Nuevamente, a las setenta y dos horas se sembraban en SS de selenito y de tetrionato en VB. Las siembras directas se hicieron sobre VB y MC.

Las colonias crecidas a 37 °C, a las dieciocho horas se aislaban en agar de Hajna-Roland (8). En la «identificación de grupo» se emplearon, además, los medios de Mossel (4), manita-movilidad, Roland-Bourbon (8) y Christensen (21), Clark y Lubs (4) con reactivo de Barritt, Simmons (4), gelatina (4), CNK (26) e Ilosvay (26). La identificación provisional de las bacterias ureasonegativas se completó con las pruebas de la ninhidrina (4), argininadihidrolasa (26) y glutámicodecarboxilasa (26) y la definitiva del género *Salmonella* con dextrotartrato (16), mucato (16) y malonato sódico (26). Por último, la identificación específica del citado género se hizo con arabinosa, inosita, ramnosa, trehalosa, xilosa, glicerina (medio de Stern), levotartrato (ácido l-tartárico Merck), mesotartrato (monohidrato de ácido mesotartárico Fluka) y citrato sódico (Merck), conforme a Kauffman (16).

En el análisis serológico se emplearon sueros de Wellcome, de Londres y la identificación fue confirmada por el Dr. Rhode, del Centro Internacional de *Salmonella* (*).

(*) El autor expresa su agradecimiento al Dr. Rhode por su colaboración.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las características bioquímicas de las 31 estirpes de *Salmonella* encontradas fueron las siguientes: *glucosa*, ácido y gas (8 estirpes) y ácido sin gas (23 estirpes); *lactosa*, negativa (treinta días); *hidrógeno sulfurado*, positivo en Hajna, excepto 6 estirpes, sólo positivas en medio de Mossel; *manita*, positiva; *movilidad*, positiva; *ureasa*, negativa; *indol*, negativo; *RM*, positivo; *VP*, negativo; *gelatinasa*, negativa (treinta días); *CNK*, negativo, y *nitratos*, positivo.

La identificación tipoespecífica de las *Salmonella* se hace en el cuadro 1. Distribuyendo las estirpes aisladas según las muestras a las que pertenecían, se concluye que se identifica en una vesícula biliar *Salmonella bredeney* y en catorce, *S. dublin*. Las fórmulas antigénicas que permiten incluirlas en estas especies fueron: 1, 4, 12, 27:1, v:1, 7 y 9, 12:g, p, respectivamente.

Salmonella bredeney presenta las características bioquímicas típicas (16), pero no las estirpes aisladas de *S. dublin*, que se diferencian especialmente en su comportamiento sobre la glicerina y ácidos orgánicos.

Se destaca, en primer lugar, que sólo cuatro de las estirpes de esta última especie producen gas en la glucosa; las demás son agasógenas, análogas a las encontradas por otros autores (19 y 22).

Las variedades admitidas de *Salmonella dublin* aparecen en el cuadro 2 (13, 16 y 19).

Si comparamos los cuadros 1 y 2 podemos incluir las estirpes de las muestras núm. 158, 170, 173 y 176 en *Salmonella dublin* var. 1, productoras de gas; las restantes estirpes, en la misma variedad, aunque agasógenas, pero les separa de las características bioquímicas típicas la no producción de trimetilglicol. Se elaboró el medio de Stern con diferentes extractos de carne (Difco y Bovril), obteniéndose siempre resultados iguales, y la esterilización del medio base a 105 °C, durante veinte minutos. El carácter negativo de trimetilglicol aproxima estas estirpes a *Salmonella rostock*, muy similar en estructura antigénica a *S. dublin*.

La acción de *Salmonella dublin* sobre los ácidos orgánicos, cuya utilidad fue destacada por Kauffman y Petersen (17), permite establecer diferencias entre las estirpes aisladas. Según Kauffman (16), el tipo fermentativo de *S. dublin* es el siguiente: D-tartrato, +; L-tartrato, +; M-tartrato, —; citrato, +, y mucato, variable.

Cuadro 1. Diferenciación tipoespecífica de las estirpes de Salmonella

Muestras	Arabinosa	Dulcita	Inosita	Ram-nosa	Treha-losa	Xi-losa	Stern	SH ₂	Gela-tina	D-tar-trato	L-tar-trato	M-tar-trato	Citrato sódico	Mu-cato
1	+	+	—	+	+	+	++	+	—	+	+	—	+	+
158	+ (7)	+	—	+	+	+	++	+	—	+ (5)	—	—	+	+
170	+ (12)	+	—	+	+	+	++	+	—	+ (5)	—	—	+	+
173	+ (4)	+	—	+	+	+	++	+	—	+ (5)	—	—	+	+
176	+ (7)	+	—	+	+	+	++	+	—	+ (5)	—	—	+	+
177	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+
178	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+
179	—	+	—	+	+	+	—	— (*)	—	+	+	—	—	+
181	—	+	—	+	+	+	—	— (*)	—	+	+	V	+	+
184	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+
189	—	+	—	+	+	+	—	— (*)	—	+	+	—	V	+
195	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	V	+
198	—	+	—	+	+	+	—	— (*)	—	+	+	—	+	+
200	—	+	—	+	+	+	—	— (*)	—	+	+	—	V	+
201	—	+	—	+	+	+	—	— (*)	—	+	+	—	+	+

Desde arabinosa hasta xilosa: += positivo, después de un día; los números entre paréntesis indican los días a los que fueron positivos; —= negativo, después de treinta días.

Medio de Stern: ++= lila, en dos-tres días; —= rosa claro o análogo al testigo, en ocho días.

En SH₂: += positivo, en medio de Hajna, en un día; —= negativo, en el mismo medio y tiempo; (*) positivo, en medio de Mossel.

En gelatina: —= no fluidificación, en treinta días.

En ácidos orgánicos: += positivo, en un día; los números entre paréntesis indican los días a los que fueron positivos; —= negativo, en catorce días; V= resultados variables, en diferentes pruebas.

Cuadro 2. Variedades de Salmonella dublin.

Variedad	Arabinosa	Dulcitol	Ramnosa	Medio de Stern
1	×	+	+	+, ++
2	×	×	+	+
3 ó coeln	×	+	×	++
4 ó teheran	×	×	×	++
5 ó hessarek	+	+	×	++
6 ó accra	+	+	+	+, ++
7 ó dawa	+	+	—	?

Glúcidos: += positivo, en un día; × = tardía e irregularmente positivo o negativo; — = negativo, en veintiocho días.

Stern: += color púrpura, al día octavo; ++ = color violeta, de los días primero a octavo.

El examen del *cuadro 1* muestra, por lo tanto, algunas variaciones en nuestras estirpes respecto al referido tipo fermentativo. Al repetir las experiencias, los resultados con levotartato y citrato seguían invariables.

Las *Salmonella* encontradas representan un 7,4 por ciento de contaminación de las muestras. En la mayoría de las veces, los terneros fueron los infectados (11, de 15 animales, de los cuales 10 eran machos y 1, hembra); sólo 4 reses mayores de dos años acusaron la presencia de estas enterobacterias. Jaeschke (14), Sakazaki, Yamada y Tajima (25) y Field (10) encuentran *Salmonella* en vesículas en proporciones del 5, 0,8 y 10 por ciento, respectivamente.

Salmonella bredeney se ha encontrado en un ternero y se cita por primera vez en España. Otros autores (2 y 12) la señalan también en terneros y Wetmore y Hoag (30), en ratones de laboratorio. Kantor (15) la ha encontrado en un caso de meningitis infantil. Fue aislada en Alemania, en diarreas y vómitos y de un enfermo con osteomielitis (31).

Salmonella dublin se nombra frecuentemente como agente etiológico del paratífus de los terneros (1, 8, 11, 18, 23-24 y 27-28) y de toxoinfecciones (5). Taylor (29), por el contrario, no encuentra esta especie en

el hígado de terneros, sino en vacuno adulto. Clarenburg y colaboradores (6) opinan que el vacuno adulto queda como portador, después de sufrir la infección.

RESUMEN

1. Se demuestra la existencia de *Salmonella bredeney* y *S. dublin* en vesículas biliares de vacuno de abasto aparentemente sano, en una proporción del 7,4 por ciento.

2. *Salmonella bredeney* y *S. dublin* se presentaron más frecuentemente en terneros que en vacuno mayor de dos años.

3. Las estirpes identificadas de *Salmonella dublin* pueden incluirse en la *variedad 1* por medio de la arabinosa, dulcitol y ramnosa, si bien diez de ellas eran agasógenas y diferían de los tipos fermentativos admitidos en su acción sobre el medio de Stern y ácidos orgánicos.

SUMMARY

1. The existence is proved of *Salmonella bredeney* and *S. dublin* in gall bladders of slaughtered cattle, apparently healthy, in proportion of 7.4 per cent.

2. The *Salmonella bredeney* and *S. dublin* were present more frequently in calves than in adult cattle.

3. The strains identified can be included in *variety 1* of *Salmonella dublin* by means of arabinose, dulcitol and ramnose, although ten of them did not produce gas and differed from the typical biochemical characteristics principally in their action in Stern broth and organic acids.

BIBLIOGRAFIA

1. BANDARANAYKE, A., y THAMBIAYAN, V. S. 1961. Ceylon Vet. J., 9, 55.
2. BIGLAND, C. M., y WILSON, G. S. 1950. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 14, 236.
3. BLANCO, A. 1946. Trabajos Inst. Biol. Animal, 8, 3.
4. BUTTIAUX, R.; BEEHRENS, M., y TACQUET, A. 1962. Manuel de techniques bactériologiques. París.

5. CLARENBERG, A. 1953. Proc. Soc. Appl. Bacteriol., 16, 10.
6. CLARENBERG, A.; VINK, H. H., y SCHURMANS, R. 1950. Tijdschr. Diergeneesk., 75, 435.
7. Difco Laboratories. 1953. Difco Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical procedures. 9.^a edición. Detroit.
8. DUMAS, J. 1951. Bacteriologie medicale. París.
9. FIELD, H. I. 1949. Vet. Record, 61, 109.
10. FIELD, H. I. 1949. Vet. Record. 61, 275.
11. HENNING, G. W. 1947. S. African J. Sci., 43, 277.
12. HOWARTH, J. A.; CORDY, D. R., y BITTLE, J. 1954. J. Am. Vet. Med. Assoc., 124, 43.
13. HUGHES, M. H. 1954. W. African Med. J., 3, 57.
14. JAESCHKE, H. 1953. Zur Bedeutung der Untersuchung der Gallenblase für die Feststellung von Salmonellen bei Not- und Krankschlachtungen. Hannover.
15. KANTOR, M. 1953. Pediatrics, 9, 597.
16. KAUFFMANN, F. 1961. Enterobacteriaceae. Copenhagen.
17. KAUFFMANN, F., y PETERSEN, A. 1956. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 38, 481.
18. MULLER, J. 1957. Bull. Office Intern. Epizoot., 48, 323.
19. NEEL, R.; JORGENSEN, K.; LE MINOR, L., y MACHOUN, A. 1953. Ann. Inst. Pasteur, 84, 400.
20. ORTIZ, F.; ALES, J. M., y ALVAREZ, R. 1961. Bull. Inst. Med. Res., 14, 145; y Rev. Clin. Españ., 83, 199.
21. OXOID. 1963. Medios de cultivo. Londres.
22. PERDRIX, J.; PLANCHON, M., y LE MINOR, L. 1958. Rec. Med. Vet. Ecole Alfort, 134, 93.
23. ROKEY, N. W., y ERLING, M. C. 1959. J. Am. Vet. Med. Assoc., 135, 117.
24. ROKEY, N. W., y ERLING, M. C. 1960. J. Am. Vet. Med. Assoc., 136, 381.
25. SAKAZAKI, H.; YAMADA, C., y TAJIMA, Y. 1955. Japan. J. Bacteriol., 10, 59.
26. SEDLAK, J., y RISCHE, H. 1961. Enterobacteriaceae Infektionen. Leipzig.
27. SLUZEWSKA, M. 1958. Med. Doswiadczalna Mikrobiol., 10, 409.
28. SLUZEWSKA, M. 1960. Roczniki Nauk Rolniczych Ser. E, 70, 291.
29. TAYLOR, W. 1955. Monthly Bull. Med. Res. Council, 14, 132.
30. WETMORE, P., y HOAG, W. G. 1960. J. Bacteriol., 80, 283.
31. WILSON, G. S., y MILES, A. A. 1949 y 1964. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. Londres.

PROF. JOSE MARIA ALBAREDA (†)

El día 27 de marzo de 1966 falleció en Madrid el Prof. José María Albareda Herrera, Secretario General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Rector de la Universidad de Navarra y Director del Instituto de Edafología y Biología Vegetal. El Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología le debe el impulso de su creación y la Sociedad de Microbiólogos Españoles, la acogida espiritual y económica que estas sociedades necesitan para su crecimiento y perduración. Ambas entidades, al comunicar con profundo sentimiento la triste noticia, quieren dejar constancia pública de su reconocimiento a quien tanto influyó en su creación, así como en el desarrollo general de la investigación en España, por lo que ha dejado memoria imperecedera.

EL PRIMER CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGIA

Se proyecta la celebración de este Congreso, organizado por la Federación Latinoamericana de Parasitología, en Santiago de Chile, del 18 al 22 de enero de 1967. El programa científico comprende los siguientes apartados:

- I. Enseñanza de la Parasitología.
- II. Inmunología de las enfermedades parasitarias.
- III. Bioquímica y fisiología de las parasitosis.
- IV. Avances en el diagnóstico y tratamiento de las parasitosis.
- V. Temas libres (sobre Parasitología general, humana o animal).

Toda la correspondencia debe dirigirse a la Secretaría General del I Congreso Latinoamericano de Parasitología, Casilla 9183, Santiago de Chile (Chile).

PROF. JOSE MARIA ALBAREDA (†)

El día 27 de marzo de 1966 falleció en Madrid el Prof. José María Albareda Herrera, Secretario General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Rector de la Universidad de Navarra y Director del Instituto de Edafología y Biología Vegetal. El Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología le debe el impulso de su creación y la Sociedad de Microbiólogos Españoles, la acogida espiritual y económica que estas sociedades necesitan para su crecimiento y perduración. Ambas entidades, al comunicar con profundo sentimiento la triste noticia, quieren dejar constancia pública de su reconocimiento a quien tanto influyó en su creación, así como en el desarrollo general de la investigación en España, por lo que ha dejado memoria imperecedera.

EL PRIMER CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGIA

Se proyecta la celebración de este Congreso, organizado por la Federación Latinoamericana de Parasitología, en Santiago de Chile, del 18 al 22 de enero de 1967. El programa científico comprende los siguientes apartados:

- I. Enseñanza de la Parasitología.
- II. Inmunología de las enfermedades parasitarias.
- III. Bioquímica y fisiología de las parasitosis.
- IV. Avances en el diagnóstico y tratamiento de las parasitosis.
- V. Temas libres (sobre Parasitología general, humana o animal).

Toda la correspondencia debe dirigirse a la Secretaría General del I Congreso Latinoamericano de Parasitología, Casilla 9183, Santiago de Chile (Chile).

Depósito legal: M. 702 - 1958

ARTES GRÁFICAS REYES.-JERÓNIMA LLORENTE, 15-MADRID