
VOLUMEN 22. 1969

ABRIL - JUNIO. NUMERO 2

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

	<u>Página</u>
Identificación taxonómica de <i>Pseudomonas azotogensis</i> , por J. Sancho y R. Parés-Farrás	85
Ultrastructure of the hyphae of <i>Phytophthora palmivora</i> with special reference to intrahyphal hyphae and vesicular elements, by F. D. Calonge	97
Variaciones en la composición de aminoácidos celulares en <i>Erwinia carotovora</i> , por M. ^a Teresa Iriarte, Purificación Fernández, E. Ronda y A. Portolés	113
Nuevo substrato para la producción de L-lisina por mutantes auxótrofos de <i>M. glutamicus</i> (<i>C. glutamicum</i>), por A. Sánchez-Marroquín, M. ^a Elena Mondragón, Lilia Vierna y Graciela Meza	121
Toxicidad de los iones metálicos para <i>Aspergillus nidulans</i> , por M. ^a Victoria Elorza	131
Immunology of <i>Bacillus cereus</i> beta-lactamases, by J. M. Arcos and A. Chordi	139
Penicillinase distribution in <i>Escherichia coli</i> cells, by J. D. Múgica, M. ^a Cristina Ruiz and J. M. Arcos	153
Valoración microbiológica de cloruro de benzalconio en placa de agar, por F. Fernández	169
X Congreso Internacional de Microbiología	175

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

IDENTIFICACION TAXONOMICA DE *PSEUDOMONAS AZOTOGENSIS*

por

J. SANCHO y R. PARÉS-FARRÁS

1. INTRODUCCION

Con frecuencia, el examen de *Azotobacter* en muestras de suelo pone de manifiesto la existencia de colonias que crecen en el mismo medio y que están constituidas por pequeños bacilos gram-negativos de flagelación polar. En la actualidad, la identificación taxonómica de los mismos ofrece dificultades.

Pseudomonas azotogensis es una nueva especie descrita por Voets y Debaker, en 1956 (19). No se encuentra en la 7.^a edición del Manual de Bergey (2), pero sí en el *Index Bergeyana* (7). Hasta el presente no se ha encontrado otra referencia de dicho organismo.

De acuerdo con la clave de *Skerman* (16), dentro de las bacterias capaces de crecer en un medio aeróbico, sin nitrógeno combinado, el *Pseudomonas azotogensis* se encontraría junto al género *Azotomonas* por su flagelación polar [*Ps. insolita* (13), *Azotomonas* (8)]. Sin embargo, el *Ps. azotogensis* diferiría de los miembros del género *Azotomonas* principalmente por su incapacidad de fermentar azúcares.

Hendrie y Shewan (6), en una clave taxonómica de las especies de *Pseudomonas* incluyen *Ps. azotogensis* junto a *Azotomonas insolita*. En esta clave se comprende también *Ps. azotocolligans*, que se diferencia de los anteriores por su capacidad de producir un pigmento amarillo. Este otro

Pseudomonas, capaz de crecer en medios sin nitrógeno combinado, fue descrito por Anderson (1) y no produce gas de los azúcares. Krassilnikov (8), describe *Az. fluorescens* como un organismo productor de un pigmento fluorescente amarillento o violeta que posiblemente coincide con la bacteria descrita por Anderson.

Recientemente, Parejko y Wilson (12) han obtenido resultados que parecen poner en duda la capacidad de fijar N_2 de los miembros del género *Azotomonas*, lo cual llevaría a revisar la misma justificación del género. En este caso, el crecimiento sobre medios sin nitrógeno combinado estaría principalmente relacionado con la utilización del amoníaco gaseoso de la atmósfera.

En el presente trabajo se describe un tipo que se ha aislado repetidamente a lo largo de varios años a partir de suelo de jardín. Todas las cepas correspondientes a él tienen la capacidad de crecer indefinidamente en medios sin nitrógeno combinado, como los utilizados para el aislamiento y cultivo de los miembros del género *Azotobacter*. Sus características taxonómicas permiten identificarlo con *Pseudomonas azotogensis* y en medio y atmósfera libres de nitrógeno combinado, su desarrollo se ha mostrado dependiente de la presencia de nitrógeno.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Medios de enriquecimiento, aislamiento y cultivo

Como medio de enriquecimiento libre de nitrógeno combinado (I), se ha utilizado: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g/l; K_2HPO_4 , 1 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 g/l; $CaCl_2$, 0,02 g/l; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,002 g/l; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,001 g/l y etanol 4 g/l. El etanol se añade después de esterilizar a 120 °C durante veinte minutos. El pH final es de 7,2 utilizando NaOH 0,1N. (17). Para el aislamiento se ha utilizado el mismo medio solidificado con 1 g/l de bacto-agar (II). También se ha utilizado a este objeto el medio (III), de agar-manitol sin nitrógeno (9). Para el cultivo en pruebas en las que se trata de excluir trazas de nitrógeno combinado se utilizan estos mismos medios preparados con agua bidestilada y utilizando reactivos de la mayor pureza posible, con especificación de impurezas.

2.2. Organismos

Las cepas estudiadas proceden de muestras de suelo de jardín y se mantienen por propagación vegetativa en tubos con medio III.

2.3. Características taxonómicas

- 1) Examen microscópico de cultivos en I, II y III, en gota pendiente y Gram.
- 2) Examen de la flagelación por la tinción de Gray (10).
- 3) Crecimiento en agua de peptona (Ox. CM61), en agua de triptona (Difco B 123), en agar y caldo ordinarios y en agar nutritivo (Ox. CM3).
- 4) Influencia de la temperatura sobre el crecimiento.
- 5) Actividad oxidásica. Prueba de Kovacs con oxalato de p-aminodimetilanilina (Difco), con clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (Fluka) y *Oxidase test tablets* (Key Scientific Products Co.).
- 6) Actividad catalásica y prueba de la bencidina (5).
- 7) Prueba de la oxidación-fermentación, según Hugh y Leiffson (3).
- 8) Producción de indol, según Kovacs (3).
- 9) Producción de nitritos a partir de nitratos (3).
- 10) Licuación de la gelatina (*Charcoal gelatin disc*, Oxoid BR10).
- 11) Fermentación de glucosa y lactosa (0,5 %) en agua de peptona, con indicador de Andrade y *Kligler iron agar* (Oxoid CM33).
- 12) Producción de H₂S (*Kligler iron agar*).
- 13) Crecimiento y acción sobre la leche tornasolada (Oxoid CM45).

2.4. Crecimiento dependiente de la presencia de N₂

Se preparan tubos con agar III inclinado y con agar III al que se ha añadido 1 g/l de NH₄Cl. Una vez inoculados con una gota de suspensión bacteriana diluída en Ringer 1/4, se preparan 3 series: 1) tubos abiertos a la atmósfera, 2) tubos cerrados a la llama y 3) tubos cerrados en atmósfera de O₂. Estos últimos se obtienen sustituyendo el aire por O₂ en varias operaciones de vaciado y llenado con oxígeno puro medicinal, mediante *Speedivac 5PS* (Edward High Vacuum Ltd.). Crecimiento positivo en las tres series con NH₄Cl junto a crecimiento sin nitrógeno combinado

en el medio 1) y 2), con ausencia de crecimiento en 3), constituye evidencia de la necesidad de N₂. En tubos muy pequeños, dicha conclusión es consistente con crecimiento pobre o nulo en 2) por efecto del escape del aire al cerrar el tubo a la llama, si no se hace en la misma máquina, como en la serie 3).

2.5. *Exclusión del carácter oligonitrófilo a partir de contaminación atmosférica*

Un resultado positivo para la prueba anterior excluye la posibilidad de un desarrollo de oligonitrófilos por contaminación del medio. Sin embargo, no elimina la posibilidad de utilización de trazas de amoníaco de la atmósfera o de otros contaminantes de la misma con nitrógeno combinado. Para proceder a una verificación más completa de la utilización del N₂ como única fuente de nitrógeno, se llevan a cabo ensayos comparativos de crecimiento en atmósfera circulante lavada con H₂SO₄ 1M. El crecimiento positivo en organismos que en la prueba anterior se han manifestado dependientes de N₂ en el medio III, permite excluir la posibilidad de la utilización de fuentes de nitrógeno combinado procedentes de la atmósfera.

3. RESULTADOS

Ensayos de enriquecimiento en el medio I, utilizando como inóculo tierra de jardín, repetidos a lo largo de varios años (1963, 1965 y 1967), después de unos días de incubación permiten obtener dos tipos distintos de colonias, de forma completamente constante en placas de medios II y III. A partir de éstas, se han obtenido una serie de cepas, cuyas características de cultivo permiten distribuirlas en dos biotipos distintos: *Azotobacter chroococcum* y un pequeño bacilo gram-negativo (*cuadro 1*).

La prueba de la actividad oxidásica da un resultado característico negativo con las cepas del biotipo I, en cualquiera de los medios ensayados y con independencia de la técnica utilizada, pero con *Oxidase test tablets* da una coloración anómala, distinta a la que dan las cepas positivas y negativas. Las cepas del biotipo II dan, en todo caso, una reacción dudosa.

Cuadro 1

Características taxonómica (Véase apartado 2,3)	Biotipo I <i>Azotobacter chroococcum</i>	Biotipo II Bacilo móvil gram-negativo
1	Bacilos relativamente grandes, móviles, gram - negativos, pleomórficos, pequeñas agrupaciones rodeadas de limo, inclusiones refringentes, cistos característicos.	Bacilos gram-negativos de menos de 2 μ de longitud. Muy móviles. Toman mal los colorantes cuando crecen en medios I, II o III.
2	Flagelación peritrica.	Flagelación polar característica; 1, 2 ó, raramente, 3 flagelos (<i>figuras 1-2</i>).
3	No crece en agua de peptona ni de triptona. En placas y tubos de agar inclinado (II y III) crecimiento abundante en 48 horas a 30 °C, mucoso, translúcido, con formación de pigmentos melánicos a los 3 ó 4 días. Buen crecimiento en agar ordinario y agar nutritivo en 24 horas, opaco y de consistencia pastosa. Crecimiento lento y escasísimo en caldo ordinario.	Crecimiento uniforme débil en agua de peptona y triptona. Crecimiento relativamente menos abundante, transparente y mucoso (II y III). Crecimiento relativamente menos abundante en 24 horas, transparente y mucoso. Cobra afinidad por los colorantes. Buen crecimiento superficial con formación de película rugosa en caldo ordinario.
4	Crece a temperatura ambiente y a 30 °C. No crece a 42 °C.	Crece a temperatura ambiente y a 30 °C. No crece a 42 °C.
5	Reacción negativa de la oxidasa.	Reacción anormal de la oxidasa.
6	Reacción negativa de la catalasa. Reacción positiva de la bencidina.	Reacción negativa de la catalasa. Reacción positiva de la bencidina.
7	+, —	+, —
8	Sin crecimiento en el medio de prueba.	Negativa.
9	Sin crecimiento en el medio de prueba.	Negativo en 5 días.
10	Sin crecimiento en el medio de prueba.	Negativo en 10 días.
11	No fermenta la glucosa ni la lactosa.	No fermenta la glucosa ni la lactosa.
12	Negativa.	Negativa.
13	Lenta alcalinización.	Lenta peptonización alcalina.

Ambos biotipos dan una reacción de la catalasa negativa, con independencia del medio y de la edad del cultivo. En cambio, dan una limpia reacción positiva a la bencidina. Este resultado pone de manifiesto la presencia de porfirinas con hierro no ligadas a la presencia de catalasa y también que una reacción positiva a la prueba de la bencidina no presupone una prueba de la catalasa positiva. Anderson (1), señala que *Pseudomonas azotocolligans* (*Azotobacter fluorescens*, Krassilnikov), da una prueba positiva de la catalasa con lento desprendimiento de burbujas.

Las cepas estudiadas correspondientes al biotipo II son completamente homogéneas, conservándose una como representativa con la denominación de CCB 1568. No parece haber duda alguna de que el biotipo II debe asignarse a *Pseudomonas azotogensis*, descrito por Voets y Debaeker (19).

Los ensayos para poner de manifiesto que el crecimiento del *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568 en los medios II y III, es dependiente de la presencia de N_2 , han dado un resultado positivo, paralelo al obtenido con las cepas aisladas de *Azotobacter chroococcum*. Ha quedado también excluida la posibilidad de que esta dependencia estuviera ligada a trazas de amoníaco u otro compuesto de nitrógeno presentes en la atmósfera del laboratorio.

4. DISCUSION

La identificación de *Azotobacter* y otras presuntas bacterias aeróbicas organotrofas fijadoras de N_2 está ligada al crecimiento en medios sin nitrógeno combinado (2, 8-9, 13 y 15-17). Como en alguno de estos organismos existen fundadas razones para dudar de la capacidad de fijar N_2 (12), la característica anterior sólo puede tomarse en consideración si se lleva a cabo en condiciones que excluyan la contaminación de compuestos de nitrógeno combinado, tanto en el medio como en la atmósfera. Independientemente, es probable que los organismos oligonitrófilos que puedan aislarse en estos medios constituyan un grupo fisiológico singular, de distribución taxonómica poco conocida. Por otra parte, parece evidente que desde el punto de vista de la práctica taxonómica resulte conveniente establecer un criterio que no incluya técnicas tan especializadas como las que miden la incorporación de $^{15}N_2$ ó $^{13}N_2$ a cultivos en crecimiento o a extractos libres de células.

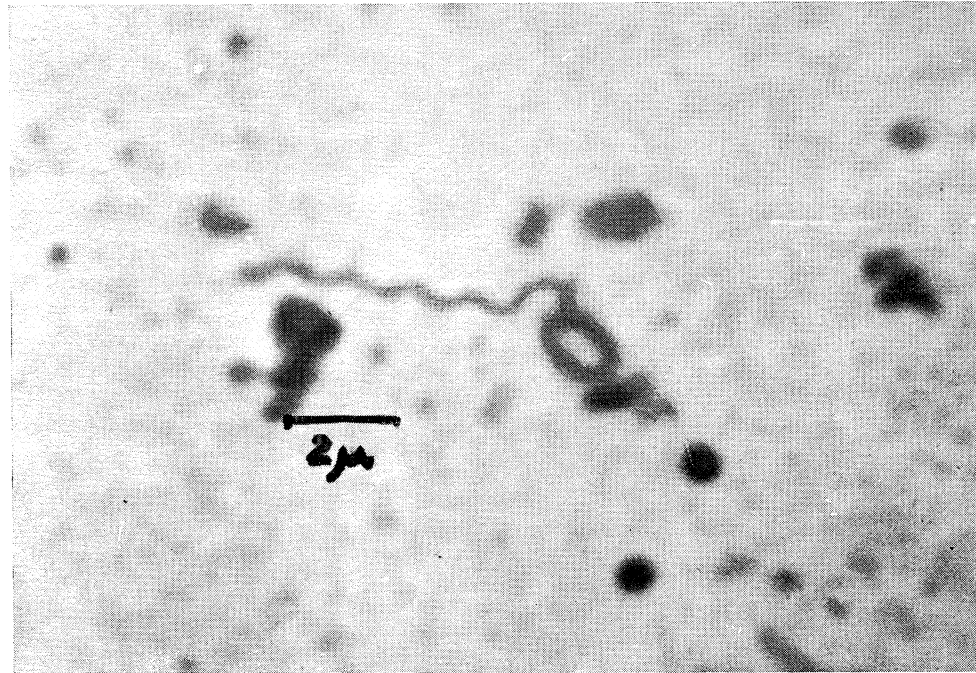


Figura 1. *Pseudomonas azotogensis*. Aspecto característico de la inserción polar del único flagelo

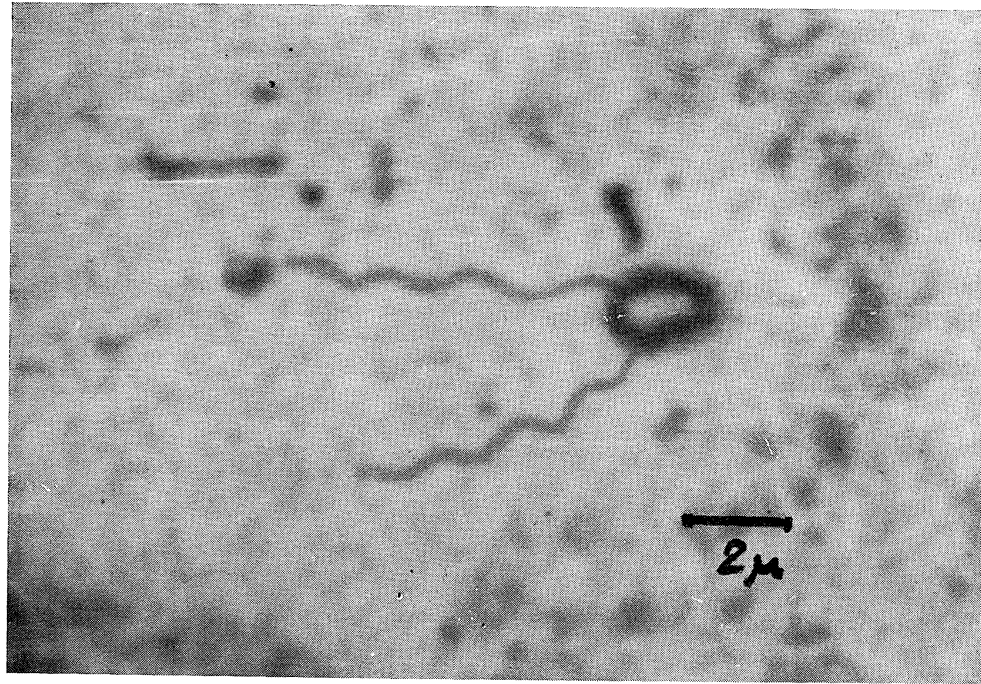


Figura 2. *Ps. azotogenis*. Aspecto característico de la inserción polar, cuando presenta dos flagelos

Stanier y colaboradores (18), en 267 cepas de laboratorio de los principales *Pseudomonas* aerobios, no han encontrado ninguna que pueda crecer en medios sin nitrógeno combinado. Por el contrario, Proctor y Wilson (14), han señalado con anterioridad que tal propiedad se encuentra en muchas cepas del género *Pseudomonas* que no habían sido aisladas en condiciones selectivas. Estos resultados impiden poder concluir por el momento sobre si la propiedad de fijar N_2 o incluso la de crecer en medio sin nitrógeno combinado, es una característica de algunos pocos definidos tipos de *Pseudomonas* o está distribuida al azar entre los miembros asignados a este género. Hasta que se alcance una solución satisfactoria a este problema, la justificación de los géneros o especies de *Pseudomonas* fijadores debería considerarse provisional. Sin embargo, por lo que hace referencia al biotipo de *Ps. azotogensis*, el carácter de presunto fijador de N_2 está vinculado a otras características muy poco frecuentes en el género *Pseudomonas*. Entre ellas cabe considerar las 2), 5) y 6) (*cuadro 1*), y el peculiar tipo de crecimiento en los medios II y III, semejante al de *Azotobacter* en estado juvenil. La constancia de todas las características observada entre cepas aisladas independientemente, en suelos distintos y con años de diferencia, así como la asociación del 100 % con el tipo descrito por Voets y Debaker (19), constituye una base sólida para la individualización del mismo.

5. RESUMEN

En distintos exámenes de *Azotobacter* en muestras de suelo de jardín se han aislado varias cepas de un pequeño bacilo gram-negativo, muy móvil por flagelación polar peculiar con 1, 2 y, raramente, 3 flagelos. Este organismo puede crecer en medios en los que se ha tomado especiales precauciones para excluir toda forma de nitrógeno combinado. Experimentos adecuados ponen de manifiesto que su desarrollo depende del N_2 del aire, excluyéndose la posibilidad de otras fuentes de nitrógeno combinado gaseoso. El estudio de sus características taxonómicas muestra una asociación del 100 % con la descripción de Voets y Debaker relativa a la nueva especie *Pseudomonas azotogensis* (19).

El biotipo de *Pseudomonas azotogensis* se identifica por otras características poco o nada comunes con los miembros del género *Pseudomo-*

nas, con independencia de su crecimiento en medios sin nitrógeno combinado. El tipo descrito difiere de todos los *Pseudomonas* presuntos fijadores de N₂ que se describen en la 7.^a Edición del Manual de Bergey, así como en otras obras de sistemática bacteriana (8 y 13). Las características distintivas con respecto a estos últimos son la ausencia de la capacidad de ataque de los azúcares, de actividad catalásica y de producción de todo pigmento.

6. SUMMARY

During the examination of different soils on the presence of *Azotobacter* we have isolated several homogeneous strains of Gram negative small rods ($1 < 2 \mu$). These rods are actively motile with a peculiar flagellation (*figures 1-2*) and they can have one, two or seldom three flagella. These strains can grow in Nitrogen-free mediums if gaseous N₂ is available. It has been made clear by adequate experiments that this organisms really depend on the gaseous N₂ for growing. There is 100 % association between these strains and Voets and Debaker's *Pseudomonas azotogensis nov. sp.* (19).

Besides its ability of growing in mediums free of Nitrogen the biotype *Pseudomonas azotogensis* presents several other differential characters from the other members of the genus *Pseudomonas*. These are mainly: type of flagellation, poor growth on peptone and tryptone water, anomalous oxidase reaction and negative catalase reaction together with a positive bencidine reaction.

These strains differ too from all the described presumptive nitrogen fixing *Pseudomonas* (8 and 13). The main differential characteristics are: loss of the ability of breaking down the sugars under conventional tests, loss of catalase activity and loss of the production of pigments.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, G. R. 1955. J. Bacteriol., 70, 129.
2. BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 1957. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
3. COLLINS, C. H. 1967. Microbiological Methods. Butterworths, Londres.

4. Difco Manual. 1964. Detroit.
5. HARRIGAN, W. E., & McCANCE, M. E. 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, N. Y.
6. HENDRIE, M. S., and SHEWAN, J. M. The identification of certain *Pseudomonas* species. En M. B. GIBBS and F. A. SKINNER. Identification Methods for Microbiologist (Part. A). Academic Press, Nueva York.
7. Index Bergeyana. 1966. Williams & Wilkins Co. Baltimore.
8. KRASSILNIKOV, N. A. 1959. Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten. Gustav Fischer Verlag, Jena.
9. LORD, T. H. 1962. Determinative Bacteriology. Burgess Publishing Co., Minnesota.
10. Manual of Microbiological Methods (Society of American Bacteriologists). 1957. McGraw-Hill Book Co., N. Y.
11. Manual Oxoid. 1963. Londres.
12. PAREJKO, R. A., & WILSON, P. W. 1968. J. Bacteriol., 96, 143.
13. PREVOT, A. R. 1961. Traité de Systématique Bactérienne. Dunod, París.
14. PROCTOR, M. H., & WILSON, P. W. 1958. Nature, 182, 891.
15. SALLE, A. J. 1961. Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology. McGraw-Hill Book Co., N. Y.
16. SKERMAN, V. B. D. 1967. A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
17. STANIER, R. Y.; DOUDOROFF, M., & ADELBERG, E. A. 1963. General Microbiology. McMillan & Co., Londres.
18. STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J., & DOUDOROFF, M. 1966. J. Gen. Microbiol., 43, 159.
19. VOETS, J. P., & DEBAKER, J. 1956. Naturwissenschaften, 43, 40.

ULTRASTRUCTURE OF THE HYPHAE OF
PHYTOPHTHORA PALMIVORA WITH SPECIAL
REFERENCE TO INTRAHYPHAL HYPHAE AND
VESICULAR ELEMENTS (*)

by

F. D. CALONGE

INTRODUCTION

Studies have already been published on the ultrastructure of the hyphae of Oomycetes such as *Pythium debaryanum* (7 and 12) and two species of *Phytophthora* (6).

Since 1920 when Dodge (5) reported the existence of internal hyphae in the Phycomycete *Saprolegnia*, the only other report of intrahyphal hyphae in Phycomycetes is in the genus *Linderina* (4).

Multivesicular bodies have been observed in various fungi (13), but as far as the author is aware they have not been seen in the Oomycetes which are Phycomycetes characterized by having cellulose in their cell walls and absence of chitin.

During a study of the ultrastructure of *Phytophthora palmivora* in culture, as a part of a general investigation of its parasitism on plant tissues, intrahyphal hyphae and multivesicular body-like structures were seen. The present paper deals with further investigations on these subjects.

(*) This work was carried out in the Department of Botany, University of Bristol, England, supported in part by grants from the Agricultural Research Council and the Fundacion "Juan March".

MATERIALS AND METHODS

Fungal material

The fungus used in these experiments was *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl., strain CMI 63552, supplied by the Commonwealth Mycological Institute, Kew, and originally isolated in Ghana.

Culture conditions

The fungus was grown on a synthetic solid medium of the following composition: 0.05 % KH_2PO_4 , 0.025 % MgSO_4 , 0.1 % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 % Maltose, 0.5 % Difco yeast extract and 2 % agar. The cultures were incubated for 4 days at 25 °C.

Electron microscopy

Samples were fixed immediately after harvesting by one of the following methods:

1. In 2 % unbuffered KMnO_4 (10) for 30 minutes at room temperature.
2. In a mixture of formaldehyde, glutaraldehyde and acrolein (Rodríguez, unpublished), followed by postfixation in 1 % OsO_4 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) for 4 hours at 4 °C.

After fixation, the material was dehydrated in an ethanol series and embedded in Araldite (11). Sections were cut on an LKB ultramicrotome using glass knives and were then stained with lead citrate (16) and later observed with an AEI EM 6B electron microscope.

Although the fixation with Rodríguez's method was much better than with KMnO_4 , the latter gave some confirmatory results for the identification of cytoplasmic constituents such as glycogen, membranes in general and lipid bodies.

RESULTS

When fresh samples of mycelium from the culture are observed with the light microscope in water mounts, abundant intrahyphal hyphae are seen, which emerge into the medium at certain points (*figure 1*). A diagrammatic representation with the possible sequence of this emergence is shown in *figure 2*. The ultrastructure of an ordinary hypha shows the usual cellular organelles of fungi and an increasing proportion of vacuoles

with the ageing of the mycelium (*figure 3*). *Figure 4* shows a dividing nucleus; the centriole, the spindle fibers connecting the centriolar pole of the nucleus with the chromosomes at the centre, and the nuclear membrane can be easily detected. A Golgi complex is also shown near to the centriole, with a few associated vesicles at its ends.

The protoplasm of the parent hypha is seen to be degenerated when the intrahyphal hyphae are present, while the cytoplasm of the latter have abundant mitochondria, vesicles, some vacuoles and lipid bodies (*figures 5-6*). *Figure 7* shows a transverse section of an intrahyphal hypha which is beginning to press on a zone of the parent wall (arrow) before penetration takes place. Later the parent wall is perforated when the intrahyphal hypha emerges (*figure 8*). As the emerging hypha develops (*figures 9*), the point of exit increases in size and thus the original constriction disappears (*figures 10-11*). The emerging intrahypha has many lomasomes and membranous complexes (*figure 12*). Such hypha may easily be distinguished from the parent one because the former is always surrounded by many vesicles (*figures 8-12*), which possess a membrane similar in thickness to those of the plasmalemma and multivesicular bodies of about 65Å. These vesicles are attached to the cell wall (*figure 13*).

The emerged intrahypha, apart from the external vesicles, looks like the parent one and is at first rich in mitochondria, membranes, with some multivesicular bodies and vacuoles (*figures 8-10 and 12*). Later many more vacuoles are present which fill most of the protoplasmic space (*figure 11*).

Multivesicular bodies are dispersed in the cytoplasm and have a membrane similar to the plasmalemma, and vesicles 300-700Å in diameter with a granular content (*figure 14*). This granular material seems very similar in ultrastructure to the cell wall (*figure 15*). Sometimes similar vesicles appear to fuse with the plasmalemma, discharging their contents between the protoplast and the wall (*figure 16*).

An attempt was made to determine whether the multivesicular body membranes originated from the plasmalemma or the endoplasmic reticulum, using a method suggested by Dr. R. Marchant (personal communication). The plasmalemma in osmium fixed material generally shows polarity. However, microdensitometer studies on *Phytophthora palmivora* did not show this polarity of the plasmalemma; it is therefore not possible to state the origin of the membranous system.

DISCUSSION

The ultrastructure of the dividing nucleus in *Phytophthora palmivora* (figure 4) shows how the centriole is associated with but not connected to the spindle, which is intranuclear, as described for *Catenaria anguillulae* (8). A direct connection between the centriolar body and the spindle apparatus was observed during mitosis in *Armillaria mellea* (15).

The occurrence of intrahyphal hyphae in *Phytophthora palmivora* represents a further example of internal proliferations in fungi when the external conditions become adverse, as has been reported for several other fungi (1).

Intrahyphal hyphae in *Phytophthora palmivora* were observed only when the fungus grew on a solid medium and not when it was grown in a similar liquid medium or when parasitic in plant tissues. This suggests that certain environmental conditions such as excessive aeration and high light intensity may produce a partial desiccation and subsequent killing of some parts of the mycelium and so stimulate the production of intrahyphal growth. Different factors have been suggested as possible inducers of intrahyphal hyphae formation in different fungi; anaerobic conditions for *Aspergillus niger* (14), wounding or intoxication for *Neurospora* (9), injury and ageing for *Linderina* (4), and recently the fluidity of the medium as the possible stimulating factor for intrahyphal production in *Sclerotinia fructigena* (2).

At present, the exact point of origin of the intrahypha in *Phytophthora palmivora* is unknown. The subsequent development, within the parent

 Abreviations

The symbols used for all figures are as follows:

<i>C</i> — Centriole	<i>N</i> — Nucleus
<i>CH</i> — Chromosome	<i>Nm</i> — Nuclear membrane
<i>G</i> — Golgi apparatus	<i>P</i> — Plasmalemma
<i>IH</i> — Intrahyphal hypha	<i>PH</i> — Parent hypha
<i>IW</i> — Intrahyphal hypha cell wall	<i>PW and pw</i> — Parent hypha cell wall
<i>L</i> — Lomasomes	<i>V</i> — Vacuole
<i>LB</i> — Lipid body	<i>VE</i> — Vesicles
<i>M</i> — Mitochondrion	<i>VG</i> — Vesicles associated with the Gol-
<i>MB</i> — Multivesicular body	gi apparatus
<i>ME</i> — Membranous complex	<i>W</i> — Cell wall

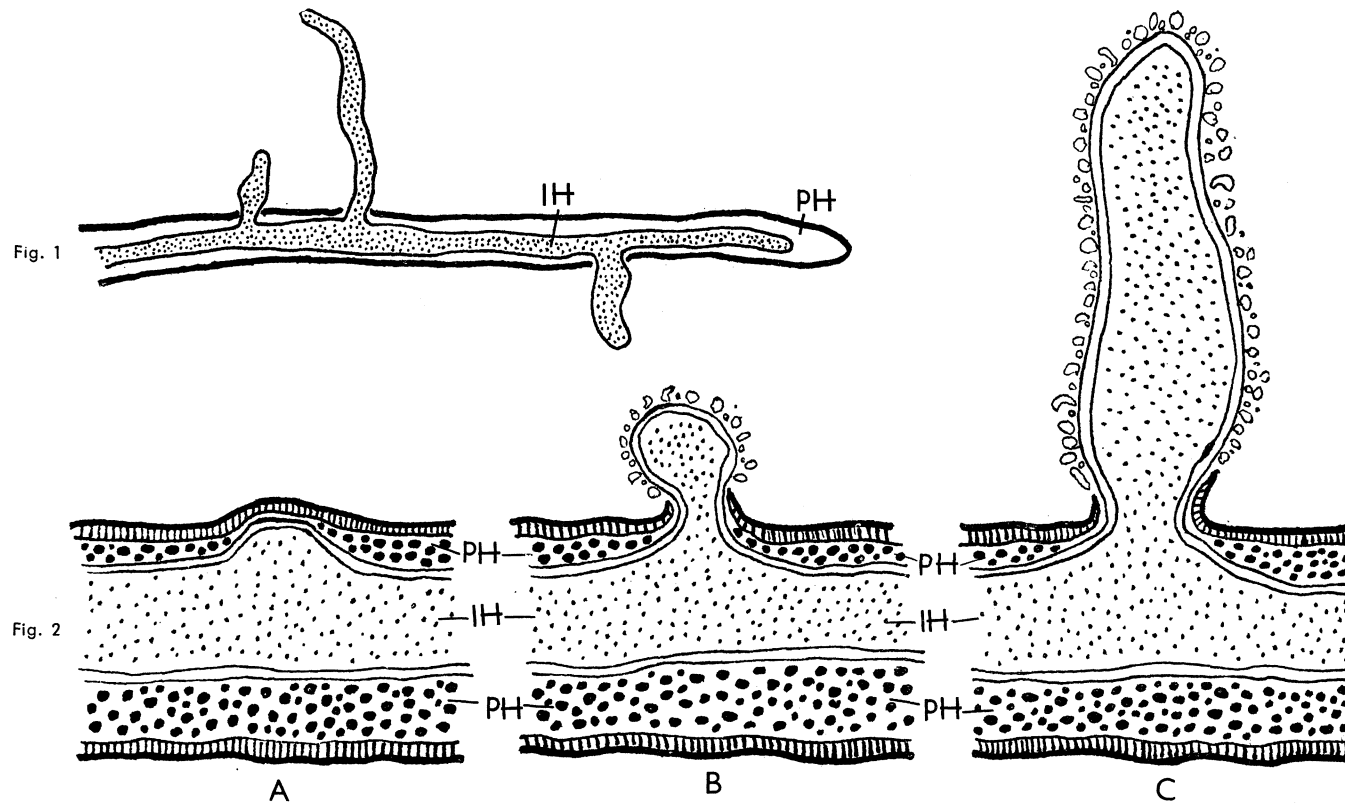


Figure 1. Intrahyphal hyphae development in *Phytophthora palmivora* ($\times 1,250$)
 Figure 2. Diagrammatic representation of the intrahyphal hypha exit ($\times 10,000$)

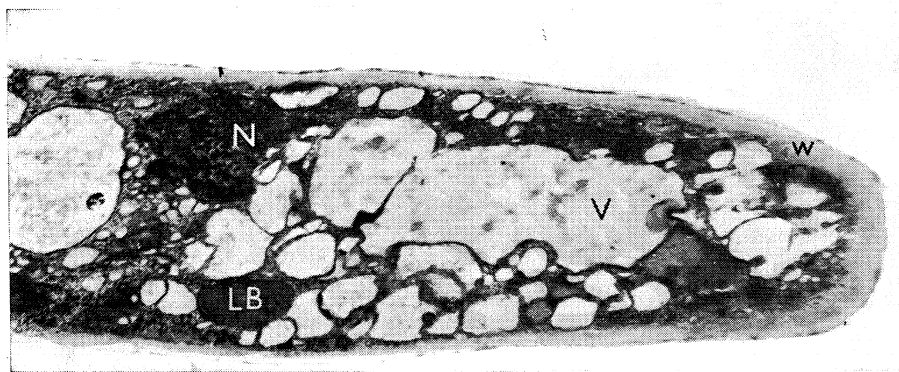


Figure 3. Ordinary hypha of *P. palmivora* ($\times 11,500$)

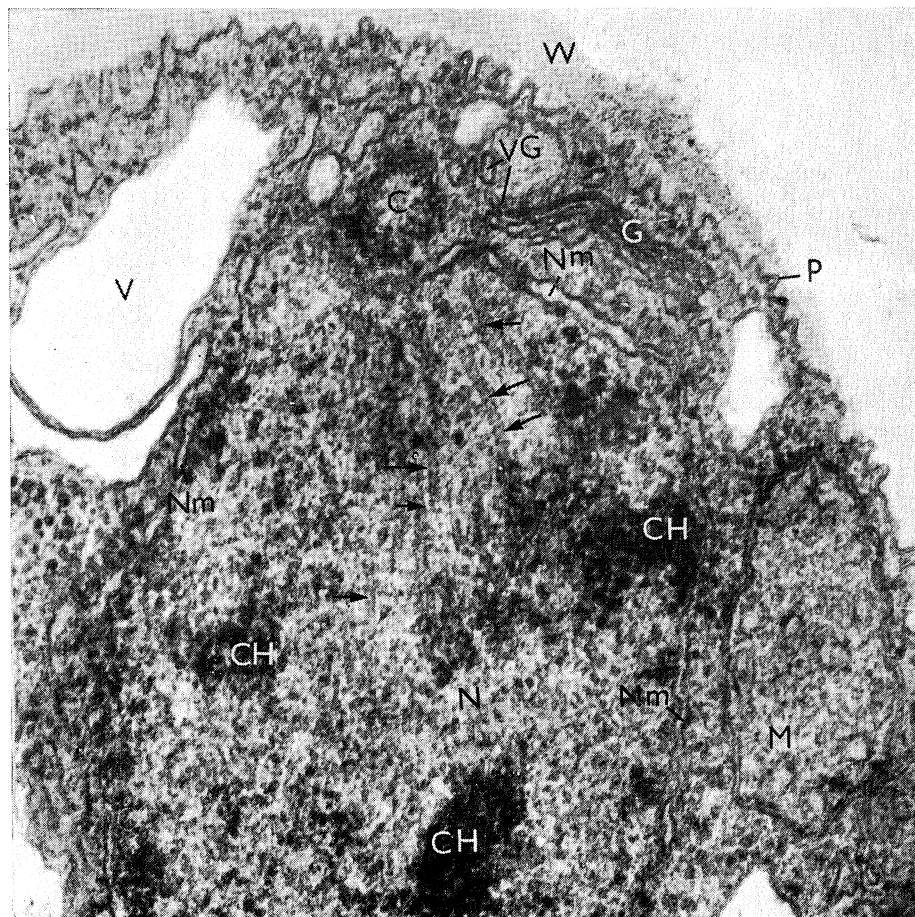


Figure 4. Nucleus during mitosis. Note the spindle fibers (arrows) ($\times 69,000$)

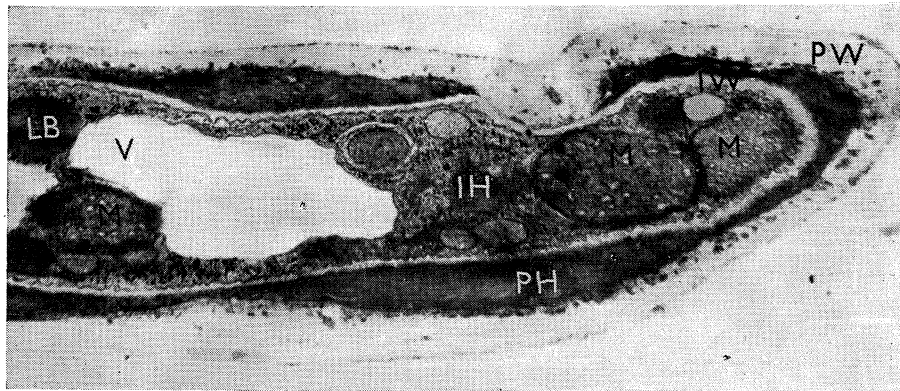


Figure 5. Ordinary and intrahyphal hyphae ($\times 17,250$)

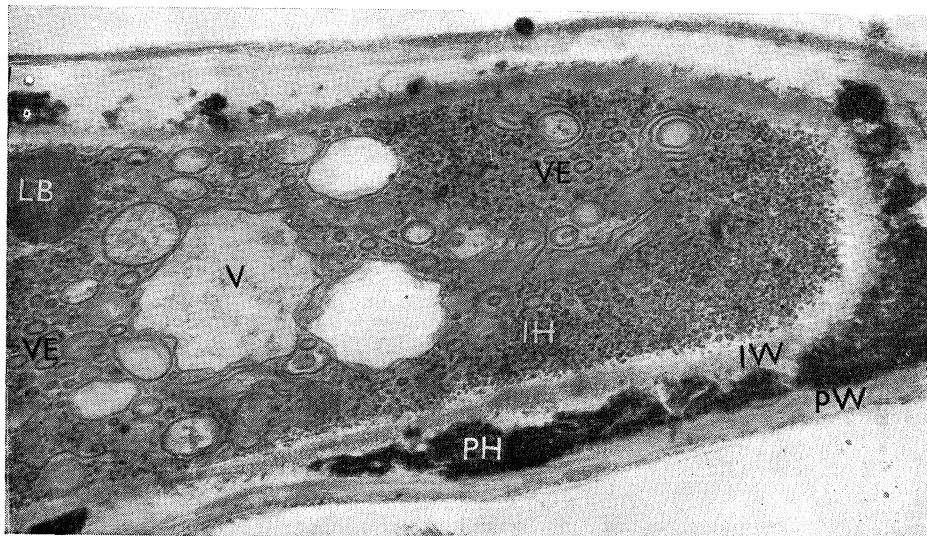


Figure 6. Intrahyphal hypha showing many vesicles inside ($\times 23,000$)

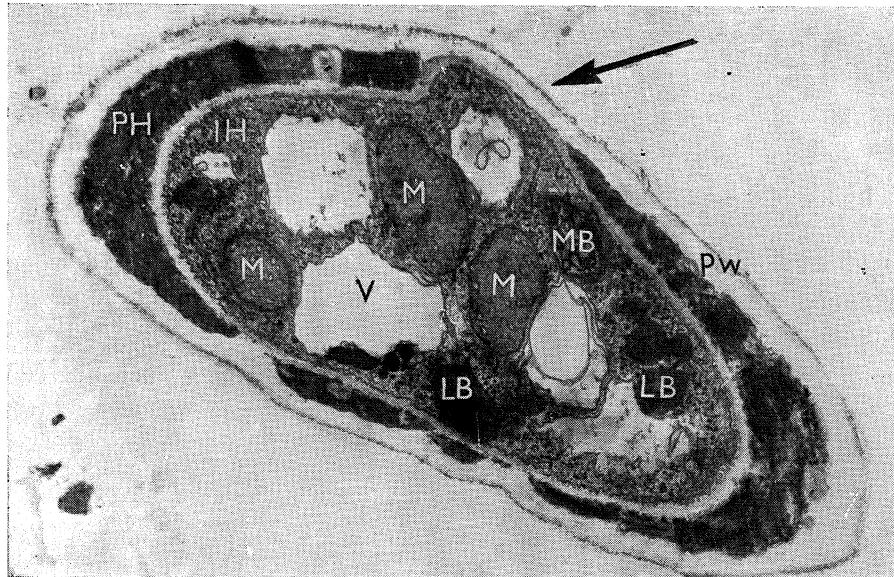


Figure 7. Intrahyphal hypha beginning to press on the parent cell wall (arrow) ($\times 15,000$)

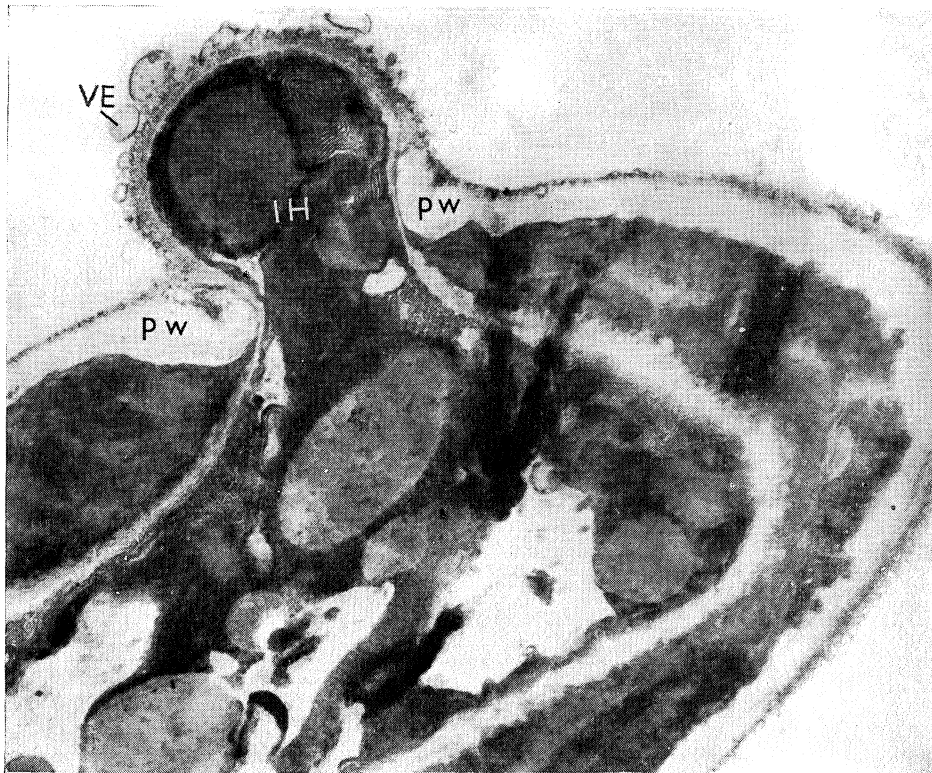


Figure 8. Intrahyphal hypha exit after penetrating the parent cell wall ($\times 25,000$)

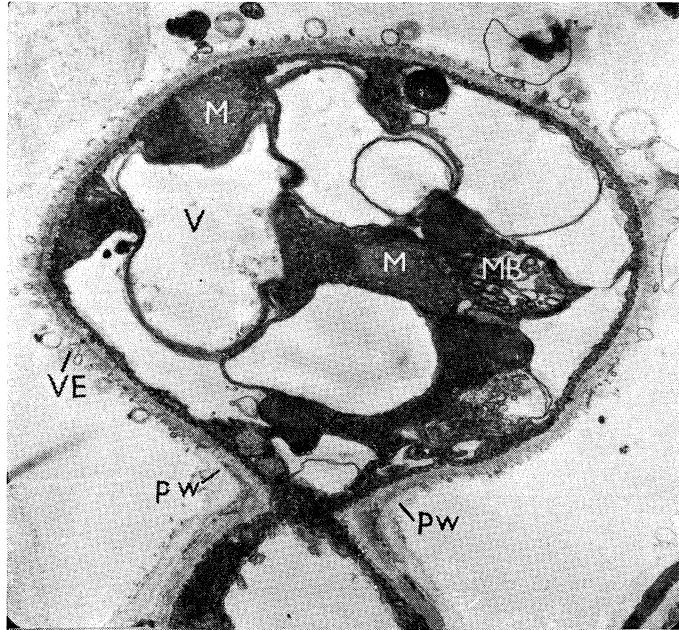


Figure 9.

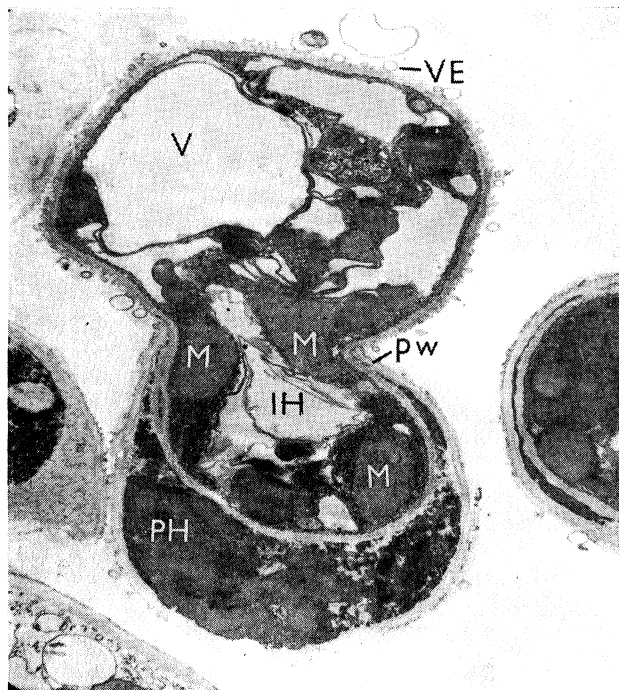


Figure 10

Figures 9-10. Later stages of the intrahyphal growth (Figure 9, $\times 15,000$; figure 10, $\times 11,250$)

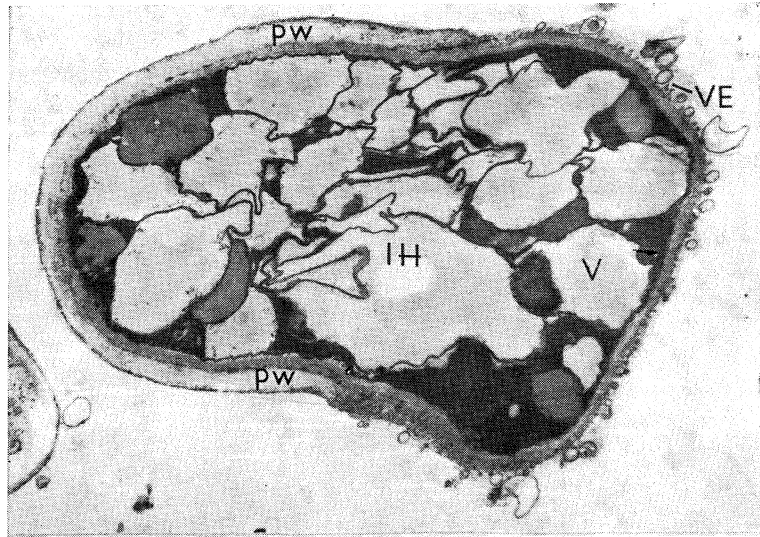


Figure 11. Disappearance of the constriction at the point of exit ($\times 12,750$)

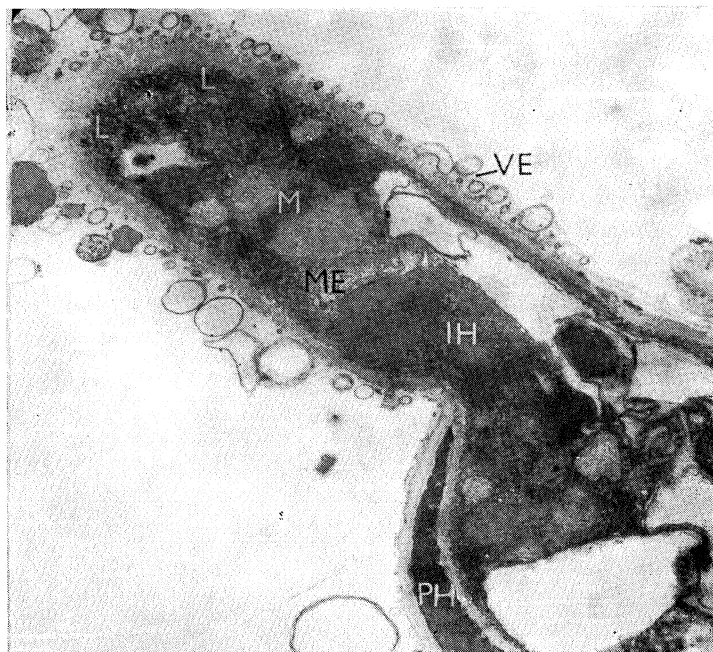


Figure 12. Intrahypha rich in lomasomes and mitochondria ($\times 17,000$)

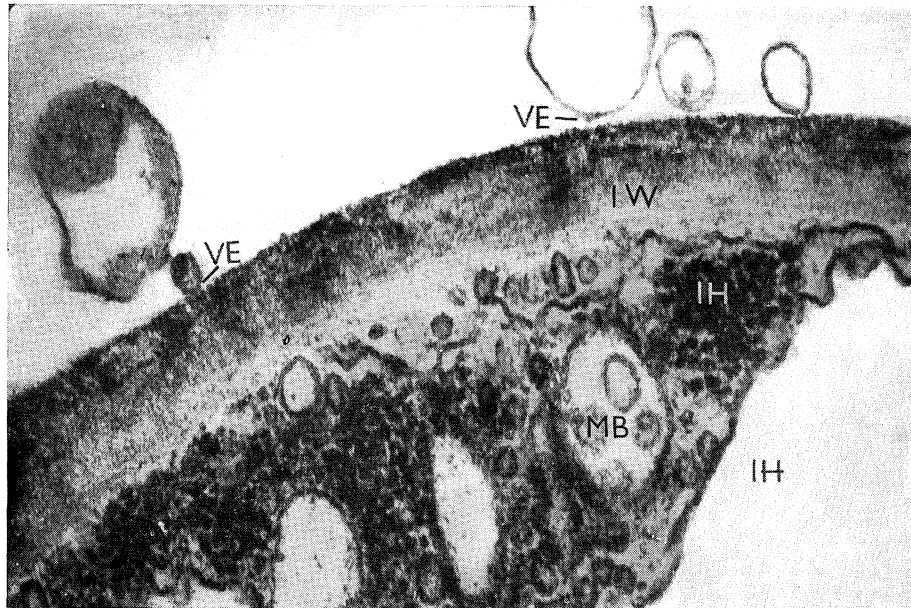


Figure 13. External vesicles attached to the outside of the intrahyphal wall ($\times 69,000$)

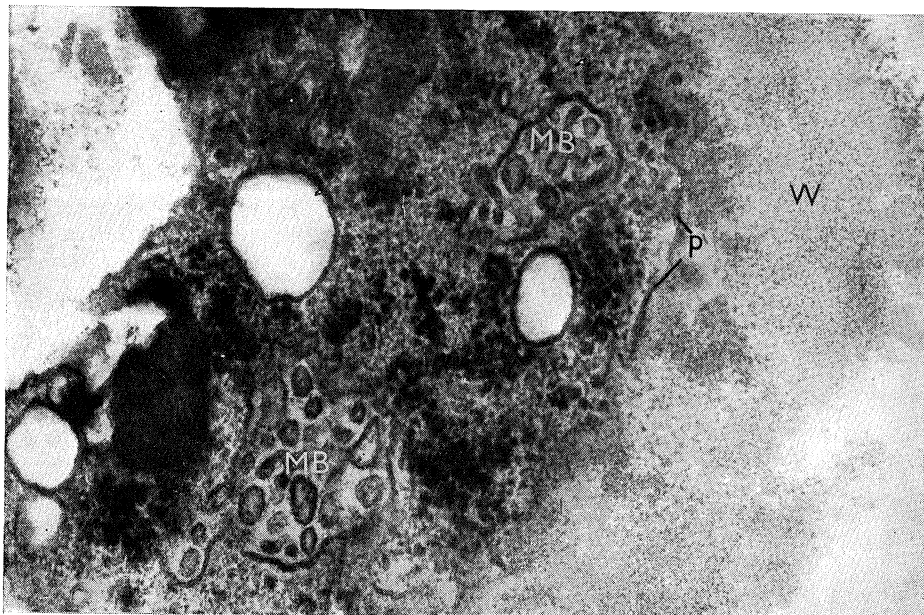


Figure 14. Multivesicular bodies within the cytoplasm ($\times 69,000$)

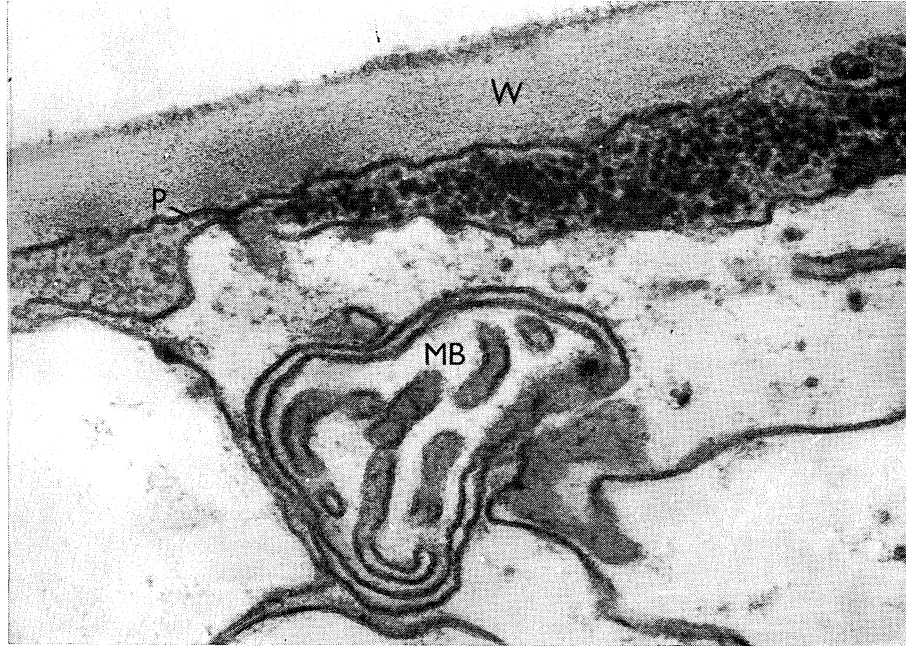


Figure 15. Multivesicular body approaching to the cell wall ($\times 69,000$)

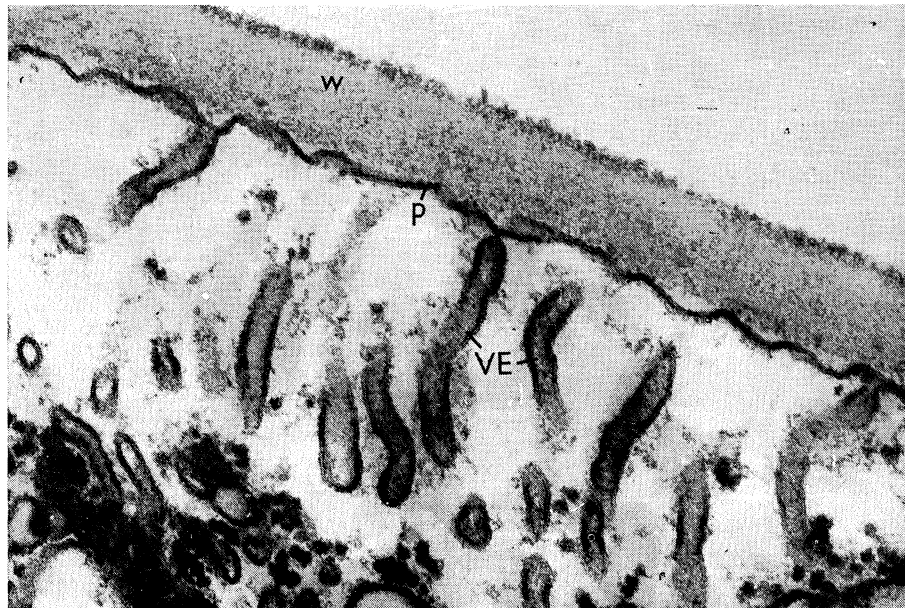


Figure 16. Fusion of the vesicles with the p'ar-malemma and discharge of their contents ($\times 69,000$)

hyphae, follows the same pattern as in other fungi (2 and 9), though in the case of *P. palmivora* the aseptate mycellium might facilitate the more rapid growth of the intrahypha. Finally the exit of the intrahypha seems to take place by mechanical rupture of the parent cell wall. It is not possible to distinguish any diffuse appearance of the old wall at the point of intrahyphal emergence, and the broken parent wall is pushed back from the exit pore as a collar rather than enzymatically dissolved (figures 7-12). It cannot be decided whether some slight enzymatic degradation takes place at the breakage initial.

Multivesicular bodies, similar in structure to those described in other fungi (13), are present in *Phytophthora palmivora*, both in intrahyphal (figures 7, 9 and 13) and in ordinary hyphae (figures 14-16). Multivesicular bodies in fungi may play a role both in new cell wall formation in various fungi (13) and possibly also in the secretion and transport of enzymes (3). Both these suggested functions may be performed by multivesicular bodies in *P. palmivora*.

The fact that, after emerging, the intrahypha shows abundant and almost empty vesicular structures attached to the outside of the wall (figures 8-13), suggests either that they may participate in wall formation by the deposition of their materials at the growing tip (figure 6), or perhaps that these vesicles are merely residual protoplasmic debris from the parent hypha.

Marchant, Peat and Banbury (13), suggested that since multivesicular bodies have been observed only in fungi with chitinous cell walls and not in non-chitinous walled fungi, these bodies might be concerned with chitin deposition in the wall. However, multivesicular bodies are here demonstrated in *Phytophthora palmivora*, which is a fungus lacking chitin in the cell wall. Thus, multivesicular bodies may well be of more general occurrence than has been realized and involved in the synthesis of fungal walls of more than one chemical composition. The use of new methods of fixation may reveal them in many more species. While the origin of multivesicular bodies in *P. palmivora* is unknown, it has been suggested that lomasome-like vesicles originate in the Golgi apparatus in *Pythium debaryanum* (12). Electron microscope autoradiography could perhaps be used to determine the origin of most cytoplasmic vesicles.

SUMMARY

The ordinary vegetative hyphae, development and exit of intrahyphal hyphae and the presence of multivesicular bodies in both types of hyphae in *Phytophthora palmivora* were studied by light and electron microscopy. The intrahyphal hypha grows within the parent hypha and later seems to emerge into the medium by mechanical breaking down of the parent wall. This work records for the third time the occurrence of intrahyphal hyphae in a Phycomycete and for the first time the existence of multivesicular bodies in a fungus having cellulose and lacking chitin in the cell wall. A series of vesicles, resembling in structure that of multivesicular bodies, are always present and attached to the outside of the intrahyphal wall after its exit. The possible significance of these vesicles and their relationships with the multivesicular bodies are discussed.

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my gratitude to Prof. L. E. Hawker, Dr. R. J. W. Bryde and Mr. R. E. Campbell for their helpful criticism and suggestions during the preparation of this manuscript.

RESUMEN

En el curso de esta investigación se ha estudiado la ultraestructura de *Phytophthora palmivora*, tanto en lo referente a las hifas vegetativas ordinarias como a las que se desarrollan internamente o intrahifas. Se ha observado la presencia de cuerpos multivesiculares en ambos tipos de hifas. Esta es la tercera vez que han sido vistas hifas intrahifales en un hongo perteneciente al grupo de los Ficomicetos y la primera vez que han sido encontrados cuerpos multivesiculares en un hongo con paredes celulares celulósicas y carentes de quitina.

La hifa intrahifal, cuyo punto de origen es desconocido en este hongo, crece dentro de la hifa materna y más tarde emerge al exterior mediante la perforación, aparentemente mecánica, de la pared celular de la madre. Esta hifa intrahifal es fácil de identificar, después de su salida, por presentar una serie de vesículas que la rodean externamente, las cuales perma-

necen ligadas a la pared y poseen una membrana similar en estructura a los cuerpos multivesiculares. En este trabajo se discuten las posibles relaciones entre estos sistemas de vesículas.

REFERENCES

1. BULLER, A. H. R. 1933. Researches on Fungi, V. Longmans, Green & Co.
2. CALONGE, F. D. 1968. Origin and development of intrahyphal hyphae in *Sclerotinia fructigena*. *Mycologia*, 60, 932-42.
3. CALONGE, F. D.; FIELDING, A. H., and BYRDE, R. J. W. 1969. Multivesicular bodies in *Sclerotinia fructigena* and their possible relation extracellular enzyme secretion. *J. Gen. Microbiol.*, 55, 177-84.
4. CHAN, C., and STEPHEN, C. 1967. Intrahyphal hyphae in the genus *Linderina*. *Can. J. Botany*, 45, 995-98.
5. DODGE, B. O. 1920. The life history of *Ascobolus magnificus*. *Mycologia*, 12, 115-34.
6. EHRlich, M. A., and EHRlich, M. G. 1966. Ultrastructure of the hyphae and haustoria of *Phytophthora infestans* and hyphae of *P. parasitica*. *Can. J. Botany*, 44, 1495-1503.
7. HAWKER, L. E., and ABBOT, P. McV. 1963. Fine structure of the young vegetative hyphae of *Pythium debaryanum*. *J. Gen. Microbiol.*, 31, 491-94.
8. ICHIDA, A. A., and FULLER, M. S. 1968. Ultrastructure of mitosis in the aquatic fungus *Catenaria anguillulae*. *Mycologia*, 60, 141-55.
9. LOWRY, R. J., and SUSSMAN, A. S. 1966. Intrahyphal hyphae in "Clock" mutants of *Neurospora*. *Mycologia*, 58, 541-48.
10. LUFT, J. H. 1956. Permanganate: a new fixative for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 799-801.
11. LUFT, J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 409-14.
12. MANOCHA, M. S., and COLVIN, J. R. 1968. Structure of the cell wall of *Pythium debaryanum*. *J. Bacteriol.*, 95, 1140-52.
13. MARCHANT, R.; PEAT, A., and BANBURY, G. H. 1967. The ultrastructural basis of hyphal growth. *New Phytol.*, 66, 623-29.
14. MILLER, C. W., and ANDERSON, N. A. 1961. Proliferation of conidiophores and intrahyphal hyphae in *Aspergillus niger*. *Mycologia*, 53, 433-36.
15. MOTTA, J. J. 1967. A note on the mitotic apparatus in the rhizomorph meristem of *Armillaria mellea*. *Mycologia*, 59, 370-75.
16. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 17, 208-12.

INSTITUTO «JAIME FERRÁN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA
SECCIÓN DE BIOLOGÍA DE INFECCIONES BACTERIANAS

VARIACIONES EN LA COMPOSICION DE AMINO- ACIDOS CELULARES EN *ERWINIA CAROTOVORA*

por

M.^a TERESA IRIARTE, PURIFICACIÓN FERNÁNDEZ, E. RONDA y A. PORTOLÉS

INTRODUCCION

Una vez estudiado el comportamiento de algunas especies de *Erwinia* frente a distintos antibióticos (3), y dado el carácter parásito de estos microorganismos, que supone un activo requerimiento y movilidad de aminoácidos, hemos creído oportuno hacer unos exámenes comparativos de la composición celular de estos compuestos nitrogenados en las distintas especies antibiótico-resistentes obtenidas.

Asimismo, para tener un criterio de base, se han estudiado previamente las variaciones de estos aminoácidos que parecen condicionadas a alteraciones en la composición del medio y características de su crecimiento.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias

Para estos estudios se ha utilizado *Erwinia carotovora*, cepa (NCPFB) 312 de la Colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas, de Harpenden (Inglaterra).

En su crecimiento se emplearon dos modalidades de cultivo: el método ordinario, sobre matraces, con sucesivas resiembras para obtener bac-

terias en la fase estacionaria, y cultivo continuo sobre quimiostato para estudiar las variaciones de composición en la fase exponencial según el factor limitante.

Antibióticos

Las sustancias antibióticas empleadas fueron: penicilina potásica, sulfato de dihidroestreptomina y clorhidrato de tetraciclina (Antibióticos, S. A.), succinato de cloranfenicol (Parke Davis), glucoheptonato de eritromicina (Lilly), sulfato de polimixina B (Pfizer, S. A.), kanamicina (Bristol) y novobiocina (Upjohn).

Con todos ellos se prepararon soluciones concentradas en agua destilada, se esterilizaron por millipore y se conservaron de acuerdo con las indicaciones de Grove y Randall (2).

Medios de cultivo

Se usaron distintos tipos de medio de cultivo. Así, para mantenimiento y resiembras, utilizamos el medio de fitopatógenos preconizado por los bacteriólogos americanos, mientras que para cultivo continuo y obtención de estirpes resistentes empleamos los que se indican a continuación.

El medio para obtener las cepas antibiótico-resistentes contenía, por litro, 5 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa y 1 g de PO_4HK_2 ; mientras que para cultivo continuo utilizamos un medio base cuya composición por litro era: 0,284 g de PO_4HNa_2 , 0,284 g de PO_4HK_2 , 0,5 g de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$, 0,528 g de L-asparagina y 0,4 g de extracto de levadura; a este último se le añadía 2 ‰ de pectina o glucosa como factor limitante.

Métodos

Entre los distintos métodos hay que distinguir:

El *método para cultivo continuo*, realizado sobre un quimiostato simple y en circuito abierto, ya utilizado en otras ocasiones (12) y en el que también hemos estudiado algunas características del crecimiento exponencial de células de *Erwinia* (1) y su producción enzimática (14).

Para la *obtención de estirpes antibiótico-resistentes* seguimos una técnica, ya habitual en nuestro laboratorio (8), en la que las bacterias se van resemebrando sobre concentraciones subinhibidoras de antibiótico, previa-

mente fijadas por determinación de la concentración mínima inhibidora (CMI) sobre medio líquido.

Para *determinación de los niveles de antibiótico-resistencia* acudimos a la determinación de la CMI sobre medio líquido en presencia de resazurina como indicador (10-11).

El *análisis y valoración de los distintos aminoácidos* se realizó por separación cromatográfica sobre columnas de Amberlita IR-120 de acuerdo con las técnicas de Moore y colaboradores (7), con algunas modificaciones en cuanto a las condiciones de elución de la gran columna (13). La cistina se valoró por separado según el método de Moore (5).

A partir de grandes volúmenes de cultivos líquidos se obtenían las muestras por centrifugación, durante veinte minutos, a 23.000 g en una sorvall, se lavaban varias veces con tampón de fosfato, a pH 7,2 y sobre él se mantenían en suspensión.

La hidrólisis se efectuó durante veinticuatro horas en medio ácido (10 mg proteína/40 cm³ de CIH 6 N), a 110 °C, de acuerdo con lo preconizado por Peters (9).

Los líquidos de elución se recogieron sobre un colector LKB 60 y en ellos se determinaron los aminoácidos según la técnica colorimétrica de Moore y Stein (6), utilizando una curva patrón de leucina.

RESULTADOS

En el *cuadro 1* se recogen las variaciones en el contenido de aminoácidos de las distintas muestras analizadas.

CONSIDERACIONES

En primer lugar, hemos de consignar que el triptófano no se ha determinado porque los métodos de que disponemos no son adecuados ni reproducibles para las concentraciones con que trabajamos, y que tan sólo se consideran significativas las oscilaciones superiores a $\pm 15\%$, aunque el error del método sea inferior al 3%, ya que análisis de proteínas de origen animal y vegetal, efectuados por uno de nosotros, nos han demostrado que variaciones inferiores al 15% en proteínas de una misma especie pueden darse con una cierta facilidad.

Cuadro 1. Variaciones en la composición de aminoácidos celulares, en Erwinia carotovora, en función de su resistencia a los antibióticos y condiciones de cultivo

Aminoácidos	Composición de las muestras en gramos de aminoácido/100 g de proteína bruta										
	Estirpes normales			Estirpes resistentes a los distintos antibióticos, UI							
	Fase estacionaria por cultivo en matraces	Fase exponencial por cultivo en quimiostato		200 de penicilina	1.000 de estreptomycin	200 de cloranfenicol	12 de tetraciclina	900 de eritromicina	125 de polimixina	12 de kanamicina	1.000 de novobiocina
		con pectina	con glucosa								
Glicina	3,24	6,39	6,93	5,68	6,00	5,26	6,03	4,98	5,05	4,78	4,68
Alanina	6,20	8,10	6,84	6,75	6,50	8,08	6,28	6,41	6,75	6,36	7,27
Valina	7,39	7,81	8,70	8,93	8,06	8,98	12,85	7,56	8,64	7,30	8,90
Isoleucina	5,77	6,00	5,00	5,91	2,70	4,34	4,37	4,59	6,25	4,92	5,14
Aloisoleucina	1,67					1,13	0,53			1,51	0,59
Leucina	9,10	10,80	9,17	9,44	8,53	7,32	8,95	8,46	8,14	8,86	7,58
γ -aminobutírico	1,69			0,64		2,44	1,20	1,57	0,23	2,83	0,39
Serina	4,56	3,03	3,87	3,67	2,62	4,66	5,10	4,93	4,19	4,56	3,57
Treonina	5,52	4,37	4,23	3,70	5,04	5,42	4,18	4,82	3,10	4,22	3,64
Cistina	1,25	0,83	0,60	0,84	1,30	1,25	1,07	1,20	0,75	1,51	0,70
Metionina	3,19	2,96	3,00	3,16	3,38	2,64	2,10	2,47	3,72	3,00	2,38
Acido aspártico	11,07	0,66	9,52	9,52	10,17	9,10	9,93	11,85	10,23	8,83	10,60
Acido glutámico	8,44	12,96	12,40	10,95	12,17	8,95	10,88	10,28	10,24	7,63	12,39
Lisina	5,03	8,93	5,94	6,44	8,27	4,85	5,27	6,94	6,87	7,80	7,46
Arginina	5,60	7,65	6,18	5,49	6,79	5,52	3,95	4,34	7,13	4,66	6,20
Fenilalanina	6,55	6,56	6,57	5,53	5,12	5,40	4,37	5,10	5,55	5,54	4,55
Tirosina	4,32	4,19	3,84	4,68	4,32	4,80	3,65	4,10	3,49	4,84	3,75
Histidina	2,43	2,89	2,66	2,38	2,55	1,08	1,24	2,66	2,00	1,70	2,90
Prolina	3,29	3,25	3,00	3,25	2,03	2,59	3,32	2,41	1,78	3,31	2,85
Triptófano		no determinado					no determinado				
NH ₃ detectado	2,17	1,39	1,34	1,46	1,50	1,62	1,52	1,37	1,60	1,60	1,50

Si acudimos a observar las variaciones de los distintos grupos de aminoácidos veremos que estas son muy diversas, presentando —las cepas normales en fase estacionaria— una composición muy distinta en aminoácidos a las de aquellas cultivadas en quimiostato o sometidas a tratamiento antibiótico; hecho ya comprobado en otra ocasión (4).

El ácido γ -aminobutírico y la aloisoleucina fueron detectados en pequeña cantidad en las bacterias normales, únicamente cuando estaban en fase estacionaria; apareciendo también una o ambas sustancias en algunas estirpes tratadas por antibióticos. Ello parece señalarlas como sustancias de reserva que por posterior movilización permiten otras transaminaciones.

En general, podemos señalar para las estirpes normales, que, cuando las células están en fase exponencial, existen menores cantidades de ácido aspártico y una marcada disminución de cistina con aumentos de glicina y ácido glutámico, y que cuando este cultivo en quimiostato se realiza sobre pectina como factor limitante, la disminución del ácido aspártico es muchísimo más acusada y va acompañada de visibles incrementos en aminoácidos básicos, sobre todo de lisina.

Como puede verse al considerar los datos de las estirpes antibiótico-resistentes no es fácil interpretar resultados en los que caben tantas variables, ya que si, por ejemplo, en presencia de antibióticos oligosacáridos, observamos las variaciones de los aminoácidos derivados del fosfoglicerato, vemos que si bien en el caso de las bacterias estreptomycin-resistentes parece acelerada la transformación de serina hacia cisteína y glicina, en el caso de las kanamicin-resistentes sucede (al igual que en presencia de cloranfenicol, tetraciclina y eritromicina) que estas variaciones señalan aumentos simultáneos de serina, cisteína y glicina. En cuanto a la leucina y valina, se aprecian escasas variaciones, que casi siempre son de signo contrario entre ellas; siendo las más significativas las encontradas en las cepas resistentes a cloranfenicol y novobiocina, en las que disminuye la leucina y aumenta la valina.

Para la alanina, apenas hay variación, excepto los marcados aumentos observables en fase exponencial con pectina en el medio y en los tratados con cloranfenicol y novobiocina.

Entre aquellos aminoácidos cuya síntesis deriva del ácido aspártico consideraremos, primero, la lisina y metionina, entre los cuales aparecen variaciones del mismo signo o de signo contrario, según los casos. Así,

aparece disminución para ambos en los tratados por cloranfenicol y aumento en los polimixín-resistentes; mientras que hay un acusado aumento de lisina, con disminución de la metionina, en las estirpes normales desarrolladas en quimiostato con pectina como fuente de energía y en las resistentes a eritromicina, novobiocina y kanamicina; aumentos de lisina, sin apenas variación de la metionina, con penicilina y estreptomycin; y disminución de metionina, sin apenas variación de la lisina, en las tetraciclín-resistentes.

La arginina aumenta cuando las bacterias están en fase exponencial y en las tratadas con polimixina, estreptomycin y novobiocina; mientras que disminuye claramente en los resistentes a tetraciclina, eritromicina y kanamicina.

En cuanto a la isoleucina y treonina, hay acusada disminución del segundo, con ligeras variaciones de aumento o disminución del primero, en los tratados con penicilina, polimixina y novobiocina; en tanto que sucede a la inversa en presencia de estreptomycin y aparecen ligeras disminuciones de ambos aminoácidos en los tratados por cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina y kanamicina.

Referente a los ácidos aspártico y glutámico, estudiando sus variaciones en comparación con las estirpes normales en fase estacionaria, se ve (excepto para los tratados por eritromicina, que hay aumento para ambos aminoácidos, y con kanamicina, en que aparece disminución) que en todos los demás casos la intervención de los antibióticos aparece reflejada en un acusado aumento del ácido glutámico, con disminución del aspártico; lo mismo que sucede con las cepas normales en fase exponencial, sobre todo con pectina como factor limitante.

Por último, en cuanto a los aminoácidos de carácter aromático, las variaciones son mucho menos acusadas y siempre tienen una significación negativa: así, vemos que hay disminución de fenilalanina en presencia de antibióticos, sobre todo con tetraciclina y novobiocina; la tirosina disminuye en los tratamientos con polimixina, tetraciclina y novobiocina, mientras que la histidina lo hace en presencia de cloranfenicol, tetraciclina y kanamicina; y la prolina con polimixina, estreptomycin, eritromicina y cloranfenicol.

RESUMEN

En el presente trabajo se hace un estudio previo de las variaciones que se producen en el contenido de aminoácidos celulares de especies normales de *Erwinia carotovora* en las fases estacionaria y exponencial de su crecimiento (sobre matraz y quimiostato, respectivamente) y según que en el medio exista pectina o glucosa como factor limitante.

Asimismo, se examinan estas variaciones cuantitativas de aminoácidos para cepas de *Erwinia carotovora* resistentes a ocho antibióticos distintos y se comparan los resultados frente a los obtenidos para las estirpes normales antibiótico-sensibles.

Estos resultados constituyen un examen previo que permitirá estudiar el problema con más detenimiento y en una segunda fase de trabajo conocer más exactamente el metabolismo y regulación de los distintos aminoácidos en presencia de diferentes antibióticos.

SUMMARY

Under several conditions of growth with pectin and glucose as substrates, the differences in cellular amino acids of *Erwinia carotovora* are studied.

After knowing the amino acid composition in the normal *Erwinia carotovora* cells, the results were compared—through the quantitative and qualitative variations—with those obtained from resistant strains to eight different antibiotic substances.

Data are examined and discussed in the several groups of amino acids according to their metabolic pathways.

BIBLIOGRAFIA

1. FERNÁNDEZ, P.; PORTOLÉS, A., e IRIARTE, M. T. 1968. The influence of growth rate on cellular size of *Erwinia carotovora*. *Z. Allgem. Mikrobiol.*, 8, 265-67.
2. GROVE, D. O., y RANDALL, W. A. 1955. Assay methods of antibiotics.
3. IRIARTE, M. T., y FERNÁNDEZ, P. 1968. Comportamiento de algunas especies de *Erwinia* frente a los antibióticos. *Microbiol. Españ.*, 21, 175-92.

4. LÓPEZ, R.; RONDA, E., y PORTOLÉS, A. 1967. Variaciones en la composición de aminoácidos en especies de azotobacteriaceas antibioticorresistentes. *Microbiol. Españ.*, 20, 191-202.
5. MOORE, S. 1963. On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, 238, 235-37.
6. MOORE, S., y STEIN, W. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211, 907.
7. MOORE, S.; SPACKMAN, D., y STEIN, W. 1958. Cromatography of aminoacids on sulfonate polystyrene resins. *Anal. Chem.*, 30, 1185-90.
8. PÉREZ-UREÑA, M. T. 1962. Las asociaciones de antibióticos y su influencia sobre la antibioticorresistencia bacteriana. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia. Madrid.
9. PETERS, F. E. 1960. Preparation and aminoacid composition of selected seed proteins fractions. Ph. D., Thesis.
10. PORTOLÉS, A. 1960. La terapia antibiótica desde el laboratorio clínico. I. Determinación de niveles antibióticos en líquidos orgánicos y valoración de su poder antimicrobiano efectivo. *Laboratorio*, 29, 21-30.
11. PORTOLÉS, A. 1961. Técnicas microbiológicas para estudiar el comportamiento de asociaciones antibióticas. *Microbiol. Españ.*, 14, 17-52.
12. PORTOLÉS, A.; PÉREZ-UREÑA, M. T.; IRIARTE, T., y FERNÁNDEZ, P. 1965. Utilization of carboxymethyl cellulose (CMC) by a *Pseudomonas atrofaciens* mutant. *Z. Allgem. Mikrobiol.* 5, 249-50.
13. RONDA, E.; SOTO, E., y RODRÍGUEZ, D. 1966. Método de elución continuo para la separación de aminoácidos en cromatografía de resinas sintéticas. *Anales Bromatol.*, 18, 105-10.
14. TEJERINA, G.; PORTOLÉS, A., y CABEZAS DE HERRERA, E. 1967. Producción de enzimas pectolíticas en cultivo continuo. *Microbiol. Españ.*, 20, 233-44.

CIUDAD UNIVERSITARIA. MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

NUEVO SUBSTRATO PARA LA PRODUCCION DE L-LISINA POR MUTANTES AUXOTROFAS DE *M. GLUTAMICUS* (*C. GLUTAMICUM*) (*)

por

A SANCHEZ-MARROQUIN (**), M.^a ELENA MONDRAGON, LILIA VIERNA y
GRACIELA MEZA

INTRODUCCION

Se ha obtenido una buena producción de lisina mediante mutantes que requieren homoserina, treonina y metionina (7 y 10-13) y buenos rendimientos de otros aminoácidos a nivel de miligramos/mililitro (6).

La introducción de mutantes de *Micrococcus glutamicus* para la producción de lisina se ha llevado a cabo por la vía de conversión del precursor inmediato, ácido diaminopimélico (3), considerándose que sigue un camino metabólico semejante al de *Escherichia coli*. Kita y Huang (9) emplearon una modificación de este procedimiento utilizando un solo organismo, el cual produce el ácido diaminopimélico y lo convierte en lisina después que las células han sido lisadas. El camino metabólico que sugieren dichos investigadores para la producción microbiológica de lisina se muestra en el *esquema 1*.

(*) Trabajo presentado parcialmente en el IV Congreso Latinoamericano de Microbiología celebrado en Lima, Perú (26 de noviembre de 1967). Parte del mismo es la tesis de M. E. M. presentada a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico de México.

(**) Dirección actual: Facultad de Ciencias, Departamento de Tecnología, Apartado 10098, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

La biosíntesis de lisina por bacterias recibió gran impulso con el trabajo de Kinoshita y colaboradores (8), quienes utilizaron mutantes auxótrofos de *Micrococcus glutamicus*.

Los rendimientos de L-lisina por vía microbiológica obtenidos hasta la fecha en todas las condiciones estudiadas oscilan entre 0,5 y 20 mg/ml.

En el presente trabajo se estudian varias cepas de *Micrococcus glutamicus*, particularmente mutantes auxótrofas, para producir lisina utilizando un nuevo substrato: el jugo de *Agave atrovirens*, denominado "aguamiel", en contribución al proyecto de industrialización que desarrolla el Patronato Nacional del Magüey en México, para el aprovechamiento integral de diversas especies del género *Agave*.

En la composición de ese jugo intervienen sacarosa, glucosa y fructosa además de diversos factores para el crecimiento microbiano (16).

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Se emplearon 3 cepas de *Micrococcus glutamicus*: B-2696, 13286 y 13287 de la "American Type Culture Collection" y 15 mutantes auxótrofas de aminoácidos obtenidas de las primeras por irradiación ultravioleta. Además, algunas de las mejores mutantes obtenidas de la primera irradiación se sometieron nuevamente a una segunda en idénticas condiciones y las mutantes obtenidas de esta manera se probaron respecto a su actividad como productoras de lisina, empleándose ahora solamente un solo medio (el núm. 9) y posteriormente tres variantes de éste. Todas las cepas se conservaron en triptona-extracto de levadura-agar (TGL).

Medios

Para la producción de lisina por las cepas estudiadas se emplearon 32 medios de cultivo a base de "aguamiel", a 5° Brix, ajustados a un pH de 7,2. En la composición de los medios habían diversos materiales que potencialmente pueden influir en la fermentación, tales como "corn steep liquor", "proflo", urea, hidrolizado de caseína, harina de soja y diferentes sales minerales.

Todos los medios se tinalizaron durante una hora tres días consecutivos. El medio 9, que fue el seleccionado por su sencillez y por permitir buenos rendimientos, tenía la siguiente composición: "corn steep liquor", 0,25 g; K_2HPO_4 , 0,1 g, y "aguamiel", 100 ml. El medio designado como núm. 4 se tomó como patrón para propósitos comparativos por contener glucosa que es el carbohidrato mejor utilizado en la biosíntesis. Su composición es la siguiente: glucosa, 3 g; "corn steep", 0,25 g; $CaCO_3$, 0,5 g; NH_4Cl , 0,5 g; KH_2PO_4 , 0,05 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 g, y agua destilada, 100 ml.

Fermentación

Se prepararon matraces de Erlenmeyer de 300 ml con 100 ml de medio de fermentación y se inocularon con 1,5 % (v/v) de un cultivo de veinticuatro horas del microorganismo de prueba. Se incubaron a 28 °C, en agitación, durante cuatro o cinco días.

Asimismo se utilizaron fermentadores de 20 l de capacidad con 10 l del medio 9 seleccionado, los cuales se inocularon con los cultivos que dieron los mejores resultados en los matraces.

La temperatura se mantuvo a 28 °C. Se pasó aire filtrado a razón de 8 pies cúbicos/min. La agitación fue de 350 r/m durante cuatro-cinco días. Periódicamente se tomaron muestras de 50 ml en condiciones de esterilidad, para las determinaciones químicas.

Análisis químicos

Lisina. Se utilizó el método cromatográfico conforme a Block y Bolling (1-2). Las lecturas de los cromatogramas se efectuaron en un densitómetro con filtro verde, a 570 m μ . En algunos casos se aplicó, además, el método microbiológico usual mediante *Pediococcus cerevisiae*.

Azúcares. Se estimaron por el procedimiento convencional del Fehling. *pH.* Se determinó mediante el potenciómetro de Beckman.

RESULTADOS

En el *cuadro 1* se pueden observar los resultados obtenidos con las cepas protótrofas B-2696, 13286 y 13287 en los medio probados. Ninguna de ellas dio rendimientos superiores a 3,5 mg/ml de L-lisina. Los rendimientos máximos correspondieron al medio 9 en su mayoría y fueron superiores a los del medio 4 a base de glucosa.

Como el medio denominado núm. 9 fue el que mostró rendimientos más altos y constantes, además, uno de los de formulación más sencilla, se seleccionó para probar en él la actividad de todas las mutantes obtenidas. Los rendimientos de algunas de las mutantes de primera irradiación

Cuadro 1. Rendimientos de L-lisina por las cepas originales

Cepas	L-lisina mg/ml (*)	Rendimiento en el medio 4
B-2696	0,17-0,90	0,09-0,75
13287	0,91-2,5	0,84-1,96
13286	0,97-3,5	1,00-2,85

(*) Valores mínimo y máximo en los diferentes medios probados.

Matraces de 250 ml con 50 ml de medio. Temperatura: 28 °C; agitación: 350 r/m; tiempo: 6 días.

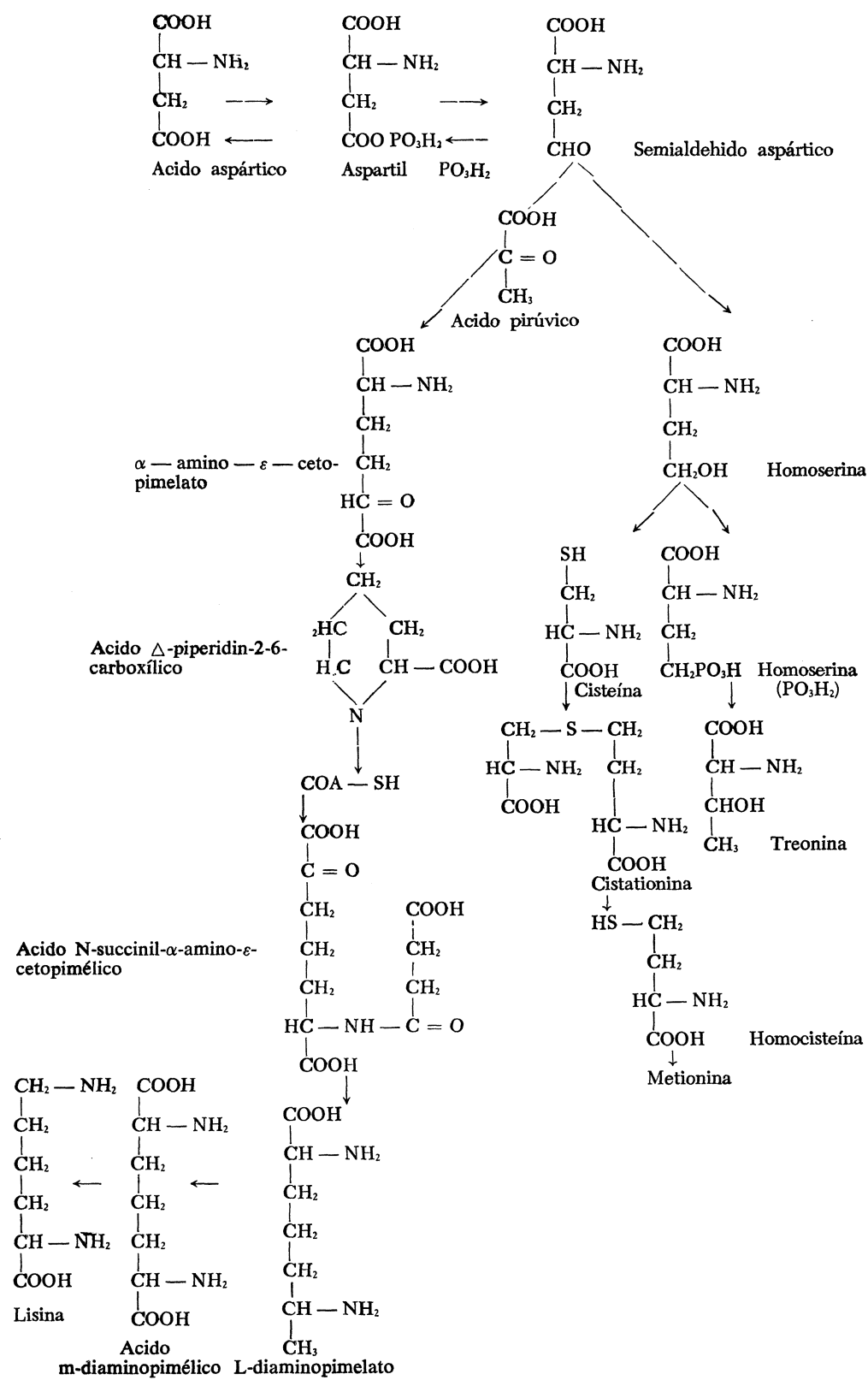
con respecto a su capacidad para producir lisina en el medio 9 se indican en el *cuadro 2*. Los valores máximos fueron de 4,2 mg/ml para la mutante auxótrofa de metionina (13287-Ia)—mayor que el valor de 1,1 mg/ml de la cepa original (13287)—y de 5,5 para la mutante 13286-IIa superior también al máximo rendimiento de la cepa original (3,5 mg/ml).

Cuadro 2. Producción de L-lisina en el medio 9 por las principales mutantes de M. glutamicus (primera irradiación)

Mutantes por luz ultravioleta	Requerimientos de aminoácidos	Rendimientos
13287-Ia	Metionina	4,2
13287-3	Cisteína	2,3
B2696-7	Metionina-treonina-cisteína	3,8
13286-IIa	Treonina	5,5
B2696-14	Treonina	2,5
13286-16a	Cisteína-treonina	2,9
13287-17	Cisteína-metionina	2,3
13287-18	Treonina	2,7
B2696-20	Treonina-cisteína	2,4

Condiciones: las mismas del cuadro 1.

Esquema 1. Camino metabólico para la síntesis bacteriana de lisina y aminoácidos de la familia del ácido aspártico



La cepa (B-2696-7) Met⁻ treo⁻ cis⁻ produjo el cuádruple de rendimiento de la cepa original (B-2696), en el medio 9 (figura 1).

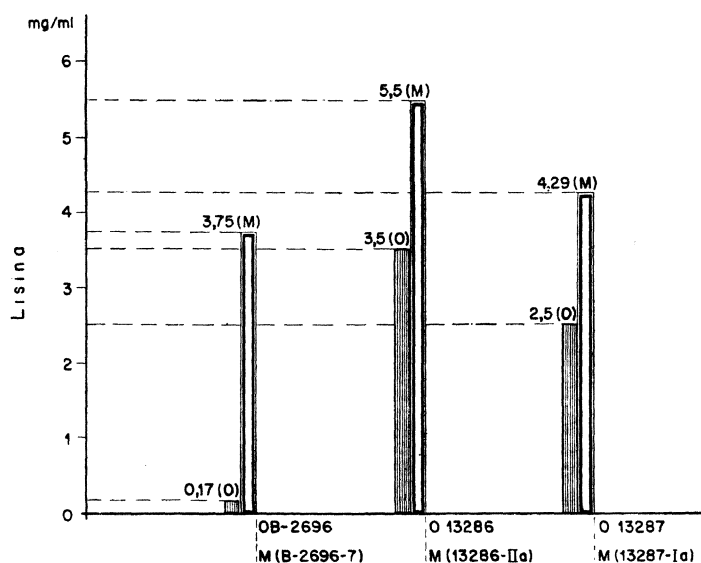


Figura 1. Rendimientos de cepas originales y mutantes auxótrofas productoras de lisina. O, cepa original. M, cepa mutante

En el cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos con cinco de las mutantes derivadas de una segunda irradiación con luz ultravioleta. Se utilizó el medio 9 simple y adicionado de componentes tales como harina desengrasada de semilla de algodón ("proflo"), caseína hidrolizada y harina de soja. Como se observa en el cuadro 3, los resultados muestran ligero aumento en relación con las cepas protótrofas en el medio 9 sin modificar, pero sin que dicho incremento sea de gran significación. Puede observarse, asimismo, que la aplicación de la segunda irradiación no afectó significativamente los resultados. La adición de harina de soja favoreció el rendimiento de L-lisina en términos generales.

Para estudiar la cinética del proceso, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando un fermentador de 20 l de capacidad con 10 l de medio seleccionado.

Cuadro 3. Producción de L-lisina (mg/ml) en el medio 9. Cepas auxótrofas obtenidas por segunda irradiación

Cepas	Requerimientos de aminoácidos	Medio 9	Medio 9 con «proflo»	Medio 9 con hidrolizado de caseína	Medio 9 con harina de soja
13286-15	Treonina	2,2	2,4	2,5	3,0
13287-Ia	Cisteína-treonina	4,2	2,3	2,8	5,6
13287-15-IIa	Treonina-cisteína	2,6	2,1	2,9	3,9
13287-15-VI	Metionina-treonina	2,0	2,0	2,2	2,3
13287-2a-XIVa	Metionina-cisteína-treonina	2,1	2,9	2,8	2,6
13287-2a-XIVb	Metionina-treonina	2,3	2,9	2,5	2,9

Condiciones: las mismas del cuadro 1.

Los resultados correspondientes a la cepa mutante 13287-Ia en el medio 9 se muestran en la *figura 2*.

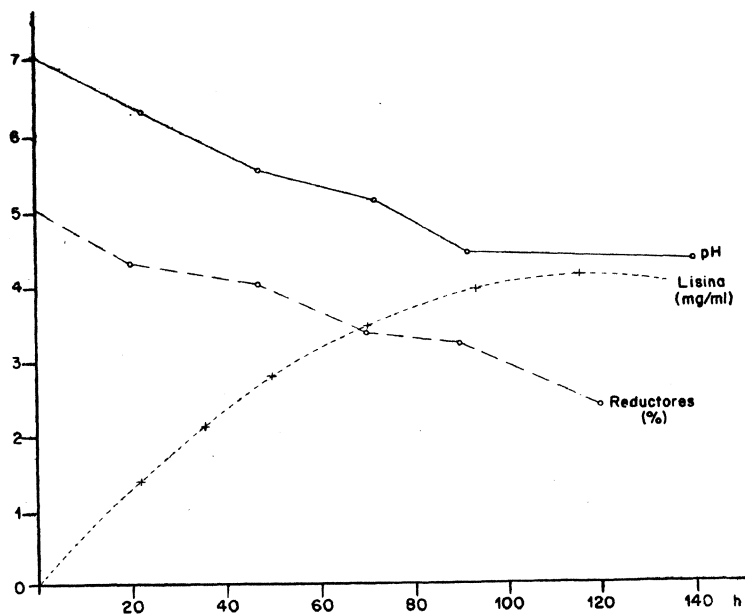


Figura 2. Cinética de la producción microbiana de lisina

En resumen, la máxima producción de lisina por dicha mutante en las condiciones estudiadas, acontece a las noventa y seis horas, aproximadamente, cuando el consumo de azúcares ha bajado de 5,0 a 3,1 y el pH de 7,1 a 4,1.

DISCUSION

Nakayama y colaboradores (11-13) y Kinoshita y colaboradores (7-8) obtuvieron mutantes auxótrofas por irradiación con luz ultravioleta y tratamiento con penicilina, empleando bacterias como *Micrococcus glutamicus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, variando en su dependencia de aminoácidos tales como homoserina, treonina y metionina.

En nuestro trabajo se obtuvieron y se utilizaron mutantes de *Micrococcus glutamicus* dependientes de metionina, treonina y cisteína.

Se considera que la homoserina estimula el crecimiento del microorganismo y su capacidad para utilizar glucosa y sintetizar lisina, y cualquier efecto inhibitorio de la lisina por homoserina tendría que dirigirse a un sitio anterior al semialdehído aspártico (4). Por otro lado, Stadtman y colaboradores (17) han demostrado que la primera enzima, la aspartocinasa, es inhibida en *Escherichia coli* y levaduras por homoserina, lisina y treonina. Todo esto significa que hay diferencias notables según la cepa del *Micrococcus glutamicus* (14).

Asimismo, Daoust y Stoudt (4) han demostrado que el crecimiento de los cultivos de *Micrococcus glutamicus* no es afectado por la metionina del medio hasta 500 mg/ml. La utilización de la glucosa y biosíntesis de lisina resultarían quizá como consecuencia de la represión de las enzimas relacionadas con la síntesis de lisina (15). En cambio, De Zeeuw (5) no observó ningún efecto inhibitorio en la acumulación de lisina, al añadir la misma concentración de metionina al medio.

Por lo que respecta a la treonina, el sitio de ataque de este aminoácido no se conoce, pero se sospecha la acción sobre la enzima aspartocinasa (17). Por otra parte, se sabe que la metionina puede revertir los efectos inhibitorios producidos por la treonina y que la homoserina y metionina pueden reactivar las enzimas implicadas (4).

No se encuentra en la literatura actual ningún dato sobre el papel de la cisteína con respecto a la biosíntesis de la lisina, pero resulta lógico suponer que tenga acción semejante a la de la metionina.

Al comparar las cepas mutantes dependientes de diferentes aminoácidos con las cepas originales B-2696, 13286 y 13287 en su capacidad para producir lisina en los medios con "aguamiel", se encontró algún aumento en los rendimientos de las mutantes, con lo cual cabe señalar la posibilidad de modificaciones genéticas en su comportamiento bioquímico.

La irradiación de las cepas por segunda vez se hizo con el objeto de tratar de producir otras lesiones dentro del mismo *locus*, especulándose que pudo suceder así, puesto que hubo variación en la dependencia de aminoácidos, lo mismo que en la producción de lisina, aunque esto en menor grado.

En cuanto a los substratos estudiados, se encontró que uno de los medios (núm. 9) fue el que permitió los mayores rendimientos de lisina por las mutantes estudiadas, lo cual representa una considerable ventaja desde el punto de vista de la economía. Los rendimientos no fueron claramente mayores cuando a dicho medio se le agregó "proflo", hidrolizado de caseína o harina de soja.

RESUMEN

Se presenta un estudio de la producción de L-lisina por 17 mutantes de *C. glutamicum* obtenidas por irradiación ultravioleta. Los mejores rendimientos (5,5 mg/ml) se obtuvieron con la mutante de metionina 13287-1a en un medio de la siguiente composición: "aguamiel" a 5° Brix (jugo de *Agave atrovirens*), 100 ml; "corn steep liquor", 0,25 g, y K_2HPO_4 , 0,1 g, a pH 7,2.

Todas las mutantes dieron rendimientos más altos que las cepas originales en los diferentes medios estudiados. Se estudió asimismo la cinética del proceso en fermentadores de 20 l, encontrándose que la máxima producción acontece a las noventa y seis horas cuando el consumo de azúcares ha bajado a 3,1 y el pH a 4,1.

SUMMARY

A study has been made of the production of L-lysine by 17 u.v. mutants of *C. glutamicum* in several media containing "aguamiel" (non fermented juice of *Agave atrovirens*) as the main substrate. The best

yields (5.5 mg/ml) were obtained by a methionine-less mutant (13287-Ia) in an "aguamiel" medium added of 0.25 and 0.1 g % of corn steep liquor and K_2HPO_4 respectively.

The maximum yield with this strain in 20 l fermenters was reached at 96 hs. when the sugar content dropped to 3.1 g and the pH to 4.1.

REFERENCIAS

1. BLOCK, R. 1956. Manual of Paper Chromatography. Academic Press, Nueva York.
2. BLOCK, R., y BOLLING. 1962. The Amino Acid Composition of Protein and Food. Nueva York.
3. CASIDA (Jr.), L. E. 1956. Preparation of diaminopimelic acid and lysine. U. S. Pat. 2. 771, 396.
4. DAoust, D. R., y STouDT, T. H. 1966. Biosynthesis of L-lysine in a strain of *Micrococcus glutamicus*. Develop. Ind. Microbiol., 7, 22-34.
5. DE ZEEUW, J. R. 1963. Lysine: Biosynthesis and production by bacteria. Symposium on the production of amino acids by fermentation. American Chemical Society 145th Meeting. Nueva York.
6. DULANEY, E. L. 1966. Perspectives on fermentation for aminoacids. Develop. Ind. Microbiol., 7, 3-6.
7. KINOSHITA, S.; NAKAYAMA, K., y KITADA, S. 1958. L-lysine production using microbial auxotrophs. J. Gen Appl. Microbiol. 4, 128-29.
8. KINOSHITA, S.; NAKAYAMA, K., y KITADA, S. 1961. Method of producing L-lysine by fermentation. U. S. Pat. 2., 971, 532.
9. KITA, D., y HUANG, H. T. 1958. Fermentation process for the production of L-lysine. U. S. Pat. 2., 841, 532.
10. NAKAYAMA, K., y KINOSHITA, S. 1966. Some considerations on the metabolism and biosynthesis of lysine. Develop. Ind. Microbiol., 7, 16-21.
11. NAKAYAMA, K.; KITADA, S., y KINOSHITA, S. 1960. Studies on lysine fermentation. I. Conversion phenomena in fermentation and control of lysine accumulation by homoserine and treonine. Amino Acids Fermentation Symposium Japan, 2, 105-10.
12. NAKAYAMA, K.; KITADA, S., y KINOSHITA, S. 1961. Studies on lysine fermentation. I. The control mechanism on lysine accumulation by homoserine and treonine. J. Gen. Appl. Microbiol., 7, 145-54.
13. NAKAYAMA, K.; KITADA, S.; SATO, Z., y KINOSHITA, S. 1961. Induction of nutritional mutants of glutamic acid bacteria and their aminoacids accumulation. J. Gen. Appl. Microbiol., 7, 41-51.
14. SAGISAKA, S., y SHIMURA, K. 1961. Studies in lysine biosynthesis. J. Biochem., 49, 392-96.

15. SAMEJIMA, H. T., *et al.* 1961. Negative feedback control caused by threonine and methionine in L-homoserine fermentation. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7, 324-40.
16. SÁNCHEZ-MARROQUÍN, A., y HOPE, P. H. 1953. Agave juice. Composition and chemical studies. *Agr. Food Chem.*, 1, 246-49.
17. STADTMAN, E. A., *et al.* 1961. Feedback inhibition and repression of aspartokinase activity in *E. coli* and *Sacch. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 236, 2033-38.

INSTITUTO DE BIOLOGIA CELULAR (C S I C)
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
SECCION DE BIOQUIMICA DE MEMBRANAS

TOXICIDAD DE LOS IONES METALICOS PARA *ASPERGILLUS NIDULANS* (*)

por

M.^a VICTORIA ELORZA

INTRODUCCION

La toxicidad de los iones metálicos ha sido estudiada en diversos microorganismos. En *Neurospora crassa*, Healy y colaboradores (4) han estudiado desde un punto de vista enzimático la influencia del hierro en la toxicidad del cobalto, níquel y zinc. Estos autores demostraron que la actividad de varias enzimas hierro-dependientes se reducía en presencia de los metales citados y que podía restaurarse suplementando con hierro los cultivos del microorganismo.

Posteriormente, Adiga y colaboradores (1), utilizando cultivos de *Aspergillus niger*, pusieron de manifiesto que la toxicidad del cobalto, níquel y zinc iba acompañada de un desequilibrio en el metabolismo de los hidratos de carbono.

En este trabajo se describe el aislamiento y la caracterización de mutantes de *Aspergillus nidulans* que presentan resistencia a la toxicidad de los iones metálicos, así como las diferentes interacciones que se han encontrado entre estos iones en cuanto a la toxicidad se refiere.

(*) Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Cambridge (Inglaterra).

MATERIALES Y METODOS

Las técnicas y los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* han sido las descritas por Pontecorvo y colaboradores (7).

ORGANISMOS

Los mutantes se han inducido en la raza bi_1 ; w_4 ; $paba_{22}$; obtenida del cruce entre bi_1 ; w_4 ; fr_1 ; $pyro_4$; $paba_{22}$; procedentes del Departamento de Genética de la Universidad de Glasgow.

AISLAMIENTO DE MUTANTES

La producción de mutantes se ha realizado en placas conteniendo medio mínimo compuesto de: sales (KCl, 26 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 26 g; KH_2PO_4 , 76 g/l), glucosa al 1 %, urea 0,05 M y agar al 2 %. Este medio se esterilizaba en el autoclave y se enfriaba a 45 °C, repartiéndose en tubos, a razón de 20 ml en cada uno. A continuación se añadían los requerimientos necesarios para el crecimiento de la raza tipo biotina y ácido p-amino benzoico, así como las diferentes soluciones de metales, todos ellos en forma de cloruros. Se mezclaban bien estas soluciones con el medio y se vertían en placas, que una vez solidificadas y secas se inoculaban en 16 puntos con conidios de la raza tipo.

La concentración del metal utilizada era aquella capaz de producir inhibición de crecimiento, de tal modo que a los cinco días de incubación a 37 °C, en el lugar de la colonia inhibida se producían sectores resistentes. A partir de estos sectores se tomaban conidios que se aislaban y purificaban en medio mínimo, siendo después comprobada su resistencia en medio mínimo adicionado de la cantidad tóxica de metal para la raza tipo.

ANALISIS GENETICO

Las pruebas de alelismo se han realizado efectuando cruces entre los mutantes aislados, siguiendo las técnicas de Pontecorvo (7).

Los conidios de las razas que se iban a cruzar se inoculaban en frascos conteniendo 20 ml de medio mínimo adicionado de 10 % de medio completo formado de: glucosa, 10 g; peptona, 2 g; hidrolizado de caseína, 1,5 g; ácido nucleico de levaduras, 1 g; extracto de malta, 10 ml; NaNO_3 , 6 g/l de medio y las sales que contiene el medio mínimo. Después de veinticuatro horas de incubación a 37 °C, el micelio que había crecido en la superficie se pasaba a una placa con 40 ml de medio mínimo y después de otras veinticuatro horas a 37 °C se cerraba la placa herméticamente con papel adhesivo.

A partir del décimo día de incubación a 37 °C se buscaban los peritecios y se separaban de las células de Hülle, rodándolos en la superficie de placas con agar al 2 %; cada peritecio se pasaba a tubos conteniendo 5 ml de agua estéril, donde se rompía y agitaba para dar salida a las ascosporas. El análisis de las ascosporas se ha realizado en placas conteniendo medio mínimo con los suplementos necesarios y el metal que va a ser probado.

La localización de las mutaciones en los diferentes grupos de ligamiento (cromosomas) se ha realizado mediante la obtención de diploides y subsiguiente haploidización. La formación de heterocariones diploides se realizó entre los mutantes resistentes a los metales y la raza multimarcada MSF que contiene marcadores genéticos en cada uno de los 8 cromosomas de *Aspergillus nidulans* (5). La haploidización se realizó siguiendo el método descrito por Lhoas (6) por medio de la p-fluorofenilalanina. Los segregantes haploides se purificaban y se inoculaban en placas que se replicaban sobre el medio apropiado.

Dado que en la haploidización resulta una segregación mitótica sin entrecruzamiento, el gen a localizar se ha de encontrar ligado al marcador de la raza MSF que esté en el mismo cromosoma.

RESULTADOS

Después de realizar los experimentos en las condiciones descritas, las concentraciones tóxicas de cationes que se obtuvieron, son las que se expresan en el *cuadro 1*.

Cuadro 1. Concentración mínima tóxica del metal ensayado

Metal	Concentración
CaCl ₂	1,2M
SrCl ₂	1,2M
MgCl ₂	1,2M
BaCl ₂	5,10 ⁻¹ M
CoCl ₂	0,10 ⁻² M
MnCl ₂	4,10 ⁻² M
SnCl ₂	6,10 ⁻³ M
FeCl ₃	4,10 ⁻³ M
ZnCl ₂	2,10 ⁻³ M
CuCl ₂	5,10 ⁻⁴ M
HgCl ₂	4,10 ⁻⁴ M
NiCl ₂	5,10 ⁻⁴ M

Utilizando las concentraciones indicadas en el *cuadro 1*, con las cuales se inhibe el crecimiento de la raza tipo bi₁; w₄; paba₂₂; se han aislado mutantes resistentes a la toxicidad de los iones Co⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Zn⁺⁺, Sn⁺⁺, Ba⁺⁺ y Ni⁺⁺. Respecto al resto de los cationes mencionados en dicho cuadro, bien porque no eran lo suficientemente tóxicos o porque no eran solubles, no fue posible el aislamiento de mutantes resistentes.

Entre los mutantes aislados por la resistencia a la toxicidad del Zn⁺⁺ hubo algunos que eran también resistentes al Co⁺⁺ y Ba⁺⁺. Recíprocamente, ciertos mutantes aislados como resistentes a la toxicidad de estos últimos metales presentaban también resistencia al Zn⁺⁺.

Este fenómeno de resistencia se ha encontrado también en los mutantes resistentes al Sn⁺⁺ y al Fe⁺⁺⁺.

Al hacer cruces entre una raza sensible y cada uno de los mutantes metal-resistentes, se encuentra una segregación 1 : 1, con lo que se demuestra que es un solo gen el que, en cada caso, origina la resistencia.

Para diferenciar unos mutantes de otros dentro de los grupos de resistencia cruzada y evitar la posibilidad de alelismo, se han realizado cruces entre los mutantes: ZnR × CoR; CoR × BaR; ZnR × BaR y

FeR × SnR. El símbolo del catión indica el metal que contenía el medio en el que se aisló el mutante. En todos estos cruces se encontraron recombinantes de la raza tipo, es decir, sensibles, de donde se deduce que se trata de diferentes mutaciones.

En el *cuadro 2* se exponen las características de los mutantes aislados junto con los resultados de la haploidización, por la que se asignó cada mutación al grupo de ligamiento en que se encuentra situado.

Cuadro 2

Mutante	Resistente a la toxicidad de	Grupo de ligamiento
bi; w ₄ ; paba ₂₂ ; ZnR ₁	Zn ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Ba ⁺⁺	VIII
bi; w ₄ ; paba ₂₂ ; ZnR ₅	Zn ⁺⁺	VI
bi; w ₄ ; paba ₂₂ ; CoR ₂	Zn ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Ba ⁺⁺	VIII
bi; w ₄ ; paba ₂₂ ; CoR ₄	Co ⁺⁺	no localizado
bi; w ₄ ; paba ₂₂ ; NiR	Ni ⁺⁺	II
bi; w ₄ ; paba ₂₂ ; FeR	Fe ⁺⁺⁺ , Sn ⁺⁺	VI
bi; w ₄ ; paba ₂₂ ; MnR	Mn ⁺⁺	VIII
bi; w ₄ ; paba ₂₂ ; SnR	Sn ⁺⁺	VI

La resistencia cruzada encontrada en algunos mutantes para varios metales llevó a pensar que dichos metales eran transportados por una vía o portador común que estaría bloqueado o faltaría en estos mutantes, siendo su resistencia debida a esta falta de transporte al interior de la célula. Casos semejantes han sido descritos en otros sistemas. Por ejemplo, los mutantes de transporte para el sulfato no son capaces de incorporar otros aniones como molibdato o seleniato (2).

No obstante, una evidencia genética posterior nos hizo abandonar esta hipótesis. En pruebas de resistencia a los metales, utilizando los distintos diploides obtenidos de la raza metal-resistente y la raza MSF no aparecía la recesividad característica de las mutaciones de transporte.

Por otra parte, se ha observado que la ausencia de metales en el medio de cultivo producía una inhibición de crecimiento que desaparecía añadiendo trazas de hierro o zinc. Este fenómeno se producía tanto en la raza tipo como en los mutantes aislados, por lo que se pudo estable-

cer que no eran mutantes de transporte, ya que eran capaces de transportar el metal, aun encontrándose en pequeñísima concentración en el medio.

Descartado el hecho de que los mutantes aislados fueran de transporte, sólo quedaba la posibilidad de clasificarlos como mutantes en los que la resistencia es ocasionada por una desintoxicación intracelular de los metales.

Estudiada la toxicidad de los metales, presentaba interés conocer por medio de qué procesos se podía conseguir la reversión de la toxicidad.

Para ver si existía competición en el transporte se realizaron numerosos experimentos en los que se utilizaron placas conteniendo la concentración de un metal y un décimo un quinto o un medio de la concentración tóxica de otro. El resultado más significativo fue el de la desintoxicación de todos los metales ensayados anteriormente por los iones K^+ , NH_4^+ , Mg^{++} y Ca^{++} en concentraciones que oscilaban entre 0,05 M y 0,1 M.

En levaduras se ha descrito (3) un portador de cationes inorgánicos al que se ha llamado "portador fisiológico del K", por ser este catión el que presenta mayor afinidad. Este portador es capaz de transportar al interior de la célula K, Rb, Cs, Li, Ca y Mg. El hecho de que en *Aspergillus nidulans* la toxicidad de los metales desaparezca en presencia de K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} y NH_4^+ , solamente puede ser explicado sobre la base de una competencia en el transporte de esos cationes al interior de la célula. Se ha observado que entre los cationes desintoxicantes, es el K^+ el que actúa con mayor eficacia. Todos estos hechos conducen a postular la existencia de un portador general para todos los metales en *A. nidulans*.

Agradezco al Dr. Cove y Dr. Arst el apoyo y discusión en este trabajo y a la "Ramsay Memorial Fellowship Trust" la ayuda económica recibida.

RESUMEN

Se ha estudiado la toxicidad de los iones metálicos para *Aspergillus nidulans*. Se han aislado mutantes de este organismo que son resistentes a la toxicidad de los cationes Zn^{++} , Co^{++} , Ba^{++} , Ni^{++} , Fe^{+++} , Sn^{++} y Mn^{++} . La desintoxicación de los metales en estos mutantes no es debida a un transporte defectivo, sino que se efectúa a nivel intracelular.

En el análisis genético se ha asignado cada mutación al grupo de ligamiento que corresponde.

La toxicidad de los cationes mencionados se revierte en la raza tipo con concentraciones definidas de K^+ , NH_4^+ , Mg^{++} y Ca^{++} lo que sugiere una competencia en el transporte de estos cationes al interior de la célula.

SUMMARY

Metal toxicity has been studied in *Aspergillus nidulans*. Several mutants have been isolated which are able to grow on toxic concentrations of Zn^{++} , Co^{++} , Ba^{++} , Ni^{++} , Fe^{+++} , Sn^{++} and Mn^{++} . The resistance of these mutants to the metals is due to an intracellular detoxification rather than a defective transport.

Genetics analyses have been carried out and each mutation is due to a single gene and has been located in its corresponding linkage group.

Toxicities of Zn, Co, Ba, Ni, Fe, Sn and Mn are reverted in the wild type of *Aspergillus nidulans* by definite amounts of K^+ , NH_4^{++} , Mg^{++} and Ca^{++} . These competitions between pairs of cations suggest a general system responsible for the transport of cations in this microorganism.

BIBLIOGRAFIA

1. ADIGA, P. R.; SIVARAMA, S. K.; VENKATASUBRAMANYAM, V., y SARMA, P. S. 1961. *Biochem. J.*, 81, 545.
2. ARST, H. 1967. Tesis Doctoral. Universidad de Cambridge.
3. CONWAY, E. J., y GAFFEY, H. M. 1966. *Biochem. J.*, 101, 385.
4. HEALY, W. B.; CHENG, S., y MC ELROY, W. D. 1955. *Arch. Biochem. Biophys.*, 54, 206.
5. KAUFER, E. 1958. *Advan. Genet.*, 9, 105.
6. LHOAS, P. 1961. *Nature*, 190, 744.
7. PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MAC DONALD, D. K., y BUFTON, W. J. 1953. *Advan. Genet.*, 5, 141.

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. PAMPLONA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

IMMUNOLOGY OF *BACILLUS CEREUS* BETA - LACTAMASES

by

J. M. ARCOS and A. CHORDI

INTRODUCTION

The formation of rabbit neutralizing antibodies against *Bacillus cereus* penicillinases is already known (4, 9 and 15). Corresponding antisera always neutralize, at least partially, enzymatic activity of other microorganisms (2 and 14), whilst blocking antisera evoked by injection of penicillinase-producing *B. cereus* NRRL 569/H intact cells is almost totally absorbed by these, to a lesser degree by induced *B. cereus* NRRL 569 cells, and not at all by these when not induced (4). On the other hand, the identity of purified basal, induced and constitutive penicillinases is confirmed (7-8 and 13).

Yet more within each induced or constitutive culture, the existence of two different immunological states is universally admitted in agreement with cellular localization of penicillinase (2-3, 9, 11 and 15).

In a previous work we have applied microbiological and chemical techniques in the study of penicillinases electrophoretically different proceeding from constitutive and inducible *Bacillus cereus* strains (1).

The present study was undertaken to ascertain whether the heterogeneity found in exopenicillinases as well as in cell-bound enzymes, is immunological beside electrophoretical, as a first step towards their physico-chemical characterization.

MATERIAL AND METHODS

Crude penicillinase preparations

Bacillus cereus NRRL 569 (NCTC 7464) and NRRL 569/H (NCTC 9945) (*) were cultured according to methods described by Pollock (10) for high titer penicillinase production. A list of crude penicillinase preparations tested in this work is given in *table 1*. The procedure of obtaining each one has already been described (1). The constitutive strain NRRL 569/H and inducible one NRRL 569 were both cultured in presence and absence of sodium benzylpenicillin.

Table 1. Origin of crude preparations referred to in the text

Culture	<i>Bacillus cereus</i> strain	Penicillin in the medium (*)	Cell-free supernatant fluid	Cellular extract
Constitutive	NRRL 569/H	No	S/H	C/H
Induced	NRRL 569	Yes	S/I	C/I
Forced-constitutive	NRRL 569/H	Yes	S/F	C/F
Basal	NRRL 569	No	S/B	C/B

(*) All the other culture conditions were identical always.

The name forced-constitutive penicillinase has been given to the enzyme produced when the constitutive strain is cultured in the presence of the antibiotic.

Antisera

Male rabbits of 3 kg body weight were inoculated subcutaneously with crude penicillinase preparations, as it is shown in *table 2*.

The constitutive cell-free supernatant fluid (S/H) was concentrated 15 times and mixed with equal quantities of Freund's incomplete adjuvant. The corresponding acetone-dried cell-extract (17) was added in a proportion of 2 g of C/H to each 25 ml of concentrated S/H. After

(*) These strains were kindly supplied by the National Collection of Type Cultures, Colindale Avenue, London N. W. 9.

homogenization in Freund's incomplete adjuvant, it constituted the constitutive total culture antigen (S/H + C/H). Similarly induced culture antigen (S/I + C/I) was obtained from induced culture of *Bacillus cereus* NRRL 569.

During 4 weeks, 1 ml of antigen mixture was administered subcutaneously to each rabbit, thrice a week. After resting 15 days 2 ml were similarly injected as far as a high antibody titer was obtained as controlled by agar gel immunodiffusion techniques.

Chosen antisera (I-141, I-144 and I-146) were used in posterior immunoelectrophoretic studies (table 2). The agar gel microimmunoelectrophoresis was performed according to a slightly modified (5) Scheidegger method (16).

Table 2. Antigens injected to rabbits and antisera obtained

Crude preparations	Protein nitrogen in mg	Exocellular penicillinase UP (*)	Cell-bound penicillinase UP (*)	Antisera obtained
S/H	24	1,782,000		I-140
S/H	18	1,365,500		I-141 (**)
S/H	24	1,782,000		I-145
S/H + C/H	26	891,000	9,000	I-143
S/H + C/H	26	891,000	9,000	I-144 (**)
S/H + C/H	26	891,000	9,000	I-149
S/I + C/I	40	540,000	5,400	I-146 (**)
S/I + C/I	40	540,000	5,400	I-147
S/I + C/I	40	540,000	5,400	I-148

(*) Unit as described by Pollock and Torriani (12).

(**) Chosen antisera for immunoelectrophoretic analysis.

Combined chemical revelation and immunoelectrophoresis

To identify the precipitation bands corresponding to penicillinases a technique was used which combines the chemical and immunological revelation of electrophoretogram. After normal 16 hours immunodiffusion

the agar layer was covered with agar medium containing penicillin and bromocresol purple in adequate amounts (1). The presence of penicillinase-positive zones is indicated by the change of purple to yellow, while the corresponding immunoprecipitation bands limit and encircle these spots.

Repetition of electrophoretic test

Small agar plugs were removed from different electrophoretogram points, and submitted to a second electrophoresis after refilling new antigen wells. On this new electrophoretogram combined immunological and chemical revelations were repeated, as have already been described.

RESULTS

Immuno-electrophoretic analysis of crude preparations

Absolute and relative electrophoretic mobilities as well as presence of precipitation bands in each enzymic preparations are given in *table 3*. In all 40 bands were observed which were differentiated mainly by their electrophoretic mobility or by their form and position when the first was identical.

When S/H reacted directly against antisera I-141, I-144 and I-146, twelve precipitation bands were obtained. However, its antigenic complexity is much more high as shown by the fact that its specific antiserum I-141 developed 28 different bands against other heterologous preparations. Therefore there are at least 16 antigens in S/H in sufficient quantities to evoke antibody formation and its absorption but not enough to form visible immunoprecipitation band.

The total constitutive culture (S/H + C/H) revealed 26 "major" antigens (though only 22 of these were homologous) and a total of 31 which means that 5 are heterologous "minor" antigens. The total induced culture (S/I + C/I) directly revealed 21 homologous "major" antigens and 9 heterologous "major" antigens and indirectly shows to possess two more heterologous "minor" antigens. Only one band (electrophoretic mobility 80 %) belonging to induced culture (S/I + C/I) was not present in constitutive one (S/H + C/H).

Table 3. Total precipitation bands obtained by immunoelectrophoretic analysis of crude preparations against the three chosen antisera

Electrophoretic mobility		Crude preparations							
Absolute 10^{-5} cm^2 $\text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Relative (*)	S/H	S/I	S/F	S/B	C/H	C/I	C/F	C/B
— 2.6	— 31	2	2				2		
— 1.5	— 18		2		1	1			
0	0	2	2	2		2	2		
0.7	8		2			2	2	1	2
1.2	15		1			1			
1.9	23	1	1		1	1			
2.4	29		2				1	2	
3.2	38	1	1			1		1	
3.9	47		3	4	2	3	3	4	2
4.3	52	2	2	2	2	2	2	2	2
4.5	58							1	
5.6	67	1	1			1			
6.2	74							1	1
6.5	78			1				1	
6.7	80		1				1		1
7.5	90			1					
8.0	96	1	1			1	1	1	
8.7	105			1		3	1	2	1
9.7	116		2	2				1	2
9.8	118							1	
10.2	123			1		2	2	2	2
11.2	134					2	2	2	2
12.0	143	1	1	1		1	1	1	1
12.5	150							2	
12.7	153	1				1	1	1	1

(*) This mobility is given as percentage relative to that of human albumin. The numbers are used for characterization of each precipitation arc.

The total number of antigens found in the forced-constitutive culture were similar to that of the normal one, though their electrophoretic mobilities varied considerably. As their number increased in the cathodic zone it decreased in the anodic one. On the other hand, non-induced NRRL 569 strain presented a significant lessening of the number of antigens capable of reacting with heterologous antisera.

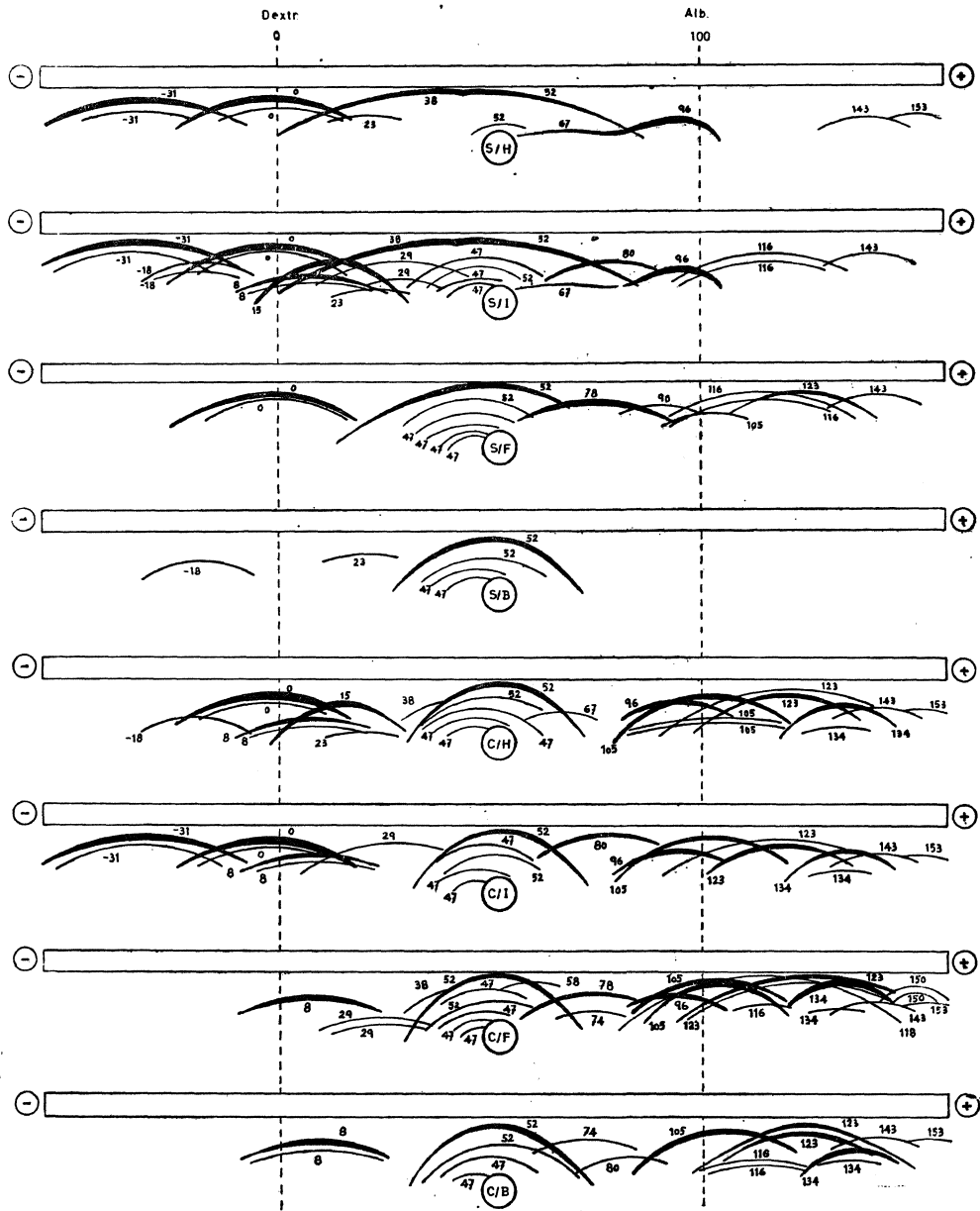


Figure 1. Immunoelectrophoretic patterns of the eight crude preparations from *Bacillus cereus* cultures. S/H, S/I, S/F, S/B, C/H, C/I, C/F and C/B, as explained in table 1. Numbers show electrophoretic mobility as percentage relative to that of human albumin

Determination of penicillinase immunoprecipitation bands

Combining chemical revelation with immunoelectrophoresis it was possible to distinguish the immunoprecipitation lines corresponding to penicillinase-positive electrophoretic zones which have been previously detected, that is P-38, P-52, P-67, P-78, P-80, P-96 and P-143 (1).

Figure 1 shows antigenic complexity of each of the 8 enzymatic preparations separately and figure 2 represents graphically the results obtained from the three revealing systems performed on electrophoretogram of S/H, that is microbiological (inverse bioautography), chemical and immunological system.

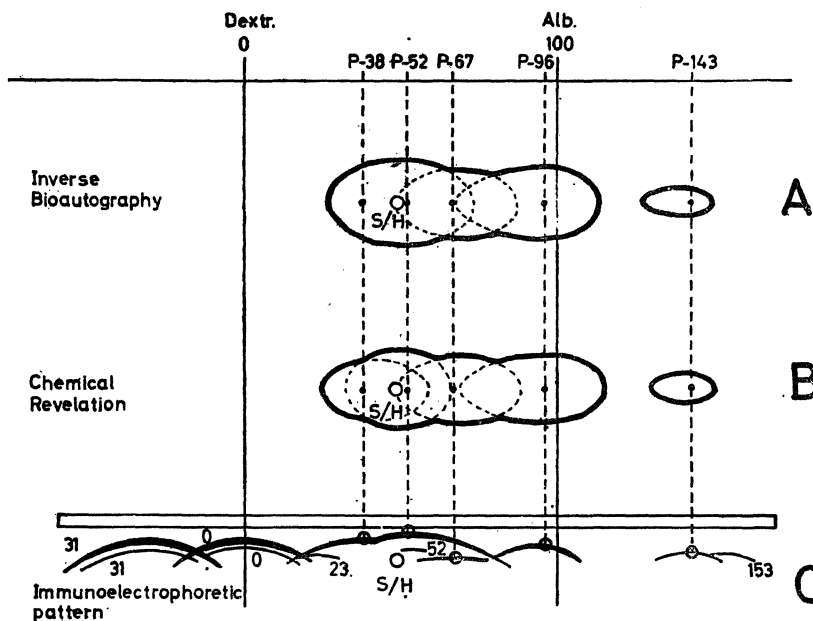


Figure 2. Reverse bioautography (A), chemical revelation (B) and immunoelectrophoretic analysis (C) of supernatant cell-free fluid of normal culture of constitutive strain *B. cereus* NRRL 569/H (S/H). Small white circles indicate initial well position. The dashed lines bound penicillinase-positive electrophoretic zones whilst corresponding precipitation bands are marked

The penicillinase P-38 (table 4) was found in both fractions of normal constitutive culture (S/H and C/H), and in the induced culture supernatant

Table 4. Electrophoretic zones and precipitation bands identified as penicillinases in each crude *Bacillus cereus* NRRL 569 and 569/H preparation

Crude penicillinase preparations	P-38	P-52	P-67	P-78	P-80	P-96	P-143
S/H	+	+	+			+	+
C/H	+	+	+			+	(*)
S/I	+	+	+		+	+	+
C/I		+			+	+	(*)
S/F		+		+			+
C/F	(*)	+		+		+	(*)
S/B		(*)					
C/B		(*)					(*)

(*) The existence of penicillinase-active electrophoretic zone was not demonstrated though the precipitation band with the corresponding mobility was eliminated when antisera were absorbed by S/H.

fluid (S/I). In the cellular extract of the forced-constitutive culture (C/F) one precipitation band was visible having the same shape and mobility. Nevertheless the corresponding penicillinase-positive zone could not be revealed neither microbiologically nor chemically. For this reason it cannot be confirmed that this precipitation line was P-38 in spite of the fact that it disappeared when antisera I-144 and I-146 were absorbed with S/H.

The penicillinase P-52 (*table 4*) appeared in the 8 preparations tested although its presence as an active enzyme could not be demonstrated in the basal culture. It was always linked to P-38 with which it showed partial immunological identity.

The penicillinase P-67 (*table 4*) was clearly manifest in S/H, C/H and S/I. It showed immunological community with P-26.

The penicillinase P-78 (*table 4*) only appeared in forced-constitutive culture against the three chosen antisera. Its corresponding antibody was absorbed by S/H of any of these antisera.

The penicillinase P-80 (*table 4*) only appeared in the induced culture when S/I and C/I were matched with their homologous antiserum I-146 and did not disappear when these were absorbed with S/H.

The penicillinase P-96 (*table 4*) was present in normal constitutive and induced cultures but only in the cellular extract C/F of forced-constitutive culture. It showed total immunological identity with P-67 and both were immunologically different from P-32 and P-52.

Lastly, the penicillinase P-143 (*table 4*) was present in S/H, S/I and S/F and possibly too in the four cellular extracts, despite the impossibility to detect it neither chemically nor microbiologically.

DISCUSSION

The antigenicity of *Bacillus cereus* penicillinase is beyond doubt as is shown by various authors (4 and 8). We have also obtained antisera from rabbit after prolonged inoculation with both cellular extracts and cell-free preparations. Ouchterlony's simple immunodiffusion testifies that sera diluted 23 times still manifest precipitation bands by this procedure.

The antigenic analysis of the constitutive strain *Bacillus cereus* NRRL 569/H shows great complexity both in cells and supernatant cell-free fluid of the corresponding culture. When this strain was cultivated in presence of sodium benzyl-penicillin, the alteration produced in the electrophoretic distribution of its antigenic components was very significant, though the immunological character of these does not vary, as is shown by crossed absorptions.

The effect produced by the presence of sodium penicillin G in the culture medium on NRRL 569 inducible strain was also very important. The concentration of penicillinase reached in the absence of the inductor was practically nil. Only traces of this enzyme could be detected by microbiological procedures. On the other hand, a marked loss of common antigens was found in non-induced NRRL 569 in respect to the same induced strain coinciding with the protein loss found by Kogut et al. (7), when trying to isolate the penicillinase fraction from the non-induced NRRL 569 culture (7).

When the inducible NRRL 569 strain is effectively induced its antigenic analysis shows great similarity with the constitutive NRRL 569/H the only difference being one precipitation band and its corresponding penicillinase. It appears, therefore, that the induction of NRRL 569 strain activates "constitutive" system of penicillinase production beside another production system of penicillinases is started which originates a truly indu-

ced penicillinase. This induced penicillinase (P-80) is immunologically distinct from constitutive ones as is shown by failed crossed absorption. This fact could explain the partial crossed immunoneutralization between constitutive and induced penicillinases and their corresponding antisera which is described by Pollock (8), Kogut et al. (7) and Citri et al. (4).

Contrary to other workers (2-3, 9, 11 and 15) we have not found any immunological differences between exocellular and cell-bound penicillinases since all last ones have also been detected outside the cells. Nevertheless some exocellular ones have not been seen, in the cell extracts. According to these findings, all the cell-bound penicillinases are at the same time exopenicillinases. Only the forced-constitutive cell extracts, C/F, possess two (P-38 and P-96) which are not found in respective supernatant fluid S/F (table 4).

On the contrary, among the different constitutive as well as induced exopenicillinases clear immunological differences appear as is shown by the complete crossing of their precipitation bands. This phenomenon is not produced in all the detected penicillinases but only among the family P-31, P-32 on one hand and the family P-67, P-96 on the other.

According to our results the penicillin also alter in some manner the penicillinases of cells which spontaneously produce it, though the quantity produced, in agreement with Day et al. (6) and Yip et al. (17) is very similar, whether the penicillin is present or not in culture medium. The immunoelectrophoretogram shows deep changes in the electrophoretic distribution of these enzymes.

The forced-constitutive penicillinase (P-78) is immunologically differentiated from the induced (P-80), by the capacity of that to produce a precipitation band against the I-141 antiserum while P-80 cannot. Similarly the P-78 band disappears by absorbing heterologous I-146 antiserum with S/H while P-80 does not. This demonstrates that P-78 constitutes a penicillinase immunologically similar to one or more of the induced and constitutive ones but excluding P-80.

SUMMARY

Beta-lactamases of *Bacillus cereus* NRRL 569 and NRRL 569/H produce precipitating antibodies when inoculated subcutaneously to rabbits. The immunoelectrophoretic analysis of crude preparations of both

strains against homologous and heterologous antisera show immunoprecipitation bands of penicillinase-antipenicillinase complexes which could be characterized by the use of appropriate revealing techniques. Immunological relationships are described between exocellular and cell-bound beta-lactamases of normal and penicillin-treated cultures of both constitutive and inducible strains of *B. cereus*. Only one induced penicillinase was antigenically different to all constitutive penicillinases which show in turn two distinct immunological families at least.

RESUMEN

Una cepa constitutiva de *Bacillus cereus* (NRRL 569/H) y otra inducible (NRRL 569) en lo que se refiere a su producción de β -lactamasas de la penicilina, han sido cultivadas en presencia y en ausencia de bencilpenicilina sódica. En cada caso, las células fueron estudiadas por separado de los caldos finales desprovistos de ellas por centrifugación, con lo que se obtuvieron 8 preparados diferentes, que se enfrentaron contra inmunoseros homólogos y heterólogos de conejos, por técnicas clásicas de microinmuno-electroforesis.

El análisis antigénico demostró la presencia de gran número de antígenos, tanto en los sobrenadantes como en los extractos celulares. Cuando fueron cultivadas, en ausencia del inductor, la cepa constitutiva (cultivo constitutivo), y en su presencia, la cepa inducible (cultivo inducido), las diferencias antigénicas entre ambas se redujeron a una sola banda de inmunoprecipitación, siendo las 31 restantes comunes. En condiciones no idóneas, es decir, cuando la cepa constitutiva se cultiva en presencia de penicilina (cultivo forzado) y la cepa inducible no se induce (cultivo basal), se producen fuertes variaciones en la distribución del inmuno-electroforeto-grama, en el primer caso, y se pierden gran cantidad de antígenos comunes, en el segundo caso. Se dan las movilidades electroforéticas absolutas y relativas a la albúmina humana correspondientes a cada antígeno detectado, así como su presencia o no en cada uno de los 8 diferentes preparados sometidos a análisis.

Mediante la combinación de la inmuno-electroforesis y el revelado químico sobre la misma placa, se consiguió determinar que los arcos de precipitación cuyas movilidades electroforéticas relativas a la albúmina huma-

na normal expresadas en tanto por ciento eran 143, 96, 80, 78, 67, 52 y 38, correspondían a las β -lactamasas P-143, P-96, P-80, P-78, P-67, P-52 y P-38, respectivamente.

No pudieron hallarse diferencias antigénicas entre las exopenicilinasas y las que se extraen de las células desintegradas, aunque la familia P-96, P-97 demostró ser inmunológicamente distinta de la familia P-52, P-38, independientemente de su localización extra o endocelular. La nueva penicilinasas formada durante la inducción de la cepa inducible (P-80) fue específica de este cultivo inducido y no reaccionó nunca con inmunoseros heterólogos. Sin embargo, la penicilinasas P-78 detectada solamente en el cultivo forzado de la cepa constitutiva fue inmunológicamente idéntica a alguna de las normales, aunque su posición en el electroforetograma no correspondiera a ninguna de éstas.

El cultivo constitutivo presentó un total de 5 exopenicilinasas (P-143, P-96, P-67, P-52 y P-28); todas ellas, excepto quizá P-143, estuvieron también en el extracto celular. La naturaleza de penicilinasas de la banda de precipitación 143 % no pudo ser demostrada en ningún extracto celular, a pesar de que apareció en los correspondientes a los cuatro cultivos.

El cultivo inducido presentó todas las penicilinasas exocelulares constitutivas citadas más P-80, que tampoco faltó en el extracto celular, donde no se detectaron P-38 y P-67. El cultivo constitutivo forzado mostró en el sobrenadante P-52, P-78 y P-143, mientras las células proporcionaron P-52, P-78 y P-96 de forma segura y sólo las bandas de precipitación que podrían corresponder a P-38 y P-143. Por último, el cultivo basal sólo contenía trazas de penicilinasas y fue imposible determinar si la banda del 52 % de movilidad que presentaban el sobrenadante y el extracto celular correspondía o no a una penicilinasas P-52 activa.

BIBLIOGRAPHY

1. ARCOS, J. M., et CHORDI, A. 1968. *Ann. Inst. Pasteur*, 115, 1008.
2. CITRI, N. 1958. *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 277.
3. CITRI, N. 1960. *Bull. Res. Council Israel Sect. A*, 28.
4. CITRI, N., and STREJAN, G. 1961. *Nature*, 190, 1010.
5. CHORDI, A.; WALLS, K. W., and KAGAN, I. G. 1964. *J. Immunol.*, 93, 1034.
6. DAY, R. A., and SHAH, R. 1962. *Science*, 138, 1108.

7. KOGUT, M.; POLLOCK, M. R., and TRIDGELL, E. J. 1956. *Biochem. J.*, 62, 391.
8. POLLOCK, M. R. 1956. *J. Gen. Microbiol.*, 14, 90.
9. POLLOCK, M. R. 1956. *J. Gen. Microbiol.*, 15, 154.
10. POLLOCK, M. R. 1957. *J. Pharmacol.*, 9, 609.
11. POLLOCK, M. R., and KRAMER, M. 1958. *Biochem. J.*, 70, 665.
12. POLLOCK, M. R., and TORRIANI, A. M. 1953. *Compt. Rend.*, 237, 276.
13. POLLOCK, M. R.; TORRIANI, A. M., and TRIDGELL, E. J. 1956. *Biochem. J.*, 62, 387.
14. RHODES, H. K.; GOLDNER, M., and WILSON, R. J. 1961. *Can. J. Microbiol.*, 7, 335.
15. RON-ZENZIPER, E., and CITRI, N. 1963. *Nature*, 198, 887.
16. SCHEIDEGGER, J. J. 1965. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7, 103.
17. YIP, L. C.; SHAH, R., and DAY, R. A. 1964. *J. Bacteriol.*, 88, 297.

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. PAMPLONA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

PENICILLINASE DISTRIBUTION IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

by

J. D. MÚGICA, M.^a CRISTINA RUIZ and J. M. ARCOS

INTRODUCTION

The intracellular localization of penicillin β -lactamhydrolases and their relation to ribosomes of *Bacillus cereus* NRRL 569 and 569/H cells have already been demonstrated (5). However the literature does not cite similar studies on *Escherichia coli* cells although exclusive intracellular localization of its penicillin-splitting enzymes is admitted (6) and also in spite of the fact that recently typical subcellular fractions have been separated and obtained by ultracentrifugation (7).

In previous work (1) we have used bioautographic techniques on agar gel electrophoresis to study different penicillinases produced by *Bacillus cereus* strains.

These same techniques are now applied to demonstrate electrophoretic complexity of the penicillin-splitting enzymes produced by one *Escherichia coli* strain and their distribution in the conventional subcellular fractions.

MATERIALS AND METHODS

Crude preparations of microorganism

The human enteropathogen *Escherichia coli* O 127 : K 63 : (B 8) : H-, kindly supplied by Statens Seruminstitut of Copenhagen, was cultured on

nutrient agar for 20 h at 36 °C. The cells were harvested into saline, centrifuged at 2,100 g for 15 min at 4 °C, washed several times, treated with acetone at -20 °C, for 36 h and finally lyophilized.

The dried material obtained was triturated and resuspended in distilled water. After 36 h at 4 °C for the aqueous extraction, it was concentrated to 60 mg/ml dry weight. On the other hand the cells to be subjected to ultracentrifugal fractionation were simply collected in saline and centrifuged at 2,100 g as previously indicated. After washing they were resuspended in distilled water to a concentration of 2×10^{11} cells/ml.

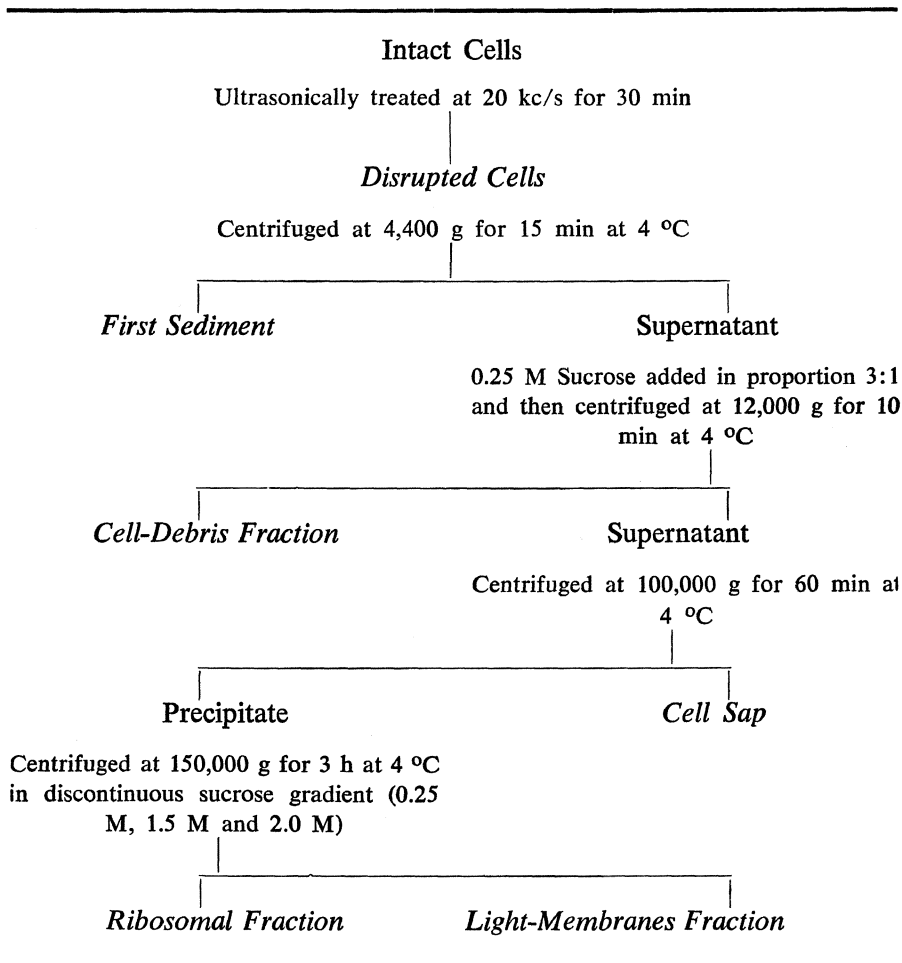
The enzymic activity of different preparations were measured by microbiological methods (3), taking as a unit the amount of penicillinase which hydrolyzes 1 micromole of benzylpenicillin in 60 min at 30 °C and pH 7.0 (4).

Preparation of subcellular fractions

The technique used is based on that described by Lathi y Saukkonen (7) slightly modified (*schema 1*). Aqueous suspensions of cultures grown on nutrient agar were ultrasonically disrupted by treatment for 30 min at 20 kc/s. A First Sediment (F. S.) was obtained by centrifugation for 15 min at 4,400 g at 4 °C, while the supernatant was diluted with 3 volumes of 0.33 M sucrose solution. Another centrifugation at 12,000 g for 10 min at 4 °C yielded a new sediment (*figure 1*) designated Cell-Debris Fraction (C. D. F.). The supernatant was centrifuged now at 100,000 g for 60 min at 4 °C. The Cell Sap (C. S.) was collected and the sedimented microsomal fraction was immediately resuspended in phosphate buffer pH 7.2 and centrifuged at 150,000 g for 3 h at 4 °C in a discontinuous gradient of sucrose (0.25 M, 1.5 M and 2.0 M). The sediment was the Ribosomal Fraction (R. F.) while the two layers obtained at different levels of the gradient were combined under the name of Light-Membranes Fraction (L. M. F.). Its constitution, predominantly membranous was controlled by electron microscopy (*figure 1*).

All fractions were then precipitated in great volume of acetone at -20 °C. From the dried sediment obtained a final concentration of 60 mg dry weight/ml was prepared in phosphate buffer pH 7.2.

Schema 1. Fractionation of *Escherichia coli* O 127 : K 63 : (B 8) : H-cells. Names in italic letters point out the assayed material



Preparation of immunosera and immunoelectrophoresis

3 kg male rabbits were inoculated with suspensions of cells at a concentration of 60 mg/ml of dry weight, prepared as described. Two series of 12 injections each were carried out with 15 days separation. In the first series 60 mg dry weight in 1 ml of water plus 1 ml of Freund's incomplete adjuvant, were injected thrice a week. In the second series

the dry weight was raised to 120 mg all other conditions being unchanged. Potent immunosera were obtained which served for the antigenic analysis of different preparations by immunoelectrophoretic methods after Scheidegger (8).

Agar gel electrophoresis and the bioautographic revelation

The technique was the same as that described by us for the penicillinases of *Bacillus cereus* (1).

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P and *Sarcina lutea* ATCC 9341 were used as revealing microorganisms. Penicillin G, penicillin V, 6 amino-penicillanic acid (6-APA) and ampicillin were tested as substrates.

In some cases immunoelectrophoresis and inverse bioautography were carried out simultaneously on the same slide. The latter being done after 16 h of immunodiffusion, when the immunoelectropherogram was already well developed. All conditions were kept as much aseptic as possible, without any substance which might interfere with the microbiological revelation.

RESULTS

Ultrasonically-disrupted cells showed a specific activity of 0.130 UP/mg of protein (table 1) which is not appreciably different from that corresponding to aqueous extract of acetone-dried cells. Similar penicillinase levels were found in both C. D. F. and R. F. On the other hand F. S. possessed practically double the activity (0.232 UP/mg), whilst L. M. F. lacked almost completely this activity. Only 0.066 UP/mg were found in C. S. Bioautoelectropherographic analysis showed heterogeneity of the penicillinase content of acetone dried *Escherichia coli* cells. When 0.5-2,000 UI/ml of sodium benzylpenicillin was the concentration on revelation layer and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P served as microbial revealer four active electrophoretic zones appeared, whose mobilities were -21 %, 11 %, 48 % and 98 % relative to that of normal human serum albumin. These penicillinases were called by us P-(-21), P-11, P-48 and P-98 respectively (2). In ultrasonically-disrupted cell suspensions P-98 was never detected but only the other three, also found in F. S., C. D. F. and R. F. In L. M. F. the presence of only one penicillinase, P-(-21), could be detected perhaps due to lack of sufficient concentration of the rest. C. S. however showed quite

a different bioautoelectropherogram (figure 2). In this preparation no penicillinase previously detected was found but two whose mobilities were -34 % and 3 %, P-(-34) and P-3 respectively, appeared (table 2).

Table 1. Specific activity of penicillinase in ultracentrifugal preparations from *Escherichia coli* O 127 : K 63 : (B 8) : H- cells

	Total penicillinase UP (*)	Dry weight mg	Soluble protein mg	Specific activity UP/mg (Protein)
Cells (**)	25.8	320	198	0.130
F.S.	13	93	56	0.232
C.D.F.	3.8	55	33	0.115
C.S.	6.3	125	96	0.066
R.F.	1.4	22.5	11	0.127
L.M.F.	0.06	18	6	0.010

(*) Penicillinase units as described by Citri and Pollock (4).

(**) The same activity was found in both ultrasonically-disrupted and acetone-dried cells.

Table 2. Distribution of electrophoretically different penicillin-splitting enzymes in ultracentrifugal preparations from *Escherichia coli* O 127 cells, as revealed by inverse bioautographic methods

	P-(-34)	P-(-21)	P-3	P-11	P-48	P-98
Acetone-dried cells		X		X	X	X
Ultrasonically-disrupted cells		X		X	X	
F.S.		X		X	X	
C.D.F.		X		X	X	
C.S.	X		X			
R.F.		X		X	X	
L.M.F.		X				

Table 3. Some properties of electrophoretically-different penicillin-splitting enzymes from *Escherichia coli* cells

	Absolute mobility $\times 10^{-5} \text{cm}^2$ V^{-1} s^{-1}	Relative mobility (*) (%)	Enzymic type	Activity against				Inactivation time at 56 °C (min)
				Penicillin G	Penicillin V	Ampicillin	6-APA	
P-(-34)	-3.1	-34	β -lactamase	X	X	X	X	120
P-(-21)	-1.9	-21	β -lactamase	X	X	X	X	140
P-3	0.3	3	acylase	X	X	—	—	30
P-11	1.0	11	acylase	X	X	—	—	100
P-48	4.4	48	acylase	X	X	—	—	150
P-98	9.0	98	acylase	X	X	—	—	10

(*) This value is given in relation to the mobility of normal human serum albumin.

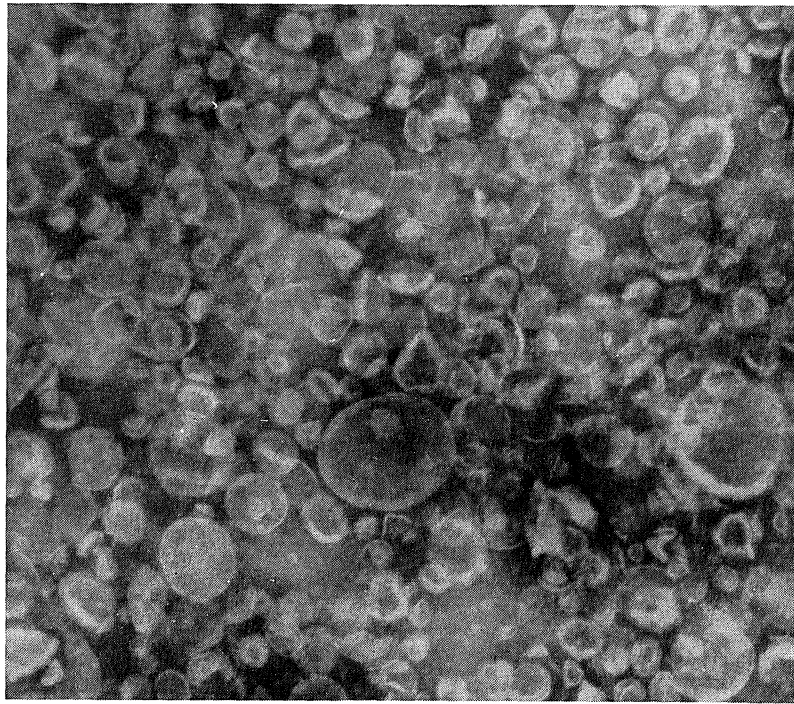
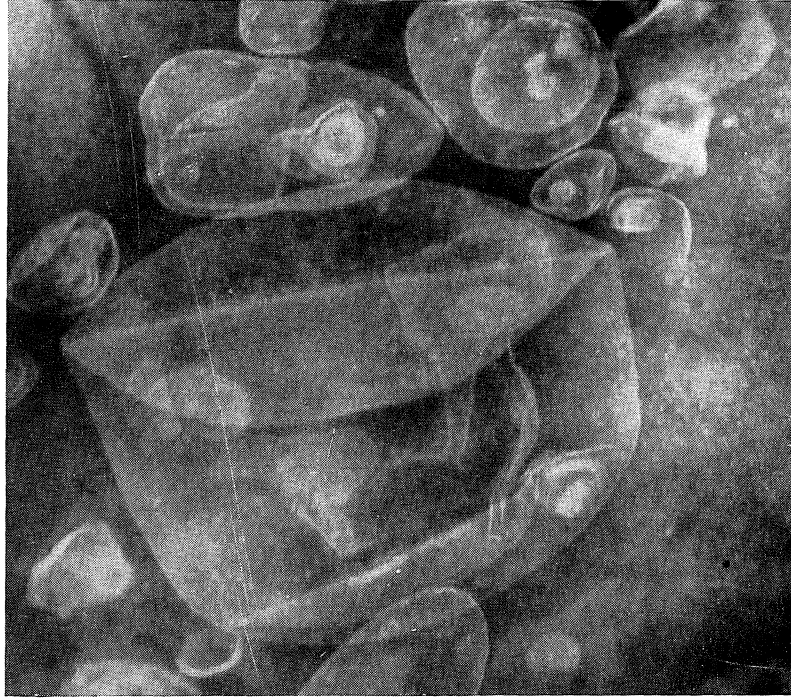


Figure 1. Electron micrographs of Cell-Debris Fraction $\times 72,000$ (top) and of Light-Membranes Fraction $\times 72,000$ (down) of Escherichia coli O 127.

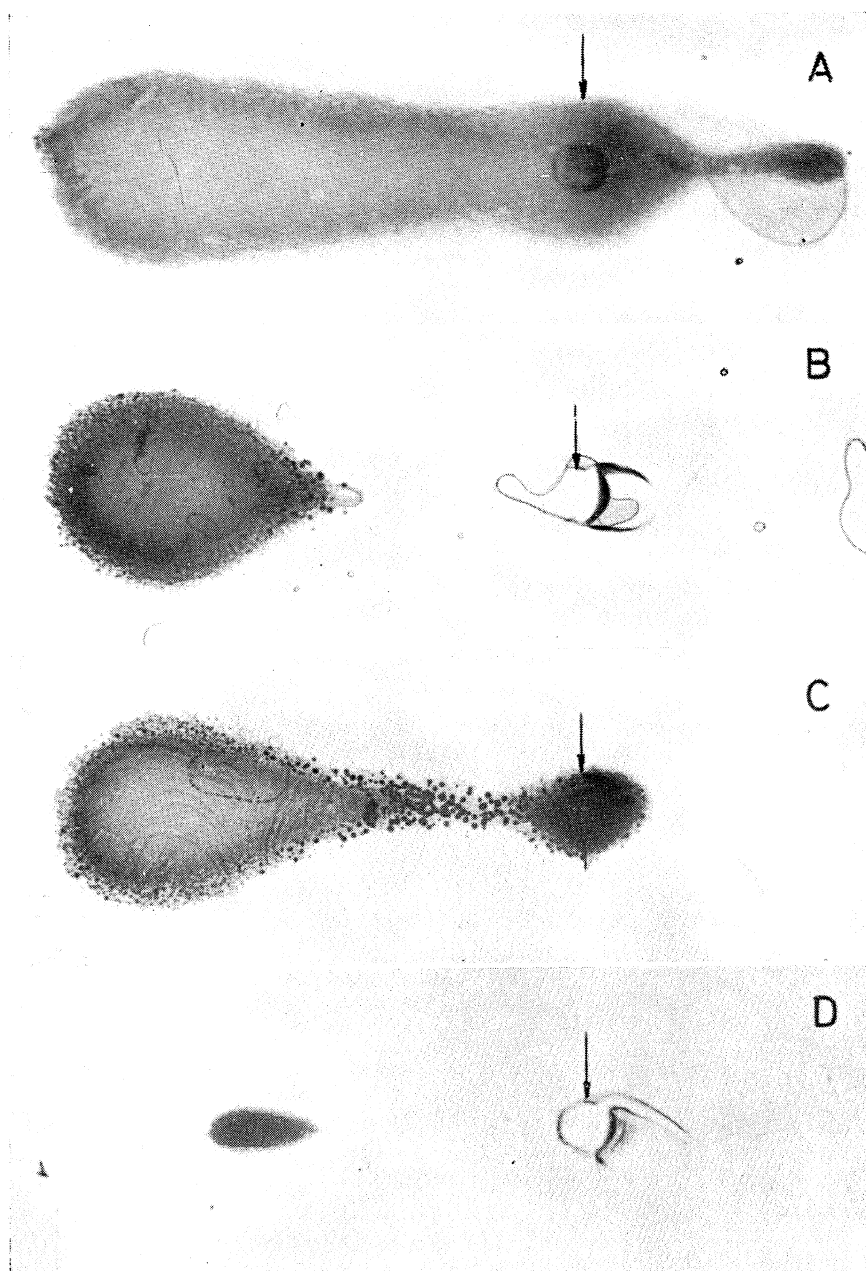


Figure 2. Bioautoelectropherograms of penicillin-splitting enzymes present in *E. coli* O 127. (A) Aqueous extract of acetone-dried cells. (B) Cell Sap. (C) Ribosomal Fraction. (D) Light-Membranes Fraction. Cathode at the left. Arrows indicate initial well positions.

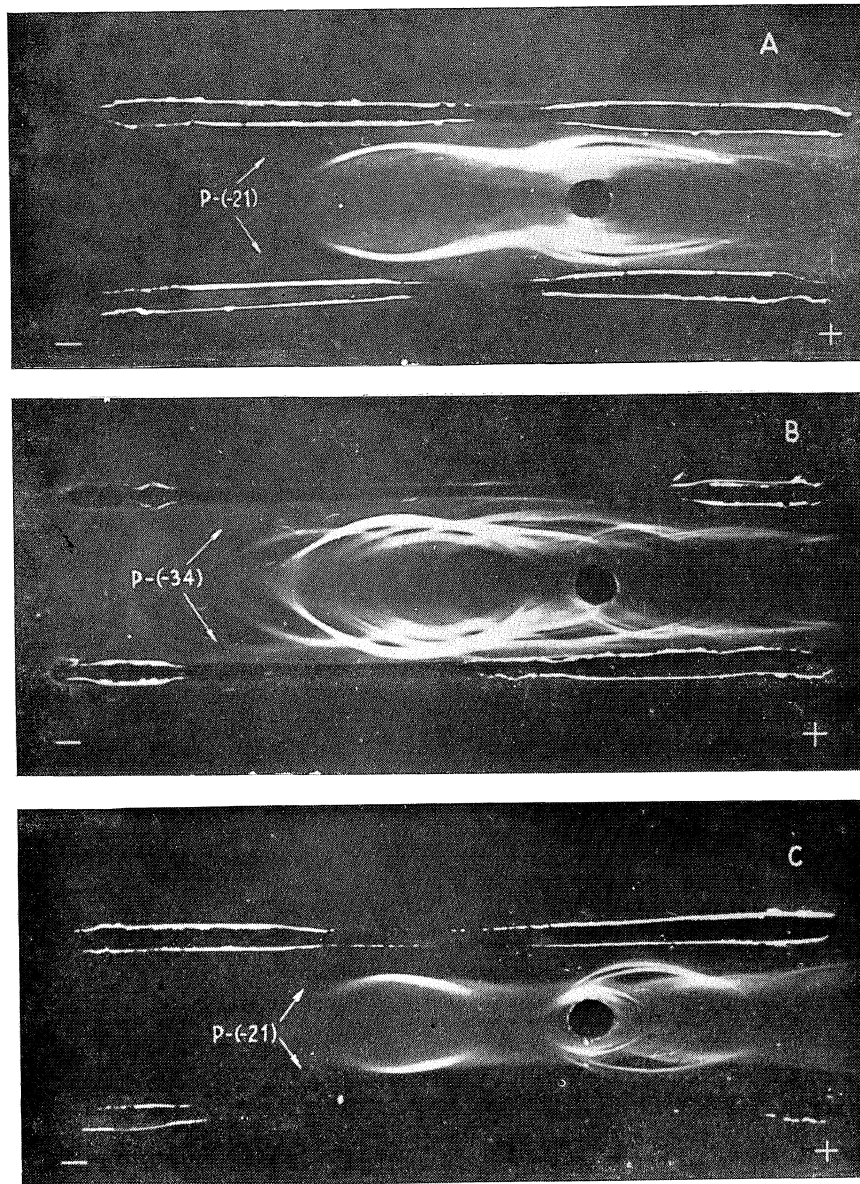


Figure 3. Immunoelectrophoretic patterns of (A) Disrupted cells, (B) Cell Sap and (C) Ribosomal Fraction. In each figure antiserum anti-*E. coli* intact cells was put on the canals on top and down. Cathode at the left. Arrows indicate precipitation bands corresponding to strongly basic β -lactamase.

After substituting sodium benzylpenicillin in the revelation medium by potassium phenoxymethylpenicillin, ampicillin and 6-APA, at different levels, the capacity of each detected penicillinase to inactivate the β -lactamic substances was studied (table 3). Only P-(-21) and P-(-34) were capable of inactivating benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin and ampicillin besides hydrolysing intact β -lactam ring of 6-APA. This last phenomenon was demonstrated by the appearance of the corresponding exhibition zone of *Sarcina lutea* ATCC 9341 in the electropherogram as described earlier (2). The rest of the detected penicillinases showed an activity on 6-aminopenicillanic acid which suggests that they are acylases of benzylpenicillin as indicated in table 3.

In this same table another difference is described among the six penicillin-splitting enzymes which consist in the time they were able to remain in sodium veronal-HCl buffer pH 8.6 and ionic strength 0.035 at 56 °C without being inactivated. The most thermostable enzyme was P-48 requiring 150 min for its inactivation. At this temperature P-(-21) required 140 min, P-(-34) 120 min, P-11 100 min, P-3 30 min and finally P-98 10 min.

Immunoelectrophoretic analysis showed different antigenic composition for each ultracentrifugal fraction. When both immunoelectrophoresis and microbiological revelation were carried out combining on the same slide we were able to determine the precipitation band corresponding to P-(-34) and P-(-21) (figure 3). The lack of superimposed arcs with the same or similar electrophoretic mobility and the limitation of antigen-antibody complex on the free diffusion of these β -lactamases in agar gel were sufficient criteria to reach at such identification. The precipitation bands corresponding to the penicillinacylases could not be identified with certainty among the various which appeared in the same zone of the immunoelectropherogram.

DISCUSSION

The penicillin-splitting activity in *Escherichia coli* crude subcellular fractions has not been studied yet. Our results permit us to deduce that such activity is preferably linked with the surface structures of the cell, according to the theories of cellular topology of β -lactamase in Gram-negative bacteria (4). It is quite impressive the fact that F. S., sediment

obtained at 4,400 g, has 3 to 4 times more penicillinase per unit weight of protein than C. S., which practically lack any structural material.

On the other hand L. M. F. possess a specific activity 23 times inferior to the F. S. This could be explained by considering that such light membranes are not identical with those found in the heavier fractions. However the possibility that such light membranes are finely disintegrated fragments of the primitive cell and cytoplasmic membranes, cannot be eliminated. The disappearance in this case of the penicillinase activity may be due either to ultrasonic denaturation of penicillinase or to its almost total solubilization and separation from these light membranes.

Against any possible enzymatic destruction is the fact that the total amount of penicillinase is practically the same as when cells are acetone-dried without ultrasonic disruption. However in the bioautoelectropherogram of the ultrasonically-disrupted cells, P-98 was never detected and in none of the other fractions obtained from them. The fact that P-98 is destroyed by ultrasonication or only modified or altered by it, is still far from being proved by us.

Strangely enough, not only does C. S. differ from the rest of the preparations in its specific activity but also by electrophoretic pattern of penicillinases. The β -lactamase nature of P-(-34) and P-(-21) suggests the identity between both of them, while the difference in electrophoretic mobility and its greater basicity could be due to free state of the former. At this moment it is impossible to ascertain whether P-3 of C. S. correspond to any others found in whole cells, whilst on the contrary P-48 which is present in the disrupted cells, F. S., C. D. F., and R. F. is absent in C. S. and L. M. F.

The phenomenon already observed by us (2) of the coexistence of β -lactamase and penicillinacylases in *Escherichia coli* O 127 acetone-dried cells, is repeated in subcellular preparations obtained by ultracentrifugal analysis.

On the other hand the resistance to the inactivation at 56 °C is quite different and make it easy to distinguish it from the other penicillin-splitting enzymes detected. In this respect it is worth to note that the thermoresistance of the β -lactamases of *Bacillus cereus* is very lower, besides the absence in this microorganism of basic β -lactamases (1).

The low levels of penicillinases made it impossible to carry out the chemical revelation of the electropherogram. Therefore the identification of immunoprecipitation bands with penicillinase activity could not be carried out in with this technique and we had to resort to the combination of immunoelectrophoresis and inverse bioautography. With this technique only P-(-21) and P-(-34) could be found to be related to their immunoprecipitation bands whose morphology and location suggest greater immunological similarity between these two β -lactamases. Later studies should be carried out in this line to prove the immunological relationship between the free and cell-bound penicillin-splitting enzymes and their immunoneutralization with the antisera.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported in part by Penibérica S. A. (Pamplona, Spain). We are grateful to Dr. J. Vázquez and Dr. G. Ortuño, Department of Pathology, University of Navarra, Spain, for their contribution in electron micrographs. We also thank Dr. Richard J. Holt (Queen Mary's Hospital for Children, Carshalton, Surrey) for the supply of 6-APA sample.

ABSTRACT

Ultrasonically-disrupted cell suspensions of human enteropathogen *Escherichia coli* O 127 : K 63 : (8 2) : H- strain were submitted to ultracentrifugal analysis in order to obtain several cell fractions. Penicillinase activity of all these preparations was measured by microbial methods. Cell sap showed specific activity nearly half of that corresponding to other fractions having membranes as was demonstrated by electron microscopy control. Ribosomal fraction also showed high specific activity while the so called light membranes fraction had very low one. Inverse bioautoelectropherography was applied to every centrifuged material. Only cell sap presented a penicillinase content quite different from all other fractions. An attempt to identify the immunoprecipitation band with penicillinase activity was made by combining immunoelectrophoretic and bioautographic methods.

RESUMEN

Células de *Escherichia coli* O 127 : K 63 : (B 8) : H-, enteropatógeno para el lactante, fueron cultivadas sobre agar nutritivo, recogidas en suero fisiológico y sometidas a ultrasonación durante treinta minutos a 20 kc/s. El resultado fue sometido a centrifugación diferencial obteniéndose cinco fracciones convencionales controladas por microscopía electrónica que fueron denominadas: Primer Sedimento (sedimento de 4.400 g durante quince minutos); Detritus Celulares (sedimento de 12.000 g durante diez minutos, en sacarosa 0,33 M); Jugo Celular (sobrenadante de 100.000 g durante sesenta minutos); Fracción Ribosómica (sedimento de 150.000 g durante tres horas, en gradiente discontinuo de sacarosa 0,25 M, 1,5 M y 2,0 M); y Fracción de Membranas Ligeras (zonas intermedias del gradiente). Todas ellas fueron a continuación precipitadas por acetona a -20 °C y los sedimentos obtenidos redissueltos en tampón de fosfato pH 7,2, hasta 60 mg de peso seco/ml.

Sobre estas preparaciones se realizaron medidas de actividad específica de penicilinasas, y se estudió el comportamiento electroforético de su contenido en esta enzima. La fracción más pobre fue la denominada Membranas Ligeras, mientras que el Primer Sedimento proporcionó un nivel cuatro veces superior.

En cuanto al comportamiento electroforético de las penicilinasas de cada fracción, el revelado bioautográfico mediante *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P y *Sarcina lutea* ATCC 9341, permitió diferenciar hasta seis zonas electroforéticas activas frente a distintos antibióticos β -lactámicos. La Fracción de Membranas Ligeras, de acuerdo con su bajo nivel de actividad penicilínica, demostró poseer únicamente aquella penicilinasas cuya movilidad electroforética relativa a la de la albúmina humana normal era de -21 %, es decir, claramente básica al pH 8,6 de la electroforesis. Sobre las fracciones denominadas Primer Sedimento, Detritus Celulares y Ribosómica se detectaron 3 zonas penicilinasopositivas de movilidades electroforéticas -21 %, 11 % y 48 %. El Jugo Celular, por su parte, sólo presentó dos (-34 % y 3 %), pero ambas con localización diferente a las anteriores en el electroforetograma. Finalmente, sobre las células desecadas por acetona y no sometidas a ultrasonación se detectó otra cuya movilidad (98 %) indicaba su claro carácter ácido al pH de la operación.

Mediante el empleo de varios tipos de antibióticos β -lactámicos y gérmenes reveladores pudo demostrarse el carácter de β -lactamasa de algunas de estas penicilinasas (-34 %, -21 %) y el de acilasas de las restantes.

Se realizó un intento de combinar la inmunoelectroforesis y el revelado bioautográfico con objeto de determinar la banda de inmunoprecipitación correspondiente al complejo penicilinasas-anticuerpo. El gran número de arcos de precipitación formados y la poca visibilidad de los posiblemente específicos hicieron imposible un total éxito. Se realizan actualmente trabajos encaminados a conseguir este interesante objetivo.

LITERATURE CITED

1. ARCOS, J. M. 1968. Diferenciación de penicilinasas en *Bacillus cereus*. Rev. Españ. Fisiol., 3, 10-19.
2. ARCOS, J. M.; RUIZ, M. C., and MÚGICA, J. D. 1968. β -lactamase and penicillinacylase coexistence in *Escherichia coli* cells. J. Bacteriol., 96, 1870-72.
3. BOWMAN, F. W., and HOLDOWSKY, S. 1960. Production and control of a stable penicillinase. Antibiot. Chemotherapy, 10, 508-14.
4. CITRI, N., and POLLOCK, M. R. 1966. The biochemistry and function of β -lactamase (penicillinase). Advan. Enzymol., 28, 237-323.
5. DUERKSEN, J. D., and O'CONNOR, M. L. 1963. The demonstration of ribosome-bound penicillinase in *Bacillus cereus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 34-39.
6. HAMILTON-MILLER, J. M. T. 1966. Penicillinacylase. Bacteriol. Rev., 30, 761-71.
7. LATHI, A., and SAUKKONEN, J. J. 1966. Immunodiffusion analysis of subcellular fractions of *Escherichia coli*. Ann. Med. Exptl. Biol. Fenniae (Helsinki), 44, 216-20.
8. SCHEIDEGGER, J. J. 1965. Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7, 103-10.

LABORATORIOS ALTER
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA

VALORACION MICROBIOLOGICA DE CLORURO DE BENZALCONIO EN PLACA DE AGAR

por

F. FERNÁNDEZ

INTRODUCCION

Aunque los antisépticos pueden valorarse corrientemente por procedimientos químicos, hay ocasiones en que resulta conveniente el empleo de métodos microbiológicos. Tal sucede, por ejemplo, cuando la cantidad a valorar es muy pequeña, ya que la sensibilidad de los ensayos microbiológicos es superior, en general, a la de los análisis químicos. También ocurre en ocasiones, que puede haber presente alguna sustancia que interfiera en la valoración química y que, sin embargo, no sea obstáculo en la microbiológica.

Ya anteriormente hemos publicado un procedimiento para valorar formaldehído en placa de agar (2), y dada nuestra preferencia por este tipo de ensayos, hemos probado a valorar otros antisépticos por procedimientos análogos. En este caso particular nos vamos a ocupar de la valoración de cloruro de benzalconio con *Micrococcus flavus*.

MATERIAL Y METODOS

Como hemos apuntado anteriormente, el germen de ensayo es el *Micrococcus flavus* (ATCC 10.240). El procedimiento para preparar el inóculo es similar al que se describe en la Farmacopea Británica (1), así

como el medio de ensayo que es el mismo que se emplea para la valoración de bacitracina. La cantidad óptima de suspensión microbiana que se añade al medio de ensayo se ajusta mediante tanteo la primera vez, y esto sirve de orientación para veces sucesivas. Las diluciones se efectúan con agua destilada.

En cuanto a la técnica del ensayo para el establecimiento de una curva patrón, es la misma que se describe en otro trabajo anterior (3).

Para la curva patrón se emplearon cinco concentraciones diferentes en progresión geométrica, lo que permite el empleo de coeficientes polinominales, lo cual simplifica notablemente el cálculo estadístico. En este caso, la relación entre las concentraciones fue de 1,7, siendo la más baja de 11,97 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, y la más alta, de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, lo cual indica la suficiente sensibilidad del método.

La temperatura de incubación fue de 32°-35 °C, durante un período de alrededor de dieciocho horas.

Las lecturas se efectuaron con un calibrador adecuado, obteniéndose en milímetros y décimas de milímetro.

El crecimiento del germen fue homogéneo, como ocurre cuando se emplea para valorar bacitracina, y los halos de inhibición resultantes fueron nítidos, de borde bien definido y de tamaño apropiado.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el *cuadro 1* pueden verse los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones. Para el cálculo estadístico se emplean los coeficientes polinominales en vez de los logaritmos de las concentraciones.

Para el estudio estadístico de los resultados empleamos las mismas fórmulas y procedimientos que en trabajos anteriores (2-3).

Cálculo de la línea de regresión

Como ya sabemos, cuando se usan coeficientes polinominales, el coeficiente de regresión viene dado por la fórmula:

$$b = \frac{S(XZ)}{S(X^2)}$$

Cuadro 1

Concentraciones, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	11,97	20,35	34,60	58,82	100,00
Logaritmos de las concentraciones	1,07820	1,30865	1,53910	1,76955	2,00000
Coefficientes polinomiales, X	-2	-1	0	+1	+2
Resultados en milímetros, Y	18,4	19,7	21,6	23,1	24,7
	18,4	20,1	21,9	22,9	24,8
	18,2	20,0	21,6	23,1	24,5
	18,3	20,2	21,7	23,4	24,5
	18,4	20,3	21,7	23,0	24,7
Totales, T	91,7	100,3	108,5	115,5	123,2
Medias, Z	18,34	20,06	21,70	23,10	24,64

El valor calculado para b en este caso es de 1,564.

Esto quiere decir que la ecuación para la línea de regresión será:

$$Z = \bar{Z} + 1,564 X$$

o sea:

$$Z = 21,568 + 1,564 X$$

En la figura 1 puede verse la línea de regresión que se obtiene mediante el cálculo anterior.

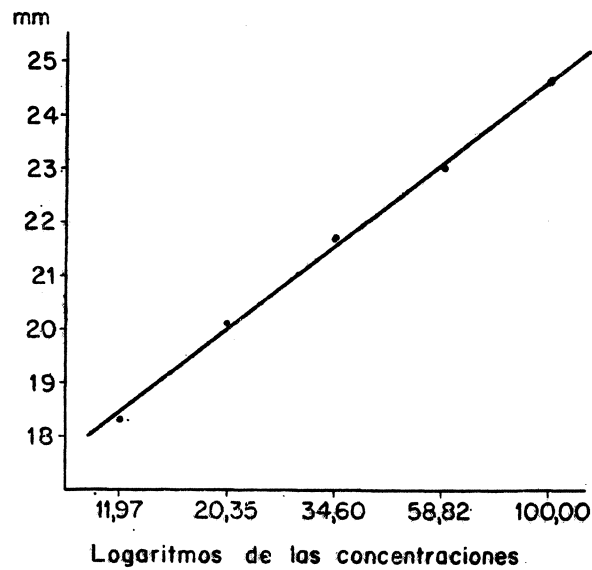


Figura 1

Análisis de la varianza

En el *cuadro 2* presentamos el análisis de la varianza efectuado teniendo en cuenta diferentes fuentes de variación.

Cuadro 2

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Razón de la varianza (F)	
				Calculada	P = 0,95
Total	122,9944	24			
Entre concentraciones	122,4784	4	30,619		
Regresión	122,3048	1	122,3048	4.740,48	4,35
Desviación de la linealidad	0,1736	3	0,057866	2,24	3,10
Error experimental	0,5160	20	0,0258		

Como puede verse, la regresión es altamente significativa, ya que el valor calculado de F es mucho mayor que el valor tabulado. Por otro lado, no hay desviación significativa en la linealidad, ya que el valor obtenido es menor que el encontrado en la tabla para valores de F.

Comentario final

Como procedimiento puede usarse el del tipo 2×2 , empleando dos concentraciones, que deben elegirse dentro de los límites que señala la curva. En cada placa pueden incluirse, si es necesario, varios problemas, que se comparan simultáneamente con el mismo patrón. Para el cálculo de la potencia, prueba de paralelismo y obtención de los límites de error pueden seguirse las indicaciones de la Farmacopea Británica.

CONCLUSIONES

A la vista de lo anteriormente expuesto se deduce que puede valorarse el cloruro de benzalconio con el *Micrococcus flavus*, ya que:

- 1) El crecimiento del germen en las placas es perfectamente homogéneo.

- 2) Los halos de inhibición que se producen son nítidos, de borde bien definido y de tamaño apropiado.
- 3) La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas es lineal, dentro de límites corrientes.

RESUMEN

Se estudia la valoración microbiológica del cloruro de benzalconio con *Micrococcus flavus* por el método de difusión en agar y mediante el empleo de pocillos. Se obtuvieron halos de inhibición nítidos, bien definidos y de tamaño apropiado. La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas fue lineal para las concentraciones empleadas. Se describe el análisis estadístico llevado a cabo, que comprende el cálculo de la regresión y el análisis de la varianza de los resultados obtenidos.

SUMMARY

The microbiological assay of benzalkonium chloride with *Micrococcus flavus* is studied by the agar cup diffusion method. Clear, well defined inhibition zones of an appropriate size were obtained. The relationship between the logarithm of the concentrations and the responses was a linear one for the concentrations used. It is described the statistical analysis made which includes the regression calculation and the variance analysis of the results obtained.

BIBLIOGRAFIA

1. British Pharmacopoeia. 1963.
2. FERNÁNDEZ, F. 1963. Valoración de formaldehído en placa de agar. Comunicaciones libres y a las ponencias de la II Convención Bienal de la Industria Farmacéutica Nacional, 140.
3. FERNÁNDEZ, F. 1964. Valoración de estreptomycin y derivados con *Bacillus licheniformis* Alter. Microbiol. Españ., 17, 209-23.

X CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA

(MEXICO, 1970)

Se ha publicado la segunda circular, que incluye el programa científico. Este comprende, en principio, los siguientes apartados: A) Microbiología General. B) Fisiología Microbiana. C) Genética. D) Inmunología. E) Microbiología Médica. F) Epidemiología. G) Microbiología Industrial. H) Microbiología Agrícola. I) Micología. J) Virología.

La cuota de inscripción es de 55 dólares para los congresistas y de 35 para los acompañantes, hasta el 30 de abril de 1970. Después de esta fecha, las cuotas se elevarán a 65 y 45 dólares, respectivamente. Los trabajos podrán ir escritos en español, francés o inglés; habrá traducción simultánea.

En nuestro país, la correspondencia debe dirigirse al Dr. Miguel Rubio Huertos, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, calle de Joaquín Costa, 32, Madrid-6.

Depósito legal: M. 702. - 1968.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15. Madrid