
VOLUMEN 21. 1968

JULIO - DICIEMBRE. NUMEROS 3 - 4

Microbiología Española

Revista

*del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y de 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



Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirectores: Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio, Jefe de Departamento del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Publicaciones del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

INDICE

	Página
Influencia de la hidrazida maleica sobre el <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . I. Estudio de la acción de la hidrazida maleica sobre el crecimiento y síntesis del ácido beta-indolacético, por R. Beltrá	109
Influencia de la hidrazida maleica sobre el <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . II. Formación de tumores por acción de la hidrazida maleica sobre la bacteria y precursores del ácido beta-indolacético, por R. Beltrá	121
Especies de <i>Clostridium</i> aisladas de salmueras de aceitunas aderezadas. Influencia del pH y cloruro sódico sobre el desarrollo, por F. González-Cancho y M. J. Fernández-Díez	129
Estudio citoquímico en los excojugantes de <i>Stylonychia muscorum</i> Kahl y <i>Steinia candens</i> Kahl (Ciliados hipotricos), por Pilar Alonso	143
Segregación de aminoácidos por una cepa de <i>C. intermedium</i> , por R. Clotet, J. Guinea y R. Parés-Farrás	155
Comportamiento de algunas especies de <i>Erwinia</i> frente a los antibióticos, por María T. Iriarte y Purificación Fernández.	175
Étude de quatre champignons arthosporés, formant des endospores, par H. Saëz	193
Verdeamiento del jamón cocido por <i>Aerococcus viridans</i> y estudio de su resistencia térmica, por C. Parrera y P. del Toro.	205
La guerra bacteriológica y su defensa, por E. Gastón de Iriarte.	213
Fallecimiento de un microbiólogo ilustre, por E. Feduchy ...	229
Nueva estructura del Instituto	231
Congreso Internacional de Microbiología	233
Errata advertida	233
Bibliografía, por J. Pérez-Silva y R. de Vicente	235

Microbiología Española

Revista

*del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y de la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
MADRID

Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirectores: Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio, Jefe de Departamento del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Publicaciones del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

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

I N D I C E

	Página
<i>Alonso, Pilar</i> : Estudio citoquímico en los exconjugantes de <i>Stylo- nychia muscorum</i> Kahl y <i>Steinia candens</i> Kahl (Ciliados hipotricos)	143
<i>Becking, J. H.</i> : véase <i>López, R.</i>	53
<i>Beltrá, R.</i> : Influencia de la hidrazida maleica sobre el <i>Agrobac- terium tumefaciens</i> . I. Estudio de la acción de la hidrazida maleica sobre el crecimiento y síntesis del ácido beta-indola- cético	109
<i>Beltrá, R.</i> : Influencia de la hidrazida maleica sobre el <i>Agrobac- terium tumefaciens</i> . II. Formación de tumores por acción de la hidrazida maleica sobre la bacteria y precursores del ácido beta-indolacético	121
<i>Callao, V.</i> : véase <i>Ramos, A.</i>	23
<i>Callao, V.</i> : véase <i>Romero, P.</i>	45
<i>Carvalho, P. C. T. de</i> : véase: <i>Ramos, A.</i>	23
<i>Castro, Serafina</i> : véase <i>Rubio-Huertos, M.</i>	1
<i>Clotet, R.</i> ; <i>Guinea, J.</i> , y <i>Parés-Farrás, R.</i> : Segregación de ami- noácidos por una cepa de <i>C. intermedium</i>	155
Congreso Internacional de Microbiología	233
Errata advertida	233
<i>Feduchy, E.</i> : Fallecimiento de un microbiólogo ilustre	229
<i>Fernández, F.</i> , y <i>Piña, M.</i> : Valoración de ácido fusídico con <i>Ba- cillus licheniformis</i>	39

	Página
<i>Fernández, Purificación: véase Iriarte, María T.</i>	175
<i>Fernández-Díez, M. J.: véase González-Cancho, F.</i>	129
<i>Fernández-Puentes, J. L., y Rodríguez, D.: Influencia de la res- piración endógena en la oxidación de aminoácidos por De- baryomyces klockeri</i>	93
<i>Gastón de Iriarte, E.: La guerra bacteriológica y su defensa</i> ...	213
<i>González-Cancho, F., y Fernández-Díez, M. J.: Especies de Clostridium aisladas de salmueras de aceitunas aderezadas. Influencia del pH y cloruro sódico sobre el desarrollo</i>	129
<i>Guinea, J.: véase Clotet, R.</i>	155
<i>Iriarte, María T., y Fernández, Purificación: Comportamiento de algunas especies de Erwinia frente a los antibióticos</i>	175
<i>López, R., and Becking, J. H.: Polysaccharide production by Beijerinckia and Azotobacter</i>	53
<i>López-Abella, D.: véase Rubio-Huertos, M.</i>	1
<i>Moreno, R.: véase Rubio-Huertos, M.</i>	1
<i>Moreno, R.: véase Rubio-Huertos, M.</i>	13
<i>Nueva estructura del Instituto</i>	231
<i>Ochenta cumpleaños del Dr. Waksman</i>	101
<i>Parés-Farrás, R.: véase Clotet, R.</i>	155
<i>Parrera, C., y Toro, P. del: Verdeamiento del jamón cocido por Aerococcus viridans y estudio de su resistencia térmica</i> ...	205
<i>Pérez-Silva, J., y Portolés, A.: Bibliografía</i>	105
<i>Pérez-Silva, J., y Vicente, R. de: Bibliografía</i>	235
<i>Piña, M.: véase Fernández, F.</i>	39
<i>Pitkin, D. H., véase Ramírez, C.</i>	89
<i>Portolés, A.: véase Pérez-Silva, J.</i>	105
<i>Ramírez, C., and Ransom, J. P.: The growth of Candida albicans and Salmonella typhimurium in mixed culture</i>	77
<i>Ramírez, C.; Ransom, J. P., and Pitkin, D. H.: The in vivo interaction of Candida albicans and Salmonella thyphimurium</i>	89

	Página
<i>Ramos, A.; Callao, V., y Carvalho, P. C. T. de: La solubilización de fosfatos por hongos del suelo</i>	23
<i>Ransom, J. P.: véase Ramírez, C.</i>	77
<i>Ransom, J. P.: véase Ramírez, C.</i>	89
<i>Rodríguez, D.: véase Fernández-Puentes, J. L.</i>	93
<i>Romero, P., y Callao, V.: Efecto in vitro de diferentes antibióticos y sustancias químicas sobre 90 cepas de Pseudomonas savastanoi</i>	45
<i>Rubio-Huertos, M.; Castro, Serafina; Moreno, R., y López-Abella, D.: Ultraestructura de células de Dianthus caryophyllus infectadas por dos virus al mismo tiempo</i>	1
<i>Rubio-Huertos, M., y Moreno, R.: Estudio de un virus de la alfalfa y ultraestructura de las hojas infectadas</i>	13
<i>Saëz, H.: Étude de quatre champignons arthosporés, formant des endospores</i>	193
<i>Toro, P. del: véase Parrera, C.</i>	205
<i>Vicente, R. de: véase Pérez-Silva, J.</i>	235

INFLUENCIA DE LA HIDRAZIDA MALEICA SOBRE EL *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

I. Estudio de la acción de la hidrazida maleica sobre el crecimiento y síntesis del ácido beta-indolacético

por

R. BELTRÁ

Braun en 1956 (7), al estudiar las diferentes etapas por las que pasa una célula sana vegetal para transformarse en célula tumoral, bajo la acción del *Agrobacterium tumefaciens*, encuentra que las auxinas intervienen en las dos primeras etapas de la formación del tumor (acondicionamiento y promoción) como hormonas de la herida o sintetizadas por la bacteria causal (11). La naturaleza de esas auxinas, ácido beta-indolacético (AIA), ha sido estudiada entre otros autores por Beltrá (4), Berthelot y Amoreaux (5), Kaper y Veldstra (9) y Kulescha (12).

En investigaciones llevadas a cabo a partir del año 1950, se ha estudiado la acción del AIA sobre el crecimiento y contenido de auxinas de diferentes tejidos tumorales producidos por el *Agrobacterium tumefaciens* mediante inhibidores del crecimiento, como la hidrazida maleica (HM). Con ciertas reservas, se puede admitir la hipótesis de Kulescha (14), según la cual la HM interviene a nivel de los grupos sulfhidrilos de substratos proteínicos, sobre los cuales se fijan las auxinas: de esta manera, la acción de la sustancia de crecimiento queda anulada al no poder ser utilizada por el tejido. De acuerdo con este concepto, para que el AIA sea fisiológicamente efectivo deberá combinarse con una proteína espe-

cífica para formar una enzima, la cual cataliza entonces una reacción esencial para el proceso de crecimiento.

Esta hipótesis está basada en los trabajos de Skoog (18) y Wildman (21), los cuales liberan auxinas por agentes proteolíticos; la observación de que el contenido de auxinas de los tejidos tratados con HM no disminuía a pesar de haber inhibición del crecimiento (2, 13 y 17) elimina la hipótesis de esa inhibición causada por destrucción de auxina (1-3), al comprobar en los tejidos tratados con HM un aumento de indolacético-oxidasa.

En nuestro trabajo, hemos investigado la acción de diferentes concentraciones de HM sobre la bacteria tumorigena *Agrobacterium tumefaciens*, estudiando cómo influye sobre el crecimiento y síntesis del AIA, cuando se cultiva en un medio con cantidad fija de triptófano.

MATERIALES Y METODOS

Agrobacterium tumefaciens aislados por nosotros de vid se cultivaron durante veinticuatro horas en agar glucosado y se inocularon en matraces de Monod, que contenían 30 ml de un medio de cultivo con sales minerales, glucosa y triptófano al 1 ‰ (9), adicionado de HM, a concentraciones de 10^{-3} a 10^{-8} g/ml. Los matraces se incubaron durante siete días (ciento setenta y dos-ciento setenta y cuatro horas) a 26 °C, durante los cuales se estudió la curva de crecimiento del *Ag. tumefaciens* en dichos medios, usando un espectrofotómetro de Bausch y Lomb (Spectronic "20") a 600 μ . Para estudiar el crecimiento de la bacteria y la síntesis del AIA sin la intervención de la hidrazida, se cultivó la bacteria en matraces que contenían únicamente el medio de cultivo dado por Kaper y Veldstra (9).

Las auxinas ácidas, principalmente AIA, sintetizadas por la bacteria en el medio de cultivo con y sin hidrazida, se extrajeron mediante la técnica de Bitancourt (6), partiendo de 60 ml del medio de cultivo. Estas auxinas se estudiaron por cromatografía unidimensional ascendente, empleando como disolvente alcohol isopropílico + amoníaco + agua (80:5:15) y como revelador el reactivo de Ehrlich (20). Después de identificado el AIA por cromatografía, usando como testigo AIA puro Merck, se valoró cuantitativamente por la técnica de Yamaki y Nakamura (22), en un espectrofotómetro de Beckman, modelo B, a 450 μ .

RESULTADOS

A) Crecimiento del *Agrobacterium tumefaciens* en el medio de cultivo con triptofano, con y sin hidrazida maleica

En la figura 1 exponemos las diferentes curvas de crecimiento de la bacteria en el medio con triptofano solo y adicionado de HM, en concentraciones de 10^{-3} a 10^{-8} g/ml.

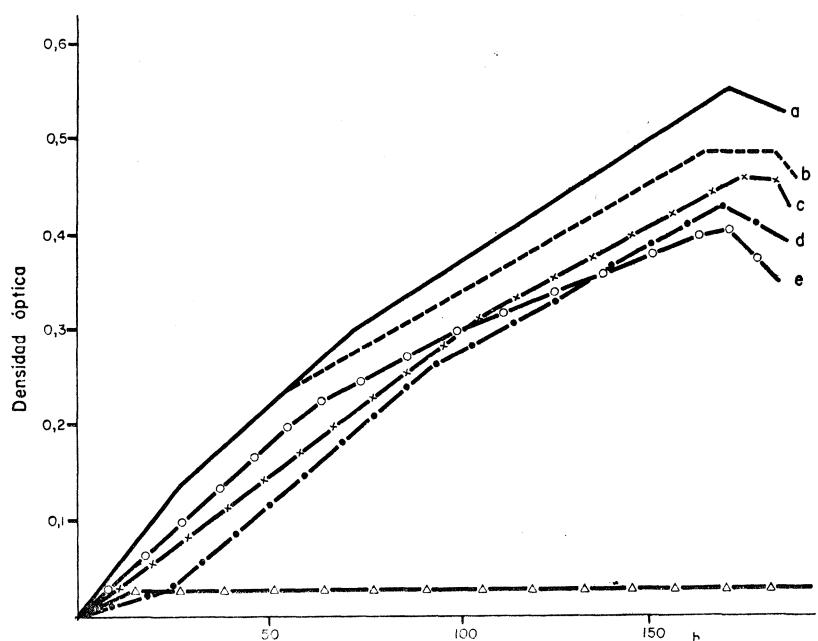


Figura 1. a) Medio de cultivo con triptofano (T) sólo. b) T+HM 10^{-4} . c) T+HM 10^{-6} y 10^{-7} . d) T+HM 10^{-8} . e) T+HM 10^{-5} . f) T+HM 10^{-3}

El crecimiento máximo se observó cuando cultivamos la bacteria en el medio con triptofano, sin hidrazida y entre ciento setenta y dos-ciento setenta y cuatro horas.

De todas las concentraciones de HM ensayadas, solamente con la concentración de 10^{-4} g/ml obtuvimos una curva de crecimiento para el *Agrobacterium tumefaciens* bastante similar a la obtenida en el medio con

triptofano solo; es decir, esta concentración de hidrazida no inhibe apenas el crecimiento del *Ag. tumefaciens*.

La influencia de las diferentes concentraciones de HM sobre el crecimiento del *Agrobacterium tumefaciens* sería, teniendo en cuenta su máximo poder de inhibición, en el orden siguiente:

$$10^{-3}, 10^{-8}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} \text{ y } 10^{-4}.$$

B) Influencia de la HM en la síntesis del AIA por el Agrobacterium tumefaciens cultivado en presencia de triptofano

En el *cuadro 1* resumimos las concentraciones de triptofano del medio, así como las de AIA sintetizadas por la bacteria en dicho medio.

Cuadro 1. Concentraciones de AIA producidas por Agrobacterium tumefaciens, cultivado durante 172-174 horas, en un medio con cantidad fija de triptofano y diferentes concentraciones de HM expresadas en gramos/mililitro de cultivo

Concentraciones de HM	Concentraciones de AIA
0	$4,6 \times 10^{-5}$
10^{-3}	Indicios
10^{-4}	13×10^{-5}
10^{-5}	$4,6 \times 10^{-5}$
10^{-6}	$6,6 \times 10^{-5}$
10^{-7}	9×10^{-5}
10^{-8}	12×10^{-5}

De la exposición de estos resultados deducimos que la HM adicionada al medio en concentraciones de 10^{-4} , 10^{-8} y 10^{-7} estimula la síntesis de AIA por la bacteria, a partir del triptofano del medio. El orden de mayor a menor estímulo sobre la síntesis del AIA sería el siguiente:

$$10^{-4}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6} (10^{-5} \text{ y sin hidrazida}) \text{ y } 10^{-3}.$$

Asimismo, se ha observado en los cromatogramas de las auxinas ácidas (*figura 2*) las manchas típicas de desdoblamiento del ácido beta-indolpi-

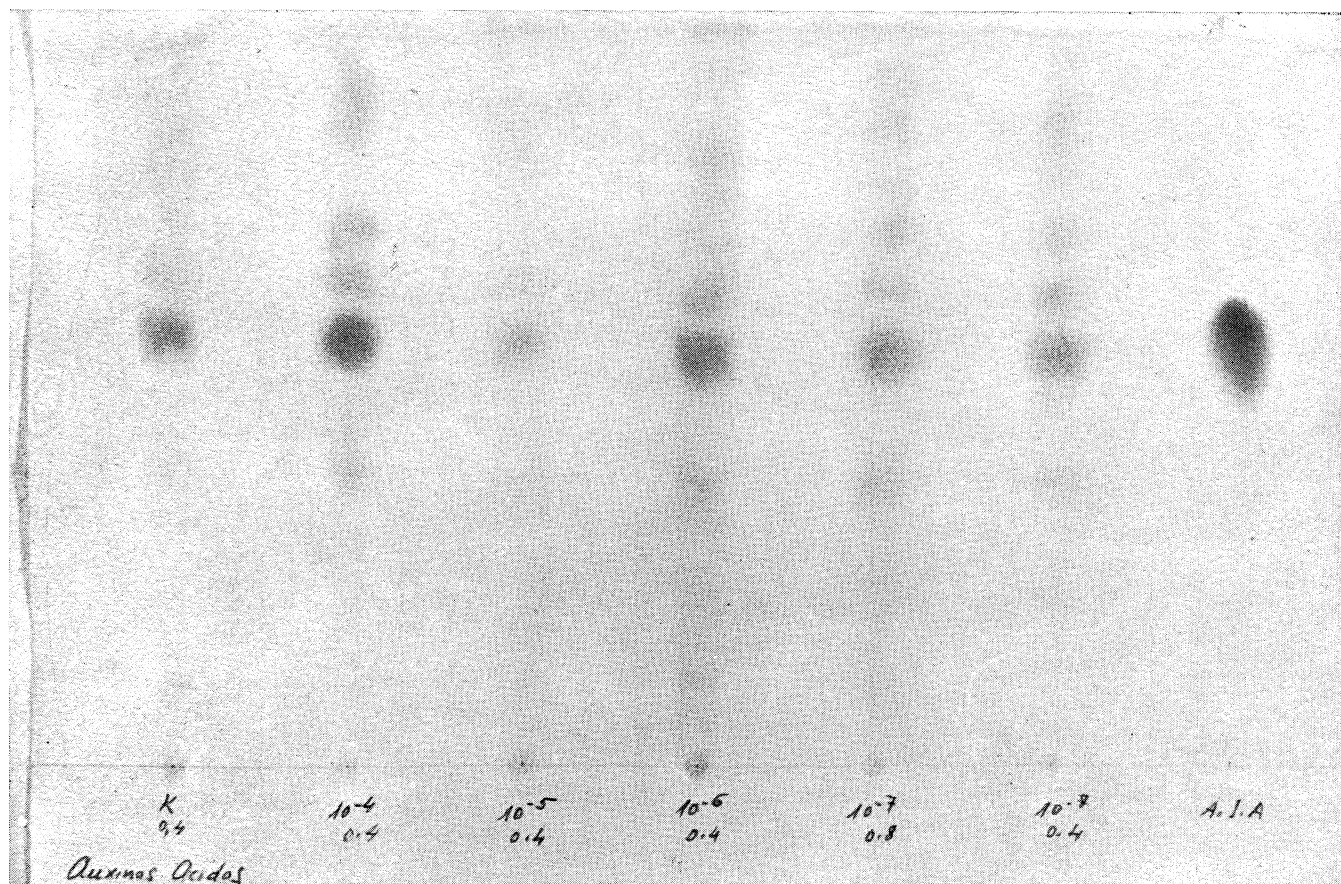


Figura 2. Cromatograma unidimensional ascendente de auxinas ácidas en medios de cultivo con triptofano solo y adicionado de hidrazida maleica, a concentraciones de 10^{-4} a 10^{-8}

rúvico (AIPc) producidas en la biogénesis del AIA por el *Agrobacterium tumefaciens* (9).

DISCUSION

Concentraciones de 10^{-4} g/ml de HM adicionada al medio de cultivo con triptofano, producen un ligero descenso del crecimiento de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, sin afectar apenas a la multiplicación celular, en comparación con el cultivo testigo sin hidrazida; obtenemos, como en el caso de la curva de crecimiento testigo (*figura 1*), un máximo de crecimiento entre ciento veinte-ciento treinta horas de cultivo, observándose este fenómeno con todas las concentraciones de HM ensayadas, excepto con la concentración de 10^{-3} . Con esta concentración, en el intervalo comprendido entre diez y veinte horas, cesa la multiplicación celular y el número de bacterias se mantiene constante durante un total de ciento setenta y dos-ciento setenta y cuatro horas, que fue el tiempo máximo de crecimiento que se estudió. Las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-5} de HM se pueden considerar unificadas, ya que producen aproximadamente la misma disminución en el crecimiento y multiplicación de la bacteria.

La acción de la HM sobre el crecimiento del *Agrobacterium tumefaciens* podría interpretarse admitiendo que esta sustancia es metabolizada por la bacteria, como sucede con *Alcaligenes faecalis* y *Flavobacterium diffusum* (15-16), modificando su metabolismo y produciendo una suave disminución del crecimiento (HM a concentraciones de 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-5}) o una inhibición de la multiplicación celular (HM a concentraciones de 10^{-3}). Esta inhibición del crecimiento bacteriano por HM ya se ha observado por otros autores con *Escherichia coli* (19).

El hecho observado por Callaghan y colaboradores (8), de la incorporación de HM marcada por el ARN de algunos microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*) nos lleva a admitir como una posibilidad el que la HM interfiera la multiplicación del *Agrobacterium tumefaciens* a nivel de los ácidos nucleicos bacterianos.

Klein y Klein (10) han estudiado la acción de la HM a diferentes concentraciones, comprendidas entre 10^{-3} y 10^{-4} sobre el *Agrobacterium tumefaciens*; encuentran que la concentración de 10^{-4} no influye en el crecimiento de la bacteria, coincidiendo sus resultados con los obtenidos

por nosotros. Con la concentración de 10^{-3} no observan paralización de la multiplicación celular. La disparidad de estos resultados en relación con los nuestros creemos se debe a que estos autores sólo estudian la influencia de la HM sobre el crecimiento del *Ag. tumefaciens*, durante dieciocho-veinte horas, tiempo en el que se produce el máximo de crecimiento; a partir de ese momento y según nuestros resultados es cuando se produce la paralización de la multiplicación celular, manteniéndose constante el número de bacterias durante un total de ciento setenta y dos-ciento setenta y cuatro horas, tiempo que duró nuestra experiencia.

La biogénesis del AIA a partir del triptofano por el *Agrobacterium tumefaciens* se realiza vía AIPc (9). La adición al medio de cultivo con triptofano, de diferentes concentraciones de HM (de 10^{-4} a 10^{-8}), no desvía el metabolismo del triptofano por esta bacteria, ya que hemos encontrado por cromatografía de las auxinas ácidas extraídas del cultivo, las manchas típicas del desdoblamiento del AIPc (indolacetaldehído, AIA, ácido indolglicólico...) que se produce al desarrollar el cromatograma en disolventes alcalinos.

La producción de AIA a partir del triptofano por el *Agrobacterium tumefaciens*, bajo la acción de la HM a concentraciones de 10^{-4} a 10^{-8} sería, pues, la propuesta por Kaper y Veldstra: triptofano $\rightarrow$ AIPc $\rightarrow$ indolacetaldehído $\rightarrow$ AIA.

Al estudiar las concentraciones de AIA producidas por el *Agrobacterium tumefaciens* en el medio de cultivo con triptofano y diferentes concentraciones de HM encontramos que con 10^{-3} sólo se producen indicios de AIA y con 10^{-4} se produce un estímulo notable de la síntesis de AIA; parece indicar con esto que la mayor o menor producción de AIA está íntimamente ligada al crecimiento de la bacteria en las mismas condiciones; con estas concentraciones de HM, la síntesis de auxinas es directamente proporcional a la multiplicación celular. Sin embargo, cuando estudiamos la influencia de la HM a 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} , ya no observamos proporción directa con el crecimiento de la bacteria.

Suponemos por estos hechos que la HM influye en la síntesis del AIA según las concentraciones que se adicionen al medio de cultivo con triptofano, de dos formas: o activando la multiplicación celular o los sistemas enzimáticos del *Agrobacterium tumefaciens* responsables de la síntesis del AIA.

RESUMEN

Se estudia la acción de la hidrazida maleica en concentraciones de 10^{-3} a 10^{-8} g/ml sobre el crecimiento y síntesis del AIA por el *Agrobacterium tumefaciens*, cultivado en un medio con 10^{-3} g/ml de triptofano. La concentración de 10^{-3} de hidrazida maleica inhibe la multiplicación bacteriana entre dieciocho-veinte horas y sólo produce indicios de AIA; 10^{-4} produce una ligera disminución del crecimiento sin paralizar la multiplicación de la bacteria y un gran estímulo de la síntesis del AIA. Las concentraciones de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} producen descenso del crecimiento y las de 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} estimulan también la síntesis de AIA aunque más débilmente que 10^{-4} .

SUMMARY

The action of maleic hydrazide on the growth and in the synthesis of AIA by *Agrobacterium tumefaciens* grown in a medium containing 10^{-3} g/ml, of tryptophan have been studied. Concentrations of maleic hydrazide in the range 10^{-3} - 10^{-8} g/ml were tested. The concentration of 10^{-3} g/ml of maleic hydrazide inhibited bacterial multiplication between 18-20 hr, producing only traces of AIA. A concentration of 10^{-4} g/ml of maleic hydrazide gave rise to a slight diminution in the growth without stopping bacterial multiplication as well as a stimulant in the synthesis of AIA. Concentrations of 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} g/ml diminished the growth. Concentrations of 10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} stimulated the synthesis of AIA though more weakly than does the 10^{-4} concentration.

BIBLIOGRAFIA

1. ABERG, B. 1953. On the interaction of 2-3-5 triiodo-benzoic acid and maleic hydrazide with auxins. *Physiol. Plantarum*, 6, 277-91.
2. ANDREAE, W. A. 1954. The effect of maleic hydrazide on indoleacetic oxidase and growth. *Congr. Intern. Botan.* 8e. París, 11, 151.
3. ANDREAE, W. A., y ANDREAE, S. R. 1953. Studies on indoleacetic acid metabolism. I. Effect of methyl-umbelliferone, maleic hydrazide and 2-4-D on indoleacetic acid oxidation. *Can. J. Botany*, 31, 426-37.

4. BELTRÁ, R. 1959. El ácido beta-indolacético y los tumores vegetales de origen bacteriano. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 2, 23-32.
5. BERTHELOT, A., y AMOREAUX, G. 1938. Sur la formation d'acide indole-3-acétique dans l'action de *Bacterium tumefaciens* sur le tryptophane. *Compt. Rend.*, 206, 537-40.
6. BITANCOURT, A. A. 1954. La nature des auxines des tumeurs vegetales. *Année Biol.*, 30, 7-10.
7. BRAUN, A. C. 1956. The activation of two growth-substances systems accompanying the conversion of normal to tumor cells in crown-gall. *Cancer Res.*, 16, 53-56.
8. CALLAGHAN, J. J.; APPLETON, M. D.; HAAB, W., y PORTANOVA, R. P. 1962. Incorporation of C¹⁴ labeled maleic hydrazide by ribonucleic acid (RNA) derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Penn. Acad. Sci.*, 36, 91-95.
9. KAPER, J. M., y VELDSTRA, H. 1958. On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 401-20.
10. KLEIN, R. M., y KLEIN, D. T. 1952. The effects of maleic hydrazide on initiation and development of tomato crown-gall tumors. *Am. J. Botany*, 39, 727-30.
11. KLEIN, R. M., y LINK, G. K. K. 1952. Studies on the metabolism of plant neoplasms. V. Auxin as a promoting agent in the transformation of normal to crown-gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 38, 1.066-72.
12. KULESCHA, Z. 1952. Recherches sur l'elaboration de substances de croissance par les tissus vegetaux. *Rev. Gén. Botan.*, 59, 92-111, 127-57, 195-208 y 241-64.
13. KULESCHA, Z. 1953. Action de l'hydrazide maleique sur la prolifération des tissus de crown-gall de Scorsonère et sur leur teneur en auxine. *Compt. Rend.*, 236, 958-59.
14. KULESCHA, Z. 1955. Action de l'hydrazide maleique sur la teneur en auxine des tissus de Topinambour cultivés en presence de diverses substances de division. *Acta Botan. Neerl.* 4, 404-9.
15. LEMBECK, W. J., y COLMER, A. R. 1957. Aspects of the descomposition and utilization of maleic hydrazide by bacteria. *Weeds*, 5, 34-39.
16. MAGEE, L. A., y COLMER, A. R. 1966. Oxidation of maleic hydrazide and diethanolammonium maleic hydrazide by *Alcaligenes faecalis*. *J. Miss. Acad. Sci.*, 12, 166-69.
17. PILET, P. E. 1953. Etude de l'action de l'hydrazide maleique sur le développement et la teneur en auxines des racines de *Lens culinaris*. *Compt. Rend.*, 273, 1.430-33.
18. SKOOG, F., y THIMANN, K. V. 1940. Enzymatic liberation of auxin from plant tissues. *Science*, 92, 62-67.
19. SUDA, S. 1960. Mode of action of maleic hydrazide on the growth of *Escherichia coli* and avena coleoptile sections. *Plant Cell Physiol. Tokyo*, 1, 247-53.

20. VLITOS, A. J., y MEUDT, W. 1953. The role of auxin in plant flowering. I. A quantitative method based on paper chromatography for the determination of indole compounds and of 3-indoleacetic acid in plant tissues. Contrib. Boyce Thompson Inst., 17, 197-202.
21. WILDMAN, S. G.; FERRI, M. G., y BONNER, J. 1947. The enzymatic conversion of tryptophan to auxin by spinach leaves. Arch. Biochem., 13, 131-44.
22. YAMAKI, T., y NAKAMURA, K. 1952. Formation of indoleacetic acid in mayze embryo. Sci. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo, 2, 81-98.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL
SECCION DE QUIMICA MICROBIANA Y SERVICIO DE ANALISIS QUIMICO

INFLUENCIA DE LA HIDRAZIDA MALEICA SOBRE EL *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

II. Formación de tumores por acción de la hidrazida maleica sobre la bacteria y precursores del ácido beta-indolacético.

por

R. BELTRÁ

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (1) hemos observado que la hidrazida maleica (HM) a concentraciones de 10^{-4} g/ml no actúa apenas sobre el crecimiento del *Agrobacterium tumefaciens*, en un medio con triptofano, y, sin embargo, es la que más estimula la síntesis del ácido beta-indolacético (AIA). Gautheret, en 1952 (4), trabajando con tumores producidos por el *Ag. tumefaciens*, encuentra que dosis altas de HM y AIA son antagonistas y que dosis débiles de HM refuerzan la acción estimulante del AIA. Basados en la primera observación de Gautheret, es por lo que hemos escogido la concentración de 10^{-4} g/ml para estudiar *in vivo* y sobre plantas de experimentación, la influencia de la HM sobre la bacteria y triptofano (precursor del AIA) en la formación de tumores.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Agrobacterium tumefaciens, aislados por nosotros de vid, se cultivaron durante cuarenta y ocho horas en agar glucosado inclinado, haciendo

posteriormente una suspensión masiva de la bacteria con una solución en agua destilada de HM a concentración de 10^{-4} g/ml.

Igualmente se hizo otra suspensión masiva de la bacteria en una solución de triptofano a concentración de 10^{-3} g/ml.

Estas dos suspensiones, así como sus correspondientes testigos, se inocularon sobre tallos de judía, *Phaseolus vulgaris*, variedad pinta, y se observó durante veintiocho días la formación de tumores.

Hemos estudiado, por tanto, la respuesta tumorigénica de las inoculaciones siguientes:

- 1.^a *Agrobacterium tumefaciens*.
- 2.^a *Ag. tumefaciens* + HM, concentración 10^{-4} g/ml.
- 3.^a Triptofano, concentración 10^{-3} g/ml.
- 4.^a Triptofano, concentración 10^{-3} g/ml + HM, concentración 10^{-4} g/ml.
- 5.^a HM, concentración 10^{-4} g/ml.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos al inocular las diferentes suspensiones en los tallos de judía, los referimos a tanto por ciento de tumores. En el *cuadro 1* resumimos estos resultados.

Cuadro 1. Porcentaje de tumores obtenidos con las cinco inoculaciones anteriores

Inoculaciones	Porcentaje de tumores
1. ^a	80
2. ^a	38
3. ^a	13
4. ^a	14
5. ^a	0

Las *figuras 1-3* corresponden a tumores obtenidos en estas inoculaciones.

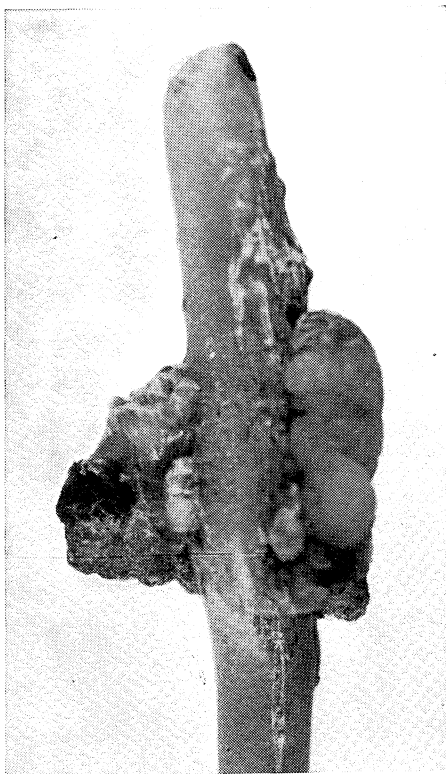


Figura 1. Tumores obtenidos en tallos de judía, var. pinta, por inoculación del *Agrobacterium tumefaciens*, e hidrazida maleica a la concentración de 10^{-4} g/ml

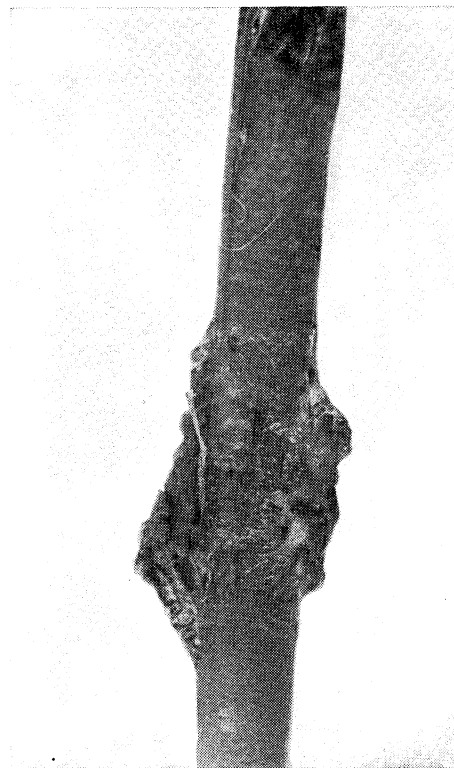


Figura 2. Tumores obtenidos por inoculación de triptofano a la concentración de 10^{-3} g/ml

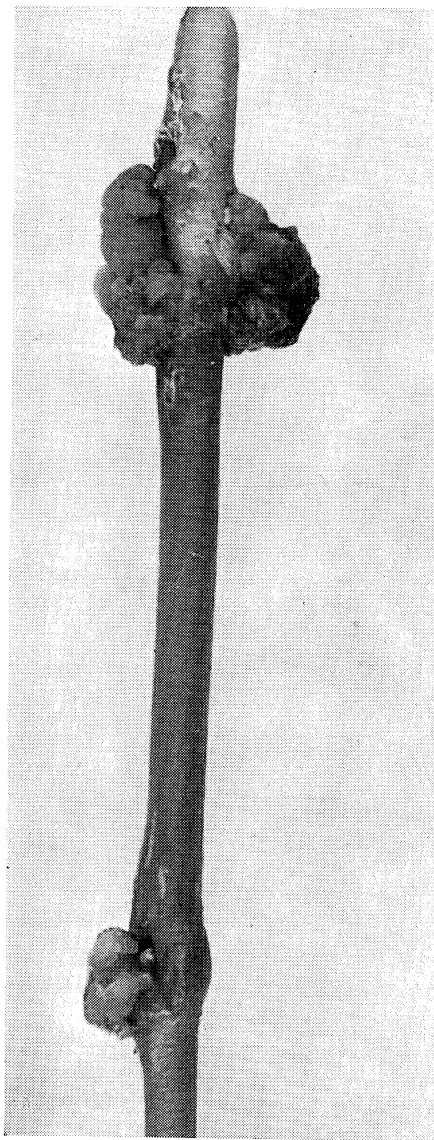


Figura 3. Tumores obtenidos por inoculación de triptofano a la concentración de 10^{-3} g/ml, e hidrazida maleica, a la de 10^{-4} g/ml

Kulescha (6), trabajando en cultivo de tejidos de "crown-gall", observa que a pesar de inhibirse fuertemente la proliferación del tejido, el contenido de AIA es elevado, lo que nos inclina a creer que la intensidad de proliferación de un tejido tumoral en un momento dado, no está siempre relacionado con la cantidad de auxina que ellos contienen en ese instante, pues, como demuestra este autor, la inhibición provocada por HM puede ir acompañada por una acumulación de auxinas en los tejidos; estos hechos y los obtenidos por nosotros en estas experiencias afirman la creencia de muchos investigadores, según la cual las auxinas no son las únicas responsables de la formación del tumor. Según nuestros resultados, la HM, a concentración de 10^{-4} g/ml, no actúa oponiéndose a la acción de las auxinas (como se desprende del hecho de que no actúe sobre los tumores formados por precursores del AIA, como es el triptofano), actuando, por tanto, la HM sobre una fracción desconocida de *Agrobacterium tumefaciens* o producida por la bacteria. Esta fracción tiene un poder inductor de tumores del 50 %.

Esta fracción de la bacteria sobre la que actúa la HM bien pudiera ser la de los ácidos nucleicos, ya que otros autores (3), trabajando con el *Saccharomyces cerevisiae*, han encontrado que la HM se incorpora al ácido ribonucleico de la levadura.

DISCUSION

Como consecuencia de las inoculaciones realizadas, hemos observado que la adición de HM a la concentración de 10^{-4} g/ml, a cultivos de *Agrobacterium tumefaciens*, rebaja la virulencia de la bacteria, lo que se manifiesta en una reducción del 50 % del número de tumores que produce. Si la misma concentración de HM la adicionamos a un precursor del AIA no parece actuar sobre el poder tumorigénico de éste.

Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por ciertos autores (2, 4 y 6-7), los cuales con HM a 10^{-4} g/ml obtienen un bloqueo total del crecimiento tumoral, cualquiera que sea la dosis de AIA que se encuentra en el tejido, así como con los de otros autores (8-10), quienes, al generalizar sobre la acción de HM, opinan que una concentración elevada de ésta (10^{-4}) no sólo inhibe la acción del AIA, sino también la de aquellas sustancias que tienen acción proliferante y liberan AIA como el triptofano.

Puesto que las auxinas se requieren específicamente como agentes de promoción en los procesos de transformación tumoral (5) y la HM actúa según diferentes autores oponiéndose a la acción de las auxinas, es de suponer que cuando la HM no inhibe la formación de tumores es, o porque no afecta a las reacciones de promoción que requieren las auxinas, o no se acumula en el sitio de la inoculación en cantidad suficiente para influir en estas reacciones, o actúa de manera diferente a la propuesta en los trabajos citados.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Rubio Huertos por la ayuda prestada en la interpretación de estos resultados.

RESUMEN

La adición de hidrazida maleica, concentración 10^{-4} g/ml, a cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* rebaja la virulencia de la bacteria, obteniéndose una disminución del 50 % en el número de tumores que produce; la misma concentración de hidrazida no parece actuar sobre el poder tumorigeno del triptofano, precursor del ácido beta-indolacético.

Según estos hechos, la hidrazida maleica no actúa sobre la proliferación tumoral que produce el ácido beta-indolacético, sino sobre una fracción del *Agrobacterium tumefaciens* o producida por esta bacteria, la cual tiene un poder inductor de tumores del 50 %.

SUMMARY

When maleic hydrazide is added, at a rate of 10^{-4} g/ml, to cultives of *Agrobacterium tumefaciens*, a depression on the virulence of the bacteria have been observed. We have found that the capacity for this bacteria to form tumors diminished by 50 %. It seemed that this concentration (10^{-4} g/ml) of the maleic hydrazide does not act on the tumorigen capacity of tryptophan, which is known to be a precursor in the beta-indoleacetic acid formation. According to these facts maleic hydrazide does not act on the tumoral proliferation produced by the beta-indoleacetic acid. This influence could be exerted either on an unknown fraction of *Ag. tumefaciens* or produced by this bacteria whose tumoral capacity amounted to 50 %.

BIBLIOGRAFIA

1. BELTRÁ, R. 1968. Influencia de la hidrazida maleica sobre el *Agrobacterium tumefaciens*. I. Estudio de la acción de la hidrazida maleica sobre el crecimiento y síntesis del ácido beta-indolacético. Microbiol. Españ., 21, 109-20.
2. BOURIQUET, R. 1960. Action combinée de quelques facteurs de croissance. Rev. Cytol. Biol. Vegetales, 21, 249.
3. CALLAGHAN, J. J.; APPLETON, M. D.; HAAB, W., y PORTANOVA, R. P. 1962. Incorporation of C¹⁴ labeled maleic hydrazide by ribonucleic acid (RNA) derived from *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Penn. Acad. Sci., 36, 91-95.
4. GAUTHERET, R. J. 1952. Recherches sur l'action combinée de l'hydrazide maléique et de l'acide indoleacétique sur les cultures de tissus de Topinambour. Compt. Rend., 234, 2.218-21.
5. KLEIN, R. M., y LINK, G. K. K. 1952. Studies on the metabolism of plant neoplasms. V. Auxin as a promoting agent in the transformation of normal to crown-gall tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 38, 1.066-72.
6. KULESCHA, Z. 1953. Action de l'hydrazide maleique sur la proliferation des tissus de crown-gall de Scorsonère et sur leur teneur en auxine. Compt. Rend., 236, 958-59.
7. KULESCHA, Z. 1955. Action de l'hydrazide maleique sur la teneur en auxine des tissus de Topinambour cultivés en presence de diverses substances de division. Acta Botan. Néerl., 4, 404-9.
8. LEOPOLD, A. C., y KLEIN, W. H. 1951. Maleic hydrazide as an antiauxin in plants. Science, 114, 9.
9. LEOPOLD, A. C., y KLEIN, W. H. 1952. Maleic hydrazide as an antiauxin. Physiol. Plantarum, 5, 91-99.
10. SCHOEN, V., y MOREL, G. 1954. Elaboration de sustancias de croissance par tissus de Topinambour cultivés *in vitro*. Compt. Rend., 238, 2.549-50.

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

ESPECIES DE *CLOSTRIDIUM* AISLADAS
DE SALMUERAS DE ACEITUNAS ADEREZADAS.
INFLUENCIA DEL pH Y CLORURO SODICO
SOBRE EL DESARROLLO

por

F. GONZÁLEZ-CANCHO y M. J. FERNÁNDEZ-DÍEZ

INTRODUCCION

Cuando la fermentación láctica de aceitunas verdes aderezadas no sigue su curso normal, se pueden presentar, a lo largo de sus distintas fases (10), una serie de alteraciones de origen microbiano. Las más importantes desde el punto de vista económico, aparte del "alambrado", ya estudiado (8-9), son las fermentaciones pútridas, fermentaciones butíricas y "zapatería".

Con dichas alteraciones se asocian diferentes microorganismos, entre los que citaremos, distintas especies de *Clostridium* (2-3), de *Propionibacterium* (6) y de *Desulfovibrio* (5 y 11).

Como paso previo indispensable para evitar dichas alteraciones, es necesario conocer, lo más completamente posible, los diferentes microorganismos responsables de las mismas. En consecuencia, en la presente comunicación, se hace un estudio sistemático de algunos de los gérmenes que por encontrarse en salmueras alteradas, pueden ser causa de las indicadas fermentaciones anormales.

Asimismo, siendo la salmuera el medio de cultivo donde se desarrollan los distintos microorganismos, es de indudable utilidad conocer el efecto

que tienen sobre su desarrollo, los diversos factores físico-químicos que la caracterizan. Entre éstos, el pH y el contenido de cloruro sódico tienen una marcada influencia.

PARTE EXPERIMENTAL

La toma de muestras se realiza en condiciones asépticas, de la salmuera del fondo o de la parte media de treinta bocoyes de diferentes variedades de aceitunas aderezadas en verde, "estilo español", alteradas. Circunstancialmente se hacen muestreos en bocoyes vacíos ya utilizados, así como de "aguas de pozo" empleadas en dichas industrias.

A tubos con 0,5 g de carbonato cálcico estéril se les añaden 10 ml de dichas salmueras y se calienta a 80 °C durante diez minutos, para destruir las formas vegetativas. Una vez enfriados a temperatura ambiente, 1 ml de las mismas se inocula en tubos de 200 × 15 mm, previamente regenerados, que contienen de 2,5-3 cm de trocitos de hígado y 12 ml de los siguientes caldos de cultivo, a pH = 7,0:

Jugo de hígado	1.000 ml
PO ₄ HK ₂	1 g
Peptona	10 g
Jugo de hígado	1.000 ml
PO ₄ HK ₂	1 g
Tryptona	5 g
Glucosa	10 g

A continuación se cubren con vaspar y se incuban en estufa a 37 °C.

Los cultivos desarrollados, se purifican por pases sucesivos en los medios de cultivo V F glucosado líquido y agar V F glucosado profundo (4).

Por dicho procedimiento se aíslan setenta cultivos puros de bacilos anaerobios gram-positivos, formadores de esporas.

La sistemática de las mismas se hace de acuerdo con las normas del Bergey's (1) y de Prevot (7).

Asimismo, para el estudio de la resistencia de dichas cepas, a diferentes valores de pH y a distintas concentraciones de cloruro sódico, se emplea también el medio V F glucosado, ajustado a pH = 7,0. Desarrolladas

las distintas cepas en dicho medio, se transfieren sucesivamente los cultivos correspondientes en cantidades de 0,2 ml, aproximadamente, al mismo medio de cultivo ajustado a los valores de pH: 6,0; 5,5; 5,2; 5,0; 4,75, 4,50, sin cloruro sódico; y a las concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 % de cloruro sódico, a pH = 7,0, respectivamente.

Posteriormente, y de acuerdo con los resultados obtenidos, se fijan tres niveles diferentes de pH y cloruro sódico para cada especie y se plantea una experiencia factorial para obtener las curvas de desarrollo, por recuento total, para cada par de valores pH - ClNa.

El estudio de las diferentes curvas de desarrollo, se hace con cultivos de cuarenta y ocho horas de los correspondientes microorganismos adaptados a las distintas condiciones de pH y cloruro sódico, y empleando siempre la misma concentración de gérmenes como inóculo (aproximadamente, 600.000/ml).

RESULTADOS Y DISCUSION

La taxonomía de las setenta cepas aisladas se resume en el *cuadro 1*.

Como se observa en dicho cuadro, las especies más representativas corresponden al *Clostridium sporogenes*, con 27 cepas, y al *Cl. lituseburense*, única especie no móvil, con 24 cultivos. Siguen en importancia *Cl. limosum* (7 cepas), *Cl. aerofoetidum* y *Cl. nauseum* (con 5 cultivos cada uno) y finalmente, con 1 sola cepa, las especies *Cl. multifementans* y *Cl. innotinum*.

En el *cuadro 2* se incluye la distribución de las distintas especies, observándose que el mayor número de cepas aisladas corresponde a salmueras cuyo pH es superior a 4,6.

Es conveniente, sin embargo, tener en cuenta que la existencia de dichos microorganismos en salmueras cuyo pH es inferior al anteriormente indicado, no permite considerar *a priori* la posibilidad de desarrollo en dichos casos, ya que su presencia puede ser debida a contaminaciones accidentales. Por otra parte, bocoyes alterados pueden haber sido tratados para disminuir el pH, lo que no implica la destrucción de esporas. Los altos valores de acidez volátil correspondientes a las salmueras de pH elevado, confirman lo anteriormente expuesto.

Finalmente, las variaciones de acidez libre encontradas son consecuencia del amplio intervalo de pH.

Cuadro 1. Taxonomía de

Número de cepas	Movilidad	Gram	Endosporas			Ataque a proteínas					NO ₃ reducido
			Bacilo hinchado	Forma	Posición	Licuefacción de la gelatina	Licuefacción de la albúmina de huevo coagulada	Leche tornasolada	Producción de indol	Producción de SH ₂	
27	+	+	+	ov.	sub.	+	+	dig.	—	+	-
24	—	+	+	ov.	sub.	+	—	dig.	—	+	-
7	+	+	+	ov.	cen. o sub.	+	—	dig.	$\frac{+}{-}$	+	-
5	+	+	+	ov.	sub.	+	+	dig.	—	+	.
5	+	+	+	ov.	sub.	+	—	coag.	$\frac{+}{-}$	+	$\frac{+}{-}$
1	+	+	+	ov.	cen. o sub.	—	—	coag.	—	—	.
1	+	+	+	esf.	sub.	—	—	acd.	—	—	.

* = Fermentado a los 10 días. ov. = oval. esf. = esférica. sub. = subterminal.

ferentes especies de Clostridium

de alcohol	Producción de acetona	Producción de pigmento	Fermentación de carbohidratos										Diagnóstico
			Glucosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	Maltosa	Manitol	Glicerol	Almidón	Celulosa	Salicina	
-			+	$\frac{+}{\delta}$	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Cl. sporogenes</i>
-	$\frac{+}{\delta}$	-	+	-	-	$\frac{+}{\delta}$	-	-	-	-	-	-	<i>Cl. lituseburens</i>
$\frac{+}{\delta}$	-	-	+	$\frac{+}{\delta}$	-	$\frac{+}{\delta}$	-	-	-	-	-	-	<i>Cl. limosum</i>
-			*	$\frac{+}{\delta}$		$\frac{+}{\delta}$							
				*		*							
$\frac{+}{\delta}$	-	-	+	$\frac{+}{\delta}$	+	+	+	-	-	$\frac{+}{\delta}$	-	+	<i>Cl. aerofoetidum</i>
-			+	$\frac{+}{\delta}$	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Cl. nauseum</i>
-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	<i>Cl. multifementans</i>
-		-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	<i>Cl. innominatum</i>

central. dig. = digerida. coag. = coagulada. acd. = acidificada.

Cuadro 2. Distribución de las diferentes cepas

Especies aisladas	Distribución				
	Número total de cepas	Procedencia	Intervalo de pH	Intervalo de acidez libre	Intervalo de acidez volátil
<i>Clostridium sporogenes</i>	5	Salmueras alteradas	4,20-4,50	0,23-0,60	0,42-0,50
	19	Salmueras alteradas	4,60-5,30	0,23-0,45	0,42-1,10
	1	Envases vacíos			
	2	Agua de industria			
	27				
<i>Cl. lituseburense</i>	6	Salmueras alteradas	4,00-4,40	0,49-1,18	
	16	Salmueras alteradas	4,65-5,30	0,23-0,54	0,81-0,92
	1	Envases vacíos			
	1	Agua de industria			
	24				
<i>Cl. limosum</i>	3	Salmueras alteradas	4,00-4,40	0,23-0,51	0,42
	4	Salmueras alteradas	4,90-5,30	0,23-0,30	0,94-1,10
	7				
<i>Cl. aerofetidum</i>	2	Salmueras alteradas	4,10-4,15	0,39-0,51	
	3	Salmueras alteradas	4,65-4,80	0,31-0,55	
	5				
<i>Cl. nauseum</i>	1	Salmueras alteradas	4,40	0,49	
	1	Salmueras alteradas	4,90	0,35	1,0
	2	Envases vacíos			
	1	Agua de industria			
	5				
<i>Cl. multifermentans</i>	1	Salmueras alteradas	5,20	0,31	
<i>Cl. innominatum</i>	1	Salmueras alteradas	4,80	0,31	

En el *cuadro 3* se indican los límites de tolerancia de las distintas especies al pH y al tanto por ciento de cloruro sódico. Como se observa, todas se desarrollan a pH = 5,0, destacándose la mayor resistencia del *Clostri-*

dium lituseburense. Respecto a la tolerancia para el cloruro sódico, *Cl. sporogenes*, *Cl. aerofoetidum* y *Cl. lituseburense* se desarrollan al 7-8 % y el *Cl. limosum* y *Cl. nauseum*, sólo lo hacen hasta el 5 %. No se incluyen en esta parte del estudio las especies *Cl. multifementans* y *Cl. innominatum* por haberse perdido las correspondientes cepas.

Cuadro 3. Efecto del pH y concentración de sal sobre el desarrollo de las diferentes especies

Especies aisladas	Límites de tolerancia	
	Porcentaje de ClNa a pH = 7,0	pH en ausencia de ClNa
<i>Clostridium sporogenes</i>	8	5,00
<i>Cl. lituseburense</i>	7	4,75
<i>Cl. limosum</i>	5	5,00
<i>Cl. aerofoetidum</i>	8	5,00
<i>Cl. nauseum</i>	5	5,00

De acuerdo con lo ya indicado, los tres niveles de pH y cloruro sódico para el estudio de las curvas de desarrollo de las distintas especies son los siguientes:

	pH	ClNa, %
<i>Clostridium sporogenes</i>	7,0	0
<i>Cl. aerofoetidum</i>	6,0	4
	5,0	7
<i>Cl. limosum</i>	7,0	0
<i>Cl. nauseum</i>	6,0	2
	5,0	5
<i>Cl. lituseburense</i>	7,0	0
	6,0	3
	4,75	5

En los cuadros 4a-c se indican, para las diferentes especies, la duración de la fase de latencia, en horas, y el valor máximo de la fase estacionaria, expresado por el logaritmo del número de microorganismos, de las distintas curvas de desarrollo.

Puede observarse que, al aumentar el contenido de cloruro sódico, para un mismo valor de pH, se prolonga la fase de latencia. Análogamente, al disminuir el pH dentro de un mismo nivel de cloruro sódico aumenta también el período de duración de dicha fase.

Cuadro 4a. *Clostridium sporogenes*

Fase de latencia (horas)				Máximo desarrollo (log)			
pH ClNa %	7,0	6,0	5,0	pH ClNa %	7,0	6,0	5,0
0	9,5	10,0	47,0	0	8,72	8,85	8,66
4	22,5	22,5	s. d.	4	8,79	8,43	5,95
7	46,5	95,5	s. d.	7	8,26	8,30	5,95

s. d. = sin desarrollo.

Cuadro 4b. *Cl. lituseburens*

Fase de latencia (horas)				Máximo desarrollo (log)			
pH ClNa %	7,0	6,0	4,7	pH ClNa %	7,0	6,0	4,7
0	5,0	5,0	166,0	0	8,65	8,73	7,72
3	22,0	31,0	s. d.	3	8,08	7,72	5,95
5	45,5	s. d.	s. d.	5	7,99	5,95	5,95

Cuadro 4c. Cl. limosum

Fase de latencia (horas)				Máximo desarrollo (log)			
pH ClNa %	7,0	6,0	5,0	pH ClNa %	7,0	6,0	5,0
0	9	22,5	23,0	0	8,56	8,56	8,99
2	9	22,5	79,5	2	8,56	8,90	6,56
5	73,5	113,5	s. d.	5	8,32	6,56	5,95

Cuadro 4d. Cl. aerofetidum

Fase de latencia (horas)				Máximo desarrollo (log)			
pH ClNa %	7,0	6,0	5,0	pH ClNa %	7	6,0	5,0
0	8,0	22,5	44,5	0	9,11	8,65	8,56
4	22,5	22,5	s. d.	4	8,56	8,30	5,95
7	47,0	47,0	s. d.	7,0	8,08	8,26	5,95

Cuadro 4e. Cl. nauseum

Fase de latencia (horas)				Máximo desarrollo (log)			
pH ClNa %	7,0	6,0	5,0	pH ClNa %	7,0	6,0	5,0
0	6	8,5	115	0	8,72	9,08	8,68
2	22,5	22,5	s. d.	2	8,79	8,38	5,95
5	64,0	s. d.	s. d.	5	7,65	5,95	5,95

Por lo que respecta al valor máximo de la fase estacionaria, únicamente se observan diferencias significativas, en general, en los niveles extremos.

De la observación de los cuadros 3-4 se deduce, como era lógico esperar, que el efecto combinado pH-ClNa es más efectivo como inhibidor del desarrollo que la acción independiente de dichos factores.

Merece igualmente destacarse, al comparar el desarrollo obtenido a

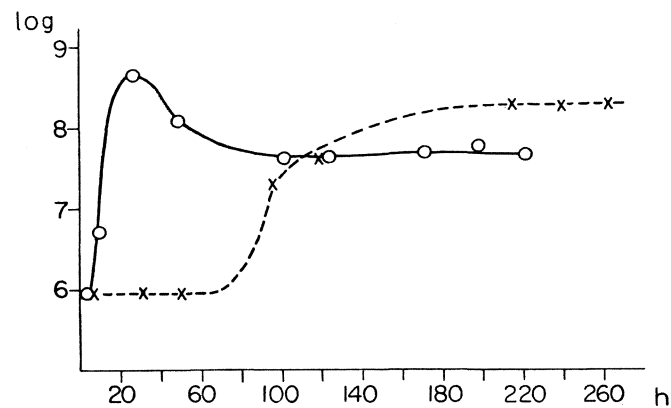


Figura 1. Clostridium sporogenes. o) pH, 7,0; ClNa, 0 %.
x) pH, 6,0; ClNa, 7 %

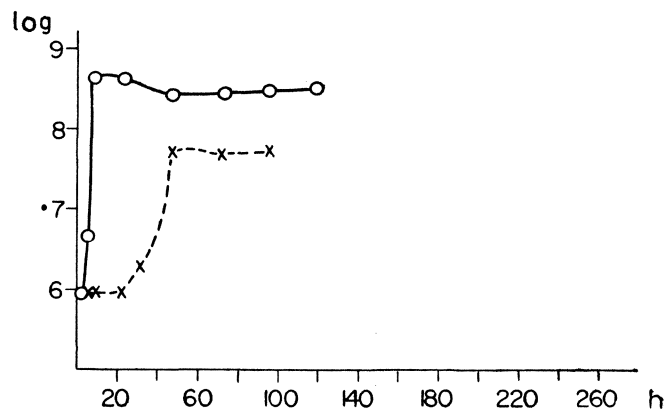


Figura 2. Cl. lituseburens. o) pH, 7,0; ClNa, 0 %. x) pH, 6,0; ClNa, 3 %

los diferentes niveles de sal y pH, que la esporulación se retrasa o inhibe al aumentar el contenido en cloruro sódico o disminuir el pH. No obstante, el efecto del primero de los factores es mucho más acusado puesto que, incluso a pH óptimo, no se produce esporulación durante el tiempo de observación (unas doscientas horas) para los niveles superiores de sal ensayados.

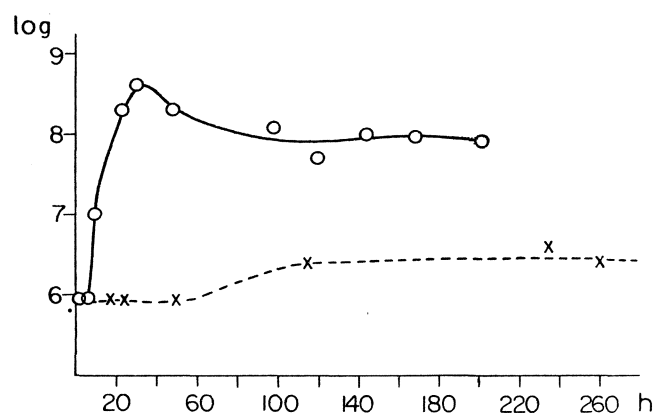


Figura 3. Cl. limosum. o) pH, 7,0; ClNa, 0 %. x) pH, 6,0; ClNa, 5 %

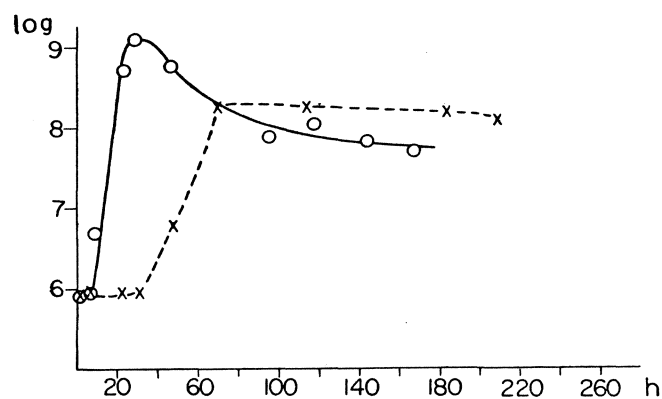


Figura 4. Cl. aerofaecidum. o) pH, 7,0; ClNa, 0 %. x) pH, 6,0; ClNa, 7 %

En las figuras 1-5 se presentan, para cada especie, ejemplos típicos de las mencionadas curvas de desarrollo, para dos niveles diferentes de pH y sal.

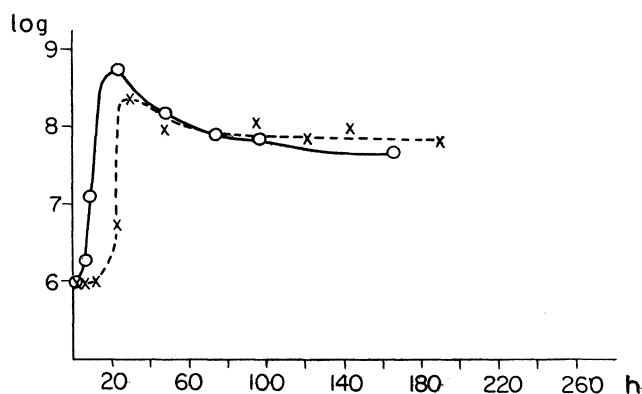


Figura 5. *Cl. nauseum*. o) pH, 7,0; ClNa, 0 %. ×) pH, 6,0; ClNa, 2 %

AGRADECIMIENTO

A la Sra. Da. M.^a Josefa Revillas de Montes, por la eficaz colaboración en el desarrollo de la parte experimental.

RESUMEN

Se estudia la sistemática de setenta cepas de *Clostridium*, aisladas de salmueras de aceitunas aderezadas alteradas. Asimismo, se estudia el efecto del pH y cloruro sódico sobre el desarrollo de las especies más representativas.

SUMMARY

A taxonomic study was undertaken on seventy strains of *Clostridium*, isolated from the brine of spoiled Spanish-Style Green Olives.

The effect of pH and salt content on the growth of the most representative species was also studied.

BIBLIOGRAFIA

1. BRÉED, R. S.; MURRAY, E. G. D., y SMITH, N. R. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7.^a edición. The Willians Wilkins Co., Baltimore.
2. GILLILLAND, J. R., y VAUGHN, R. H. 1943. *J. Bacteriol.*, 46, 315.
3. KAWATOVARI, T., y VAUGHN, R. H. 1956. *Food Res.*, 21, 481.
4. LEBERT, R., y TARDIEUX, P. 1952. *Technique d'Isolement et de Determination des Bacteries Anaerobies*. 2.^a edición. Paconsly S.A.R.L. Editeurs, París.
5. LEVIN, R. E., y VAUGHN, R. H. 1966. *Food Sci.*, 31, 768.
6. PLASTOURGOS, S., y VAUGHN, R. H. 1957. *Appl. Microbiol.*, 5, 267.
7. PREVOT, A. R. 1961. *Traité de Systematique Bacterienne*, II. Dunod, París.
8. RODRÍGUEZ-DE-LA-BORBOLLA, J. M.; FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J., y GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1959. *Grasas Aceites*, 10, 221.
9. RODRÍGUEZ-DE-LA-BORBOLLA, J. M.; FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J., y GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1960. *Grasas Aceites*, 11, 256.
10. RODRÍGUEZ-DE-LA-BORBOLLA, J. M.; GÓMEZ-HERRERA, C.; GONZÁLEZ-CANCHO, F., y FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. J. 1958. *Grasas Aceites*, 9, 118.
11. SORIANO, S. 1955. 1.^a Conf. Nacl. Olivicultura, Buenos Aires, 397.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL
SECCION DE PROTOZOOLOGIA

ESTUDIO CITOQUIMICO EN LOS EXCONJUGANTES DE *STYLONYCHIA MUSCORUM* KAHL Y *STEINIA CANDENS* KAHL (CILIADOS HIPOTRICOS)

por

PILAR ALONSO

INTRODUCCION

Al estudiar en los ciliados hipotricos el desarrollo del nuevo macronúcleo que se origina después del proceso de conjugación, hemos observado repetidamente que utilizando diversos métodos de coloración (reacción nuclear de Feulgen, acetocarmín, orceína acética y verde de metilopironina), el esbozo macronuclear se tiñe débilmente; incluso cuando los cromosomas politénicos que lo constituyen están bien desarrollados, las bandas de estos cromosomas no se colorean intensamente y se observan mejor con óptica de contraste de fases (4 y 18).

En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos utilizando diferentes técnicas citoquímicas encaminadas a demostrar la presencia de sustancias que pudieran interferir con la coloración de los ácidos nucleicos en el esbozo macronuclear.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado en este estudio dos especies de ciliados oxitríquidos: *Stylonychia muscorum* Kahl y *Steinia candens* Kahl; la primera se aisló de una muestra de agua recogida en Chamartín (Madrid) y la segunda,

de una muestra de musgo de Segovia. Ambas se vienen cultivando en nuestro laboratorio por los métodos descritos en trabajos anteriores (2-3).

Hemos utilizado como fijadores metanol — ácido acético (3:1) o sublimado alcohólico de Schaudinn. En el primer caso hemos empleado en ocasiones etanol al 95 % como postfijador. Como colorantes hemos utilizado el verde de metilo — pironina de Unna-Pappenheim (VMP) o la mezcla neutra de Grosso: verde de metilo — pironina — naranja G (VMPN) según las técnicas descritas por Romeis (22). Asimismo, hemos utilizado el azul de bromofenol mercúrico (en ocasiones sin la adición de Cl_2Hg) según los métodos de Mazia y colaboradores (14) y de Ray y Hajra (21), con algunas variantes introducidas por nosotros: coloración, de quince a veinte minutos y diferenciación en agua.

Para eliminar el ácido ribonucleico se trató el material con ribonucleasa (Boehringer o Sigma 12-B) a concentraciones de 1 mg/ml, a 37 °C, durante treinta minutos, según el método descrito por Pearse (16), siguiendo la técnica de Brachet (8) de teñir conjuntamente unas preparaciones tratadas con la enzima y otras, que sirven de testigo, con agua por destilador de vidrio. Otras preparaciones se trataron con tripsina pancreática (Sigma, tipo III, recristalizada) a concentraciones de 0,1 mg/ml en amortiguador de fosfatos 0,05M a pH = 6, durante quince minutos, a 37 °C; simultáneamente se mantuvieron preparaciones testigo en el amortiguador de fosfatos.

RESULTADOS

En preparaciones teñidas con VMP, los macronúcleos y micronúcleos de los individuos vegetativos se colorean intensamente de verde o verde azulado, mientras que el citoplasma toma un color rosado, que suele ser más intenso en el lado derecho de los individuos. En los exconjugantes, los micronúcleos se colorean también de verde azulado; el citoplasma, de rosa, y los fragmentos del macronúcleo viejo quedan teñidos en azul o morado; sin embargo, el esbozo macronuclear aparece coloreado de verde muy pálido.

En las preparaciones tratadas con la mezcla neutra (VMPN), los individuos vegetativos presentan una coloración parecida a la anterior, si bien el azul de los macronúcleos y el rosa del citoplasma son más intensos; por el contrario, en los exconjugantes se observan marcadas diferencias: el

esbozo macronuclear aparece coloreado de amarillo anaranjado, y en el citoplasma, aparte de la coloración rosa del fondo, destacan generalmente unas esferas pequeñas (de 0,5-3 μ de diámetro) en rosa intenso, y otras en anaranjado intenso o en naranja amarillento.

Cuando el VMPN se aplica después de haber tratado las preparaciones con ribonucleasa, persiste el color amarillo del esbozo macronuclear de los exconjugantes, mientras que todos los tonos rosa más o menos intensos desaparecen del citoplasma, que también queda coloreado de amarillo, con esferitas amarillas o anaranjadas en tonos más intensos; los micronúcleos destacan en tonos verdosos, y los fragmentos del macronúcleo viejo, en azul intenso o morado, presentando un aspecto muy similar al de las preparaciones sin tratar con la enzima.

La tonalidad amarilla del esbozo macronuclear aparece desde los primeros momentos en que empieza a destacarse este orgánulo, poco antes de separarse los conjugantes. Sin embargo, las esferitas amarillas del citoplasma no se observan claramente hasta después de haberse separado los conjugantes. Cuando los exconjugantes son muy jóvenes se aprecian masas anaranjadas alrededor del esbozo macronuclear, y en estados más avanzados del desarrollo se observan ya como esferas bien definidas, hasta que desaparecen por completo del citoplasma en el momento en que el esbozo macronuclear se divide en dos, originando los macronúcleos definitivos.

En preparaciones tratadas con azul de bromofenol mercúrico (o sin mercurio) por el método de Mazia y colaboradores (14), o indistintamente por el método de Ray y Hajra (21), el esbozo macronuclear de los exconjugantes aparece teñido en azul intenso (*figuras 2-6*); en los primeros estados de su desarrollo, sin estructura aparente (*figura 2*); en estados más avanzados, constituyendo filamentos (*figuras 3-5*), y posteriormente, gránulos definidos (*figuras 6*). El citoplasma de los exconjugantes aparece coloreado de azul pálido, en el que destacan esferas en azul más intenso, del mismo tamaño y localización que las esferas amarillas o anaranjadas que se observan al colorear con la mezcla neutra. El número de dichas esferas varía mucho de unos exconjugantes a otros, desde más de 100 a unas pocas (*figuras 3-6*); e incluso, en ocasiones, aparece el citoplasma sin ellas. Si las preparaciones se someten previamente a la acción de la ribonucleasa, se obtienen resultados similares, salvo que, en general, el citoplasma queda más intensamente teñido.

Por el método de Mazia y colaboradores (14) (utilizando preferentemente el azul de bromofenol mercúrico en solución acuosa), los macro-

núcleos de los individuos en estado vegetativo se colorean de azul más o menos intenso, y por el de Ray y Hajra (21), de rojo pardo, rojo sangre o azul; mientras que por cualquiera de estos dos métodos, el citoplasma aparece en azul pálido más o menos uniformemente coloreado, sobre el que destacan los cirros en azul más intenso (*figura 1*).

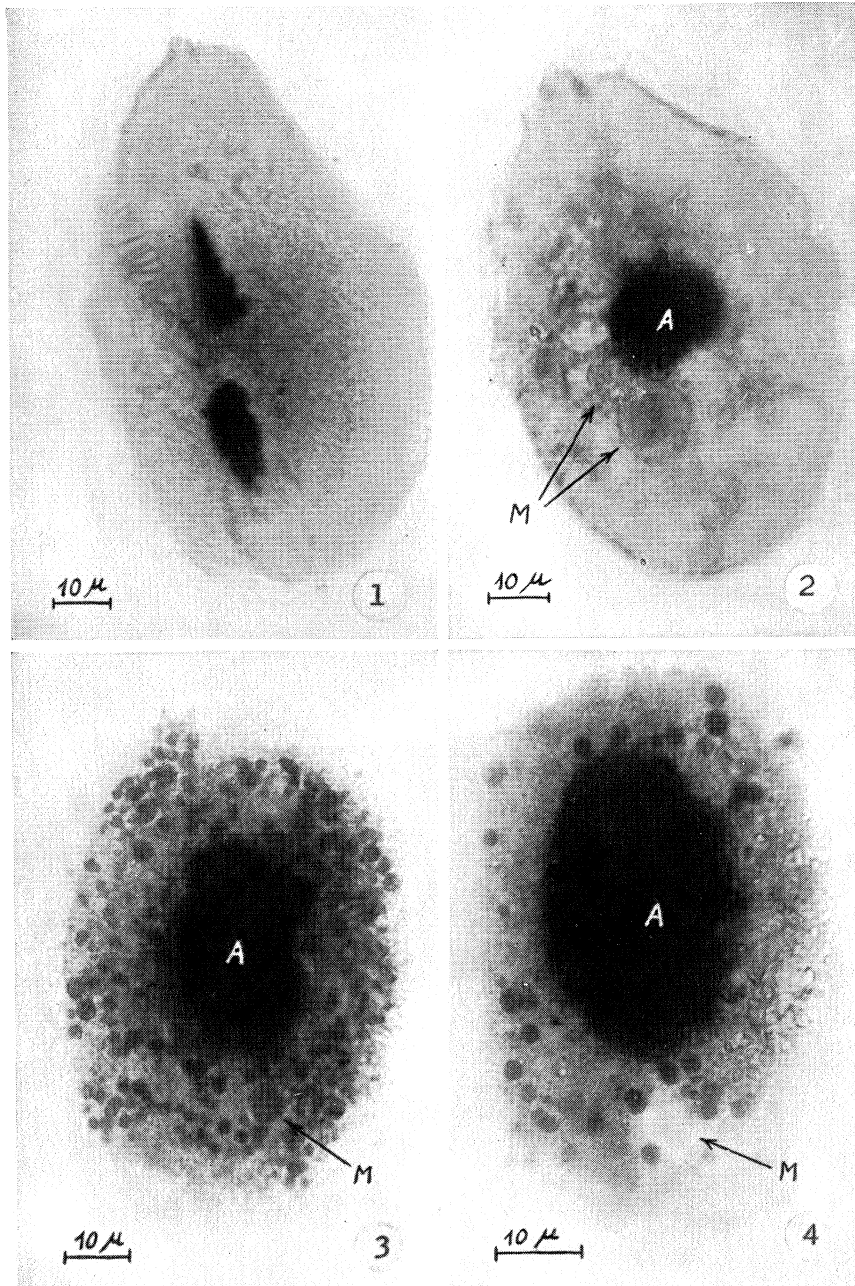
En las preparaciones tratadas con tripsina y coloreadas con la mezcla neutra, el esbozo macronuclear presenta un color azul verdoso, y el citoplasma, rosa muy pálido, en el que se aprecian ocasionalmente algunas esferas en amarillo rosado muy pálido. Por el contrario, en las preparaciones testigo, el esbozo macronuclear se colorea de amarillo, y el citoplasma, de rosa intenso, en el que se distinguen esferas de color amarillo o anaranjado.

Estas reacciones citoquímicas se han realizado principalmente con *Stylonychia muscorum*, aunque las llevadas a cabo con *Steinia candens* (*figuras 5-6*) confirman los resultados obtenidos con aquella. Sin embargo, se observa que en el citoplasma de los exconjugantes de *S. candens* teñidos con la mezcla neutra hay un predominio de las esferitas coloreadas de rosa sobre las amarillentas.

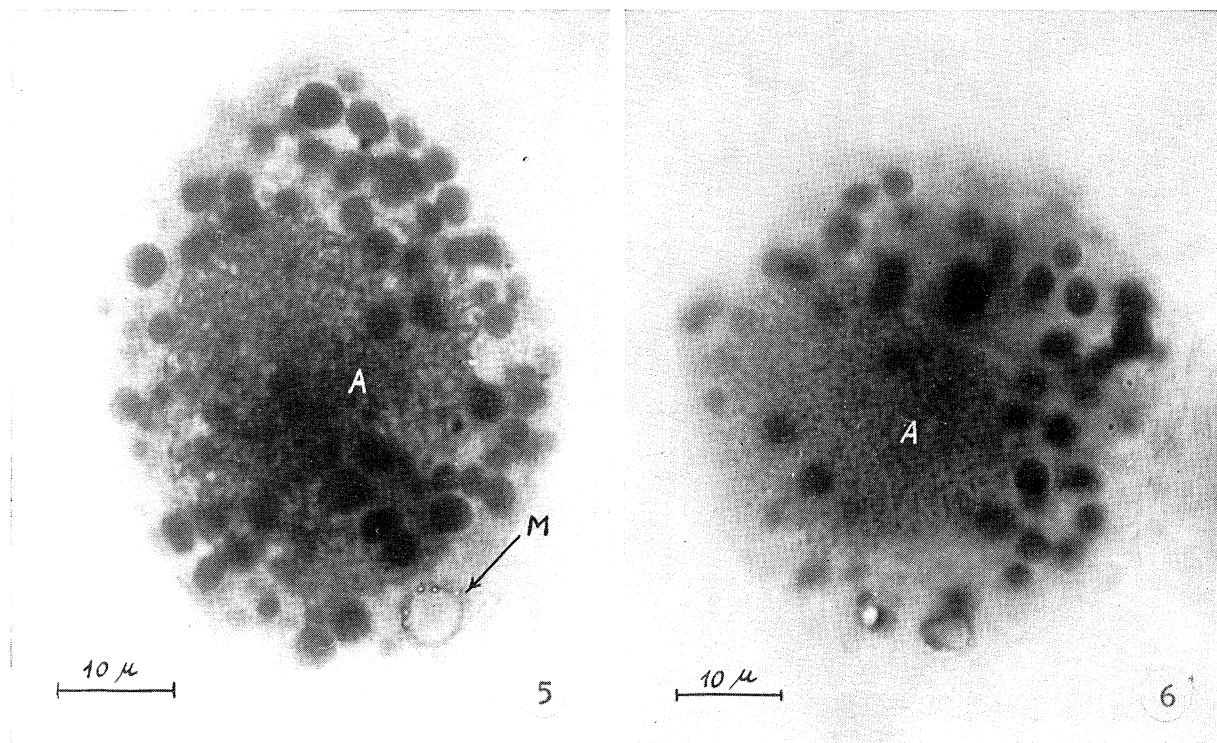
DISCUSION

Desde que Brachet demostró que la coloración doble del verde de metilo — pironina, puesta a punto por Unna y Pappenheim, diferenciaba los dos ácidos nucleicos, coloreando de verde, verde azulado o diversos tonos de morado al ADN, y de rojo o rosado al ARN (8), han aparecido numerosos trabajos en los que se emplea esta técnica. Al utilizarla nosotros, pudimos observar que existe una notable diferencia entre los macronúcleos de los individuos vegetativos y los esbozos macronucleares de los exconjugantes en cuanto a la afinidad por el verde de metilo, siendo en estos últimos mucho menor, según se ha indicado en los resultados.

Tratando de investigar la presencia de otras sustancias en el esbozo macronuclear, utilizamos estos mismos colorantes mezclados con el naranja G, según la técnica de Grosso, y pudimos comprobar la afinidad tan marcada por el naranja G que presentan, tanto el macronúcleo en desarrollo como determinados corpúsculos o esferitas del citoplasma. Estos corpúsculos destacan sobre la coloración de fondo del citoplasma, especialmente después de haber tratado las preparaciones con ribonucleasa, pues



Figuras 1-4. *Stylonychia muscorum*. Azul de bromofenol mercúrico. 1) Individuo vegetativo. 2) Exconjugante joven; en el citoplasma empiezan a destacarse corpúsculos coloreables; los fragmentos de macronúcleo viejo quedan débilmente teñidos. 3-4) Exconjugantes en estadios más avanzados que en la figura 2. Obsérvese que el número de esferas del citoplasma es mucho mayor en el individuo de la figura 3. A, esbozo macronuclear; M, fragmento de macronúcleo viejo



Figuras 5-6. *Steinia candens*. Azul de bromofenol mercúrico. 5) Exconjugante con numerosas esferitas en el citoplasma; en el esbozo macronuclear se observan filamentos que corresponden a los cromosomas politénicos. 6) Exconjugante en un estadio algo más avanzado que el de la figura 5; en el esbozo macronuclear, A, se observan gránulos individualizados. M, fragmento de macronúcleo viejo

en este caso desaparecen todos los tonos rojizos que pudieran enmascarar el amarillo o anaranjado.

Como es sabido, las técnicas que utilizan el azul de bromofenol mercúrico ponen de manifiesto las proteínas. Según se indica en los resultados, nosotros, siguiendo la técnica de Mazia y colaboradores (14) o la utilizada por Ray y Hajra (21), hemos visto que tanto el esbozo macronuclear como las esferitas del citoplasma quedan intensamente teñidos de azul. En preparaciones previamente tratadas con ribonucleasa, no observamos grandes diferencias, salvo que el citoplasma parece colorearse algo más intensamente, lo cual está de acuerdo con las observaciones de Ficq (11) en oocitos de anfibios.

El hecho de que el esbozo macronuclear se coloree débilmente con el verde de metilo de la mezcla VMP y reaccione intensamente frente al azul de bromofenol parece indicar que las proteínas que contiene el nuevo macronúcleo en desarrollo interfieren con la coloración de los ácidos nucleicos; caso comparable a los estudiados por Alfert (1) en cortes de diferentes tejidos animales, donde la coloración de los ácidos nucleicos puede variar debido a la presencia de proteínas. Además, el que con la coloración de la mezcla de Grosso (VMPN), dicho macronúcleo en desarrollo quede coloreado en amarillo, a diferencia de los fragmentos del macronúcleo viejo y al macronúcleo de los individuos vegetativos, que se colorean de azul verdoso o morado, hace suponer que las proteínas más o menos ligadas a los ácidos nucleicos se encuentren en un estado diferente, o constituyan un tipo de proteínas especiales que se manifiestan citoquímicamente en ese estado del desarrollo. Por otra parte, en las preparaciones de VMPN, tratadas previamente con tripsina, el esbozo macronuclear se colorea de azul verdoso, lo cual indica que si se eliminan las proteínas coloreables por el naranja G, el ADN puede ponerse de manifiesto con el verde de metilo de la mezcla neutra.

Si se comparan entre sí las preparaciones teñidas con la mezcla neutra (VMPN) y las tratadas con azul de bromofenol, se puede comprobar que las estructuras que se tiñen de amarillo o anaranjado con el primer colorante (esbozo macronuclear y esferitas del citoplasma) coinciden con las que reaccionan intensamente frente al azul de bromofenol; por tanto, deben estar formadas, al menos en parte, por proteínas.

Dado que en nuestros experimentos los exconjugantes se mantuvieron prácticamente sin alimento, no parece probable que dichas esferitas sean

vacuolas digestivas. Además, su aspecto es diferente al que presenta este tipo de vacuolas en los individuos vegetativos.

Por otra parte, dichos corpúsculos proteínicos podrían estar relacionados con la desintegración del macronúcleo viejo; sin embargo, según las pruebas citoquímicas realizadas no parece que contengan ADN, sino que se demuestra la presencia de ARN, al menos en algunos de ellos.

Sería interesante averiguar dónde se originan las proteínas que se ponen de manifiesto en el esbozo macronuclear y en el citoplasma de los exconjugantes. Como es sabido, la síntesis de proteínas tiene lugar preferentemente en el citoplasma; sin embargo, Brachet (9) cita varios trabajos en los que se describe una abundante síntesis de proteínas nucleares al comienzo del desarrollo de los embriones de anfibios y aves. Asimismo, según Mazia y Prescott (15) y Goldstein (12), en el núcleo de las amebas se sintetiza una considerable cantidad de proteínas, o bien esta síntesis está ligada a procesos localizados en el núcleo.

En el caso que nos ocupa, el único indicio que tenemos es que en exconjugantes muy jóvenes (e incluso antes de separarse las parejas) el esbozo macronuclear ya reacciona intensamente frente a los colorantes VMPN y ABF-Hg, mientras que las esferitas del citoplasma aparecen en estadios un poco más avanzados (*figuras 3-6*). Ese material proteico podría originarse, al menos parcialmente, en el esbozo macronuclear, o bien sintetizarse, tanto en el núcleo como en el citoplasma, de manera semejante a lo que ocurre con la ascaridina (10). Aunque en nuestro caso no tenemos pruebas de que las proteínas del esbozo macronuclear y de los corpúsculos del citoplasma sean de la misma naturaleza.

Por otra parte, se ha demostrado que el desarrollo del nuevo macronúcleo lleva consigo la formación de cromosomas politénicos (7, 13 y 18). Posteriormente (5-6) hemos podido observar la formación de bullones o "puffs" en estos cromosomas. Pelling (17) demostró que en los "puffs" de los cromosomas gigantes de las larvas de *Chironomus* se produce síntesis de ARN. Por otra parte, Sirlin y Knight (23), Plaut y Howard (20) y Platova (19), parecen demostrar síntesis localizada de proteínas en los cromosomas de las glándulas salivales de *Drosophila*. Es posible que en los cromosomas politénicos de los protozoos ciliados tengan lugar procesos de síntesis similares, que tal vez estén relacionados con la aparición de las esferitas proteínicas en el citoplasma. El hecho de que varíe tanto el número de estos corpúsculos, aún en estados muy próximos en el des-

arrollo, hace pensar que en los exconjugantes se verifica una renovación muy rápida de proteínas.

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Dr. D. Julio Pérez Silva las sugerencias y ayuda en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Utilizando como colorantes la mezcla neutra de Grosso (VMPN) y el azul de bromofenol mercúrico se han podido poner de manifiesto en los exconjugantes de *Stylonychia muscorum* y *Steinia candens* (Ciliados hipotricos) la presencia de ciertas proteínas en el esbozo macronuclear y en el citoplasma. En el esbozo macronuclear estas proteínas interfieren con la coloración de los ácidos nucleicos, y en el citoplasma se encuentran localizadas en unos corpúsculos esféricos de aspecto diferente a las vacuolas digestivas de los individuos vegetativos. Se discute el origen de estas proteínas y su posible relación con la formación y actividad de los cromosomas politénicos del esbozo macronuclear.

SUMMARY

By using the neutral mixture of Grosso (methyl green-pyronin-orange G) and the mercuric bromophenol blue test some proteins were revealed in the exconjugants of *Stylonychia muscorum* and *Steinia candens*, both in the macronuclear anlage and in the cytoplasm. Such proteins interfere with nucleic acid staining in the macronuclear anlage, and they are present in the cytoplasm as discrete spherical bodies, whose appearance is different to the food vacuoles of vegetative individuals. The origin of these proteins as well as its possible relation to the formation and activity of polytene chromosomes in the macronuclear anlage is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. ALFERT, M. 1952. Studies on basophilia of nucleic acids. The methyl green stainability of nucleic acids. Biol. Bull., 103, 145-56.
2. ALONSO, P., y PÉREZ SILVA, J. 1963. Gigantismo y variación en la dotación de cirros en *Stylonychia*. Microbiol. Españ., 16, 55-61.
3. ALONSO, P., y PÉREZ-SILVA, J. 1963. División de *Stylonychia muscorum* y variación en el número de micronúcleos. Microbiol. Españ., 16, 263-74.
4. ALONSO, P., y PÉREZ-SILVA, J. 1966. Cromosomas politénicos en ciliados hipotricos. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Nat. Secc. Biol., 64, 171-76.
5. ALONSO, P., y PÉREZ-SILVA, J. 1966. Formación de "puffs" en los cromosomas politénicos de ciliados oxitríquidos. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Nat. Secc. Biol., 64, 397-98.
6. ALONSO, P., y PÉREZ-SILVA, J. 1967. Apareamiento somático y politenización en los cromosomas gigantes de ciliados hipotricos. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Nat. Secc. Biol., 65, 469-75.
7. AMMERMAN, D. 1965. Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten *Stylonychia mytilus*. Arch. Protistenk., 108, 109-52.
8. BRACHET, J. 1953. The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. Quart. J. Microscop. Sci., 94, 1-9.
9. BRACHET, J. 1961. Nucleocytoplasmic interactions in unicellular organisms. Cell Biochem. Physiol. Morphol., 2, 822.
10. FAVARD, P. 1962. Secretion nucleolaire au cours de la spermatogenese de l'*Ascaris*. Intern. Congr. Electron Microscopy 5th Philadelphia, 2, NN6.
11. FICQ, A. 1955. Etude autoradiographique du métabolisme des protéines et des acides nucléiques au cours de l'oogénèse chez les Batraciens. Exptl. Cell Res., 9, 286-93.
12. GOLDSTEIN, L. 1958. Localization of nucleus-specific protein as shown by transplantation experiments in *Amoeba proteus*. Exptl. Cell Res., 15, 635-37.
13. GOLIKOVA, M. N. 1965. Der Aufbau des Kernapparates und die Verteilung der Nukleinsäuren und Proteine bei *Nyctotherus cordiformis* Stein. Arch. Protistenk., 108, 191-216.
14. MAZIA, D.; BREWER, P., y ALFERT, M. 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. Biol. Bull., 104, 57-67.
15. MAZIA, D., y PRESCOTT, D. M. 1955. The role of the nucleus in protein synthesis in *Amoeba*. Biochim. Biophys. Acta, 17, 23-33.
16. PEARSE, A. G. E. 1960. Histochemistry, theoretical and applied. Churchill, J. & A., London.
17. PELLING, C. 1959. Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by the incorporation of uridine labeled with tritium. Nature, 184, 655-56.
18. PÉREZ-SILVA, J., y ALONSO, P. 1966. Demonstration of polytene chromosomes in the macronuclear anlage of Oxytrichous ciliates. Arch. Protistenk., 109, 65-70.

19. PLATOVA, T. P. 1965. Detection of intermediate stages of protein synthesis in the nuclei of cells in the salivary gland of *Drosophila melanogaster*. Tsitologiya, 7, 318-25.
20. PLAUT, W., y HOWARD, E. 1963. On the relationship between nucleic acid and protein syntheses in *Drosophila* salivary gland chromosomes. J. Cell Biol., 19, 56A.
21. RAY, H. N., y HAJRA, B. 1963. Cytochemical demonstration of protein in Protozoa by mercuric bromophenol blue test. Proc. Intern. Congr. Protozool. 1st Praga 1961, 297-99.
22. ROMEIS, B. 1928. Guía-formulario de Técnica Histológica. Editorial Labor, S. A., Barcelona.
23. SIRLIN, J. L., y KNIGHT, G. R. 1960. Chromosomal synthesis of protein. Exptl. Cell Res., 19, 210-19.

SEGREGACION DE AMINOACIDOS POR UNA CEPA DE *C. INTERMEDIUM*

por

R. CLOTET, J. GUINEA y R. PARÉS-FARRÁS

1. INTRODUCCION

Se sabe que algunos microorganismos acumulan aminoácidos en el medio de cultivo durante el crecimiento (16). Este hecho se considera importante bajo dos aspectos distintos: producción industrial de aminoácidos e investigación de los mecanismos de regulación de su biosíntesis. Una cepa segregadora de aminoácidos representa la posibilidad de analizar los cambios de tipo genético y enzimático correlativos a un fallo definido en dichos mecanismos.

En el presente trabajo se describe la metodología seguida en la búsqueda deliberada de bacterias segregadoras de aminoácidos y los resultados obtenidos sobre una serie de cepas bacterianas procedentes del agua o del suelo (6 y 13).

2. MATERIAL Y METODOS

2, 1. Medio de aislamiento, procedencia y conservación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas obtenidas se han aislado en un medio que contiene 20 g de glucosa, 7 g de NH_4Cl , 1 g de PO_4KH_2 y 0,5 g de $\text{MgSO}_4/1.000$ ml. Se ajusta el pH a 7,5 con NaOH N y se esteriliza

durante quince minutos a 120 °C (pH final: 7,0). 0,1 g de una muestra líquida se extiende sobre placas de este medio solidificado con 0,9 % de agar (Difco). Se aíslan cultivos puros de las colonias morfológicamente distintas desarrolladas en el transcurso de tres días de incubación a 30 °C, sobre agar inclinado de la misma constitución. Los cultivos obtenidos proceden de diversas muestras de suelo (CP₁, C_{48/1}, P₁, P₂, P_{3/c}, C₅, P₇, C₆, P₈ y P₉), de aguas coladas de papelera (C₃, C₄, P₄ y P₅), de engrudo de almidón alterado (P₆) y de una solución fisiológica contaminada accidentalmente (CG). También se incluye la cepa de *Bacillus megaterium* 1023 de la CCTM (Lausana).

2, 2. Técnicas de identificación y taxonomía de las cepas

C₃ y P₅ son bacilos gram-negativos, oxidasonegativos, que reducen nitratos con formación de nitritos, que crecen en el medio de McConkey, que fermentan la glucosa con producción de ácido y gas, con un O/F : + / + en el medio de Hugh-Leifson y buen crecimiento a 30 °C en agar ordinario. C₃ fermenta la lactosa a 30 °C, con producción de gas, pero no a 44 °C. Utiliza citrato como única fuente de carbono (Simmons y Koser). Es Voges-Proskauer negativo o muy débil, a las tres horas; SH₂, negativo (acetato de plomo), o reacción muy ligera (Klieger); rojo de metilo, positivo; ureasa, negativo; indol, negativo; gelatina, negativo; motilidad, positiva (Craigie); P. P. A., negativo; y, KCN, positivo. Descarboxilasas (Moelles): ornitina, negativa; lisina, positiva, y arginina, negativa. Desarrolla una débil pigmentación violácea sobre agar inclinado en cultivos viejos. La identificación de este tipo de cultivo corresponde a *Citrobacter intermedium* (*Escherichia freundii*, *E. intermedia*) (3 y 9). P₅ crece en medio de lactosa a 30 °C. Citrato, negativo (Simmons). Es Voges-Proskauer negativo; SH₂, negativo; rojo de metilo, positivo; ureasa, negativo; indol, negativo; no licúa gelatina; y P. P. A., negativo. Descarboxilasas: ornitina, negativo; lisina, positivo y arginina, negativo. Sustituyendo en el medio de aislamiento la glucosa por otras fuentes de carbono, los ensayos de crecimiento dan los siguientes resultados: lactosa, positivo; manitol, positivo; sacarosa, negativo, y xilosa, positivo (12). Este tipo de cultivo corresponde a un *Escherichia coli* irregular (7, 9 y 23).

CP₁, CG, C_{48/1} y P₄ son bacilos gram-negativos, asporógenos, catalasopositivos (CG y C_{48/1}) o negativos (CP₁ y P₄), oxidasopositivos (Kovacs); crecen bien a 37 °C, en agar ordinario, prueba de O/F : —/— en

el medio de Hugh-Leifson, con crecimiento. Motilidad, positiva ($C_{48/1}$ y CP_1) o negativa (CG). Las cepas CG, C_{48} y PC_1 producen un pigmento amarillo no difusible y no producen nitritos a partir de nitratos. P_4 es acromógena y produce nitritos. Todas son indolnegativas, no licúan la gelatina (CG, $C_{48/1}$ y P_4) o la licúan (CP_1). Las cepas cromógenas (CG, $C_{48/1}$ y CP_1) corresponden al género *Flavobacterium* (7-8). La cepa P_4 es un tipo de cultivo del grupo *Acromobacter-Acinetobacter-Alcaligenes* (7-8).

P_1 y P_2 son bacilos esporógenos, gram-positivos, catalasopositivos, que crecen bien en condiciones aeróbicas sobre agar ordinario. Se presentan aislados o formando cadenas, protoplasmas de aspecto vacuolar, móviles (Graigie), esporangio no hinchado, licúan lentamente la gelatina, fermentan la glucosa sin producir gas, no producen nitritos de nitratos, forman cápsulas. Corresponden al biotipo de *Bacillus megaterium* (3).

Se describen resultados comparativos en relación con las demás cepas que no han sido objeto de estudio taxonómico.

2, 3. Medida del crecimiento

Se lleva a cabo por peso seco del residuo celular a 105 °C. Se obtiene por centrifugación a 4.000 r/m de 10 ml de cultivo durante quince minutos. Se lava tres veces con el mismo volumen de agua destilada.

2, 4. Medida de la proteína soluble

Se utiliza el método turbidimétrico de Layne (18). La curva de calibrado se prepara con un lisado de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 obtenido con clorhidrato de lisozima (14). La enzima utilizada se ha obtenido de clara de huevo, según el método de Felvod y Alderton (10). El nitrógeno proteico del sobrenadante se determina por micro-kjeldahl (2). Las cantidades de nitrógeno proteico soluble presentes en el medio de cultivo de las cepas objeto de estudio eran demasiado pequeñas para poder determinarlo directamente con dicho método.

2, 5. Medida del nitrógeno amínico soluble

Se utiliza el método espectrofotométrico de Spies & Chambers (26). Las determinaciones se llevan a cabo en el sobrenadante después de centrifugar el cultivo a 4.000 r/m. Se utiliza como blanco medio estéril trata-

do en las mismas condiciones que el problema. Por ser el medio alcalino y hallarse presente ion amonio, se forma también el complejo azul del cobre con el amoníaco, pero el método continúa siendo utilizable dentro de un amplio margen, dado que los valores de extinción de este complejo son mucho menores que los correspondientes al complejo con los aminoácidos (*cuadro 1*).

Cuadro 1. Influencia del cloruro amónico sobre la reacción del fosfato de cobre a distintas concentraciones de aminoácidos. Extinciones a 620 m μ

Aminoácidos	Cloruro amónico, g/l	
mM	0	7
0	0,000	0,022
1		0,038
2		0,068
3		0,082
4		0,104
5	0,058	0,132
15	0,203	0,309
25	0,340	0,459
40	0,554	0,640

Por sustracción de la extinción basal del medio no se obtienen los valores de la primera columna, probablemente debido a las condiciones de equilibrio entre los distintos complejos de cobre presentes (amonio, aminoácidos y alanina). Para las determinaciones se utiliza la curva de calibrado que se obtiene con los valores del *cuadro 1*, previa sustracción de la extinción basal.

2, 6. Volumen de cultivo y su corrección

Todos los ensayos referidos en los resultados se han verificado en tubos de 20 $\times$ 200 mm. Normalmente el volumen de medio es de 10 ml. Para largos períodos de incubación se corrige la disminución de volumen por efecto de evaporación a 30 °C con los valores consignados en el *cuadro 2*.

Cuadro 2. Reducción del volumen por evaporación a 30 °C. Relación superficie/volumen: tubos 20 × 200 mm. Volumen inicial: 10 ml

Horas de incubación	Factor de corrección (volumen de 1 ml)
0	1,000
24	0,992
48	0,986
72	0,978
96	0,972
168	0,948
264	0,920
360	0,890
456	0,860
600	0,820
816	0,750

3. RESULTADOS

En las condiciones de cultivo señaladas se han obtenido los correspondientes valores del nitrógeno amínico extracelular (*cuadro 3*), de la proteína soluble (*cuadro 4*) y de la masa celular (*cuadro 5*), a lo largo del tiempo. Al finalizar el período de cultivo se ha determinado el pH del medio para cada una de las cepas estudiadas (*cuadro 6*).

Las curvas de producción de aminoácidos (mM — NH_2/g de peso seco) y de autólisis (g de proteína soluble/100 g de peso seco celular) que pueden obtenerse de los datos consignados en los cuadros anteriores corresponden a dos tipos distintos, prescindiendo de los valores cuantitativos específicos de cada caso. El gráfico de la *figura 1* muestra el aspecto de dichas curvas para la cepa C_3 . El gráfico de la *figura 2*, el correspondiente a las demás cepas bacterianas estudiadas. En uno y otro caso se pone de manifiesto de forma completamente constante la existencia de un máximo durante las primeras horas de cultivo, en tanto que la masa celular permanece constante o cuando experimenta sólo un ligero incremento. Durante esta etapa, las dos curvas son sensiblemente paralelas. Por otra parte,

Cuadro 3. Nitrogeno amínico extracelular (mM/l) durante el crecimiento

Cepa	Horas							
	0	6	15	24	48	96	168	204
CP ₁	0,00	0,37	0,12	0,46	0,37	0,71	0,86	0,60
C _{4b}	0,00	0,07	0,05	0,26	0,15	0,37	0,55	0,53
P ₁	0,12	0,10	0,39	0,37	0,39	0,46	0,51	0,48
P ₂	0,20	0,12	0,39	0,30	0,32	0,55	0,53	0,61
CG	0,00	0,29	0,20	0,37	0,46	0,92	1,05	1,22
P _{3/a}	0,00	0,46	0,46	0,46	0,37	0,42	0,55	0,82
P _{3/c}	0,00	0,15	0,95	1,40	1,40	1,22	1,45	1,62
C ₃	0,00	0,32	0,82	0,92	1,15	1,80	2,37	3,22
C ₄	0,00	0,37	0,37	0,64	0,51	0,60	0,42	0,37
P ₄	0,10	0,25	0,32	0,10	0,10	0,00	0,37	0,20
P ₅	0,30	0,25	0,29	0,51	0,50	0,29	0,92	0,75
P ₆	0,00	0,05	0,55	0,39	0,43	0,55	0,82	1,08
C ₅	0,05	0,00	0,68	0,77	0,55	0,46	0,62	0,72
C ₆	0,10	0,15		1,00	0,64	0,60	1,08	0,55
CCTM	0,05	0,20	0,34	0,34	0,37	0,51	0,48	0,50

Cuadro 4. Proteína soluble (N × 6,25) durante el crecimiento. g/l de proteína soluble

Cepa	Horas							
	0	6	15	24	48	96	168	264
CP ₁			0,018	0,022	0,016	0,028	0,028	0,028
C _{4b}			0,025	0,027	0,018	0,027	0,026	0,027
P ₁	0,014	0,012 < 0,010	0,018 < 0,010	0,027	0,018 < 0,010	0,027	0,018 < 0,010	0,010
P ₂	0,016	0,012 < 0,010	0,013 < 0,010	0,027	0,011 < 0,010	0,027	0,011 < 0,010	0,010
CG		0,022	0,026	0,013	0,027	0,027	0,032	0,028
P _{3/a}		0,030	0,027	0,027	0,030	0,030	0,032	0,036
P _{3/c}	0,033	0,037	0,030	0,034	0,018	0,033	0,040	0,036
C ₃		0,024	0,030	0,030	0,029	0,037	0,038	0,038
C ₄		0,014	0,026	0,030	0,026	0,029	0,029	0,030
P ₄								
P ₅								
P ₆	0,030	0,032	0,029	0,029 < 0,010	0,029	0,037	0,031	0,031
C ₅	0,027	0,022	0,012	0,018	0,018	0,013	0,013	0,013
C ₆	0,022 < 0,010		0,011	0,014	0,012	0,012	0,012 < 0,010	0,010
CCTM	0,014 < 0,010	0,013	0,010 < 0,010	0,028	0,016	0,016	0,016	0,016

Cuadro 5. Material celular expresado en peso seco (g/l)

Cepa	Horas				
	24	48	96	168	264
CP ₁		0,285	0,440	0,490	0,380
C ₄₈		0,120	0,120	0,140	0,290
P ₁	0,190	0,300	0,275	0,275	
P ₂	0,190	0,255	0,310	0,310	
CG		0,160	0,350	0,700	0,480
P _{3/a}		0,200	0,330	0,455	0,705
P _{3/c}		0,500	0,480	0,410	0,360
C ₃		0,130	0,212	0,140	0,130
C ₄		0,315	0,382	0,385	0,415
P ₄				0,155	0,260
P ₅			0,160	0,180	0,225
C ₅	0,405	0,970	0,530	0,270	0,195
C ₆		0,100	0,180	0,360	0,360
C ₆		0,130	0,240	0,590	0,690
CCTM	0,140	0,295	0,270	0,255	

Cuadro 6. Modificación del pH del medio como consecuencia del desarrollo bacteriano. pH inicial: 7,0. Lectura final: a las doscientas sesenta y cuatro horas

Cepa	pH
CP ₁	5,0
C ₄₈	5,4
P ₁	5,1
P ₂	4,8
CG	5,3
P _{3/a}	4,1
P _{3/c}	4,2
C ₃	4,7
C ₄	4,9
P ₄	6,3
P ₅	4,6
P ₆	4,7
C ₅	4,4
C ₆	4,6
CCTM	4,4

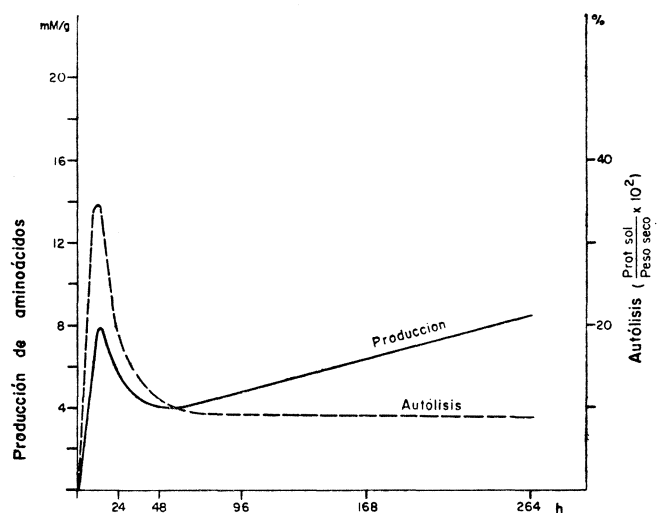


Figura 1. Producción de aminoácidos y autólisis durante el crecimiento de una cepa bacteriana productora (C_3)

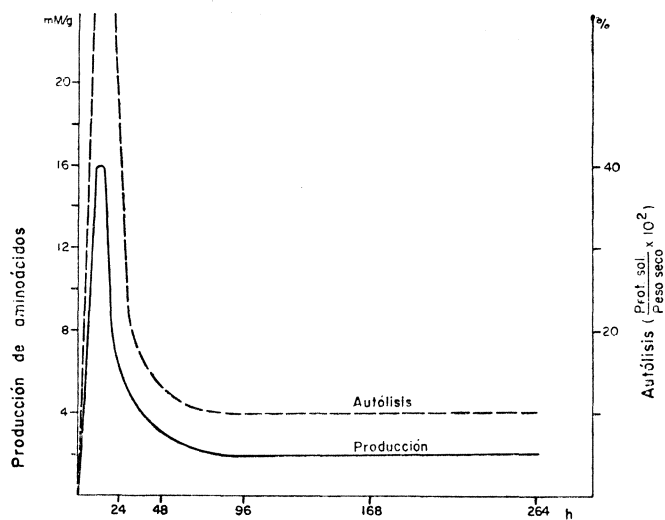


Figura 2. Producción de aminoácidos y autólisis durante el crecimiento de una cepa bacteriana no productora (CP_1 , C_{48} , P_1 , P_2 , CG , $P_{3/a}$, $P_{3/c}$, C_4 , P_4 , P_5 , P_6 , C_5 , C_6 y *B. megaterium* 1.023 CCTM)

examinando los valores absolutos de aminoácidos y proteína soluble presentes en el medio, puede observarse que son frecuentemente inferiores a los que se alcanzan en una etapa posterior del desarrollo bacteriano. La conjugación de estos hechos sugiere de forma convincente que se trata en todos los casos de un proceso de autólisis parcial del inóculo (5).

Si se admite que por término medio la fracción proteica es un 50 % del peso bacteriano durante el crecimiento logarítmico (19), los valores absolutos de proteína soluble (*cuadro 4*) pueden convertirse en equivalentes de masa celular. Estos valores pueden compararse con la masa celular correspondiente al inóculo utilizado, la cual se calcula a partir del peso seco a las cuarenta y ocho horas (*cuadro 5*) habida cuenta que se emplea como inóculo un volumen de 0,1 ml de un cultivo de este tiempo de incubación. Por otra parte, puede compararse también con el peso seco correspondiente a la masa celular presente a las veinticuatro o cuarenta y ocho horas (*cuadro 5*). Resulta interesante contemplar el cuadro de resultados obtenidos de esta forma (*cuadro 7*), porque pone en evidencia la gran importancia cuantitativa de la autólisis con respecto al inóculo, la cual

Cuadro 7. Autólisis máximas durante la fase de latencia

Cepa	Peso seco del inóculo (estimado) $g \times 10^{-4}$	Masa celular equivalente a la proteína soluble máxima $2 \times g \times 10^{-4}$ en 10 ml	Horas de cultivo	Peso seco $g \times 10^{-4}$ en 10 ml	
				24 h	48 h
CP ₁	0,285	4,4	24		28,5
C ₄₈	0,120	5,4	24		12,0
P ₁	0,300	3,6	24	19,0	30,0
P ₂	0,255	3,2	0	19,0	25,5
CG	0,160	5,2	24		16,0
P _{3/a}	0,200	6,4	15		20,0
P _{3/c}	0,500	7,4	6		50,0
C ₃	0,315	6,0	24		31,5
C ₄	0,130	6,0	24		13,0
C ₅	0,100	5,4	0		10,0
C ₆	0,130	4,4	0		13,0
CCTM	0,295	2,8	0	14	29,5

corresponde, no sólo a una porción del mismo sino incluso a una parte importante de las células formadas en esta primera etapa del cultivo. Esta etapa corresponde a la fase de latencia de la curva clásica del crecimiento bacteriano en cultivo discontinuo.

Los valores de autólisis representan la fracción mínima de material celular que se ha utilizado. En efecto, se prescinde de la fracción que haya podido degradarse, la cual no precipitaría con ácido tricloracético. El mismo descenso posterior de la curva de proteína soluble revela que de un modo u otro desaparece del medio. Por otra parte, el paralelismo señalado de la curva de aminoácidos hace pensar que estos mismos aminoácidos sean el resultado de esta degradación de la proteína de autólisis (20).

Después de un descenso de las curvas de proteína soluble y aminoácidos del medio concomitante con el inicio de la etapa logarítmica del crecimiento, dichos valores se incrementan de nuevo (*figuras 1-2*). Esta segunda fase difiere en el detalle de una a otra cepa. Una estimación comparativa puede desprenderse de la concentración máxima de aminoácidos en el medio (*cuadro 8*). Otro aspecto complementario puede derivarse de la producción máxima de aminoácidos referida a masa celular a un mismo tiempo de desarrollo (*cuadro 9*).

En todos los casos estudiados, el pH del medio inicialmente neutro se hace considerablemente ácido al final de la etapa logarítmica del crecimiento, como muestran los valores consignados en el *cuadro 6*. Esto está de acuerdo con el hecho de que todas las cepas estudiadas acidifican el medio como consecuencia de la utilización de glucosa, tanto aeróbica como anaeróbicamente.

De los *cuadros 8-9* se puede llegar a una importante conclusión: la cepa C₃ manifiesta un comportamiento completamente distinto al de las demás cepas; la segregación absoluta y relativa de aminoácidos es netamente superior y el tipo de la curva de producción de aminoácidos manifiesta un crecimiento lineal (*figura 1*). A las doscientas sesenta y cuatro horas de incubación, la cantidad de aminoácidos acumulada en el medio expresada en alanina es de 0,287 g/l, lo cual representa el 70 % del crecimiento. La importancia relativa de esta fracción y la diferencia de comportamiento con las demás cepas llevan a pensar que nos encontramos ante un fenómeno singular de segregación de aminoácidos.

Una confirmación de la conclusión establecida la constituye el análisis

Cuadro 8. Valor máximo de la concentración de aminoácidos en el medio de crecimiento de las distintas cepas estudiadas

Aminoácidos mM/l	Cepas
Menos de 0,5	P ₄
De 0,5 a 1,0	CP ₁ , C ₄₈ , P ₁ , P ₂ , P _{3/a} , C ₄ , P ₅ , C ₅ , CCTM
De 1,0 a 1,5	CG, P ₆ , C ₆
De 1,5 a 2,0	P _{3/c}
De 2,0 a 2,5	
De 2,5 a 3,0	
Mayor de 3,0	C ₃

Cuadro 9. Valor máximo de la producción de aminoácidos para las distintas cepas estudiadas

Aminoácidos nM/g	Cepas
Menos de 1,0	P ₄ , P ₅
De 1,0 a 2,0	CP ₁ , C ₁ , P ₂ , CG, P _{3/a} , C ₅ , C ₆ , CCTM
De 2,0 a 3,0	C ₄₈ , P _{3/c} , C ₄
De 3,0 a 4,0	
De 4,0 a 5,0	P ₆
De 5,0 a 6,0	
De 6,0 a 7,0	
De 7,0 a 8,0	
De 8,0 a 9,0	C ₃

de la relación aminoácidos/proteína soluble, al final de la etapa logarítmica en las distintas cepas (*cuadro 10*), la cual es sensiblemente mayor para la referida cepa C₃ de *Citrobacter intermedium*.

Cuadro 10. Relación de aminoácidos/proteína en el medio al final de la etapa logarítmica

Cepa	Horas	Amino- ácidos m M/l	Proteína soluble (N × 6,25) g/l	Amino- ácidos/ proteína soluble
CP ₁	168	0,86	0,028	30,8
C ₄₈	264	0,53	0,027	19,6
P ₁	96	0,46	0,027	17,0
P ₂	96	0,55	0,027	20,4
CG	168	1,05	0,027	38,9
P _{3/a}	264	0,82	0,036	22,8
P _{3/c}	96	1,22	0,033	37,0
C ₃	264	3,22	0,038	85,0
C ₄	96	0,60	0,029	20,7
P ₆	264	1,08	0,031	34,8
C ₅	168	0,62	0,013	47,5
C ₆	264	0,55	≅ 0,010	≅ 55,0
CCTM	96	0,51	0,028	18,2

4. DISCUSION

La constancia del fenómeno de autólisis durante la fase de latencia hace pensar que quizá sea completamente general para todas las primeras etapas del crecimiento bacteriano en cultivo discontinuo y quizá su propia causa. Esto permitiría explicar también la morfología anómala de las bacterias en la fase de latencia señalada por algunos autores (11 y 28). A la luz de los resultados aquí consignados se deberían interpretar como elementos de escasa viabilidad que terminarían por autolisarse (21).

Hay que tener en cuenta que la presencia de aminoácidos puede, en parte, ser independiente de la degradación de proteína, aun siendo ambas curvas completamente paralelas en esta etapa. En la autólisis se liberan también los aminoácidos del "pool" celular, cuya concentración absoluta será siempre proporcional a la cantidad de proteína solubilizada.

Dando por supuesto que las curvas de producción de aminoácidos y proteína correspondientes a las primeras horas del cultivo bacteriano re-

presentan un fenómeno de autólisis, es sugestivo determinar la relación entre aminoácidos y proteína soluble correspondientes a una misma masa celular presente (*cuadro 11*). Puede observarse que los valores más pequeños del cociente aminoácidos/proteína corresponden a las cepas que tienen el máximo de autólisis más precoz. Completando la conclusión señalada anteriormente que, no sólo se autolisa parte del inóculo, sino también parte del crecimiento inicial, este resultado permite inferir que el porcentaje de autólisis va disminuyendo con el tiempo de cultivo. Por otra parte, las diferencias entre los valores obtenidos entre las distintas cepas pueden ser debidas tanto a un porcentaje de autólisis distinto, como a una diferente proporción de la fracción ácido-soluble.

Cuadro 11. Relación aminoácidos/proteína en el medio durante la fase de latencia. Valores correspondientes al tiempo de autólisis máxima

Cepa	Horas de cultivo	Aminoácidos mM/1	Proteína soluble (N $\times$ 6,25) g/1	Aminoácidos/proteína soluble
CP ₁	24	0,46	0,022	20,9
C ₄₈	24	0,26	0,027	9,6
P ₁	24	0,37	0,018	20,6
P ₂	0	0,20	0,016	12,5
CG	24	0,37	0,026	14,2
P _{3/a}	15	0,46	0,030	15,3
P _{3/c}	6	0,15	0,037	4,0
C ₃	24	0,92	0,030	30,6
C ₄	24	0,64	0,030	21,3
P ₆	6	0,05	0,032	1,5
C ₅	0	0,05	0,027	1,8
C ₆	0	0,10	0,022	4,5
CCTM	0	0,05	0,014	3,5

Lógicamente, la fluctuación del cociente aminoácido/proteína entre las distintas cepas nos da unos márgenes suficientemente significativos de la variabilidad del mismo para el fenómeno de la lisis celular. En consecuencia, si encontramos en otra fase de crecimiento valores del referido cociente muy diferentes, se deberá concluir que interviene otro fenómeno distinto al de la lisis. De este modo, si los cocientes son mucho mayores,

es muy verosímil que sean consecuencia de una segregación de aminoácidos.

Se ha señalado que la lisis de una importante fracción del inóculo puede ser la causa de la fase de latencia del crecimiento. Esto parece particularmente verosímil en aquellos casos análogos a los descritos aquí, en los que el inóculo procede de un medio igual al que se utiliza para el crecimiento; donde no se puede invocar una acción selectiva de los factores de un nuevo medio sobre la población del inóculo. Entonces es posible pensar en dos alternativas: a) sólo una fracción del inóculo es viable y el resto se lisa, ahora rápidamente y de forma paulatina si hubiera continuado a lo largo de una prolongada fase estacionaria en el medio del que procede; y, b) sólo puede iniciarse el crecimiento si se encuentran factores específicos como cebadores. Esta última eventualidad representaría que el medio de crecimiento utilizado no es estrictamente suficiente para soportarlo. En realidad, no se ha obtenido hasta el presente una evidencia para ninguna de las dos posibilidades, señalándose simplemente como una visión coherente de los hechos observados. Por otra parte, la referida evidencia es marginal a la problemática que aborda el presente trabajo.

Los cocientes aminoácidos/proteína consignados en el *cuadro 10* no difieren sustancialmente de los encontrados para la fase de latencia (*cuadro 11*) más que en algunos pocos casos, entre los cuales destaca netamente *Citrobacter intermedium* C₃. Por lo tanto, se hace evidente la existencia de un fenómeno de segregación de aminoácidos para esta cepa. En la cepa C₆, no sólo el cociente aminoácidos/proteína es ya notablemente inferior, sino que la concentración absoluta de aminoácidos es muy pequeña (*cuadro 8*).

Las cantidades de proteína soluble que se encuentran después de la fase de latencia son variables de una cepa a la otra, si bien en valor absoluto del mismo orden que las encontradas en la fase de latencia. Sin embargo, como la cantidad de material celular es mucho mayor, sólo son consistentes con el supuesto de una constante fracción de lisis celular que puede ser incrementada sensiblemente durante la etapa estacionaria. Esta observación está de acuerdo con la interpretación que antes se ha dado de la autólisis durante la latencia.

Citrobacter intermedium C₃ se muestra como una cepa que acumula aminoácidos durante el crecimiento con independencia de la autólisis celular. En las condiciones estudiadas, el valor máximo obtenido es de

3,22 mM/l. Si lo comparamos con los valores obtenidos con las cepas bacterianas productoras de aminoácidos consignados en el *cuadro 12*, llegamos a la conclusión de que la producción es relativamente pequeña. Sin embargo, se considera que es importante disponer de una cepa capaz de desarrollar una verdadera producción directa de aminoácidos que se acumulan en el medio. Las experiencias precedentes han tenido por objeto conseguir este resultado bajo unas condiciones rigurosas y en ningún momento se ha planteado la posibilidad de incrementar la cantidad de aminoácidos producidos. En los valores más altos consignados en el *cuadro 12* se hace referencia a rendimientos obtenidos en procesos cuidadosamente estudiados para llevar la producción de aminoácidos al máximo posible.

Cuadro 12. Concentración final de aminoácidos en el medio, en varios procesos de producción directa por fermentación

Aminoácido dominante	Concentración total en mM/l	Microorganismo	Autor
Acido L-glutámico	17,0	<i>Escherichia coli</i> K-2	Kinoshita (17)
Acido L-glutámico	13,5	<i>Sarcina lutea</i>	"
Acido L-glutámico	12,9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	"
Acido L-glutámico	15,6	<i>Bacillus megaterium</i>	"
Acido L-glutámico	143,0	<i>Micrococcus</i> núm. 534	"
Acido L-glutámico	10,9	<i>Streptomyces sinnamonensis</i>	"
Acido L-glutámico	13,5	<i>Torulopsis utilis</i>	"
Acido L-glutámico	17,0	<i>Penicillium chrysogenum</i>	"
Acido L-glutámico	12,2	<i>Mucor racemosus</i>	"
Acido L-glutámico	9,5	<i>Aspergillus oryzae</i>	"
Acido L-glutámico	6,8	<i>Rhizopus nigricans</i>	"
Acido L-glutámico	20,4	<i>Micrococcus varians</i>	Asai (1)
L-alanina	36,0	<i>Fusarium moniliforme</i>	Carito y Pisano (4)
L-alanina	224,0	Bacilo gram-negativo no especificado	Samejima (24)
L-lisina	137,0	<i>Micrococcus glutamicus</i> M-534	Nakayama (20)
L-treonina	12,6	<i>Escherichia coli</i> 13071	Huang (15)
L-valina	128,0	<i>Aerobacter cloacae</i> NISR-B-151	Sugisaki (27)
L-fenilalanina	6,0	<i>Bacillus</i> sp. NK2	Shibuya (25)

RESUMEN

En los resultados de las determinaciones de nitrógeno (N_a), proteína soluble (P_1) y peso seco (P_s) durante el crecimiento, en 15 cepas bacterianas aisladas del suelo, llevado a cabo en un medio completamente mineral con glucosa, igual al que había servido para el aislamiento, se encuentra un máximo de N_a y P_1 durante la fase de latencia. Ocasionalmente, también en la fase estacionaria, pero con un valor relativo a P_s muy pequeño, con la sola excepción de una etapa denominada C_3 . En ésta N_a llega a alcanzar 3,2 mM/l frente a P_1 despreciable.

Se da considerable evidencia experimental para admitir que la presencia de N_a y P_1 durante la fase de latencia es consecuencia de un fenómeno de autólisis. Igualmente se pone de manifiesto que la acumulación de N_a al final de la etapa logarítmica del crecimiento de C_3 tiene lugar sin autólisis sustancial.

Se describen taxonómicamente las cepas estudiadas y en particular la C_3 , clasificándola como *Citrobacter intermedium*.

SUMMARY

This paper reports a screening among soil and water bacterial strains accumulating free amino-acids extracellularly during growth. The isolating and cultivation medium contains: dextrose (20 g/l), NH_4Cl (7 g/l) and mineral salts (see 2,1). The taxonomy of the isolated strains is described (see 2,2): *Citrobacter intermedium* (C_3); irregular *Escherichia coli* (P_3); strains of *Flavobacterium* sp. (CG, $C_{48/1}$ and CP_1); a member of the group *Achromobacter-Acinetobacter-Alcaligenes* (P_4); and two strains of *Bacillus megaterium* (P_1 and P_2).

The bacterial growth is measured by the dry weight to 105 °C. The free proteins by the Layne method (18) using standard curve the one obtained by micro-Kjeldhal determinations of proteinic nitrogen in a preparation from a bulk enzymatic bacterial lysis (14). The aminic nitrogen determinations were made by the Spies and Chambers method (26) making a correction for the effect of residual ammonia (table 1). The assays were usually carried out in amounts of 10 ml of the stated culture medium, using 20 × 200 mm tubes. The loss of volume due to evaporation after prolonged incubation periods at 30 °C was corrected (table 2).

In tables 3-5, the amounts of aminic extracellular nitrogen (A_n), free protein (F_p) and dry weight (D_w) are respectively stated all through the incubation period. In the figures 1-2 the two different types of curves

obtained for the amino-acid production $\frac{A_n}{D_w}$ and the stimatd

autolysis $\frac{F_p}{D_w}$ are stated. It is taken as a positive test of aminoacid

excretion an increasing quotient $\frac{A_n}{F_p}$ during the logarithmic phase.

Meroveover, the value of this quotient during the logarithmic phase stays clearly higher than the same during the lack phase. Thus *Citrobacter intermedium* C_3 is well separated from the other strains studied as an organism able to excrete amino-acids. This late conclusion is confirmed too by the tables 8-9 wich show the relative maximum amounts of

A_n and $\frac{A_n}{D_w}$. At 264 hours of incubation time the amount of amino-

acids accumulated in the medium is of 0.287 g/l taken as alanine. This represents 70 % of growth. In table 12 the production of amino-acids by *Citrobacter intermedium* C_3 is compared with the production of different amino-acids by direct fermentation by other organisms as found in litterature.

In all the strains investigated the examination of the curves $\frac{A_n}{D_w}$

and $\frac{F_p}{D_w}$ states clearly the importance of the autolysis in the lack phase

(table 7). This fact is independent of the ability of the strain to excrete amino-acids but it has some interest concerning a more correct understanding of the lack phase.

5. BIBLIOGRAFIA

1. ASAI, T.; AIDA, K., y OISHI. 1957. Bull. Agr. Chem. Soc., 21, 134.
2. Association of Official Agricultural Chemists. 1960. Official Methods of Analysis, 9.^a edición. Washington, D. C.
3. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7.^a edición. 1957. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
4. CARITO, S., y PISANO, M. 1966. Appl. Microbiol., 14, 39.
5. CLOTET, R. 1962. Producción de aminoácidos por bacterias del suelo. I Reunión de Microbiólogos Españoles, Madrid.
6. CLOTET, R. 1968. Producción directa de alanina por *Citrobacter intermedium* C3. Tesis doctoral. Universidad de Madrid.
7. COLLINS, C. H. 1967. Microbiological Methods. Butterworths.
8. COWAN, S. T., y STEEL, K. J. 1965. Manual of the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press.
9. EDWARDS, P. R., y EWING, W. H. 1964. Identification of Enterobacteriaceae. Burges Pub. Co.
10. FELVOLD, H. L., y ALDERTON, G. 1949. Biochemical Preparations, I, 67. J. Wiley & Sons, N. Y.
11. GARDNER, H. O. 1948. The Biology of Bacteria. Heat and Co.
12. GUINEA, J. 1962. Utilización de azúcares por bacterias del suelo. I Reunión de Microbiólogos Españoles, Madrid.
13. GUINEA, J. 1966. Estudio sobre la segregación de aminoácidos por *E. intermedia* C3 y su condicionamiento genético. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
14. HERBERT, D. 1955. Catalase from bacteria (*Micrococcus lysodeikticus*). Methods Enzimol., II.
15. HUANG, H. T. 1961. Appl. Microbiol., 9, 419.
16. KINOSHITA, S. 1959. The production of aminoacids by fermentation process. Advan. Appl. Microbiol., I.
17. KINOSHITA, S.; NAKAYAMA, K., y UDAKA, S. 1963. J. Gen. Appl. Microbiol. Tokyo, 3, 193.
18. LAYNE, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods Enzimol., III.
19. LURIA, S. E. 1960. The Bacterial Protoplasm: Composition and Organisation. Bacteria, I.
20. NAKAYAMA, K.; NIKADA, S., y KINOSHITA, S. 1960. Amino Acids, 2, 105.
21. PARÉS, R. 1965. Proteínas extracelulares en la fase de latencia del crecimiento bacteriano. Real Academia de Farmacia, de Barcelona.

22. PARÉS, R., y CLOTET, R. 1963. Producción de aminoácidos por bacterias del suelo. VII Jornadas Bioquímicas Latinas, Génova.
23. PARR, L. W. 1938. J. Bacteriol., 36, 1-14.
24. SAMEJIMA, H.; FUJITA, C.; NARA, C., y KINOSHITA, S. 1960. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 34, 838.
25. SHIBUYA, H.; SUZUKI, S.; FUJII, Y., y UENURA, T. 1960. Amino Acids, 2, 120.
26. SPIES, J. R. 1957. Colorimetric procedures for amino acids. Methods Enzimol., III.
27. SUGISAKI, Z. 1959. J. Gen. Appl. Microbiol. Tokyo, 5, 138.
28. XALABARDER, C. 1963. Treballs Soc. Catalana Biol., 18, 31.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA DE INFECCIONES BACTERIANAS

COMPORTAMIENTO DE ALGUNAS ESPECIES DE *ERWINIA* FRENTE A LOS ANTIBIOTICOS

por

MARÍA T. IRIARTE y PURIFICACIÓN FERNÁNDEZ

INTRODUCCION

En relación con el comportamiento del género *Erwinia* frente a los antibióticos, son pocos los estudios microbiológicos encontrados pese al interés de esta bacteria. English y Van Halsena, en 1954 (1), hicieron experiencias de adaptación de *E. amylovora* a la estreptomycin y terramicina.

Posteriormente, otros autores vuelven a ocuparse de la estreptomycin-resistencia, en relación con la *Erwinia chrysanthemi* (10) y la *E. amylovora* (11). Asociando este mismo antibiótico con otras sustancias químicas se ha visto su acción sobre *E. carotovora* (3).

También son de gran interés otros trabajos en relación con los efectos de ciertas penicilinas y de la cicloserina sobre la inhibición del crecimiento y división de especies de *Erwinia* (5-6), pero no se encuentra un trabajo completo frente a distintos antibióticos en los diferentes aspectos que presenta la quimiorresistencia.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias

Erwinia carotovora. Estirpe (NCPPB) 312 de la colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas, de Harpenden (Inglaterra).

Erwinia atroseptica. Estirpe (NCPBP) 443 de la colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas, de Harpenden (Inglaterra).

Antibióticos

Se emplearon 15 antibióticos: penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, polimixina, kanamicina, novobiocina, oxitetraciclina, clorotetraciclina, neomicina, colimicina, paramomicina, aminosidina y oleandomicina.

Con ellos se prepararon soluciones patrón en agua destilada a las concentraciones necesarias en cada caso. Estas soluciones se esterilizaron por filtración y se conservaron de acuerdo con la pauta señalada por Grove y Randall (4).

Medios de cultivo

Se han utilizado diversos medios: el de Smith (12), el medio para fitopatógenos del "Northern Regional Research Laboratory" (*); una variación de este medio, cuya composición es: triptona, 10 g; extracto de levadura, 10 g; fosfato bipotásico, 2 g; agua destilada, c. s. p. 1 l; y por último, se ha empleado también medio líquido Penassay (Difco).

En el *cuadro 1* se indican algunas características de los medios de cultivo anteriormente utilizados.

Cuadro 1. Características de los distintos medios utilizados

Medios	pH a 22 °C	Sustancias reductoras mg/cm ³	Nitrógeno inorgánico mg/cm ³	Nitrógeno orgánico mg/cm ³	Nitrógeno total mg/cm ³
Smith	7,0	0,2	0,21	0,9676	1,1776
Penassay	7,2	1,0	—	0,9752	0,9752
Fitopatógeno	7,3	2,0	—	1,9356	1,9356
Fitopatógeno 1G	7,1	1,0	—	1,9356	1,9356

(*) V6ase "Manual of Microbiological Methods", de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos.

El medio sólido de mantenimiento se preparó añadiendo al medio para fitopatógenos agar al 1,25 %.

En cuanto a los medios empleados en el estudio comparativo de las pruebas bioquímicas, son los habituales en estos casos (2).

Determinación de antibióticosensibilidad

La técnica empleada consistió en determinar la C. M. I. sobre medio líquido, con un indicador, siguiendo una pauta ya habitual en nuestro laboratorio (8-9).

Control de resistencias cruzadas

Después de obtener estirpes antibiótico-resistentes por adaptación, se determina la C. M. I. sobre medio líquido frente a los 15 antibióticos indicados anteriormente.

Adaptación a la antibiótico-resistencia

La técnica seguida para la obtención de estirpes antibiótico-resistentes es la de Pérez-Ureña (7).

Estudio de pruebas bioquímicas

Se han seguido técnicas perfectamente experimentadas (véanse 2 y 13).

RESULTADOS

I) Estudio de la antibióticosensibilidad en función de la edad y medio de cultivo

Se hizo sobre dos especies de *Erwinia*, y de los resultados, medidos en C. M. I., dan idea los cuadros 2-3.

II) Estudio de la sensibilidad frente a asociaciones antibióticas

Los resultados obtenidos se indican en grados de crecimiento medidos a densidad óptica de 600 m μ , y adoptando una disposición semejante a la utilizada en el protocolo experimental para mejor obtener una representación del método (cuadro 4).

Cuadro 2. Variaciones en la antibióticosensibilidad de *Erwinia atroseptica* en distintos medios y según la edad del cultivo

Antibióticos	C.M.I. en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de medio líquido					
	Medio Smith			Medio Penassay		
	20 h	48 h	96 h	20 h	48 h	96 h
Penicilina	250,00	250,00	250,00	250,00	250,00	250,00
Estreptomicina	7,81	31,25	7,81	31,25	31,25	62,50
Cloranfenicol	3,90	15,62	15,62	15,62	15,62	15,62
Tetraciclina	0,97	0,97	0,97	0,97	0,73	1,46
Clorotetraciclina	0,97	0,97	0,97	0,73	0,73	1,46
Oxitetraciclina	0,97	0,97	0,97	0,73	0,73	1,46
Eritromicina	125,00	125,00	31,25	62,25	73,75	125,00
Polimixina	0,97	2,92	3,90	0,97	0,97	0,48
Neomicina	0,97	3,90	0,97	1,46	3,90	1,46
Novobiocina	46,87	46,87	250,00	73,75	73,75	62,50
Oleandomicina	250,00	250,00	250,00	250,00	250,00	250,00
Kanamicina	3,90	7,81	15,62	3,90	3,90	7,81
Colimicina	31,25	31,25	250,00	31,25	31,25	125,00
Paromomicina	0,97	15,62	250,00	1,46	7,87	7,81
Aminosidina	3,90	15,62	7,81	3,90	3,90	7,81

III) Adaptación a la antibiótico-resistencia en estirpes de *Erwinia*

De los resultados obtenidos dan una idea las figuras 1-4.

IV) Modificaciones bioquímicas, producidas por distintas acciones antibióticas en células de *Erwinia carotovora*

Las variaciones en el comportamiento frente a compuestos carbonados, de estirpes normales y antibiótico-resistentes de *Erwinia carotovora* están representadas en el cuadro 5.

Su acción sobre ácidos orgánicos y sales de ácidos orgánicos, en el cuadro 6.

En el cuadro 7 vemos su acción frente a diversas pruebas bioquímicas, como reducción de nitratos, licuefacción de gelatina, producción de indol, rojo de metilo, producción de SH_2 , Voges-Proskauer y triple azúcar.

Cuadro 3. Variaciones en la antibióticosensibilidad de E. carotovora en distintos medios y según la edad de cultivo

Antibióticos	C.M.I. en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de medio líquido							
	Medio Smith		Medio Penassay		Medio fitopatígeno		Medio fitopatígeno 1 G	
	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h
Penicilina	0,73	2,92	5,85	5,85	1,46	0,73	5,85	2,92
Estreptomicina	0,73	1,46	5,58	73,75	0,52	0,48	2,92	11,71
Cloranfenicol	73,75	187,50	187,50	125,00	187,50	73,75	187,50	187,50
Tetraciclina	0,48	1,46	0,73	0,73	0,48	0,48	2,92	2,92
Clorotetraciclina	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
Oxitetraciclina	0,48	0,73	0,48	0,48	0,48	0,48	0,73	0,73
Eritromicina	125,00	125,00	73,75	125,00	46,87	31,25	73,75	46,87
Polimixina	0,48	0,48	0,97	0,48	0,48	0,73	0,52	5,85
Neomicina	2,92	5,85	2,92	2,92	1,46	0,73	2,92	1,46
Novobiocina	62,50	73,75	73,75	73,75	73,75	23,43	73,75	31,25
Oleandomicina	375,00	375,00	375,00	375,00	375,00	375,00	375,00	375,00
Kanamicina	2,92	3,90	7,81	7,81	0,97	0,52	5,85	16,12
Colimicina	0,73	2,92	1,46	0,97	1,46	2,92	5,85	11,71
Paromomicina	2,92	2,92	5,85	7,81	0,97	0,73	2,92	5,85
Aminosidina	7,81	5,85	7,81	7,81	1,46	0,73	5,85	5,85

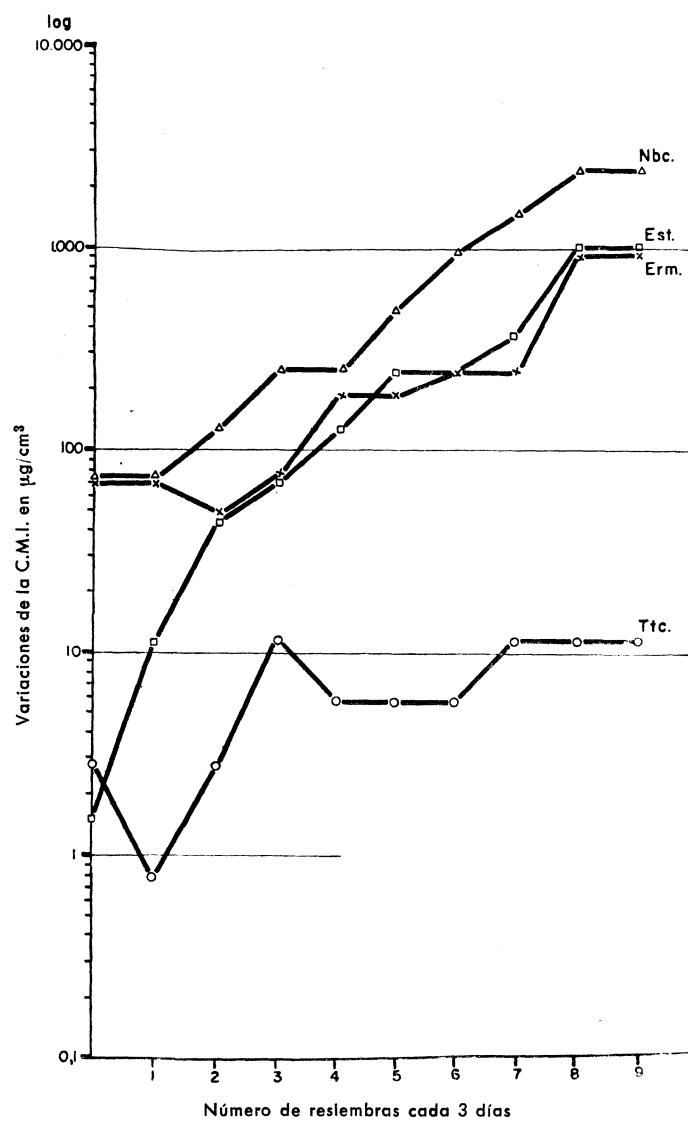


Figura 1. *Erwinia atroseptica*. Nbc., novobiocina. Est., estreptomicina. Erm., eritromicina. Tt., tetraciclina

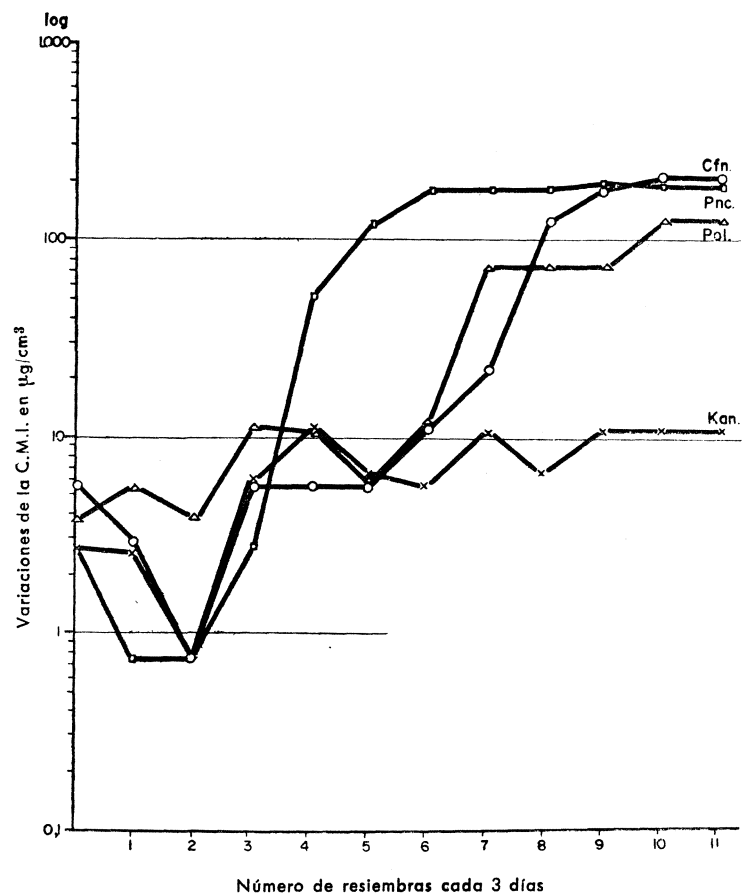
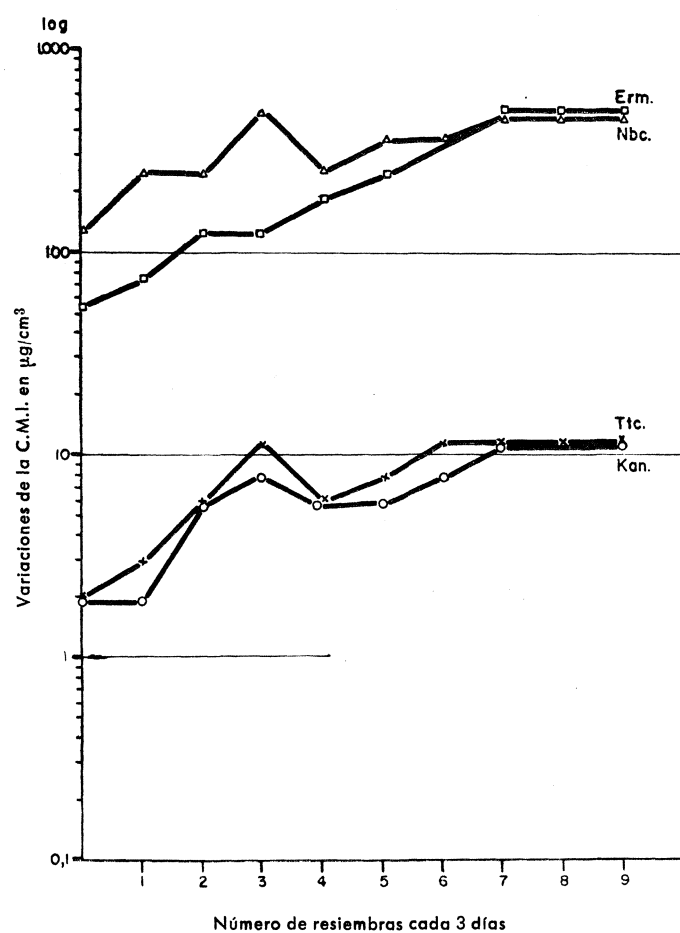
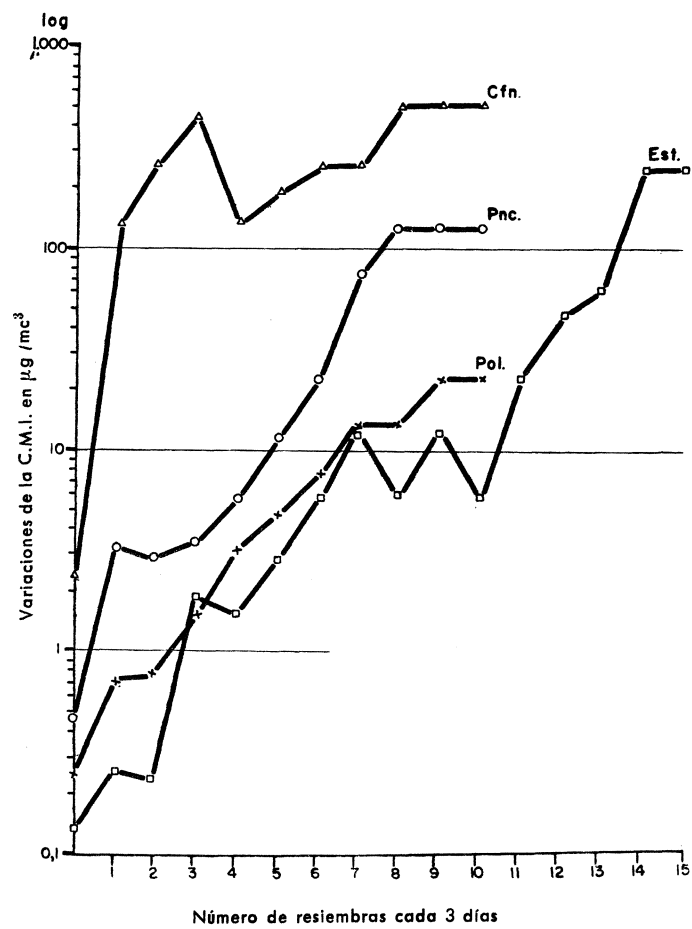


Figura 2. *E. atroseptica*. Cfn., cloranfenicol. Pnc., penicilina. Pol., polimixina. Kan., kanamicina

Figura 3. *E. carotovora*

Figura 4. *E. carotovora*

Cuadro 5. Variaciones en el comportamiento, frente a compuestos carbonados, de estirpes normales y antibiótico-resistentes de E. carotovora

[illegible]

Cuadro 6. Variaciones en el comportamiento, frente a ácidos orgánicos y sales de ácidos orgánicos, de estirpes normales y antibiótico-resistentes de E. carotovora

Estirpes	Hipurato sódico	Malo- naño sódico	Tartrato sódico	Urato sódico	Pectato sódico	Acido péctico
Estirpe normal	±	±	±	+	±	—
Penicilin-resistente	+	—	—	+	±	—
Estreptomycin-resistente	±	—	—	+	±	—
Cloranfenicol-resistente	+	—	—	+	±	—
Tetraciclín-resistente	—	—	—	+	±	—
Eritromicin-resistente	+	—	—	+	±	—
Polimixin-resistente	±	—	—	+	±	—
Kanamycin-resistente	+	—	—	+	±	—
Novobiocin-resistente	+	—	—	+	±	—

Cuadro 7. Variaciones en el comportamiento, frente a distintas pruebas bioquímicas, de estirpes normales y antibiótico-resistentes de E. carotovora

Estirpes	Reduc- ción de hidratos	Licuefac- ción de gelatina	SH ₂	Indol	Voges- Pros- kauer	Rojo de metilo	Triple azúcar
Estirpe normal	+	+	—	—	—	+	+
Penicilin- resistente	+	+	—	—	—	+	+
Estreptomycin- resistente	+	+	—	—	—	+	+
Cloranfenicol resistente	+	+	—	—	—	+	+
Tetraciclín- resistente	+	+	—	—	—	+	+
Eritromicin- resistente	+	+	—	—	—	+	+
Polimixin- resistente	+	+	—	—	—	+	+
Kanamycin- resistente	+	+	—	—	—	+	+
Novobiocin- resistente	+	+	—	—	—	+	+

Y las variaciones en el comportamiento frente a medios hostiles están representadas en el *cuadro 8*.

Cuadro 8. Variaciones en el comportamiento, frente a medios hostiles, de estirpes normales y anti-biótico-resistentes de E. carotovora

Estirpes	Medio de fitopatógenos con ClNa 5 %, a las 24 h	Medio de fitopatógenos con ClNa 7 %, a las 24 h
Estirpe normal	+	—
Penicilin-resistente	±	—
Estreptomycin-resistente	—	—
Cloranfenicol-resistente	+	—
Tetraciclín-resistente	+	—
Eritromicin-resistente	+	—
Polimixin-resistente	—	—
Kanamycin-resistente	+	—
Novobiocin-resistente	+	—

CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

Los distintos resultados obtenidos sobre medios líquidos, frente a 15 antibióticos aislados, nos permitieron comprobar la existencia de algunas variaciones de sensibilidad, tanto a nivel de especies como incluso a nivel de la propia estirpe bacteriana.

En el primer caso se pudo observar sobre dos medios de distinta composición que las variaciones eran bastante acusadas para la penicilina, cloranfenicol y colimicina, y ligeras para estreptomina, neomicina, paromomicina y aminosidina, hasta el punto de originar calificaciones distintas en cuanto al grado de resistencia. Sin embargo, ambas especies (*Erwinia atroseptica* y *E. carotovora*) se mostraron de acuerdo en cuanto a su acusada sensibilidad frente a tetraciclinas y polimixina, teniendo sensibilidad variable frente a kanamicina, paromomicina y kanamicina, siendo resistentes a eritromicina, novobiocina y oleandomicina.

Entre las variaciones a nivel de la estirpe hay que distinguir entre los factores que dependen del medio ambiente (pH, sustancias reductoras, nitrógeno del medio) y los derivados de ciertas condiciones de la célula, como la edad del cultivo. Así, se ha visto en ensayos de veinticuatro horas que variaciones en el medio pueden modificar bastante los resultados en el comportamiento frente a penicilina, estreptomycin, eritromicina, kanamicina y paromomicina; producir modificaciones ligeras con tetraciclina, oxitetraciclina, polimixina, neomicina, colimicina y aminosidina; y ninguna modificación en los resultados frente a clorotetraciclina, novobiocina y oleandomicina.

Por otra parte, el hecho de que para estos ensayos se observen más modificaciones en cultivos de cuarenta y ocho horas que en los de veinticuatro horas habla elocuentemente de la marcada intervención del medio en los procesos de adaptación a la antibiótico-resistencia *in vitro*.

En general, se observa que la elevación del pH y las sustancias reductoras en el medio tiende a hacerlos más sensibles.

En cuanto a la posibilidad de acciones de sinergia antibiótica respecto al género *Erwinia*, se han hecho frente a un centenar de asociaciones bivalentes. Al observar los resultados obtenidos, se puede ver que lo que otros autores consideraron sinergismo entre estreptomycin y oxitetraciclina es más bien una acción aditiva, ya que el verdadero sinergismo aparece entre estreptomycin y penicilina o novobiocina, paromomicina y aminosidina y colimicina con novobiocina.

En cuanto a las posibilidades de adaptación a la antibiótico-resistencia en el género *Erwinia*, se puede ver que, en general, la especie *E. carotovora* alcanza más fácilmente que la *E. atroseptica* niveles elevados de resistencia.

En cuanto a la acción inductora de las diferentes drogas, se ve que con tetraciclina y kanamicina no se consigue fácilmente la adaptación y los niveles alcanzados son siempre mucho más bajos; sin embargo, con la estreptomycin, cloranfenicol, eritromicina y novobiocina se obtienen altos niveles de resistencia que se desarrollan rápidamente; y finalmente, la polimixina muestra un comportamiento intermedio, no alcanzando niveles tan elevados y siendo más lenta su implantación.

No se ha prestado atención a la aparición de resistencias frente a asociaciones antibióticas por ser un hecho perfectamente demostrado: la existencia de sinergismos disminuye las posibilidades de aparición de antibiótico-resistencia y la frecuencia de aparición de mutaciones viene dada

por una razón de mutación inferior, que es igual a la suma de los exponentes de dilución en ambas drogas.

En relación con la implantación de resistencias cruzadas —fenómeno importante, a tener en cuenta con vistas a una antibiótico-resistencia de carácter evolutivo en la especie tratada— se puede ver que el comportamiento es algo más complejo de lo que se venía observando sobre estirpes de origen humano.

En cualquier caso, es lógico pensar que en esta aparición de resistencias cruzadas influirá el nivel de antibiótico-resistencia alcanzado por cada estirpe, pero para nuestro concepto, todos los niveles obtenidos se consideran como verdaderas resistencias de adaptación, porque permanecieron invariables durante las últimas resiembras.

Respecto al estudio diferencial de las reacciones bioquímicas y el comportamiento fisiológico de estirpes normales y antibiótico-resistentes de *Erwinia carotovora*, permite señalar algunas consideraciones de las que se derivarán consecuencias para la sistemática, ecología y patología vegetal.

Así, en cuanto a la fermentación de distintos substratos hidrocarbonados, se ve que azúcares o alcoholes cuyo metabolismo es dudoso, o de difícil utilización, no son fermentados por las estirpes antibiótico-resistentes.

También en ocasiones puede desaparecer o hacerse más débil una característica de las células normales, como sucede con la utilización de la inosita, que desaparece en células resistentes a penicilina, estreptomycin, polimixina y kanamicina.

Otras veces, en cambio, aparece una actividad fermentativa, como sucede con la dextrina, que es negativa en las células normales y se hace positiva en las resistentes a estreptomycin, cloranfenicol y tetraciclina.

Algo semejante sucede en el comportamiento frente a distintas sales de ácidos orgánicos: permanecen invariables los resultados frente a uratos, pectatos y ácido péctico; pierden la débil capacidad de metabolizar malonato y tartrato sódicos cuando se hacen antibiótico-resistentes, y hay una gran variación de resultados frente a hipurato sódico, según la naturaleza del tratamiento antibiótico.

En relación con las distintas pruebas fisiológicas, no aparecen diferenciadas entre las estirpes normales y las antibiótico-resistentes.

Cuando se investiga la resistencia en medios hostiles hipersalinos puede verse que ninguna de las estirpes crece en medios con 7 % de cloruro sódico, mientras que en concentraciones del 5 % crecen bien todas, menos

las estreptomicín y polimixin-resistentes y lo hacen débilmente las penicilin-resistentes.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos es posible concluir que, efectivamente, antes de iniciar cualquier control antibiótico de fitoinfecciones es necesario realizar el estudio microbiológico *in vitro* de las distintas relaciones droga-parásito; ya que, si solamente se dispone de datos en cuanto a la antibióticosensibilidad, puede utilizarse un antibiótico que siendo eficaz, por el momento, puede inducir fácilmente a la resistencia. También, el hecho de que este grado de sensibilidad *in vitro* varíe en función del medio y del estado fisiológico de las células, nos lleva a considerar tan sólo los resultados obtenidos a las veinticuatro horas de cultivo sobre medios con pectina y otros que estimulan la capacidad enzimática de las bacterias (medio para fitopatógenos).

En estas condiciones hemos visto que para *Erwinia carotovora*, los antibióticos más activos son penicilina, tetraciclina, polimixina, colimicina y antibióticos del grupo de los oligosacáridos, mientras que para *E. atroseptica* los más eficaces fueron polimixina, tetraciclina, neomicina, paromomicina y kanamicina.

En cuanto a sensibilidad frente a las 105 asociaciones antibióticas, se han detectado escasos sinergismos, que dada la naturaleza de sus componentes —que presentan dificultades de absorción— no son aconsejables para tratar infecciones generalizadas, y son útiles tan sólo para una eficaz esterilización en semillas (novobiocina + colimicina). Dado que mediante pruebas de adaptación a la resistencia se ha comprobado que con tetraciclina y kanamicina aparecen más lentamente y de menor concentración los niveles de antibiótico-resistencia, y que, por otra parte, son drogas para las que las complicaciones de resistencia cruzada tienen menor significación por manifestarse frente a drogas con parentesco químico o de carácter muy ligero, consideramos que estos dos antibióticos son utilizables para el control de fitoinfecciones por *Erwinia*.

Las alteraciones de tipo bioquímico provocadas por los antibióticos en células de *Erwinia carotovora*, muestran que algunas pruebas de fermentación o utilización de substratos no deben emplearse con propósitos sistemáticos, ya que los resultados pueden ser variables, de acuerdo con

la naturaleza y grado de la antibiótico-resistencia. Sin embargo, estas alteraciones celulares no llegan a modificar los resultados de las pruebas fisiológicas.

RESUMEN

Se realizó un estudio acerca de la antibióticosensibilidad en función de la edad y medio de cultivo, de ciertas especies de *Erwinia*, frente a 15 antibióticos distintos, controlándose la aparición de resistencias cruzadas en estirpes previamente adaptadas a penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, polimixina, kanamicina y novobiocina.

Asimismo, se hizo un examen de la sensibilidad frente a 105 asociaciones antibióticas bivalentes.

Por otra parte, se estudiaron las modificaciones bioquímicas producidas por las distintas acciones antibióticas en células de *Erwinia carotovora*, examinando las variaciones correspondientes a la fermentación de substratos carbonados, utilización de ácidos orgánicos, pruebas fisiológicas y comportamiento sobre medios hostiles hipersalinos.

Todo ello permite concluir que tetraciclina y kanamicina son los antibióticos más idóneos para el control de fitoinfecciones por *Erwinia*.

SUMMARY

The behaviour of two *Erwinia* species against different antibiotics was studied and data on the sensitivity to 15 isolated drugs and to their associations are included.

Also the increase of *in vitro* resistences and cross-resistences were tested.

By the other hand, the authors have observed the differences in fermentation and other physiological tests between resistant and sensitive *Erwinia* strains.

All these results have shown the interest of tetracyclin and kanamycin in the control of *Erwinia* phytoinfections.

BIBLIOGRAFIA

1. ENGLISH, A. R., y VAN HALSEMA, G. 1954. Plant Disease, Rep., 38.
2. GASTÓN DE IRIARTE, E. 1960. Microbiología. Prácticas de Laboratorio.
3. GORLENKO, N. V., y NOVIK, I. V. 1965. Bacterial Diseases of Plants. Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem.
4. GROVE, D. O., y RANDALL, W. A. 1965. Assay Methods of Antibiotics. Medical Encyclopedia Inc., Nueva York.
5. GRULA, M. M., y GRULA, E. A. 1965. Can. J. Microbiol., 2, 453.
6. GRULA, M. M., y GRULA, E. A. 1965. J. Gen. Microbiol., 41, 155.
7. PÉREZ-UREÑA, M. T. 1962. Las asociaciones de antibióticos y su influencia sobre la antibióticorresistencia bacteriana. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Madrid.
8. PORTOLES, A. 1960. Laboratorio, 29, 21.
9. PORTOLES, A. 1961. Microbiol. Españ., 14, 17.
10. PRAMER, D.; ROBINSON, R. S., y STARKEY, R. L. 1956. Phytopathology, 46, 341.
11. SHAFFER (Jr.), y GOODMAN, R. N. 1962. Phytopathology, 52, 1.201.
12. SMITH, N. K. 1958. J. Gen. Microbiol., 18, 33.
13. VERNA, L. 1945. Técnicas Generales y Experimentación Bacteriológica. Editorial El Ateneo, Buenos Aires.

ÉTUDE DE QUATRE CHAMPIGNONS ARTHROSPORÉS, FORMANT DES ENDOSPORES

par

H. SAËZ

Les quatre souches étudiées sont:

trois obtenues du Pr. Windisch: les *Endomyces magnusii* n° 28, 29 et 30; une quatrième envoyée par Mlle Slooff (isolée de vin de palmier, en provenance du Ghana).

CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES

Aux quatre souches nous avons trouvé les mêmes caractéristiques morphologiques suivantes.

Culture en milieu solide

Au bout d'un mois de culture, à température du laboratoire, sur milieu de Sabouraud glucosé 2 %: colonie de couleur blanc pur à blanc sale ou blanc jaunâtre—de section plane ou légèrement convexe (cependant, dans une culture jeune, la section de la colonie est franchement convexe) de consistance membrano-crèmeuse—à surface glabre, brillante et humide ou bien encore recouverte d'un duvet ras et mate (le duvet existe toujours à la surface de la jeune colonie); lisse ou finement striée voire quelque peu plissée—à bord régulier ou lobulé, se poursuivant, dans la plupart des cultures, par des arborisations mycéliennes rampant à la surface de la gélose et s'y enfonçant.

Culture en milieu liquide

Formation d'un voile qui s'épaissit davantage en Eau peptonée 1 %-glucosée 2 % qu'en Eau peptonée 1 %. Il tombe facilement en entier ou en lambeaux. Au bout d'un mois de culture à 25 °C on peut constater: soit l'absence de voile (tombé), soit la présence de quelques îlots ou d'une pellicule dont les dimensions extrêmes vont de moins 1 mm à 3 mm.

Morphologie microscopique

Dans une culture de 3 jours, à 25 °C, en milieu solide et liquide, il existe du mycélium et des arthrospores, pour lesquels nous avons trouvé les dimensions suivantes (largeur des filaments; largeur et longueur ou petit axe et grand axe en ce qui concerne les arthrospores) (*tableau 1*).

Tableau 1

	Sur Sabouraud glucosé 2%	En Eau peptonée 1 %-glucosée 2 %
Mycélium	2 a 12,5 μ	2,5 a 13 μ
Arthrospores	(4,5-14,5) (9-36) μ	(3,5-16) (9-39) μ

Le mycélium est constitué de filaments hyalins, septés, plus ou moins ramifiés selon le milieu de culture et l'âge de la colonie. Les ramifications partent, généralement, immédiatement avant un septum et les dernières formées siègent dans la région apicale. Les filaments les plus larges ont un diamètre supérieur à celui des plus larges filaments de la plupart des souches de *Geotrichum candidum*. Nous n'avons pas noté de bifurcation des sommets des filaments et d'images de pseudodichotomie. D'autres images peuvent être observées, auxquelles, d'ailleurs, on ne peut accorder de valeur spécifique, comme par exemple: image en plume d'oiseau, quand les ramifications naissent alternativement de l'une et l'autre face du filament; parfois les ramifications ne partent que d'une seule face.

Les filaments se fragmentent en arthrospores. Elle sont de section régulièrement quadrangulaire (le plus souvent rectangulaire) à un stade encore assez proche de la désarticulation; par la suite, les angles s'arrondis-

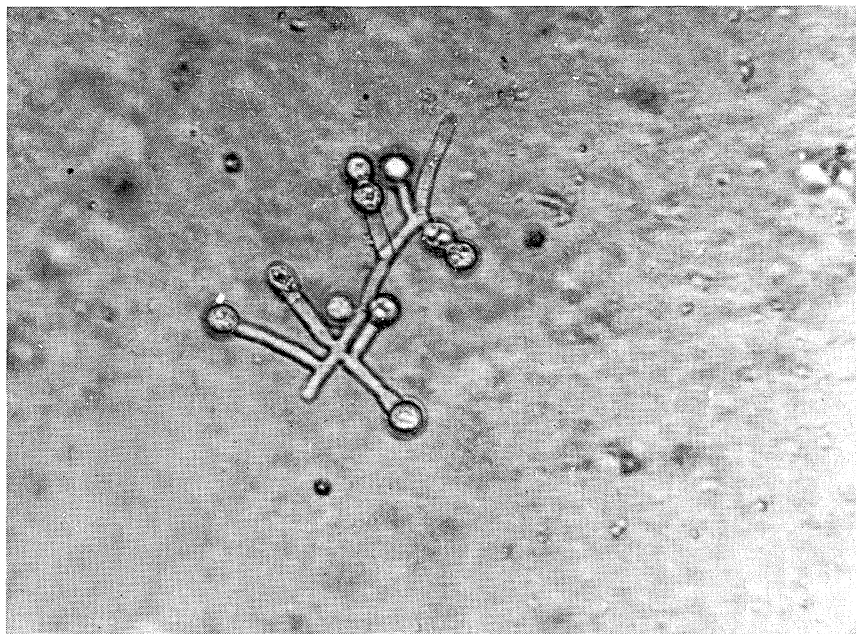


Figure 1. *Chlamydospores apicales*

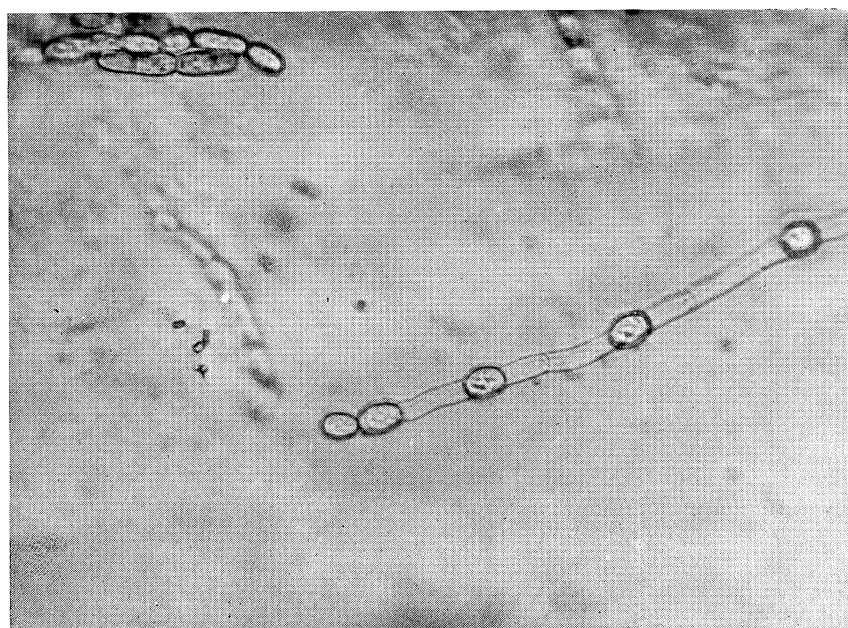


Figure 2. *Chlamydospores intercalaires*

Chlamydospores observées dans la souche Windisch n° 28, dans deux cultures de 18 jours à 25 °C: l'une (1) sur Maltea Moser 1 % et l'autre (2) sur Sabouraud glucosé 2 %. Grossissement: 600

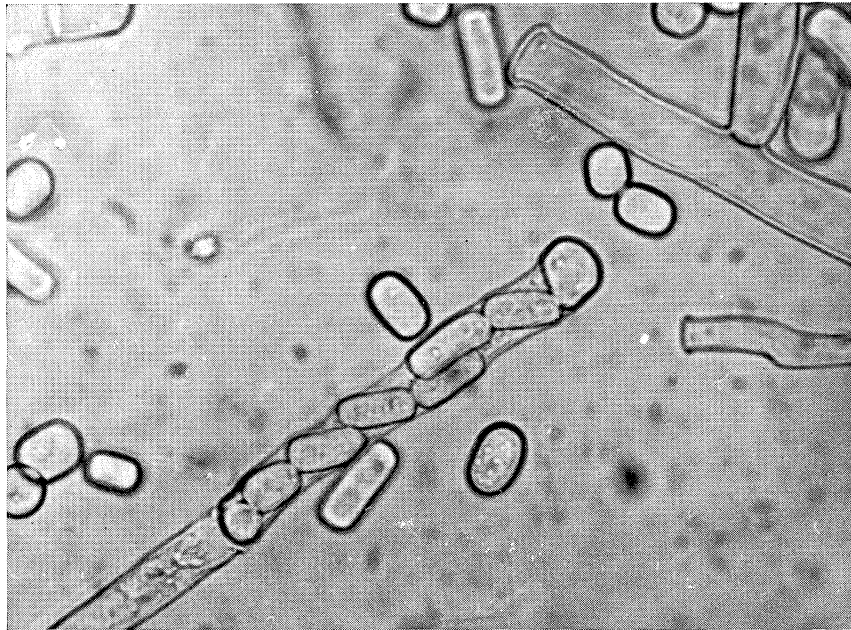


Figure 3. Endospores dans une portion apicale de filament mycélien. Observées dans une culture sur Maltea Moser 1 %, de 15 jours à 25 °C. Souche Slooff (vin de palmier, Ghana). Grossissement: 1200

sent (surtout en milieu liquide) et la forme devient ovoïde, piriforme ou sphérique. Une cloison médiane ou paramédiane peut apparaître chez quelques-unes d'entre elles. Dans une jeune culture nombre d'arthrospores germent en émettant un ou plusieurs tubes en position généralement angulaire.

Quelques arthrospores ou portions de filaments, apicales ou intercalaires, à contenu plus riche et à paroi externe épaissie, prennent l'allure de chlamydospores (*figures 1-2*). On les trouve aisément dans la profondeur de la gélose, à la périphérie de la colonie, dans une culture d'une semaine environ, sur milieu de Sabouraud glucosé ou de Maltea Moser 1 %. Quand ces éléments sont disposés apicalement (*figure 1*) la ressemblance avec les chlamydospores de *Candida albicans* est parfois surprenante.

Nous n'avons observé ni bourgeonnement, ni production d'asques. En revanche, chez les quatre souches nous avons vu des endospores, en nombre très variable, dans une portion de filament mycélien. De telles formations ont également été examinées chez maintes souches de *Geotrichum candidum* et chez *G. gracile*. Nous les retrouvons: dans des milieux gélosés comme le Sabouraud glucosé, le Maltea Moser 1 % et le milieu de Gorodkova (les deux premiers semblent les plus favorables); dans des cultures âgées d'au moins une semaine; à température du laboratoire, à 25 °C ou à 30 °C; enfin, préférentiellement, dans la zone d'arborisation mycélienne qui auréole la colonie.

Ainsi donc, comme les deux espèces sus-nommées, les quatre souches étudiées peuvent former des endospores dans une portion de filament apicale (ou secondairement apicale) ou intercalaire. Elles s'individualisent par fragmentation du contenu de la portion de filament en une ou, plus rarement, plusieurs rangées parallèles. A l'intérieur de la paroi de cette portion de filament elles demeurent alignées (leur grand axe coïncidant avec l'axe longitudinal du filament) ou prennent une position oblique ou encore quelconque. De forme quadrangulaire, tendant ensuite à s'ovaliser, comme les arthrospores provenant de la désarticulation, elles sont, cependant, fréquemment de taille quelque peu inférieure à celles-ci. Elles peuvent se libérer par rupture de la paroi mycélienne amincie (*figure 3*).

CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUES (CF. TABLEAU 2)

Physiologiquement les quatre souches diffèrent deux à deux. Possèdent les mêmes propriétés physiologiques:

d'une part: les souches n° 28 et du Ghana;

d'autre part: les souches n° 29 et 30.

Fermentation

Méthode de Guerra (3). Dernière lecture des tests après un mois d'étuve à 25 °C.

1) Souches n° 28 et du Ghana

Le glucose et le galactose sont bien fermentés. La fermentation du glucose est toujours précocée (avant le 5^e jour); celle du galactose peut n'apparaître qu'entre le 5^e et le 10^e jour.

Au cours de quelques examens, et au bout d'un mois, une grosse bulle gazeuse est apparue dans le saccharose. Ce sucre n'est donc pas fermenté ou tardivement et faiblement.

Ne sont pas fermentés: maltose, lactose, raffinose et inuline.

2) Souches n° 29 et 30

Glucose, saccharose et raffinose sont précocement fermentés. Forte fermentation avec les deux premiers; fermentation à 1/3 avec le troisième.

Le galactose est toujours fermenté, mais tardivement; moins bonne fermentation avec la souche n° 29 qu'avec la souche n° 30.

Ne sont pas fermentés: maltose, lactose et inuline.

Assimilation

Méthode en milieu solide, en tube. Dernière lecture après un mois d'étuve à 25 °C.

1) Souches n° 28 et du Ghana

Sont assimilés: glucose, galactose, éthanol, D mannitol, D— sorbitol.

Tableau 2. Propriétés physiologiques comparées des quatre souches étudiées

	Souche n° 28	Souche du Ghana	Souche n° 29	Souche n° 30
Fermentation				
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+f, t	+t
Saccharose	0/+f, t	0/+f, t	+	+
Maltose	0	0	0	0
Lactose	0	0	0	0
Raffinose	0	0	+	+
Inuline	0	0	0	0
Assimilation				
D+Glucose	+	+	+	+
D+Galactose	+	+	+	+
Saccharose	0/+f, t	0/+f, t	+	+
Maltose	0	0	0	0
Lactose	0	0	0	0
Raffinose	0	0	+	+
Inuline	0	0	0	0
D+Xylose	0	0	0	0
L+Arabinose	0	0	0	0
D-Ribose	0	0	0	0
L-Rhamnose	0	0	0	0
Ethanol	+	+	+	+
Erythritol	0	0	0	0
Adonitol	0/+f, t	0/+f, t	0/+f, t	0/+f, t
Dulcitol	0	0	0	0
D Mannitol	+	+	+	+
D— Sorbitol	+	+	+	+
Inositol	0	0	0	0
NO ₃ K	0	0	0	0
Température				
1/ au 10 ^e jour				
2/ au 15 ^e jour				
30 °C 1/	+	+	+	+
2/	+	+	+	+
35 °C 1/	+	+	0	0
2/	+	+	0	0
37 °C 1/	0/+	0/+	0	0
2/	0/+	0/+	0	0

f = faiblement. t = tardivement.

Donnent, quelquefois seulement, une réaction faiblement et tardivement positive: saccharose et adonitol.

Ne sont pas assimilés: maltose, lactose, raffinose, inuline, D + xylose, L + arabinose, D ribose, L + rhamnose, érythritol, dulcitol et inositol.

L'azote sous forme de nitrate de potassium n'est pas utilisé.

2) Souches n° 29 et 30

Sont assimilés: glucose, galactose, saccharose, raffinose, éthanol, D mannitol et D— sorbitol.

Donne, quelquefois seulement, une réaction faiblement et tardivement positive: adonitol.

Ne sont pas assimilés: maltose, lactose, inuline, D + xylose, L + arabinose, D ribose, L + rhamnose, érythritol, dulcitol et inositol.

L'azote sous forme de nitrate de potassium n'est pas utilisé.

Développement en fonction de la température

Méthode en boîte de Pétri, avec milieu de Sabouraud glucosé 2 %. Trois boîtes sontensemencées avec une jeune colonie, puis placées immédiatement à l'étuve à 30°, 35° et 37 °C. Première lecture au 10^e jour, seconde et dernière lecture au 15^e jour.

À 30 °C, les quatre souches se développent; à 35 °C, seules se développent les souches n° 28 et du Ghana; à 37 °C, pour les souches n° 28 et du Ghana l'on se trouve au voisinage de la température maximum de développement: tantôt on obtient une petite colonie (au 10^e ou au 15^e jour), tantôt il n'y pas de développement.

Valeurs extrêmes, en centimètres, du diamètre de la colonie après 10 jours de culture et plusieurs examens pour chaque souche: *tableau 3*.

Tableau 3

	30 °C	35 °C	37 °C
N° 28	4-6,7 cm	2-5,5 cm	0-1,2 cm
Du Ghana	4,5-6,6 cm	4,2-5,3 cm	0-0,3 cm
N° 29	2,8-4,5 cm	0	0
N° 30	1,8-3,8 cm	0	0

DISCUSSION

L'historique d'*Endomyces magnusii* est tout d'abord intriqué avec celui de *Saccharomycodes ludwigii*. Le premier a été décrit par Ludwig (9), le second, sous le nom générique de *Saccharomyces*, par Hansen (6). A ce propos, Guilliermond écrit (4) que *Saccharomycodes ludwigii* avait été découvert par Ludwig dans des sécrétions muqueuses de chêne, mais le considéra comme une forme de développement de *E. magnusii*.

Guilliermond distingue deux types dans le genre *Endomyces*. La plupart des espèces correspondant au 1er type (5) se retrouvent dans la Monographie des Levures de Lodder & Kreger-Van Rij dans le genre *Endomycopsis* Stilling-Dekker 1931 (8).

Le 2è type considéré par Guilliermond (5), nous intéresse davantage, ici, puisque l'Auteur y range *Endomyces magnusii* et *E. decipiens*. Ce type comprend des champignons dont certaines parties du mycélium se désarticulent en arthrospores et produisent des asques naissant aux dépens de cellules issues du bourgeonnement des articles du mycélium ou parfois, écrit-il, d'une copulation hétérogamique entre un microgamète et un macrogamète formés à l'extrémité de deux filaments voisins. A ces champignons l'Auteur oppose ceux du genre *Geotrichum* (5) qui ne produisent jamais d'asques.

Dans sa thèse, Berkhout (1) consacre un chapitre au genre *Endomyces* Reess. S'agissant de ce travail, paru en néerlandais en 1923, nous nous référons à la traduction française qui est mentionnée par Langeron & Talice dans leur mémoire de 1932 (7). A propos d'*E. magnusii*, Berkhout rappelle qu'Hansen n'ayant pas trouvé d'asques, même dans le matériel envoyé par Ludwig, le nomme *Oidium ludwigii*. Quant à elle, procédant comme Guilliermond, mais n'ayant pu obtenir d'asques sur les deux souches étudiées (la souche Claussen d'*E. magnusii* et la souche Lindner d'*O. ludwigii*), elle conclut ainsi le paragraphe concernant *E. magnusii*: "la forme conidienne doit être nommée *Oospora ludwigii*" (1).

En 1951 paraît une publication de Windisch (10) sur *Endomyces lactis* et *E. magnusii*, deux espèces qui, d'après la description de l'Auteur se rangeraient plus particulièrement dans le 2è type d'*Endomyces* de Guilliermond. En ce qui concerne l'espèce qui nous intéresse ici, *E. magnusii*, Windisch a étudié trois souches, celles précisément qu'il nous a envoyées, et dont voici les origines (10).

N° 28: *Oospora gigas* ("Stammt von Smit... Aus dem CBS.").

N° 29: *Oospora ludwigii* ("... von Stautz... Aus dem CBS.").

N° 30: *Endomyces magnusii* ("Wurde aus dem Institut für Gärungsgewerbe bezogen.").

Windisch signale des asques et, compte tenu des propriétés morpho-physiologiques, range ces trois souches dans l'espèce *E. magnusii* (10).

Quant à nous nous n'avons pas trouvé d'ascospores chez ces souches mais des éléments endoconidens de nature différente. Et, quoiqu'il en soit, l'éventualité d'isolements de souches anascosporées, présentant par ailleurs les caractères des souches ci-dessus, justifie l'existence d'une espèce pour les recevoir. Les caractères morphologiques de ces souches conduit à les classer dans le genre *Geotrichum*; le fait que nous ayons trouvé des endospores chez d'autres espèces de ce genre et, en particulier, chez la plus représentative, *G. candidum*, permet de le faire.

Par suite, pensons-nous, les souches anascosporées présentant les propriétés morpho-physiologiques des souches n° 29 et 30, doivent être nommées *Geotrichum ludwigii* n. comb., ce nom se substituant à celui d'*Oïdium ludwigii* donné par Hansen et à celui d'*Oospora ludwigii* de Berkhout.

Quant à la souche n° 28, *Oospora gigas* Smit et Meyers 1928, elle possède, à notre avis, assez de caractères physiologiques différents des souches n° 29 et 30 pour en être séparée spécifiquement, à savoir:

Principalement: la non-fermentation et la non-assimilation du raffinose. La fermentation et l'assimilation du saccharose faibles et si tardives qu'elles ne sont pas toujours observées après un mois d'étuve à 25 °C; en revanche les souches n° 29 et 30 fermentent et assimilent ce sucre fortement et précocement.

La température maximum de développement de la souche n° 28 (aux alentours de 37 °C) est supérieure à celle des souches n° 29 et 30 (pour juger de la valeur de ce caractère il conviendrait de pourvoir examiner un plus grand nombre de souches).

Afin d'éviter toute confusion avec *Geotrichum giganteum* Behrend 1890, cité par Coudert dans son ouvrage (2), nous proposons d'appeler la nouvelle combinaison d'*Oospora gigas*, *Geotrichum magnum*. A ce dernier s'identifie, d'après nous, la souche du Ghana.

GEOTRICHUM LUDWIGII N. COMB.

In Sabouraud-agar (post unum mensem, 18 °C), colonia alba, griseola albida vel sufflava, prope plana mollis, glabra vel pilosa. Mycelium cum arthrosporis, endosporis et chlamydosporis. Post dies 3, 25 °C, mycelium: 2-12,5 μ , arthrosporis: (4,5-14,5) (9-36) μ .

In medio liquido cum peptona et glucosa pellicula formantur. Post dies 3, 25 °C, mycelium: 2,5-13 μ , arthrosporis: (3,5-16) (9-39) μ .

Fermentatio: glucosi, galactosi, saccharosi et raffinosi pro tertia parte. Glucosum, galactosum, saccharosum, raffinsum, ethanolum, adonitolum (lentissimum et exiguum vel nullum), D mannitolum et D— sorbitolum assimilatur. Nitrak kalikus non assimilatur.

37 °C: non crescit.

GEOTRICHUM MAGNUM N. COMB.

In Sabouraud-agar (post unum mensem, 18 °C), colonia alba, griseola albida vel sufflava, prope plana, mollis, glabra vel pilosa. Mycelium cum arthrosporis, endosporis et chlamydosporis. Post dies 3, 25 °C, mycelium: 2-12,5 μ , arthrosporis: (4,5-14,5) (9-36) μ .

In medio liquido cum peptona et glucosa pellicula formantur. Post dies 3, 25 °C, mycelium: 2,5-13 μ , arthrosporis: (3,5-16) (9-39) μ .

Fermentatio: glucosi, galactosi, saccharosi (lentissima et exigua). Glucosum, galactosum, saccharosum (lentissimum et exiguum), ethanolum, adonitolum (lentissimum et exiguum vel nullum), D mannitolum et D— sorbitolum assimilatur. Nitrak kalikus non assimilatur.

35 °C: crescit; 37 °C: post dies 15: crescit at non crescit.

Nous exprimons notre reconnaissance à Mademoiselle le Docteur W. Slooff et à Monsieur le Professeur S. Windisch qui nous ont obligeamment envoyé les souches que nous venons d'étudier.

RESUMÉ

Au cours d'une étude morphologique, nous avons trouvé les mêmes caractéristiques à trois souches de Collection, nommées *Endomyces magnusii* et à un quatrième champignon d'isolement plus récent, à savoir:

formation d'arthrospores, d'endospores et de chlamydospores. En revanche, les propriétés physiologiques diffèrent suffisamment, à notre avis, pour distinguer deux espèces. Eu égard au fait que nous n'avons pas observé de production d'ascospores, nous avons appelé les deux nouvelles combinaisons: *Geotrichum ludwigii* et *G. magnum*.

RESUMEN

Se han estudiado cuatro hongos: tres estirpes de colección, denominadas *Endomyces magnusii* y una cuarta, aislada más recientemente. Las cuatro presentan las mismas características morfológicas, forman artrosporas, endosporas y clamidosporas; sin embargo, sus propiedades fisiológicas se diferencian suficientemente para poder distinguir dos especies. No habiéndose observado producción de ascosporas, las dos nuevas combinaciones se han denominado: *Geotrichum ludwigii* y *G. magnum*.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERKHOUT, C. M. 1923. De Schimmelgeschlachten *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* en *Torula*. Thèse Fac. Sci. Univ. Utrecht. (Traduction française par le Dr. E. A. R. F. Baudet, texte dactylographié).
2. COUDERT, J. 1955. Guide Pratique de Mycologie Médicale. Masson et Cie. Editeurs, Paris.
3. GUERRA, P. 1935. Rôle des levures en dermatologie. Etude clinique et mycologique. Thèse Fac. Méd. Univ. Paris.
4. GUILLIERMOND, A. 1912. Les levures, 331-32. Doin et Fils Editeurs, Paris.
5. GUILLIERMOND, A. 1928. Clef dichotomique pour la détermination des levures, 59-64 et 66. Le François Editeur, Paris.
6. HANSEN, Ch. 1889. Ueber die im Schleimflüsse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. Zentr. Bakteriell. Parasitenk. 5, 632.
7. LANGERON, M., & TALICE, R. V. 1932. Nouvelles méthodes d'étude et d'essai de classification des champignons levuriformes. Ann. Parasitol. Humaine Comparée, 10, 5.
8. LODDER, J., & KREGER-VAN RIJ, N. J. W. 1952. The Yeasts. A taxonomic study, 95. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
9. LUDWIG, F. 1886. Ueber der Alkoholgärung und Schleimfluss lebender Bäume und deren Urheber. Ber. Deut. Botan. Ges., 4, 17.
10. WINDISCH, S. 1951. Zur Biologie und Systematik des Milchsimmels und einiger ähnlicher Formen. I-Der Milchsimmel (*Endomyces lactis* und *Endomyces magnusii*. Beitr. Biol. Pflanzen, 28, 69-130.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

PURLOM, S. A.
LABORATORIO DE INVESTIGACION

VERDEAMIENTO DEL JAMON COCIDO POR *AEROCOCCUS VIRIDANS* Y ESTUDIO DE SU RESISTENCIA TERMICA

por

C. PARRERA y P. DEL TORO

INTRODUCCION

Una de las alteraciones más usuales en el jamón cocido es el verdeamiento; el jamón presenta un buen aspecto exterior, pero al cortarse en lonchas, y después de cierto tiempo de exposición al aire, el color de las mismas se vuelve verde.

Existen verdeamientos en las carnes curadas que son de origen químico, por la falta o exceso de nitrito en el proceso de curación de las mismas, pero corrientemente dichas alteraciones son de origen bacteriológico.

En la mayoría de los casos de verdeamiento microbiano en carnes curadas, se han detectado dos tipos de microorganismos como principales causantes del mismo: el *Lactobacillus viridescens* y el *Streptococcus faecium*, especialmente el primero (1). Una contaminación por *St. faecium* no es observable aparentemente, ya que por ser el microorganismo homofermentativo la lata no se hincha y puede no tener olores extraños; una contaminación por *L. viridescens* puede dar lugar a abombamiento de la lata a causa de la producción de CO₂ por el microorganismo.

En general, todas las bacterias capaces de producir verdeamientos tienen características comunes: son tolerantes para la sal, capaces de crecer

a bajas temperaturas y producen agua oxigenada en condiciones aerobias; poseen una actividad fermentativa relativamente débil y son indiferentes a la tensión de oxígeno.

El verdeamiento se produce a causa de la acumulación de agua oxigenada. En las carnes frescas, el agua oxigenada es rápidamente descompuesta por la enzima catalasa, pero esta última es destruida durante la cocción o por la presencia de nitrito y así las carnes curadas son más propensas a volverse verdes, pues este agua oxigenada, acumulada a causa de las bacterias actúa sobre los pigmentos de la carne, nitrosomioglobina o nitrosohemocromógeno (9), transformándolos en porfirinas de color verde.

Pueden producirse también pigmentos de color verde por acción del ácido sulfhídrico, aunque el papel de este compuesto es algo confuso (3 y 9).

En general, los lactobacilos heterofermentativos aislados de varios tipos de verdeamientos en productos cárnicos curados presentan una amplia variación en su resistencia térmica, aunque sean idénticos en sus requerimientos nutritivos y características fisiológicas y serológicas; algunos pueden llegar a sobrevivir ciento veinte minutos a 66 °C (8).

En este artículo describimos las características de unos tetracocos aislados de un jamón cocido alterado por verdeamiento y que se identificaron como causantes del mismo.

Las propiedades fisiológicas de los mismos son análogas a las de las especies *Aerococcus viridans*.

Deibel y Nivel (6) describen unos tetracocos aislados de salmueras de curado de carnes, muy similares a *Aerococcus viridans* y a *Gaffkya homari*. Para todos estos microorganismos proponen su inclusión en el género *Pediococcus* en la especie *Pediococcus homari*. Otros autores incluyen a los *Aerococcus* dentro del género *Streptococcus*, pues presentan algunas diferencias claras con los pediococos (4) y mantienen como una especie distinta la *Ga. homari*.

MATERIALES Y METODOS

A partir de una muestra de jamón cocido alterado por verdeamiento se han sembrado placas de agar APT Difco. Después de incubación de tres días a 30 °C, se han aislado las colonias morfológicamente distintas

y se han sembrado en tubos de agar APT. Una vez aislados de nuevo, se han inoculado pedazos de jamón cocido y se han conservado las cepas que producen el verdeamiento de los mismos después de incubación en estufa a 30 °C.

Los métodos empleados para la identificación han sido los usuales. La catalasa se ha comprobado por el método de la bencidina y el pH final se ha determinado en caldo APT con 2 % de glucosa.

Para las determinaciones de resistencia térmica se ha empleado la siguiente técnica. Se parte de un cultivo en caldo de APT, de cuarenta y ocho horas, a 30 °C. Se toma un inóculo de 0,5 ml y se siembran 6 tubos de 16 × 160 mm que contienen 4,5 ml de caldo de APT, pH = 6,7. Se incuban cuarenta y ocho horas a 30 °C. Después de la incubación, se someten a tratamiento térmico en baño termostatzado. Se enfrían inmediatamente los tubos con agua-hielo y se siembran placas de agas APT y tubos de caldo APT con 0,1 ml y 0,5 ml, respectivamente, de los cultivos sometidos a tratamiento. Los tubos y las placas se incuban a 30 °C, durante cuarenta y ocho horas. Se toman únicamente como puntos de letalidad aquellos en los que no hay crecimiento en ningún tubo y en ninguna placa.

Para la construcción de las líneas de supervivencia se ha seguido la técnica indicada por Ball y Olson (2), que consiste en tomar como ordenada para cada abcisa (temperatura), el logaritmo del valor medio entre el tiempo más alto de supervivencia y el de destrucción inmediato superior. Se construye la línea de regresión de estos logaritmos sobre las temperaturas correspondientes y se calcula la desviación típica de los puntos de la línea de regresión; se desplaza dicha línea hacia arriba una cantidad igual a tres veces la desviación típica, con lo que se obtiene una línea de supervivencia con una seguridad estadística del 99,7 %.

RESULTADOS

La producción de verdeamiento se ha comprobado por tres veces con cada una de las colonias aisladas. En total se han caracterizado dos tipos de colonias causantes de verdeamiento; con ellas se han realizado las pruebas bioquímicas del *cuadro 1*.

Los tratamientos térmicos se han realizado a 65°, 66°, 67° y 68 °C, siendo los tiempos medios de letalidad los indicados en el *cuadro 2*.

Cuadro 1

	Cepa 1	Cepa 2
Morfología	tetracocos	tetracocos
Gram	+	+
Verdeamiento del jamón	+	+
Catalasa	—	—
Relación con P _{oxígeno}	indiferentes	indiferentes
Crecimiento a 45 °C	—	—
Crecimiento a 37 °C	+	+
Crecimiento a 8 °C	+	+
Crecimiento a pH = 9,6	+	+
Crecimiento a pH = 4,5	—	—
Crecimiento en 10 % de ClNa	+	+
Crecimiento en agar McConkey (Oxoid)	+	+
Requerimiento de 5 % de ClNa	—	—
pH final del caldo glucosado	4,2 — 4,5	4,2 — 4,5
Leche tornasolada	inalterada	inalterada
CO ₂ de glucosa	—	—
Reducción de nitratos	—	—
Polisacárido de sacarosa	—	—
Crecimiento en agar nutritivo	muy escaso	muy escaso
NH ₃ de arginina	—	—
Acido de sacarosa	+	+
” lactosa	—	—
” manitol	+	—
” glucosa	+	+
” xilosa	+	+
” rafinosa	+	+
” arabinosa	—	—
” maltosa	+	+

El estudio de resistencia térmica se ha realizado únicamente sobre la cepa 1, pero se ha comprobado la efectividad de los datos obtenidos sobre la cepa 2; así, un tratamiento de veintidós minutos, a 66 °C, es letal para dicha cepa.

El valor obtenido para el coeficiente de correlación es de $r = 0,9956$ con una significación de $p < 0,01$.

Cuadro 2

Temperatura (X) °C	Tiempo medio de letalidad min	Logaritmo del tiempo (Y)	Tiempo de letalidad con 99,7 % de se- guridad min
65	39,5	1,5966	53,22
66	22,5	1,3522	28,44
67	9,5	0,9777	14,80
68	6,5	0,8129	7,87

La ecuación de la recta de regresión calculada es

$$Y = 19,4058 - 0,274 X$$

en donde Y = logaritmo decimal de los tiempos mínimos de letalidad y x = temperatura en grados centígrados.

La desviación típica en la estimación de Y es igual a 0,0407, por lo que la ecuación de regresión, corregida para una seguridad estadística del 99,7 % será

$$Y = (10,4050 - 0,274 x) + 0,1221$$

En la *figura 1* se representan las líneas de regresión correspondientes a la resistencia térmica de la cepa 1 para un pH = 6, 7 que es aproximadamente el pH del jamón cocido, y en el *cuadro 2* se dan algunos valores de los tiempos de letalidad obtenidos a partir de la ecuación de regresión.

El valor z, en grados centígrados, es igual a 3 para la línea de regresión normal, que refleja los resultados experimentales.

DISCUSION

Los resultados de las pruebas bioquímicas nos indican que los tetracocos causantes del verdeamiento en el jamón cocido son lactobacterias, halotolerantes, indiferentes con respecto al oxígeno, catalasonegativas, capaces de crecer en medios con sales biliares y que poseen las características fisiológicas típicas de la especie *Aerococcus viridans* (4-7).

Según Deibel y Nivel esta especie constituye una parte normal de la flora bacteriana asociada a las salmueras de curado de carnes. Las únicas diferencias entre las dos cepas estudiadas consisten en la capacidad de fermentar el manitol y el aspecto de las colonias, las de la cepa 1, blanco amarillentas, y las de la cepa 2, más pequeñas y de color grisáceo.

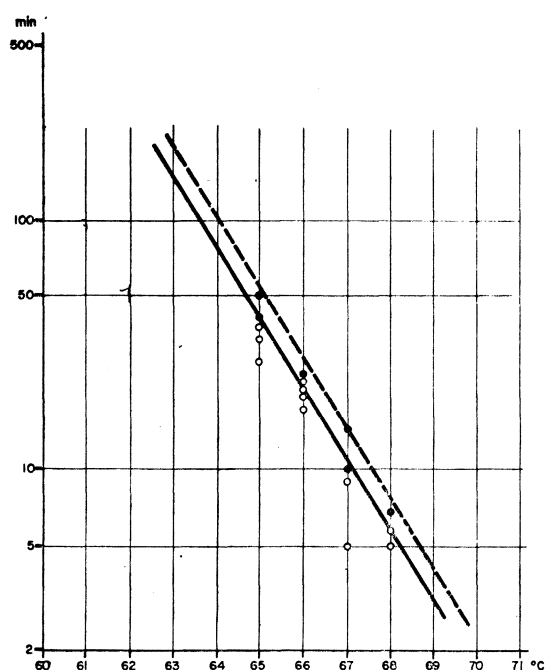


Figura 1. o, supervivencia. •, letalidad. —, línea de regresión. - -, línea de regresión corregida con 99,7 % de seguridad

Es de destacar la elevada resistencia térmica de estas cepas, pues tomando como referencia su valor letal medio a 66 °C, que es de veintidós minutos y medio, su valor es francamente superior a los usuales para las formas vegetativas de las bacterias, que generalmente resisten pocos minutos a 60 °C.

Es también importante hacer notar que en el jamón cocido, una semi-conserva, cuya cocción se realiza a baja temperatura, muchas veces no se

llega a mantener el centro del jamón a temperaturas superiores a 65 °C.

La contaminación por cepas bacterianas que han experimentado una adaptación al tratamiento térmico o bien que poseen una resistencia poco usual, puede crear, por lo tanto, verdaderos problemas a las industrias dedicadas a la fabricación del jamón cocido.

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento al Dr. Parés Farrás, Catedrático-director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona, por sus valiosos consejos y sugerencias sobre este trabajo, así como a los Dres. M. J. Fernández Díez y F. González Cancho, del Instituto de la Grasa y sus Derivados, de Sevilla, por sus comentarios acerca del mismo.

RESUMEN

Se ha identificado el *Aerococcus viridans* como microorganismo causante de verdeamiento en el jamón cocido y se ha estudiado su resistencia térmica para un pH de 6,7. Los tiempos medios de letalidad experimentales para las temperaturas de 65°, 66° y 67 °C son 39,5; 22,5, y 9,5 minutos, respectivamente. El valor z experimental es igual a 3. El verdeamiento tiene lugar por la acción del agua oxigenada acumulada aeróbicamente debido a la ausencia de catalasa, y que degrada los pigmentos de la carne curada, transformándolos en porfirinas de color verde.

SUMMARY

Aerococcus viridans is identified as microorganism that cause greening in coked ham. Its thermal resistance at pH = 6,7 was studied. The experimental lethal times for the temperatures of 65°, 66° and 67 °C are 39,5, 22,5 and 9,5 minutes respectively. The z experimental value is 3.

The greening is caused by action of hydrogen peroxide accumulated aerobically in absence of catalase; this hydrogen peroxide degrades cured meat pigments to green porphyrines.

BIBLIOGRAFIA

1. American Meat Institut Foundation. 1960. The Science of Meat and Meat Products. W. H. Freeman Co.
2. BALL, C. D., y OLSON, F. C. W. 1957. Sterilisation in Food Technology. Mc Graw Hill Co., Nueva York.
3. BRANDLY, L. 1966. Meat Hygiene. Lea & Febiger, Filadelfia.
4. COLLINS, C. H. 1967. Microbiological Methods. Butterworths.
5. COWAN, S. T., y STEEL, K. J. 1965. Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Pres.
6. DEIBEL, R. H., y NIVEN, C. F. 1960. Comparative study of *Gaffkya homari*, *Aerococcus viridans* tetrad forming cocci from meat curing brines and the genus *Pediococcus*. J. Bacteriol, 79, 175-80.
7. GIBBS, B. M., y SKINNER, F. A. (directores). 1966. Identification Methods for Microbiologists, Part A. Academic Press.
8. NIVEN, C. F.; LE BUELTNER, L. G., y EVANS, J. B. 1964. Thermal tolerance studies on the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. Appl. Microbiol., 2, 26-39.
9. SHARPE, E. 1962. Lactobacilli in meat products. Food Manuf., 582-89.

LA GUERRA BACTERIOLOGICA Y SU DEFENSA

por

E. GASTÓN DE IRIARTE (*)

HISTORIA

El conocimiento de la existencia y comportamiento de los microorganismos se tiene desde hace poco más de un siglo, época precisamente en la que, por fortuna, la guerra biológica carece de historia. Naturalmente, ha habido acusaciones, siempre infundadas, que intentan divulgar la creencia del empleo de armamentos vivos por parte de ciertos países beligerantes en determinados episodios bélicos, pero todo ello no han sido más que campañas propagandísticas, encaminadas a predisponer a la opinión pública en contra de tal o cual país, representativo de un determinado partido político.

La Historia antigua, sin embargo, nos habla de hechos más que probados sobre el empleo totalmente intencionado de materiales que, dado el concepto moderno de Guerra Biológica, pueden incluirse sin ningún género de dudas en este capítulo de la historia bélica.

Posiblemente, el hecho más antiguo que puede atribuirse a contaminación intencionada, con fines bélicos, es el citado por Le Blond en su trabajo: "La guerra bacteriológica en los tiempos de los faraones", donde describe los pormenores de la quinta plaga, sosteniendo la tesis de que fue una epizootia de peste bovina provocada por los adversarios.

En las crónicas escritas por Gabriel Mussis sobre los hechos acaeci-

(*) Conferencia pronunciada en el III Curso de la Cátedra "Alfonso V", de las Armas y las Letras. Universidad de Barcelona, marzo de 1968.

dos a principios y mediados del siglo XIV, existe uno de particular significación e interés por la gran trascendencia histórica que tuvo: La ciudad de Caffa, puerto de mar de la costa oriental de Crimea (actualmente Feodosia, ciudad rusa), era un importante nudo de comunicaciones entre Extremo Oriente y las ciudades de Génova y Venecia, constituyendo el alto obligado de todas las caravanas que hacían la ruta de Oriente. El comercio en la ciudad era muy activo y las transacciones muy prósperas; por ello era codiciada, tanto por genoveses y venecianos como por mongoles. Después de numerosas luchas, en 1308 se restableció el dominio genovés, hasta que en 1344 un nuevo conflicto estalló entre genoveses y mongoles, poniendo éstos sitio a la ciudad. Los genoveses, imposibilitados de prestar ayuda por tierra a los sitiados, pusieron a su vez cerco a los sitiadores, prolongándose esta situación durante casi tres años, hasta que la plaga de la “muerte negra” que se había originado en el lejano Oriente se propagó por medio de la vía de contaminación que constituían las caravanas y llegó a Crimea, afectando a todas las tribus mongólicas que velaban el sitio de la ciudad de Caffa. Nada más vivo y realista que la propia crónica al describir cómo los sitiadores morían repentinamente a causa de una inexplicable enfermedad, para ellos, en la que decían que los humores se les coagulaban, se producía una fiebre pútrida y fallecían inexorablemente. Los mongoles, aterrorizados por tal plaga y atónitos al observar cómo iban muriendo, dispusieron los cadáveres en las catapultas y los arrojaron a la ciudad de Caffa. Pronto el aire y el agua de la ciudad estuvieron invadidos de un nauseabundo hedor e infectados por la pestilencia, hasta tal punto, que los genoveses se vieron obligados a abandonar la ciudad por mar. Las embarcaciones procedentes de la zona de Caffa, con víctimas de la plaga a bordo, propagaron la enfermedad a todos los puntos que iban tocando, hasta llegar por último a Génova, desde donde la plaga se extendió a toda Europa, provocando con ello la gran epidemia de peste en 1348.

Siguiendo nuestro relato histórico encontraríamos muchos casos, unos ciertos, otros falsos, e incluso algunos de ellos hábilmente soslayados por escuelas de historiadores. Así, se ha pretendido decir, como parte de la leyenda negra española, en escritos de ciertos cronistas de más que dudosa honradez y autoridad, que los conquistadores, al mando directo de Pizarro, habían hecho distribuir entre los indios, bajo el pretexto de preservarlos del frío, mantas procedentes de enfermos variólicos, provocando intencionadamente una epidemia que asoló gran parte de las tribus. Hay

mucha documentación histórica que puede testimoniar en contra de la sistemática campaña encaminada a desprestigiar nuestro descubrimiento y civilización, pero cabría preguntarse: ¿Existe la misma abundancia de documentación histórica, o tan siquiera un sólo documento que demuestre lo contrario a lo ocurrido en Fuerte Pitt, durante la colonización de Nueva Escocia, en 1763, en que, durante su sitio por los indios, las fuerzas inglesas al mando del coronel Bouquet infectaron a los sitiadores con viruela, por medio de prendas de variólicos, ocasionando con ello una mortandad del 95 % de los indígenas?

La acción y extensión de epidemias entre las tropas beligerantes o en la retaguardia han sido en numerosos casos factores decisivos de grandes derrotas; nos basta sólo con recordar la derrota de los ejércitos napoleónicos en las heladas estepas rusas, víctimas de la aparentemente inocente picadura de un piojo —vector transmisor de la *Rickettsia prowazeki*—, que desencadenó la epidemia de tifus exantemático, diezmando lo mejor de sus ejércitos.

Zinser decía que no hace mucho tiempo el hombre se encontraba a completa merced de los microbios, de tal manera que en la historia de la humanidad las epidemias y las pestilencias han influido en un grado superior a las batallas y han hecho torcer muchas veces el curso de las mismas. Un piojo y un microbio pequeñísimo, que está en los límites inferiores de la visibilidad del microscopio ordinario, una rickettsia, tuvieron la culpa de la catastrófica retirada de Napoleón en Rusia y ocasionaron en definitiva la derrota del gran corso, que no pudo realizarse ante la potencia de los soberanos coaligados de toda Europa. Si este piojo con su rickettsia no hubiera picado al primer soldado, transmitiéndole el germen, no se habría desarrollado la epidemia mortífera del tifus exantemático que hizo retirar al emperador, las fuerzas de éste hubieran conquistado Moscú y el curso de la Historia sería muy diferente.

Podrían citarse numerosos casos como los descritos, todos ellos muy interesantes, pero su interés radica más en su carácter anecdótico que en el objeto de esta charla, que es el planteo actual de ventajas, inconvenientes y peligros de una guerra biológica en su dimensión moderna.

AGENTES BIOLOGICOS

La Microbiología, en toda su extensión científica, pone a disposición del militar experto en guerra biológica un caudal variadísimo de conoci-

mientos sobre numerosas formas de vida microscópica, que por su patogeneidad y particularidades especiales son susceptibles de ser empleados en táctica bélica como armas ofensivas.

Los agentes biológicos, bacterias, rickettsias, espiroquetas, protozoos, virus y hongos constituyen, por esencia, el arsenal vivo de que dispone el microbiólogo para cubrir las exigencias tácticas que ordena el alto mando militar. Todo ese mundo microscópico, convenientemente seleccionado, preparado y dispuesto, cumplirá con más perfección, si cabe, que las mismas máquinas bélicas su misión devastadora.

Es frecuente considerar como agentes de la guerra biológica a productos metabólicos, tales como toxinas, auxinas, etc. Nos inclinamos a considerar, tanto por su naturaleza, como por su acción, aplicación y efecto, que no encajan totalmente en el concepto genuino de guerra biológica, y tal vez por ello nos permitimos desglosarlos de la sistemática clásica e incluirlos en un nuevo capítulo bélico, que, si nos es permitido, denominaremos guerra bioquímica.

Los agentes biológicos son muy selectivos en su agresividad; no constituyen máquinas ciegas de destrucción, sino que eligen cuidadosamente su víctima, para la que han sido seleccionados. Nuestro afán sistemático nos induce a englobar, en tres grandes grupos: hombres, animales y plantas, a las víctimas a quienes la acción bélico-biológica dirigirá todas sus fuerzas y capacidad de destrucción.

Mucho se ha especulado sobre las características básicas de elección en el armamento vivo; muchos son los especialistas que han enunciado las condiciones a reunir para un determinado germen o mezcla de ellos, pero la relación que, sin duda, constituye un verdadero decálogo en la guerra biológica, por su simplicidad, claro concepto y exposición, es la de Rosebury, que en diez apartados resume los caracteres que debe reunir un agente biológico para ser empleado en acciones bélicas:

- 1) Elevada capacidad infectante para la mayoría de los sujetos.
- 2) Gran morbilidad, escaso período de incubación, larga inmovilización de los sujetos infectados y elevada tasa de mortandad.
- 3) Posibilidad de producción masiva y conservación de la virulencia.
- 4) Resistencia a la inmunidad espontánea o artificial.
- 5) Posibilidad de transmisión por medio del aire, agua, alimentos, contacto o agentes vectores.

- 6) Epidemicidad.
- 7) Dificultad de inmunización específica.
- 8) Dificultad de tratamiento.
- 9) Dificultad de detección e identificación rápida del agente infectante.
- 10) Reducido peligro a contaminarse el agresor.

Encontrar un microorganismo que satisfaga plenamente a los diez postulados enunciados por Rosebury es prácticamente imposible, pero sí nos permite efectuar una selección, y como más representativos consideraremos los que se indican seguidamente.

Leptospira icterohemorrágica. Produce la enfermedad de Weil. Su difusión es por el agua y los alimentos, contribuyendo también notablemente los roedores y el contagio directo. Posee gran capacidad infectante y su afección es de curso muy largo. El cultivo de la *Leptospira* patógena es fácil en medios líquidos, semisólidos o embriones de pollo. Este agente etiológico puede asociarse con otros, como, por ejemplo, la *Brucella*.

Shigella dysenteriae. Hoy en día ha disminuido considerablemente su importancia militar, pero, no obstante, tiene aún interés, ya que puede contaminar reservas hídricas, creando zonas de infección y produciendo pequeñas epidemias, lo que la hace particularmente apta para acciones de sabotaje, infectando alimentos y bebidas. La preparación del material infectante es fácil, cultivando bien en medios corrientes.

Pasteurella pestis. La infección bubónica no parece aconsejable con fines bélicos, mientras que la pulmonar sí lo es. La difusión de los bacilos virulentos por vía aérea es posible de manera que provoquen, en ciertas condiciones, graves brotes epidémicos. La variedad pulmonar es casi siempre mortal. El bacilo tiene una alta resistencia y conserva durante mucho tiempo su virulencia. La mejor forma de diseminación es la que se obtiene por suspensión de nieblas artificiales.

Virus de la gripe. Tiene gran acción infectante, pudiéndose aumentar su virulencia por asociaciones con estreptococos y estafilocos. Se puede cultivar en embrión de pollo y su virulencia dura más de quince meses. El índice de mortalidad en la gripe pandémica es bastante elevado: en 1889 fue de 345 ‰; en 1913 y 1921, de 280 ‰; en enero-febrero de

1951, en once semanas, hubo 10.502 muertos por complicaciones pulmonares, sólo en las mayores ciudades de Inglaterra. La transmisión es fácil, si se emplea la vía aérea.

Bacillus malei. La forma más corriente en el hombre es la pulmonar, siempre mortal, entre la primera y sexta semana. El período de incubación es inferior a los siete días, con sintomatología muy dolorosa y que produce gran debilidad. Se cultiva con gran facilidad, pudiéndose provocar epidemias por transmisión aérea. Parece ser que los alemanes lo emplearon con fines bélicos en la primera Guerra Mundial, en su frente oriental.

Pasteurella tularensis. Produce la tularemia, enfermedad parecida a la peste; infecta a los roedores y se trasmite al hombre. Es considerada entre los microorganismos más indicados en la guerra bacteriológica, por ser altamente infectante para el hombre. Se cultiva fácilmente y su actividad en estado de desecación persiste durante largo tiempo. La mortalidad es de un 7 %, pero alcanza el 60 % si la enfermedad se adquiere por vía digestiva. La enorme duración de la convalecencia —más de un año— hace de la tularemia un arma de mucho interés en la guerra bacteriológica.

Rickettsia prowazeki. Agente etiológico del tifus exantemático, cuyo vector transmisor es el piojo; su extensión y difusión son muy extensas, así como su gravedad e inmovilización de los afectados. La historia nos habla del derrumbamiento de grandes ejércitos, víctimas únicamente del desencadenamiento de esta epidemia entre sus filas.

Las toxinas botulínica, diftérica, tetánica y estafilocócica, constituyen los derivados del metabolismo bacteriano más adecuados para su empleo como agentes tóxicos en la guerra bacteriológica, ya sea diseminados por pulverizaciones o por envenenamiento directo de alimentos o bebidas.

En el Canadá se han llevado a cabo pruebas con toxina botulínica, efectuando pulverizaciones desde aviones en zonas bien delimitadas, comprobando seis horas más tarde que toda la vida animal había desaparecido y únicamente los controles convenientemente inmunizados lograron sobrevivir.

Agentes de acción sobre los cultivos vegetales. La acción ofensiva bélica sobre las plantas cuenta con armas procedentes casi exclusivamente

de organismos de la clase Fungi, donde contamos con abundante material bélico. Así, en el orden Oomicetales, se encuentran especies muy temidas por las devastadoras plagas que pueden ocasionar, tales como la provocada por la *Phitophthora infestans*, agente etiológico del mildiu de la patata; la *Plasmopara viticola*, que ocasiona el mildiu de la vid, y otros que atacan a gran variedad de plantas fundamentales en la economía agraria.

En la subclase Ascomicetos podemos considerar diversas especies de los géneros *Podospora*, *Uncinola*, *Filactinea*, *Limacina* y *Antenaria*, todos ellos muy temidos por las desastrosas plagas que ocasionan en árboles frutales.

Dentro de los Basidiomicetos no podemos ignorar el orden Ustilaginales, cuyas especies atacan cultivos de leguminosas, gramíneas y numerosas plantas forrajeras, caracterizándose por la extensión y persistencia de la plaga. El orden Uredinales es, en general, más especializado en su acción parasitaria y ataca sólo muy determinadas plantas, pero por hibridación, natural o artificial, pueden obtenerse especies de mayor espectro parasitario.

Los herbicidas son productos para destruir las malas hierbas, clasificándose en totales, cuando destruyen todas las plantas en general, como lo que se realiza en el Vietman, para dejar despejado de follaje un determinado lugar; o selectivos, si sólo destruyen algunas especies y dejan indemne el cultivo.

Por su modo de acción se les denomina de contacto, cuando destruyen la parte aérea de la planta al tocarlas el producto, de traslocación o transporte, cuando son absorbidos por la planta incorporándose a la savia, interviniendo en el metabolismo normal de la misma.

Algunos son de carácter inorgánico, como el ácido sulfúrico, clorato sódico, cianamida cálcica, arseniatos, tiocianatos, etc.

Los de carácter orgánico son muy variados, como los derivados de los dinitrocresoles, de los fenoxi-derivados (2, 4-DM 2, 4, 5-T; MCPA), los derivados carbámicos, los derivados de la tiourea, etc.

Sin pretender, ni mucho menos, haber sido exhaustivos en la elección, como mínimo, creemos haber dado una idea de la acción bélica de algunos de los agentes más típicos y representativos del armamento biológico. Cualquier enunciado que suponga un estudio más completo de la cuestión tropieza, como es lógico, con el veto del Secreto Militar y, por tanto,

resulta imposible exponerlo, tanto en charla como en la fría exposición científica. Todo el vasto campo de los agentes biológicos de aplicación al armamento ofensivo es objeto de activas investigaciones, así lo demuestra la creación de centros tales como el instalado por el gobierno de los Estados Unidos en el estado de Maryland, constituido por una moderna ciudad de más de 4.000 hombres de ciencia, o las experiencias efectuadas por los rusos bajo la dirección de Riskow sobre contaminaciones artificiales (trabajo que le valió el Premio Stalin, del Laboratorio de Microbiología de la Academia de Ciencias de Moscú), sin olvidar hombres de la talla de Bourdillon, en Inglaterra; Blumberger y Zinszen, en Alemania; Feng y Lan-Chon, en China; Balenescu, en Italia, y otros muchos, puesto que la investigación en este terreno, al no necesitar los recursos económicos de otros tipos de investigación bélica, permite a países económicamente modestos trabajar activamente en el campo de la Microbiología bélica.

El empleo de agentes biológicos específicos en la agresión directa es factor de candente actualidad, por las características especiales con que se enfrenta el ejército norteamericano en su guerra en el Vietnam, el cual no se detiene en consideraciones y busca y emplea armamentos de toda índole, a fin de poder dominar la situación.

Según el "Washington Post" del 15 de enero de 1967 (artículo aparecido en "Folia humanistica" del mes de enero de 1968), están siendo financiados por el gobierno, cultivos en gran escala de gérmenes patógenos de alta capacidad infectante, entre ellos los agentes causales de la disentería, la fiebre amarilla, la peste bubónica, el botulismo y la fiebre de las Montañas Rocosas. En dicho artículo se hace especial referencia —por su relación con la guerra del Vietnam— al centro de investigación biológica para fines bélicos de Fuerte Detrick, en el estado de Maryland, donde trabaja un equipo de científicos que ha conseguido desarrollar un tipo de hongo capaz de destruir las plantaciones de arroz; estas informaciones no han sido desmentidas por el Ministerio de la Guerra Norteamericano. De todo ello es fácil deducir que la escalada en el desarrollo de procedimientos biológicos para su utilización en el Vietnam es tanto o más intensa que la de otras armas bélicas.

OBJETIVOS MILITARES

El concepto puro de la guerra biológica satisface plenamente a cualquier capítulo de la logística. El armamento vivo sólo en limitados casos no es susceptible de ser empleado en alguna operación táctica aconsejada por la estrategia.

El ataque directo sobre las tropas a fin de hacer salir al frente, de un estado estático, como son la estabilización de las fuerzas, acantonamientos, interminables luchas de trinchera, etc., constituyen los objetivos por excelencia de la guerra biológica en la vanguardia. En las luchas con movimientos rápidos de tropas, avances fulminantes y guerras relámpago o combates en los que las tropas beligerantes están entre sí en estrecho contacto y donde los cambios de las posiciones son continuos, el armamento biológico tropieza con serios problemas que aconsejan posponerlo a otros; si bien es cierto que la posibilidad de inmunización de las tropas propias en vanguardia y la existencia de virus de corto período de incubación, alientan la esperanza de los investigadores a encontrar el material vivo que permita cubrir esta zona débil del arsenal biológico.

Los agentes empleados en las armas de la guerra biológica son elementos estratégicos primarios, ya que raramente poseen un efecto inmediato o matan de forma fulminante; por ello no son, como nos hemos referido antes, demasiado efectivos sobre unidades militares activas en vanguardia. Es en la retaguardia donde la acción bélico-biológica tiene mayor importancia e infinidad de posibilidades, por su acción devastadora y de poco riesgo para el país agresor, al atacar campos militares, zonas de entrenamiento, centros de intendencia, regiones agrícolas y ganaderas, así como también núcleos de población donde radica la industria; se provocará el derrumbamiento de la retaguardia y el colapso en los suministros, así como la desorganización de todas las líneas, tanto de transporte y aprovisionamientos como del alto mando, de forma que el país quedará abandonado a su triste suerte y al agresor sólo le restará esperar el tiempo suficiente para que las condiciones de vida vuelvan a ser posibles y sin riesgo alguno efectuar la ocupación total.

Un aspecto interesante lo constituye la posibilidad de acción en las retiradas estratégicas bajo el plan de "tierra calcinada", aunque, como es lógico, la elección del agente tendrá que hacerse bajo las características de que sea persistente, de poca tendencia a desarrollarse y de la

menor reversibilidad posible, para el caso probable de que el enemigo, después de pasar a través de la región infectada, contagiara las propias vanguardias.

PREPARACION Y EMPLEO

La industria bélica o para-bélica constituye siempre una carga muy difícil de soportar para la economía de cualquier país por rico que sea y por industrializado que esté, pero la obtención de armamentos vivos, de gran poder destructivo, resulta de fácil técnica y su costo tan bajo, que cualquier nación, con una pequeña industria farmacéutica, está en perfectas condiciones para abastecer a los organismos militares de agentes infectantes suficientes para provocar la contaminación de extensas zonas enemigas. Los cultivos de miles de millones de gérmenes no requieren más que un escaso número de matraces de cultivo. El desarrollo del más temido y virulento de los gérmenes puede realizarse casi en condiciones improvisadas y la desecación y conservación de los agentes vivos, por medio de las técnicas de liofilización, es práctica corriente en cualquier laboratorio, por modesto que sea.

El empleo de los agentes biológicos no presenta ninguna dificultad, siendo su característica fundamental la posibilidad que nos brinda como arma insidiosa de ser empleada por un grupo especializado, integrado por pocos soldados, e incluso por una solo. Un grupo de "comandos" o agentes, infiltrados tras las filas enemigas, podrá operar con gran facilidad en la retaguardia y verter en la red distribuidora de aguas de una ciudad, industria, campos de entrenamiento, cuarteles o en la acequia de riego de una región agrícola, un cartucho soluble, conteniendo gérmenes patógenos liofilizados e interpuestos en una mezcla de excipientes efervescente, que al disolverse favorecen la dispersión del microorganismo infectante y contaminarán todo el objetivo militar, de forma que cuando aparezcan los primeros síntomas de la infección, el grupo de acción que ha realizado el golpe de mano estará ya a salvo, y a la organización de la defensa sobre la infección se le presentarán todos los problemas, agravados por el tiempo transcurrido, correspondiente a la incubación del germen.

La infección de artrópodos o roedores, con agentes causantes de las más diversas infecciones, los convertirán en vectores transmisores de graves enfermedades y sólo la suelta de unos cuantos de ellos en zonas o

lugares determinados puede desencadenar una epidemia, epizootia o extensa plaga, que en pocos meses asole el país enemigo.

La aviación como máquina bélica es un factor decisivo en todas las formas de guerra y, naturalmente, en la guerra biológica también tiene importante aplicación; las dispersiones realizadas en vuelos a diversas alturas sobre el objetivo constituyen una forma rápida y segura de empleo, pero en este caso el carácter insidioso del arma biológica perdería su valor y las medidas defensivas podrían entrar en funcionamiento instantáneamente, con lo que el factor sorpresa habría perdido toda su oportunidad. No obstante, no ocurre lo mismo si, en lugar de pulverizaciones, se lanzan unas pocas bombas portadoras de los agentes infectantes, debidamente acondicionados, entremezcladas con las bombas de un bombardeo táctico; de esta forma, el trastorno producido por los proyectiles explosivos favorece la acción infectante, y la extensión de la contaminación del objetivo y la agresión biológica quedarán enmascaradas por el bombardeo táctico, retrasándose así la puesta en marcha de las medidas defensivas, hasta que la fase de contaminación esté muy avanzada.

En las retiradas estratégicas tienen gran importancia y rápida difusión las contaminaciones de alimentos en depósitos de intendencia, ya que, pese a las órdenes estrictas de no ingerir alimentos abandonados por el enemigo, todos sabemos, y desgraciadamente por propia experiencia, que el soldado, en el frente, hace poco caso de dichas órdenes cuando encuentra alimentos que, hasta hacía poco tiempo, sólo los podía tener en su imaginación.

La liberación de campos de concentración presenta graves riesgos, ya que puede resultar que, antes de abandonar la zona, el enemigo haya procedido a la inoculación de algún germen patógeno y la huida de los internados en el campo provoque la epidemia.

DEFENSA

Si compleja es la utilización de las armas biológicas, mucho más compleja resulta la defensa contra ellas, por tenerse que estructurar fundamentalmente de acuerdo con factores de muy difícil ponderación, tales como la idiosincrasia popular sometida a momentos de tensión, que, al desembocar en explosiones de psicosis colectiva, dificulta enormemente la labor higiénico-sanitaria aconsejable en cada caso.

En países de elevada responsabilidad popular, alto nivel educacional y conciencia clara del mutuo respeto y disciplina, son los únicos en los que será posible organizar la defensa, ya que en los países en que el sentido de la colectividad está supeditado a la razón del individualismo y la improvisación resulta de todo punto imposible cualquier intento defensivo.

Toda estructuración lógica de la defensa contra una agresión con armamento biológico debe estar basada, naturalmente, en la red sanitaria del país y hasta las más olvidadas piezas de su estructura constituyen factores clave en la defensa. El planteo táctico de la defensa puede abordarse desde tres ángulos relativos: anterior al ataque, durante el ataque y posterior al ataque.

La principal dificultad que se presenta en la elección del medio de defensa, antes de que se produzca la agresión, estriba en el hecho de que todas las medidas de protección específica han de estar basadas en el conocimiento del agente o agentes que van a constituir la ofensiva y, posteriormente, aplicar las medidas de defensa epidemiológica sobre tales; pero, por regla general, las medidas profilácticas válidas para una epidemia normal no lo serán en absoluto para una epidemia provocada con fines bélicos, en que, con el fin de aumentar el desconcierto y favorecer la acción infectante, se habrá incluso variado la vía normal de penetración y difusión del microorganismo patógeno.

En la preparación de la defensa es imprescindible llegar al conocimiento exacto y preciso del germen de la agresión y que la industria farmacéutica disponga de los fármacos apropiados, así como de todos los medios de lucha contra posibles vectores, eliminando el mayor número de ellos por medio de insecticidas, raticidas, etc.

Cuando se tiene conocimiento cierto o sospecha de que se ha realizado un ataque con armamento biológico, llevado a cabo por cualquiera de los medios de acción, deberá efectuarse el desplazamiento urgente de técnicos especializados a la zona, donde se procederá a la toma de muestra de todos los posibles puntos de contaminación; también se efectuará un aislamiento total por medio del más severo cordón sanitario, de toda la zona sospechosa o afectada por la agresión biológica, manteniéndose en este estado hasta que una información más precisa aconseje aplicar normas específicas al caso.

En la zona que ha sufrido el ataque, y después de haber sido aplicadas todas las medidas preventivas generales de inmediata acción, de-

berá aislarse a los afectados y, una vez diagnosticada la infección e identificado el agente etiológico, se empleará la terapéutica específica y mantendrá una absoluta rigidez en el aislamiento de la zona, así como en la aplicación de medidas preventivas específicas de carácter sanitario y fundamentalmente de tipo inmunizante. Naturalmente, según el factor víctima de la agresión, las modalidades de acción variarán y la lucha contra los vectores se particularizará en cada caso.

VENTAJAS E INCONVENIENTES

La capacidad destructiva de las armas biológicas, sumada al bajísimo costo de obtención y uso, convierten a la guerra bacteriológica en el instrumento bélico de más ilimitadas posibilidades. No de bajo, sino de ínfimo, se puede calificar el presupuesto necesario para arrasarse una nación entera. En la mayoría de los casos no se requieren ni potentes máquinas de lanzamiento, ni grandes ejércitos bien pertrechados; sólo uno o pocos hombres estrictamente instruidos son suficientes para poner en movimiento la onda destructiva de una epidemia dirigida, que una vez lanzada se acrecienta en progresión geométrica, pasando sus víctimas de defensores a agresores, de ciudadanos o soldados a meros vectores en beneficio del enemigo, contagiando o infectando a otros, cerrándose así la cadena de destrucción que llevará fácilmente a la derrota del país.

Todo el conjunto de ventajas, las posibilidades de obtención, el bajo costo de producción y la simplicidad de empleo, convierten al armamento biológico en un instrumento de imponderables proporciones. Pero el conjunto de factores en que se desenvuelve la acción bélico-biológica tiene una vasta serie de variables que pueden haber virar su trayectoria y, como arma bumerang, herir al propio agresor. Su uso, por fortuna, no es tan simple como pudiera parecer, por ser un arma de posible acción reversible y de difícil control, lo que sitúa al armamento biológico en un extremo de gravedad y riesgo en su aplicación.

CONCLUSION

En el curso de esta charla no hemos querido aludir, ni tan siquiera insinuar, al profundo sentimiento de condena que nos provoca la idea de que el hombre pueda emplear armas biológicas. Nuestra intención era

sólo referirnos a los aspectos científico-técnicos en el planteo de una guerra biológica, pero el obsesivo terror que nos produce ver cómo las naciones se preparan, investigan y trabajan activamente en el perfeccionamiento de armas vivas, con el fin de que la víctima tenga las mínimas esperanzas de sobrevivir, nos obliga a reflexionar sobre nuestras inciertas perspectivas.

La profesión del militar es la lucha noble en pro de la grandeza de la patria; la del científico, el desentrañar los más recónditos secretos de la naturaleza en provecho de la civilización. Pero, cuando se entremezclan conceptos, se copulan funciones y la humanidad se deja llevar de sus más bajos instintos, nace este monstruo híbrido, mitad militar, mitad científico, carente en absoluto de la nobleza y dignidad de las dos profesiones, que lleva, como único estandarte de su ideal, la destrucción, el odio y la muerte. Esto no es un efectismo fraseológico, ni un afán de sensacionalismo, sino la triste noticia cotidiana; aunque resulta alentador ver el esfuerzo que realizan algunas minorías que expresan por todos los medios su inconformidad con las tendencias modernas del belicismo. Así, ocho mil científicos americanos (entre ellos, diecisiete Premios Nobel y ciento veintinueve miembros de la Academia Americana de Ciencias) exigieron recientemente de su Presidente que se prohibiera la utilización de procedimientos bélicos de carácter biológico, y veintidós científicos y militares manifestaron que la utilización de armamentos vivos crearía un peligroso antecedente en la carrera de armamentos. El sentimiento popular tampoco permanece indiferente, y en constante clamor y pacíficas o turbulentas manifestaciones pide a gritos un poco de sensatez, pero la constante escalada bélica amordaza los puros sentimientos nacionales y busca en la desolación y la miseria su forma de poderío económico.

Si el militar conserva su digno puesto de honor y gloria en el campo de batalla y el científico emplease su inteligencia honradamente, no sería necesaria la guerra en la búsqueda de la paz.

Como Microbiólogo y Profesor de esta disciplina, no encuentro mejores palabras para terminar que las que pronunció Pasteur en La Sorbona, con motivo del homenaje que le tributaron las Academias y Sociedades Científicas de todo el mundo: "... ¡No os dejéis contagiar por un escepticismo estéril y negativo! ¡No desanimaros por la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones! Vivid en la paz serena de los laboratorios y de las bibliotecas. Preguntaos, ante todo: ¿qué he hecho yo por instruirme?, y después, según vayáis avanzando gradualmente: ¿qué

he hecho yo por mi Patria? Hasta que llegue un día en que alcancéis la inmensa felicidad de pensar que habéis contribuido de algún modo al progreso de la Ciencia y en beneficio de la Humanidad...”

BIBLIOGRAFIA

1. BECHMAN (Jr.), L. M.; LENINGER, H. V.; MCCONNELL, H. J.; MATHEWS, J. A., y SPRIHER (Jr.), A. T. 1956. Civil Defense Information for the Food and Drug Officials. U. S. Department of Health, Education Welfare, Food and Drug Administration, Washington, D.C.
2. BERGER, J. 1968. “La Guerra B.Q.” americana y la moral. *Folia humanistica*, VI, núm. 61.
3. BRAVO, J. 1961. *Guerra Biol.*
4. Civil Defense against Biological Warfare. 1953. Federal Civil Defense Administration Tech. Manual 11-10. Government Printing Office, Washington D.C.
5. COGGINS, C. H. 1963. *Armed Forces Chem. J.*, 19, 10.012.
6. Decontamination after Biological Warfare Attack. 1960. Appendix NP 24-31 to National Biological and Chemical Defense Plan. Office of Civil and Defense Mobilization, Washington, D.C.
7. Defense against Biological Warfare. 1963. *Symposium Military Medicine*, 81-144.
8. EDWARDS, R. W.; FAVERO, M. S.; HOFFMAN, R. K.; LANAHAN, T. B.; MACLEOD, N. H.; MCDADE, J. J.; SKALIY, P., y BRIGGS, G. 1965. Microbiological Contamination Control. American Association for Contamination Control.
9. FINLAY, C. J. 1940. *Carlos Finlay and Yellow Fever*. Oxford University Press.
10. GLASSMANN, H. N. 1966. *Bacteriol. Rev.*, 30, 657-59.
11. GRIMÉNEZ, D. F., y CICCARELLI, A. S. A new type of *Clostridium botulinum*. *Proc. Intern. Symp. Food Microbiol.* 5th Moscow, 1966.
12. HEDEN, C. G. 1966. Memorandum on Automation of Microbiological Techniques. Conference on Rapid Detection Methods for Airborne Bacteria and Viruses, Stockholm, 1966.
13. HOFF, E. C. (ed.) 1955. *Environmental Hygiene. Preventive Medicine in World War II*, 2. Office of the Surgeon General, Department of the Army, Washington D.C.
14. JABLONSKI, L. 1960. Importance de la Microbiologie en temps de paix et en temps de guerre. *Rev. Intern. Serv. Santé*, 33, 439.
15. LANGER, E. 1967. *Science*, 155, 174-79.
16. LANGER, E. 1967. *Science*, 155, 299-303.
17. LEBIDINSKY, Y. A. 1963. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol.*, 10, 140-42.
18. MARKKULA, H. 1966. Biological weapons and their effects (in Swedish), *Forsvars- och Katastrufmedecin*, 205-37. *Medicinastyrelsens Beredskapnamnd*, Estocolmo.

19. MATILLA, V. 1956. La Guerra Biológica; sus Posibilidades, Desarrollo y Defensa. Real Academia Nacional de Medicina, Madrid.
20. MATILLA, V.; PIEDROLA, G., y AMARO, J. 1953. Las terribles armas modernas. Guerra Biol.
21. MUROMSTEV, S. N.; BRODIYUK, N.; NENASHEV, V. P., y ALESHI, R. M. 1961. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol., 32, 589-94.
22. PIEDROLA, G., y AMARO, J. Nuevas Técnicas para la Defensa ante las Agresiones Bacteriológicas.
23. Problems of biological warfare. 1966. Pugwash Newsletter, 4.
24. RASKA, K., y KAPLAN, M. Disarmament in microbiological warfare for small powers through international guarantees of assistance in case of attack. Proc. Pugwash Conf. Sci., World Affairs, 14th, Venice, 1965, 305-7.
25. Report of the International Scientific Commission for the Investigation of the Facts Concerning Bacterial Warfare in Korea and China. 1952. Pekin.
26. Report of study group on biological warfare. Proc. Pugwash Conf. Sci. World Affairs, 14th, Venice, 1965, 24.
27. ROGOZIN, I. I. Military Epidemiology (in Russian). USSR, Ministry of Health. Medgis, Leningrado.
28. STARR, M. P. (ed.) 1964. Proc. Conf. Global Impacts Appl. Microbiol., Stockholm, 1963.

FALLECIMIENTO DE UN MICROBIOLOGO ILUSTRE

El Prof. John C. M. Formachon, Director del Instituto de Investigaciones Enológicas de Adelaida (Australia), ha fallecido el 25 de agosto pasado.

Su intensa labor, apreciada internacionalmente, estaba en todo su esplendor. Dedicado a los estudios de investigaciones vnicas desde 1934, fue nombrado Director de su Instituto en 1955, desarrollando entusiasta trabajo de investigación y siendo también un eficaz asesor de la industria enológica.

En la especialidad de microbiología enológica es donde más destacó su labor, realizando numerosos trabajos, de los que existe amplia bibliografía, pero especialmente resaltaron los realizados sobre levaduras de "flor" y sobre la fermentación maloláctica.

En los primeros fue un entusiasta admirador de D. Juan Marcilla, realizando un intenso trabajo sobre los vinos de Jerez, que publicó en 1953, que recogió en un verdadero tratado sobre la actuación de la levadura de "flor" en estos vinos, y su evolución durante la "crianza"; obra que está llena de citas entusiastas referentes a los trabajos que sobre el mismo tema realizó el Maestro español antes citado.

Resaltamos también aquí, su simpatía por España y la cordialidad grande que demostró en su visita hace varios años.

Respecto a sus estudios sobre fermentación maloláctica, han sido considerados internacionalmente entre los de mayor interés.

En el primer Simposio de Burdeos, el año 1963, desarrolló sobre este

tema interesante ponencia, en la que exponía los avances realizados en la selección de bacterias del género *Leuconostoc*, los diferentes factores más influyentes en su desarrollo y en su actuación sobre los vinos y el haber conseguido su dominio con siembras masivas, encauzando, en la práctica, oportuna fermentación maloláctica.

Ha sido una dolorosa pérdida para la Microbiología y en especial para la Microbiología enológica, y también hemos perdido un amigo sincero y cordial, con el que teníamos frecuente relación en nuestros trabajos.

E. FEDUCHY

NUEVA ESTRUCTURA DEL INSTITUTO

Ha sido aprobada por la Superioridad la nueva estructura del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, propuesta por el Director del mismo, Prof. Lorenzo Vilas. El Centro queda constituido de la siguiente forma:

Director: Prof. Lorenzo Vilas. *Vicedirector:* Dr. Enrique Feduchy. *Secretario:* Dr. Jaime del Campo.

Departamento de Virología. Jefe: Dr. Miguel Rubio, Investigador Científico.

Sección de Virus Vegetales. Jefe: Dr. Miguel Rubio, Investigador Científico.

Sección de Virus Animales. Jefe: Dr. Angel García-Gancedo, Investigador Científico.

Departamento de Bacteriología. Jefe: Dr. Román de Vicente, Investigador Científico.

Sección de Biología de Infecciones Bacterianas. Jefe: Dr. Antonio Portolés, Investigador Científico.

Sección de Fijación Simbiótica del Nitrógeno. Jefe: Dr. Gregorio Fraile, Colaborador Científico.

Sección de Fijación Directa del Nitrógeno. Jefe: Dr. Jesús Morales, Colaborador Científico.

Sección de Fisiología y Genética Bacteriana. Jefe: Dr. Román de Vicente, Investigador Científico.

Departamento de Microbiología General. Jefe: Prof. Lorenzo Vilas.

Sección de Protozoología. Jefe: Dr. Julio Pérez-Silva, Investigador Científico.

Sección de Levaduras. Jefe: Dr. Enrique Feduchy.

Sección de Microbiología Técnica. Jefe: Dra. Carmen González, Colaborador Científico.

Sección de Microbiología Fitopatológica. Jefe: Dra. Genoveva Tejerina, Colaborador Científico.

Sección de Química Microbiana y Servicio de Análisis Químico. Jefe: Dr. Rafael Lahoz, Colaborador Científico.

Laboratorio de Autorradiografía. Jefe: Dr. Carlos Ramírez, Investigador Científico.

Servicio de Biblioteca. Encargado: Dr. Román de Vicente, Investigador Científico.

Servicio de Documentación e Información Microbiológica e Inmunológica. Encargado: Dr. Román de Vicente, Investigador Científico.

Servicio de Publicaciones. Jefe: Dr. Luis Sánchez, Titulado Superior, de 1ª.

Servicio de Aparatos y Medios de Cultivo. Encargado interino: Srta. Matilde Delgado, Ayudante Técnico, de 3ª.

CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Está proyectada la celebración del X Congreso Internacional de Microbiología, de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, en la Ciudad de México, del 9 al 15 de agosto de 1970. La organización corre a cargo de la Asociación Mexicana de Microbiología. Los idiomas oficiales del Congreso serán español, francés e inglés.

Toda la correspondencia debe dirigirse al Dr. Luis F. Bojalil, Secretario General del Comité Organizador del X Congreso Internacional de Microbiología, Apartado Postal 60-603, México 18, D.F. (México).

ERRATA ADVERTIDA

En el volumen 21, páginas 53-75, de esta revista, se ha publicado el trabajo "Polysaccharide production by *Beijerinckia* and *Azotobacter*", del que, por una errata, figuran como autores los señores R. López y J. H. Backing, cuando los verdaderos autores son los señores R. López y J. H. Becking.

CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Está proyectada la celebración del X Congreso Internacional de Microbiología, de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, en la Ciudad de México, del 9 al 15 de agosto de 1970. La organización corre a cargo de la Asociación Mexicana de Microbiología. Los idiomas oficiales del Congreso serán español, francés e inglés.

Toda la correspondencia debe dirigirse al Dr. Luis F. Bojalil, Secretario General del Comité Organizador del X Congreso Internacional de Microbiología, Apartado Postal 60-603, México 18, D.F. (México).

ERRATA ADVERTIDA

En el volumen 21, páginas 53-75, de esta revista, se ha publicado el trabajo "Polysaccharide production by *Beijerinckia* and *Azotobacter*", del que, por una errata, figuran como autores los señores R. López y J. H. Backing, cuando los verdaderos autores son los señores R. López y J. H. Becking.

BIBLIOGRAFIA

PHYSIOLOGIE UND BIOCHEMIE DER MIKROORGANISMEN, por
Jirí Stárka. 1968. Veb Gustav Fischer Verlag, Jena. 608 páginas,
189 figuras.

Como es sabido, los microorganismos son un material de estudio cada vez más utilizado en la investigación de problemas fundamentales de la Biología moderna, y en consecuencia, la Fisiología y Bioquímica microbianas están experimentando un rápido desarrollo como ciencias básicas. Por ello, no resulta tarea fácil elaborar una obra que, como la que comentamos, está destinada a la formación de estudiantes universitarios o a la de quienes se inician en la investigación, ya que ello exige una cuidadosa labor de recopilación y selección crítica de las materias, de suerte que sean formativas y que no queden anticuadas demasiado pronto. Creemos que el autor ha logrado una obra ciertamente valiosa en este aspecto, pues ha demostrado poseer un gran sentido didáctico, que se evidencia tanto en la selección y exposición de las distintas materias del libro, como en la breve introducción que hace en cada capítulo.

La obra está dividida en siete capítulos (La célula microbiana, Las enzimas, Crecimiento y multiplicación, Nutrición, Metabolismo, Biosíntesis y Genética), todos ellos puestos al día y tratados a un nivel adecuado. Merece ser destacado el primero, donde se exponen de forma concisa las ideas recientes sobre la estructura y composición química de los microorganismos, centrando la atención en las bacterias y virus. Son, asimismo, destacables los capítulos sexto (Biosíntesis) y séptimo (Genética), en los que se presentan con gran claridad muchos de los conocimientos que han contribuido al desarrollo de la Biología molecular.

Esta obra, tanto por las ideas básicas que contiene, como por la claridad de exposición, facilitada por magníficas ilustraciones (muchas de ellas originales), cumple ampliamente los fines para los que fue escrita.

J. PEREZ - SILVA

APUNTES DE MICROBIOLOGIA, por Lorenzo Vilas. 1967. Editorial S. A. E. T. A., Madrid. 442 páginas.

Sí fuésemos a juzgar esta obra por las breves líneas que la preceden, y aun por su título, podríamos pensar que nos encontramos en presencia de un tratado didáctico de introducción a la Microbiología, en su exacto valor de libro de texto orientado a la enseñanza de ciertos aspectos especializados en esta Ciencia. Quienquiera que se adentre con algún interés por sus páginas pronto advertirá que esas impresiones no pasan de ser, a causa del natural recato del autor, una amable añagaza que esconde un acabado compendio de Microbiología moderna.

La sola enunciación del índice bastaría para ver que todos los aspectos de la Microbiología en sus múltiples variantes están tratados dentro de una sistemática encadenada, sin dejar resquicio o hueco sin cubrir. La fácil lectura de sus cuatrocientas y pico páginas va dejando la impresión de encontrarnos ante una prosa fluida, un bien decir de cosas difíciles de explicar, descripciones y conceptos precisos, un orden pedagógico a la par que didáctico de primera clase, y una soltura de expresión difíciles de igualar por quien carezca de una experiencia continuada en la enseñanza y en la investigación. No en vano, su autor ha consagrado su vida íntegramente a estos menesteres por más de cuarenta años.

Las ideas van apareciendo una tras otra en un estilo depurado y concreto; y aun la misma sistemática—tan árida—se presenta dentro de una sencillez de líneas tal, que rápidamente puede obtenerse un concepto claro de cada especie, familia u orden. Pues, bastan unos pocos caracteres, a veces uno o dos, los más característicos, para que dicho concepto quede fijado con precisión en la mente del lector. Los virus, las bacterias, los hongos, los protozoos, así la microbiología industrial como la patológica, tanto los microbios del suelo, como los del aire y del agua, el poder de los microorganismos en los ciclos naturales de los elementos, la inmunología, la antibioterapia, la citología de las distintas estirpes microbianas, su enzimología y caracteres principales, fisiología y crecimiento, técnicas y métodos, y tantos otros aspectos actuales de la microbiología, tienen todos su sitio en este auténtico concentrado de ciencia moderna, donde no hay una palabra de más, ni una idea de menos.

No nos parece cierto que la obra, como dice el autor, haya sido compuesta con prisa, hilvanando apuntes mecanografiados; más creemos que, por facilitar la tarea de los estudiosos, ha sido impresa de prisa y no ha dado tiempo a ilustrarla con grabados y gráficos, como suponemos ha sido el deseo del autor. Y puesto que éste pide una crítica constructiva para mejorar su segunda edición, nos permitimos sugerir la adición a esa nueva edición de la documentación gráfica precisa, para que las ideas tan magníficamente descritas tengan, a su vez, su mejor comprensión.

Por lo demás, la obra ha sido compuesta con gran medida, con mucha meditación y no menor experiencia. Esto hace que el tratado de Microbiología que comentamos sea de gran valor para todo aquel que, deseando tener ideas concretas sobre temas microbiológicos, desee encontrar el libro adecuado donde éstas se le brinden.

R. DE VICENTE

NOCIVIDAD DE LOS ANTIBIOTICOS: EFECTOS NOCIVOS CONSECUTIVOS AL EMPLEO DE ANTIBIOTICOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS, por J. Planelles y A. Jaritonova. 1967. Editorial Mir, Moscú. 634 páginas, 110 figuras. En español.

La deferente actitud de uno de los autores, que con amable dedicación nos ha enviado un ejemplar, nos ha permitido conocer esta obra, cuyo interés procede tanto de la originalidad del tema como del rigor científico con que ha sido escrita. A través de sus páginas, en verdadero alarde monográfico y por vez primera en el inmenso acervo editorial sobre los antibióticos, se estudian no menos de dos mil seiscientas citas, rigurosamente clasificadas, seleccionadas de la bibliografía mundial, sobre las reacciones secundarias—en ocasiones muy graves—que el uso y el abuso de los citados fármacos pueden causar en el organismo humano.

Por tratarse de una obra original, en la que el lector queda sorprendido por la magnitud del empeño, es muy difícil poder decir si la ordenación de tan vasta documentación, junto a la experiencia personal de los autores que con gran riqueza de matices salpica la obra, obedece en verdad a una distribución lógica, clasificatoria, de los numerosos elementos y factores que se estudien; o, si, por el contrario, y quizá en manos de

otros autores, esta distribución hubiese tomado otros derroteros más o menos acertados. De lo que no hay duda, sin embargo, es que no se trata de un trabajo improvisado y hecho con prisa, sino de un auténtico tratado meticulosamente estudiado y programado, y que ha sido realizado por manos expertas en labor de varios años.

Esta obra, en realidad, viene a ser una segunda edición de otra publicada en 1964, bajo el título "Efectos nocivos consecutivos al empleo de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas", a la que siguió, en 1965, una revisión publicada en ruso. En la presente monografía se han llevado a cabo, dentro del plan original, todas cuantas modificaciones y adiciones se han considerado de interés, de acuerdo con los avances logrados en esta rama de la ciencia, hasta el momento de su edición.

La distribución de materias viene dada en seis capítulos. En el capítulo I se estudian los distintos tipos de reacciones tóxicas y complicaciones que pueden provocar los antibióticos en la clínica humana; así como los diversos intentos que se han hecho en los últimos años, por varios autores, para clasificar debidamente estos tipos de lesiones. El segundo capítulo está dedicado exclusivamente al estudio de la acción tóxica directa de los antibióticos. A través de más de trescientas páginas se van describiendo las características y efectos nocivos de los distintos grupos de antibióticos, clasificados de acuerdo con su naturaleza química o actividad. Los 23 grupos de estudio de que se ocupa el capítulo van acompañados en cada caso de la bibliografía correspondiente.

El tercer capítulo se ha reservado a los efectos causados por la propia actividad de los antibióticos en función de sus propiedades quimioterapéuticas. En él se presta atención a la reacción de agudización descubierta por Herxheimer y Krause en 1902 y su relación con la moderna antibioterapia; así como a las causas que modifican el proceso de la enfermedad (recidivas o retardos), en razón de que el fármaco no alcanza en ocasiones los tejidos infectados o focos de infección, dejando reservorios de gérmenes para su ulterior desarrollo. Se completa el capítulo, con las modificaciones que puede sufrir el proceso infeccioso, como consecuencia de la inhibición de reacciones inmunológicas por la acción de determinados antibióticos. Un cuarto capítulo recoge las observaciones y teorías relativas a la sensibilización del organismo y reacciones alérgicas; dedica, a su vez, tres amplios apartados a describir los métodos para determinar el

estado de sensibilización a los antibióticos, las manifestaciones clínicas de las reacciones alérgicas, y las medidas profilácticas y de tratamiento de las afecciones alérgicas provocadas por dichos agentes terapéuticos.

El quinto capítulo atiende a lo que los autores denominan “reacciones nocivas debidas al desarrollo de las superinfecciones”. Es un capítulo muy interesante, donde se desmenuzan los efectos del desarrollo anormal de la población microbiana—saprofita o patógena—y los “cambios de flora” que se operan en el organismo por la desaparición de los microbios antagónicos, como consecuencia del tratamiento por antibióticos. Estas superinfecciones vienen clasificadas en tres grupos: a) las provocadas por bacterias insensibles al antibiótico empleado; b) las causadas por bacterias que han adquirido resistencias específicas a lo largo del tratamiento; c) las originadas por hongos insensibles al antibiótico empleado y más precisamente a los antibióticos de amplio espectro. Finalmente, en el sexto capítulo se exponen las reacciones de naturaleza mixta, donde pueden coincidir efectos tóxicos y alérgicos, a un tiempo, o perturbaciones de estos mismos efectos asociadas a estados de superinfección u otras causas determinadas en los capítulos anteriores. Se presta mayor atención a la enterocolitis pseudomembranosa (enterocolitis mortal o de síndrome cole-riforme), a las modificaciones de la flora intestinal y lesiones consecuentes en el intestino, aumento de permeabilidad del mismo para las bacterias, pneumonía estafilocócica, estomatofaringitis y melanoglositis o “lengua negra”.

A nuestro modo de ver, uno de los aciertos del trabajo está precisamente en su propia estructuración, basada en el intento de clasificación de las causas y efectos de las alteraciones provocadas por los antibióticos en el organismo—eje central de la obra—, donde se ha procurado eliminar todo sentido simplista en favor de una mayor eficacia científica, al hermanar los más puros conceptos microbiológicos y de la quimioterapia con los que derivan del estudio clínico y terapéutico observados en la práctica médica. Esto de por sí ya difícil, hemos de reconocer que no es frecuente: en esta obra no encontramos una sucesión reiterativa de casos clínicos de mayor o menor valor demostrativo, ni tampoco una monografía exhaustiva de las propiedades de cada antibiótico o de los síntomas de cada reacción. Si algún reparo hubiese que poner, éste sería, precisamente, la parquedad de algunas descripciones; pues, si bien sabemos que no son

esenciales y quizá saldrían del propósito de la obra, la inclusión de fórmulas estructurales e incluso un mayor detalle en el modo de acción de los antibióticos darían al conjunto una perspectiva más completa.

En resumen, diremos que la obra en sí es de gran valor educativo y práctico. Diremos, también, que la documentación anatomopatológica que la acompaña, con numerosas fotografías en blanco y negro y en color, cuadros y diagramas, junto a una buena traducción e impresión esmerada, dan a la obra mayor atractivo.

R. DE VICENTE

Depósito legal: M. 702. - 1958

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid