

---

VOLUMEN 23. 1970

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>
Esterilización de materiales plásticos por radiaciones ultravioletas, por <i>M. Ventín</i> ... ..	73
Valoración de cloranfenicol con <i>Bacillus cereus</i> , por <i>F. Fernández</i> .	107
Producción de riboflavina por <i>Eremothecium ashbyii</i> Guilliermond, en jugo de <i>Agave</i> , por <i>A. Sánchez-Marroquín, Sara Manrique</i> y <i>Lilia Vierna</i> ... ..	113
Producción de riboflavina por <i>Ashbya gossypii</i> (Ashby & Nowell) Guill. en jugo de <i>Agave</i> sp., por <i>A. Sánchez-Marroquín, Sara Manrique</i> y <i>Lilia Vierna</i> ... ..	127
Heterogeneidad colonial de <i>Citrobacter intermedium</i> C <sub>3</sub> , en relación con la segregación de alanina, por <i>S. Hernández</i> ... ..	139
Incidencia de gérmenes mineralizadores de fosfatos en suelo de vega y secano de la provincia de Granada, por <i>J. M. Barea, A. Ramos</i> y <i>V. Callao</i> ... ..	149
Congreso de Virología ... ..	157

## ESTERILIZACION DE MATERIALES PLASTICOS POR RADIACIONES ULTRAVIOLETAS

por

M. VENTÍN

### EXPOSICION Y ENFOQUE DEL PROBLEMA

El empleo cada vez más generalizado de los materiales plásticos en el acondicionamiento de productos que requieran condiciones de asepsia y la dificultad de su esterilización por procedimientos clásicos, obliga al estudio de nuevas técnicas que permitan resolver el problema.

El hecho, de todos conocido, del notable poder germicida de la radiación ultravioleta y la posible transparencia de los materiales plásticos a dicha radiación, nos inducen a considerar como factible su empleo en la esterilización de recipientes plásticos herméticos.

Nuestro propósito es, por tanto, llegar a determinar de manera sistemática la transparencia de algunos materiales plásticos a la radiación ultravioleta de acción germicida.

Planteado el objeto de nuestro estudio, indicamos dos vías resolutivas —Biológica y Física—, las cuales, de por sí, deben ser solución completa al problema, a la vez que en sus consecuencias últimas han de coincidir dentro de los márgenes de error.

El elemento fundamental del estudio biológico lo constituye un sistema integrado por una lámpara de emisión ultravioleta alojada en el interior de una pantalla de aluminio anodizado que corona a una vitrina, en cuyo interior se instala una plataforma basculante provista de alveolos adecuados para albergar pocillos que contengan una suspensión de gérmenes. Por el recuento sistemático de gérmenes viables, después de haber

sido expuesta la suspensión a las radiaciones ultravioletas a través de opérculos de plástico, obtenemos porcentajes de supervivencia para tiempos dados de exposición.

La pantalla está montada en la parte superior de la vitrina, de manera que el eje vertical de la lámpara que alberga en su interior, sea normal a la plataforma basculante en su punto de reposo. Es fundamental, puesto que ello constituye una constante básica de nuestro sistema, que la distancia de la lámpara al centro de la plataforma basculante, medida según el eje anteriormente citado, sea exactamente de un metro. Todas las observaciones las realizaremos teniendo presente la inalterabilidad de dicha distancia. El sistema lámpara-pantalla, a pesar de presentar cierta simetría, no puede ser considerado como un foco puntiforme; por tanto, no será posible en ningún caso aplicar la ley de los cuadrados.

En el aspecto físico, por experimentación espectrofotométrica hallaremos las transmisiones de los plásticos a diferentes longitudes de onda y para distintos espesores seriados, con lo que partiendo de consideraciones energéticas, podremos conocer la energía transmitida a través de ellos en función del espesor.

Constituido así nuestro sistema de trabajo, es obvio que ante todo debemos realizar una valoración profunda del mismo. Los factores variables del medio ambiente, temperatura y humedad, los reducimos a valores constantes:  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $61 - 65\%$  respectivamente, debido a que su incidencia variable influye marcadamente sobre el desarrollo bacteriano y absorción energética. Debemos tener, asimismo, un conocimiento exacto de la energía disponible, su distribución espectral y rendimiento, ya que resulta evidente que la efectividad del sistema es función directa de la energía germicida y de la uniformidad de su distribución sobre la plataforma de trabajo.

Efectuados los estudios experimentales, biológico y físico —fundamentalmente distintos—, debemos comprobar si ambos procedimientos llevan a resultados idénticos dentro de los márgenes de error calculados, lo cual será, de por sí, una mutua prueba de autenticidad y exactitud; para ello nos basamos en un punto de entronque común —la curva de letalidad de nuestro sistema de trabajo— que nos permite operar en virtud de la función hallada, con la propiedad reversible de los resultados, o sea que partiendo de porcentajes de supervivencia obtenemos valores energéticos, al tiempo que con datos energéticos conoceremos porcentajes de supervivencia. Por comparación de los resultados obtenidos en ambos procesos, de-

Cuadro 1

N	$\lambda'$	$\lambda$	E	N	$\lambda'$	$\lambda$	E	N	$\lambda'$	$\lambda$	E
7	2.389,257	2.389	4,90	19	2.803,472			31	3.341,478		
8	2.464,070	2.464	3,63	20	2.804,402	2.804	9,97	32	3.650,146	3.341	12,34
9	2.482,010			21	2.893,595	2.894	6,02	33	3.654,833		
10	2.482,720	2.483	10,14	22	2.925,400	2.926	2,02	34	3.662,878	3.654	80,11
11	2.483,830			23	2.967,278	2.967	13,14	35	3.663,276		
12	2.536,519	2.537	30,00	24	3.021,499			1	3.906,410		
13	2.576,295	2.576	14,20	25	3.023,476			2	4.046,560	4.047	32,36
14	2.652,042			26	3.025,517	3.022	22,32	3	4.077,810	4.077	11,30
15	2.653,681	2.654	23,90	27	3.027,496			4	4.339,235	4.340	2,90
16	2.655,121			28	3.125,660			5	4.347,496	4.348	5,70
17	2.698,851	2.700	5,66	29	3.131,546	3.129	52,87	6	4.358,350	4.358	47,07
18	2.752,775	2.753	3,46	30	3.131,833						

beremos observar concordancia dentro de los márgenes de error, y de su lógico desarrollo, que las dos vías resolutivas son soluciones al problema.

Finalmente, y comprobada la concordancia de resultados, deberemos estimar por discusión de ellos, si son suficientemente representativos como para poder concluir con la capacidad esterilizante del método.

## ANÁLISIS DEL MATERIAL

### *Energía del sistema*

Empleamos una lámpara de vapor de mercurio, modelo industrial, de 15 W de consumo, de la que determinamos su espectrograma (*figura 1*), disponiéndola, conjuntamente con su pantalla de aluminio anodizado, frente a la rendija de un espectrógrafo. Por exploración comparada de dicho espectrograma, mediante un microfotómetro y fichas tabuladas del espectro del hierro diferenciamos 35 rayas en la banda comprendida entre 2.389 y 4.358 Å, las cuales, agrupadas en 22 zonas (*cuadro 1*), nos proporcionan una energía radiante total de 394,01  $\mu W/cm^2$  a un metro de distancia medido sobre su eje normal. Pero el objeto de nuestro trabajo requiere basarnos únicamente en la energía ultravioleta de acción germicida propiamente dicha, por lo que de las 22 zonas consideramos sólo 14, las comprendidas entre los 2.389 y los 3.129 Å, no cometiendo con ello un error mayor del 0,05 %. Es decir, disponemos de una energía ultravioleta en la banda germicida, de 202,23  $\mu W/cm^2$ , tal como se expresa en el *cuadro 2*, donde  $\lambda$  indica la longitud de onda, P % el porcentaje de acción germicida y E la energía emitida.

*Cuadro 2*

$\lambda$	P %	E	$\lambda$	P %	E
2.389	59,0	4,90	2.753	75,000	3,46
2.464	85,0	3,63	2.804	51,200	9,97
2.483	90,0	10,14	2.894	21,400	6,02
2.537	100,0	30,00	2.926	15,700	2,02
2.576	104,0	14,20	2.967	10,100	13,14
2.654	103,0	23,90	3.022	5,600	22,32
2.700	96,0	5,66	3.129	1,080	52,87

En los ensayos microbiológicos con radiaciones ultravioletas suele emplearse la longitud de onda de 2.537 Å, debido a que siendo de gran intensidad y fácil obtención con lámpara de vapor de mercurio, es de las que presentan mayor acción germicida, pero nosotros no operamos con una sola longitud de onda, sino con toda la banda ultravioleta de acción germicida (figura 2), por lo que será de interés expresar nuestra energía germicida total en forma relativa a la longitud de onda de 2.537 Å, o sea, como

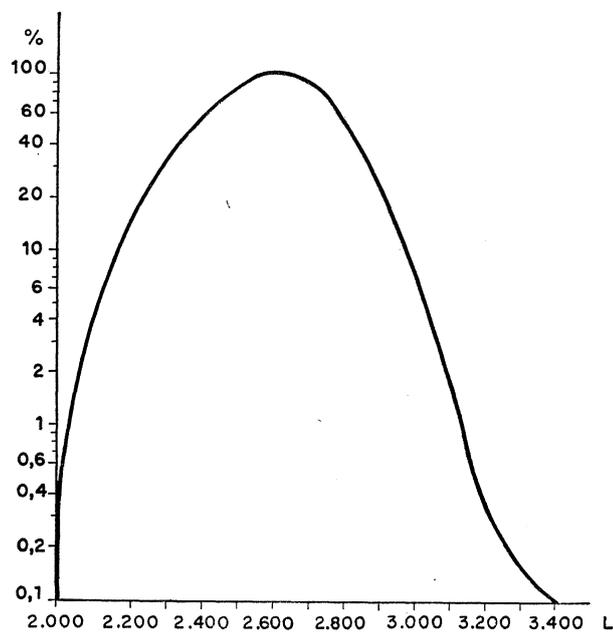


Figura 2. Acción germicida del ultravioleta próximo

procedente de un foco monocromático, de lo que resulta una potencia de máxima acción germicida de  $102,37 \mu W/cm^2$  (cuadro 3, 2.<sup>a</sup> columna). En el curso de nuestro trabajo hemos de tener presente que si la energía germicida de la banda considerada y referida a una misma longitud de onda, incide libremente sobre un microorganismo, podemos considerarla indudablemente como procedente de un foco monocromático, pero si esta incidencia tiene lugar a través de un opérculo de plástico, no puede considerarse como tal, ya que los plásticos no presentan la misma transmisión a distintas longitudes de onda.

Cuadro 3

Zonas	Energía germicida	Aumento por pantalla	Corrección por ángulo
2.389	2,891	3,548	3,528
2.464	3,085	3,787	3,766
2.483	9,126	11,203	11,141
2.537	30,000	36,828	36,625
2.576	14,768	17,129	17,035
2.654	24,617	31,220	31,048
2.700	5,433	6,670	6,633
2.753	2,595	3,176	3,159
2.804	5,104	6,276	6,241
2.894	1,288	1,571	1,562
2.926	0,317	0,399	0,397
2.967	1,327	1,629	1,620
3.022	1,249	1,533	1,525
3.129	0,570	0,700	0,696

La disposición del foco emisor de radiación ultravioleta alojado en el interior de la pantalla reflectante, tiene como objeto incrementar la energía incidente en la superficie de trabajo y con ello aumentar el rendimiento. Por tanto, para conocer exactamente el potencial energético emitido por el sistema lámpara-pantalla, deberemos conocer dicho incremento, que hemos determinado experimentalmente y es del 22,76 %, o sea, que la energía emitida por el sistema lámpara-pantalla es de  $125,669 \mu W/cm^2$  (cuadro 3, 3.<sup>a</sup> columna).

La energía procedente del sistema lámpara-pantalla, al no incidir con el mismo ángulo en todos los puntos de la superficie de trabajo, debe tener un impacto energético de distribución irregular. Por prospección experimental, llegamos a determinar que dicha forma de distribución presenta un valor promedio del 99,45 % de la energía incidente en el centro geométrico de la plataforma basculante, con lo que después de efectuar la corrección por ángulo, disponemos de una energía germicida total y referida a la longitud de onda de 2.357 Å de  $124,976 \mu W/cm^2$  (cuadro 3, 4.<sup>a</sup> columna). De todo ello podemos postular que la energía radiante de nuestro sistema lámpara-pantalla sobre la plataforma basculante, es de distribución uniforme, siempre y cuando se interprete el error del 0,55 %, como inherente al cálculo de energía.

*Espesores de los plásticos*

La transmisión a través de una lámina de plástico es función dependiente de su espesor, por lo que sería ideal desarrollar nuestro trabajo con láminas cuyos espesores fueran aumentando a intervalos iguales: plásticos de una décima, dos décimas, etc., pero en el comercio no nos ha sido posible hallar tales espesores y nos hemos visto obligados a operar con varias láminas; así, para obtener un espesor 10 veces el inicial, hemos superpuesto 10 láminas iguales. Debido a las diferencias de uniformidad del espesor dentro de una misma lámina, hemos calculado en cada plástico objeto de nuestro estudio (cloruro de polivinilo, politeno, polipropileno, acetato de celulosa, triacetato de celulosa y metacrilato), el valor promedio sobre

*Cuadro 4*

Plásticos	$z$	$\Delta z$	$\frac{\Delta z}{z}$	Porcentaje
Cloruro de polivinilo	109,05	$\pm 0,44$	0,0040	0,40
Politeno	40,00	$\pm 0,42$	0,0105	1,05
Polipropileno	70,35	$\pm 0,46$	0,0065	0,65
Acetato de celulosa	94,95	$\pm 1,42$	0,0150	1,50
Triacetato de celulosa	129,65	$\pm 1,58$	0,0122	1,22
Metacrilato	1.944,55	$\pm 7,37$	0,0037	0,37

20 determinaciones y calculado el error cuadrático medio, estimando nuestras observaciones de acuerdo con el *cuadro 4*, en donde se indican sucesivamente los valores medios, expresados en diezmilésimas de centímetro, sus errores absolutos, los errores relativos y éstos expresados en porcentajes.

*Curva de letalidad*

Consideramos de sumo interés conocer, en nuestro sistema de trabajo, el tiempo necesario para alcanzar un determinado nivel de letalidad, así como la energía que ha incidido en la plataforma basculante durante este tiempo; es decir, se trata de hallar una función que relacione los distintos porcentajes de supervivencia con la energía incidente. Debemos, pues, de-

terminar, con la mayor precisión posible, la expresión matemática de dicha función, con el fin de que, dado un tiempo de exposición cualquiera, podamos averiguar los efectos causados.

Con el germen patrón —*Escherichia coli*, variedad *fecalis*, procedente de la cepa CMFFB (CCL-48) de la colección de gérmenes liofilizados de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Barcelona y mantenido por pases en cultivos de veinticuatro horas, a 37 °C, en caldo glucosado—, preparamos una suspensión con la cual llenamos once pocillos, separamos uno para realizar su recuento y tomarlo como posterior punto de referencia y exponemos los diez restantes a la acción de la lámpara ultravioleta, retirando una cada cinco minutos. Así se ha cubierto un intervalo de cero-cincuenta minutos, dentro del cual sabemos se produce esterilidad total. A continuación realizamos los recuentos de gérmenes viables en dichas suspensiones, obteniendo así 100 series de recuentos, cada una de las cuales, de por sí, nos da idea de la función buscada.

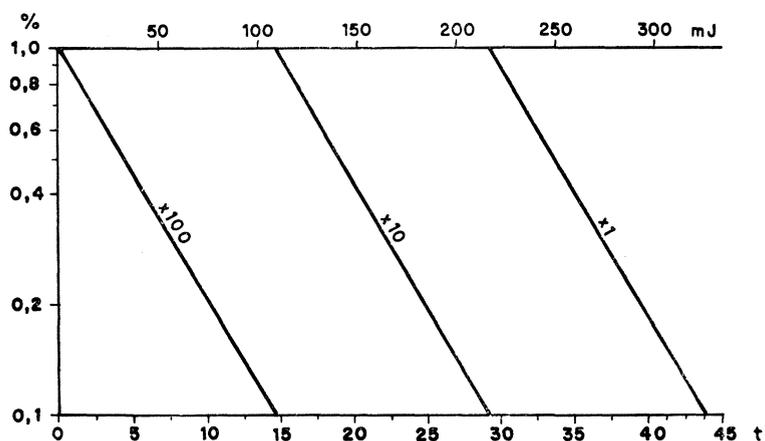
Con los recuentos realizados cada cinco minutos y los porcentajes respecto a la placa patrón, o recuento para el tiempo cero, hallamos la media aritmética y el error cuadrático medio, obteniendo los resultados indicados en el cuadro 5, en donde la columna t expresa los tiempos para los cuales se han hecho las determinaciones, la columna  $P_e$  de los valores medios de éstas, la columna  $\Delta P_e$  el error absoluto cometido en las observaciones y la  $\Delta P_e/P_e$  % el error relativo; en la columna  $P_t$  se indican los valores de una función teórica de tipo exponencial que a los 43,8 minutos diera un nivel

Cuadro 5

t	$P_e$	$\Delta P_e$	$\frac{\Delta P_e}{P_e}$ %	$P_t$	$\frac{P-P_t}{P_t}$ %
0	100,00	0,000	0,00	100,0000	0,00
5	45,13	0,460	1,02	45,4511	0,71
10	20,51	0,197	0,96	20,6571	0,72
15	9,31	0,094	1,01	9,3887	0,85
20	4,29	0,058	1,34	4,2672	0,53
25	1,95	0,020	1,02	1,9394	0,54
30	0,87	0,012	1,36	0,8814	1,31
35	0,39	0,018	4,64	0,4006	2,71
40	0,18	0,015	8,53	0,1821	1,16
45	0,08	0,012	15,31	0,0828	3,50

de supervivencia del orden del 0,1 %. Debemos tener en cuenta que de acuerdo con nuestras observaciones, se alcanza un nivel de 0,08 % a los cuarenta y cinco minutos, lo cual supone letalidad total, dentro de nuestro sistema de trabajo, para la mayor parte de los recuentos que se realicen. La última columna del *cuadro 5* indica en porcentaje el error que se comete al adoptar una función teórica en lugar de los valores determinados.

Todo ello nos induce a considerar una función lineal del tiempo en relación con el logaritmo del porcentaje de gérmenes vivos, que hace corresponder, al tiempo cero porcentaje 100, y al tiempo 43,8, porcentaje 0,1 (*figura 3*).



*Figura 3. Curva de letalidad del germen patrón*

La función buscada se ha determinado a partir de los valores experimentales, por un proceso análogo al de la correlación lineal. La suma de distancias de los puntos experimentales a la función teórica, es un mínimo. La expresión de la función es:

$$p = 10^{-Kt}$$

donde  $p$  expresa en tanto por uno la relación de gérmenes vivos, y  $K$  es el coeficiente que llamaremos "de letalidad" y cuyo valor es:

$$K = 0,0011415 \text{ seg}^{-1}$$

O sea, que conociendo la energía germicida que irradia el sistema por uni-

Cuadro 6. Porcentajes de supervivencia en el cloruro de polivinilo

z \ t	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
109,05	81,74	63,61	54,27	41,53	38,06	28,39	25,39	21,30	15,13	12,57	7,35	6,94
218,10	95,94	91,69	85,98	84,83	78,70	77,44	72,14	71,80	65,64	64,74	61,14	54,30
327,15	99,93	97,22	95,78	93,85	92,74	92,04	89,25	88,51	87,33	84,14	81,26	78,52
436,20	99,35	98,01	97,29	96,86	95,73	95,41	94,79	94,48	93,28	92,45	92,04	90,40
545,25	99,52	99,07	99,03	98,07	97,52	96,59	96,11	95,78	95,54	95,12	94,55	93,97
654,30	99,77	99,13	98,99	96,65	98,41	97,95	97,55	97,12	96,71	96,37	95,92	95,34
763,35	99,82	99,59	99,05	98,92	98,70	98,39	98,15	97,90	97,70	97,23	96,78	96,55
872,40	99,83	99,71	99,60	99,39	99,27	99,07	98,85	98,52	98,37	97,93	97,69	97,44
981,45	99,77	99,76	99,65	99,41	99,15	99,06	99,02	99,44	98,41	98,31	98,06	98,84
1.090,50	99,95	99,93	99,84	99,80	99,68	99,67	99,34	99,31	99,07	98,87	98,72	98,70

*Cuadro 7. Porcentajes de supervivencia en el politeno*

z \ t	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
40	33,34	17,52	5,09	2,71	0,88	0,30	0,12	0,02				
80	58,84	37,28	16,32	11,35	5,12	3,70	1,91	0,99	0,51	0,33	0,16	0,06
120	72,21	48,64	37,83	22,90	15,26	13,18	10,66	6,57	3,96	3,44	2,78	1,17
160	80,42	64,90	57,41	41,11	38,43	27,23	22,81	16,53	15,58	11,24	9,32	6,86
200	88,90	75,27	68,60	63,31	50,39	46,73	44,10	35,33	32,78	32,07	25,02	22,15
240	93,13	85,45	76,31	75,32	69,52	66,44	54,88	54,22	53,53	43,64	43,48	40,10
280	97,52	93,30	88,70	83,65	77,76	74,60	71,03	70,62	64,68	64,50	59,83	56,65
320	98,05	94,62	93,02	89,92	87,16	84,63	80,66	78,40	78,20	75,18	73,39	70,36
360	98,49	97,21	95,92	94,09	92,05	91,15	89,27	87,43	84,98	84,13	83,25	80,36
400	98,75	97,72	96,57	95,70	94,79	93,56	93,13	92,14	91,09	89,94	89,03	86,00

Cuadro 8. Porcentajes de supervivencias en el polipropileno

z \ t	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
70,35	45,25	24,64	8,60	4,36	2,10	1,11	0,45	0,15	0,08			
140,70	67,19	46,83	31,41	21,58	15,94	9,88	7,88	4,79	3,83	2,21	1,28	1,03
211,05	83,77	70,66	57,42	45,05	39,32	35,30	28,09	24,57	16,38	16,12	13,38	11,77
281,40	91,18	82,90	74,29	70,15	61,38	55,34	52,82	47,75	41,82	39,25	38,26	31,85
351,75	95,96	91,19	86,39	81,79	80,65	74,41	73,69	70,05	67,12	63,55	60,67	58,78
422,10	99,50	95,31	93,53	91,90	89,02	87,05	84,49	83,47	80,98	78,66	76,12	73,12
492,45	98,90	97,37	96,60	95,47	94,25	92,87	91,02	88,73	88,11	86,86	85,03	83,66
562,80	99,76	98,29	97,82	97,19	96,35	95,91	95,65	94,48	94,13	93,72	92,58	92,13
633,15	99,65	99,06	98,86	98,29	98,17	97,58	97,38	96,79	96,59	96,00	95,41	94,91
703,50	99,56	99,12	99,00	98,78	97,97	97,90	97,87	97,86	97,64	96,85	96,84	96,60

Cuadro 9. Porcentajes de supervivencia en el acetato de celulosa

z \ t	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
94,95	98,64	97,80	96,08	94,74	92,42	91,73	89,69	88,44	87,03	85,63	85,50	83,38
189,90	99,31	98,40	97,49	96,90	95,29	94,15	93,71	93,04	92,00	90,93	89,65	89,31
284,85	99,66	99,07	98,59	97,58	97,33	96,75	95,80	95,53	94,77	94,13	93,48	92,61
379,80	99,57	99,05	98,57	98,13	97,61	97,07	96,60	96,56	95,74	95,56	95,03	95,11
474,75	99,64	99,29	99,04	98,79	98,32	97,99	97,43	96,95	96,62	96,18	96,14	95,59
569,70	99,62	99,51	99,20	98,59	98,48	98,16	98,06	97,79	98,48	97,18	97,06	96,05
664,65	99,69	99,06	98,69	98,30	97,89	97,75	97,59	97,50	96,84	96,66	96,53	96,25
759,70	99,76	99,19	99,07	98,92	98,90	98,88	98,21	97,94	97,91	97,69	97,43	97,05
854,55	99,76	99,56	99,36	99,14	98,90	98,58	98,37	98,35	98,11	97,64	97,42	97,04
949,50	99,69	99,47	99,13	98,90	98,68	98,34	98,12	98,01	97,78	97,42	97,17	97,06

Cuadro 10. Porcentajes de supervivencia en el triacetato de celulosa

<i>z</i> \ <i>t</i>	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
129,65	85,66	74,62	62,78	57,61	47,04	34,45	33,59	26,89	25,57	20,80	17,73	13,98
259,30	94,91	82,21	81,44	79,52	71,11	69,21	60,71	55,91	51,87	49,46	47,03	42,56
388,95	95,68	93,54	88,20	84,36	81,79	77,18	74,26	73,33	68,87	65,92	64,93	62,53
518,60	98,76	95,57	90,14	87,71	87,35	86,32	83,36	78,54	76,88	76,26	74,89	69,87
648,25	98,75	96,85	95,28	91,29	90,81	87,80	87,22	86,83	84,42	82,99	81,67	80,09
777,90	98,72	97,26	96,64	94,78	92,43	92,80	91,77	89,48	88,54	87,41	86,80	85,45
907,55	99,21	98,57	97,14	96,15	95,41	94,54	92,69	92,69	91,62	90,43	89,23	88,66
1.037,20	99,72	98,35	97,66	96,89	96,20	95,55	94,92	94,56	94,01	92,76	92,08	90,85
1.166,85	99,21	98,29	97,91	97,10	96,90	96,47	95,90	95,29	94,72	94,05	93,60	93,01
1.296,50	99,68	99,64	98,60	98,02	96,96	96,82	96,38	95,89	95,58	95,18	95,03	94,02

Cuadro 11. Porcentajes de supervivencia en el metacrilato

t \ z	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
1.944,55	98,83	97,27	95,22	93,63	91,81	90,13	88,43	87,13	85,94	85,00	83,70	82,86
3.889,10	98,83	98,24	97,60	96,47	95,53	94,65	93,23	92,39	91,58	91,09	90,15	88,51
5.833,65	99,41	98,85	97,61	97,01	96,62	95,87	95,53	94,68	94,40	93,70	93,15	92,91
7.788,20	99,53	98,58	98,33	97,87	97,55	97,17	96,86	96,49	96,11	95,85	95,47	94,56
9.722,75	99,78	99,34	98,87	98,39	98,29	97,91	97,34	97,17	96,77	96,65	96,17	95,94
11.667,30	99,68	99,13	98,74	98,48	98,17	97,61	97,35	97,33	96,97	96,47	96,24	96,06
13.611,85	99,96	99,57	99,19	99,02	98,64	98,10	97,98	97,85	97,37	97,31	96,82	96,54
15.556,50	99,76	99,63	99,10	99,09	98,93	98,68	98,20	98,06	98,04	97,57	97,24	97,22
17.500,95	99,93	99,50	99,18	99,15	99,11	98,90	98,76	98,42	98,27	98,21	98,04	97,67
19.445,50	99,97	99,73	99,61	99,51	99,27	99,16	98,93	98,81	98,72	98,37	98,24	97,81

dad de tiempo, podremos expresar el porcentaje de gérmenes vivos en función de la energía germicida radiante.

### ESTUDIO BIOLÓGICO

Por un procedimiento análogo al empleado en la obtención de la curva de letalidad, obtenemos los porcentajes de supervivencia del germen patrón, exponiéndolo a las radiaciones ultravioletas de acción germicida, a través de los correspondientes opérculos de plástico. Operamos de forma que en el intervalo de exposición de cero a ciento veinte minutos, efectuamos recuentos cada diez minutos, y repetimos la serie por 10 veces consecutivas, con el fin de obtener valores promedios y referirlos a porcentajes de supervivencia (*cuadros 6-11*). Con dichos porcentajes podemos calcular, para cada plástico y espesor, el mínimo de tiempo y energía que es necesario aplicar para obtener letalidad total. La fórmula que nos relaciona los porcentajes de gérmenes con la energía radiante es:

$$p = 10^{-K'E}$$

donde p representa el tanto por uno y la constante K' vale:

$$K' = 0,923152 \cdot 10^{-5} \mu W^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$$

*Cuadro 12*

N	Cloruro de polivinilo		Politeno		Polipropileno	
	Espesor	Energía	Espesor	Energía	Espesor	Energía
1	109,05	16,584	40	76,489	70,35	60,933
2	218,10	3,569	80	44,559	140,70	29,357
3	327,15	1,176	120	27,080	211,05	14,354
4	436,20	0,637	160	16,659	281,40	7,363
5	545,25	0,412	200	9,799	351,75	3,588
6	654,30	0,281	240	6,124	422,10	1,724
7	763,35	0,209	280	3,413	492,45	1,031
8	872,40	0,137	320	2,141	562,80	0,525
9	981,45	0,146	360	1,266	633,15	0,318
10	1.090,50	0,061	400	0,869	703,50	0,263

Cuadro 13

N	Acetato de celulosa		Triacetato de celulosa		Metacrilato	
	Espesor	Energía	Espesor	Energía	Espesor	Energía
1	94,95	1,138	129,65	12,219	1.944,55	1,323
2	189,90	0,702	259,30	5,440	3.889,10	0,749
3	284,85	0,434	388,95	3,190	5.833,65	0,523
4	379,80	0,371	518,60	2,110	7.778,20	0,386
5	474,75	0,280	648,25	1,444	9.722,75	0,273
6	569,70	0,235	777,90	1,024	11.667,30	0,290
7	664,65	0,291	907,55	0,734	13.611,85	0,200
8	759,60	0,203	1.037,20	0,567	15.556,40	0,186
9	854,55	0,178	1.166,85	0,519	17.500,95	0,150
10	949,50	0,211	1.296,50	0,367	19.445,50	0,110

con lo que si despejamos E:

$$E = \frac{-\log p}{K'}$$

relación que nos dará la energía radiante que por unidad de tiempo llega a los gérmenes a través de las láminas de plástico en función del tiempo de exposición.

En los *cuadros 12-13* indicamos la energía germicida/segundo, que atraviesa cada espesor de plástico, calculado a partir del porcentaje de supervivencia.

### ESTUDIO FISICO

Con el fin de conocer por métodos físicos la energía transmitida a través de los distintos plásticos y espesores —en función de las longitudes de onda comprendidas en la banda de 1.900 a 3.900 Å—, disponemos las láminas de plástico en un espectrofotómetro, de modo que la radiación monocromática incida perpendicularmente a ellas. Por medio de su regis-

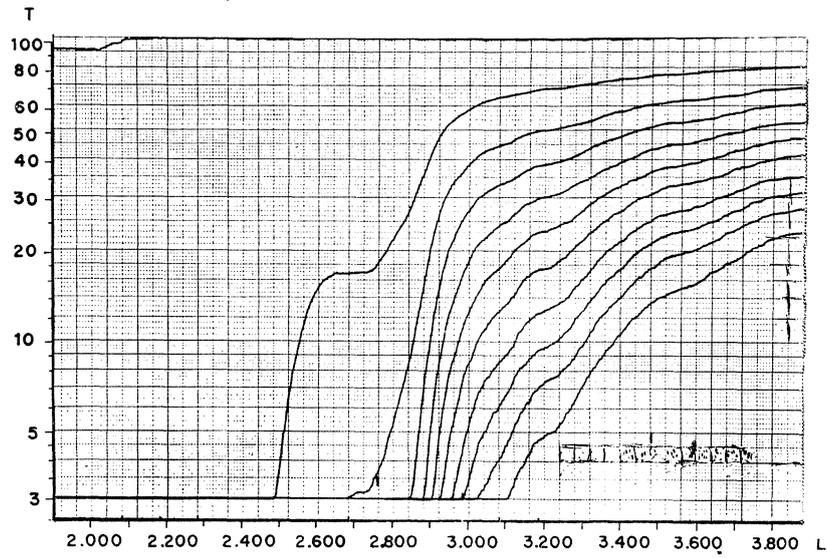


Figura 4. Curvas de transmitancia en función de la longitud de onda. Cloruro de polivinilo

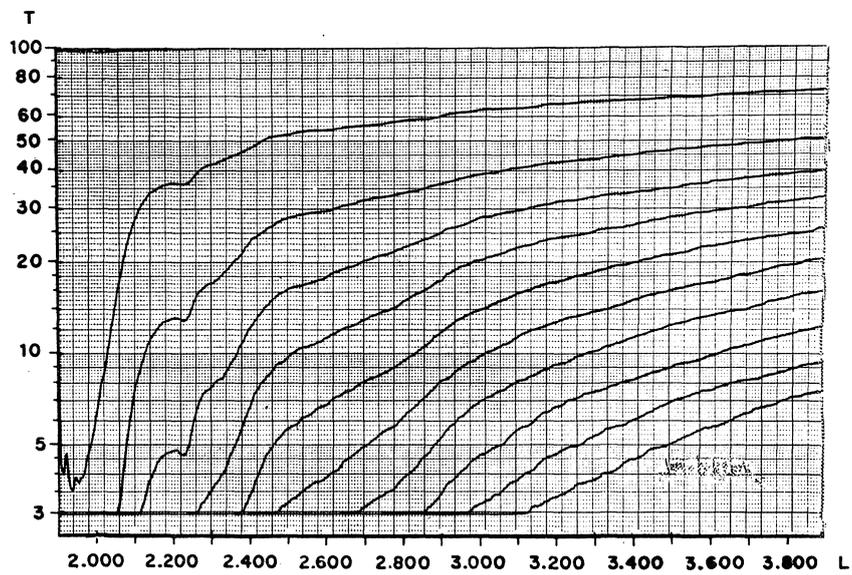


Figura 5. Curvas de transmitancia en función de la longitud de onda. Polietileno

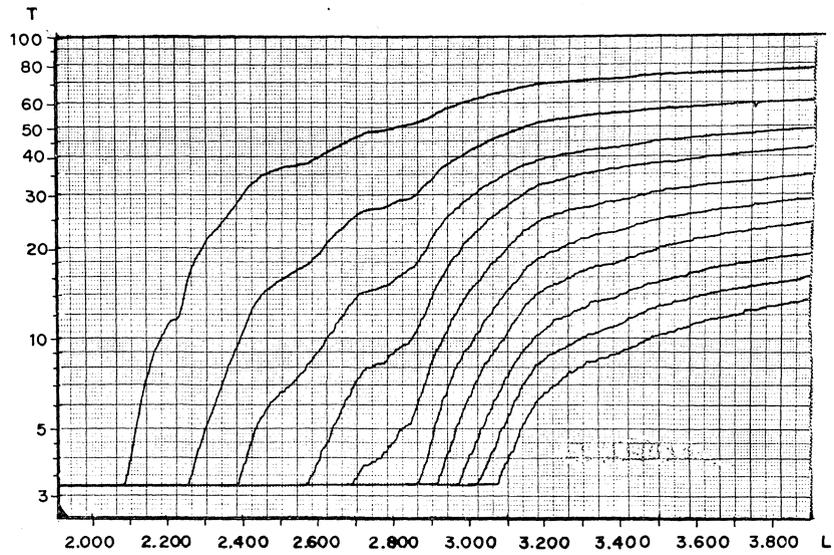


Figura 6. Curvas de transmitancia en función de la longitud de onda. Poli-propileno

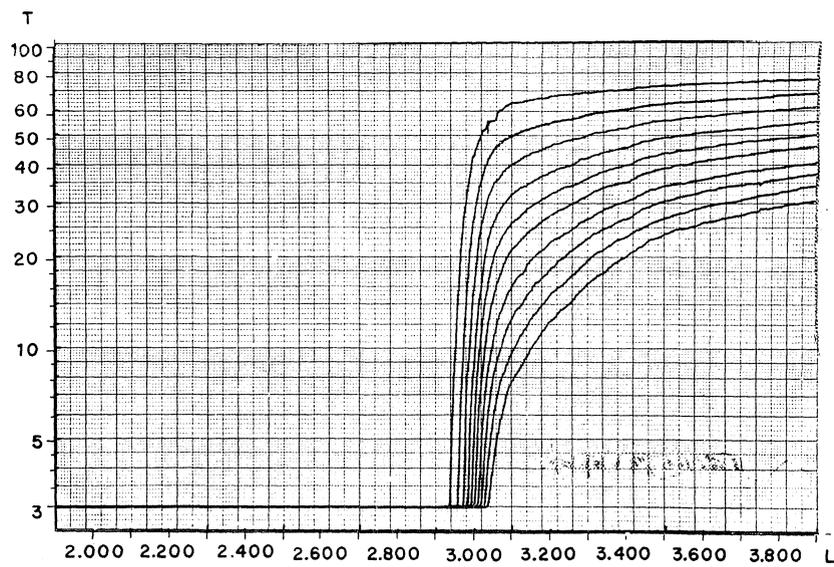


Figura 7. Curvas de transmitancia en función de la longitud de onda. Acetato de celulosa

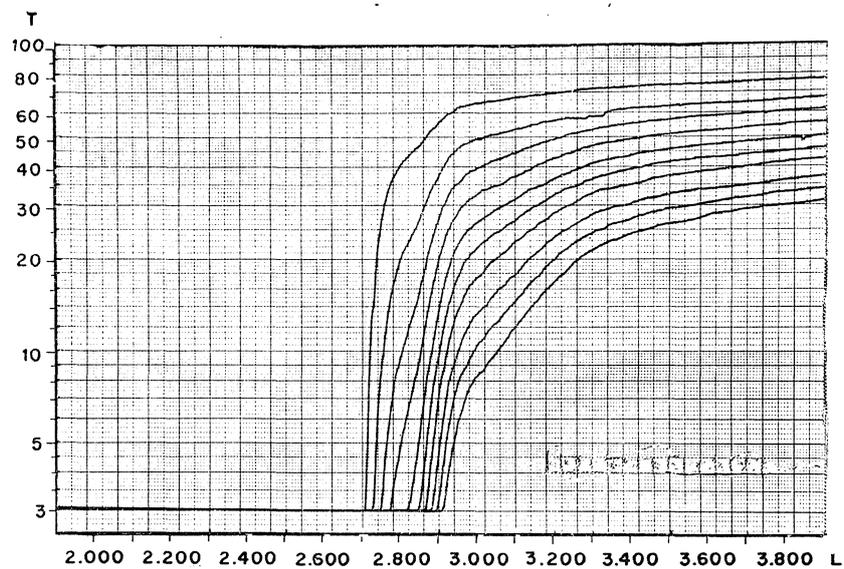


Figura 8. Curvas de transmitancia en función de la longitud de onda. Triacetato de celulosa

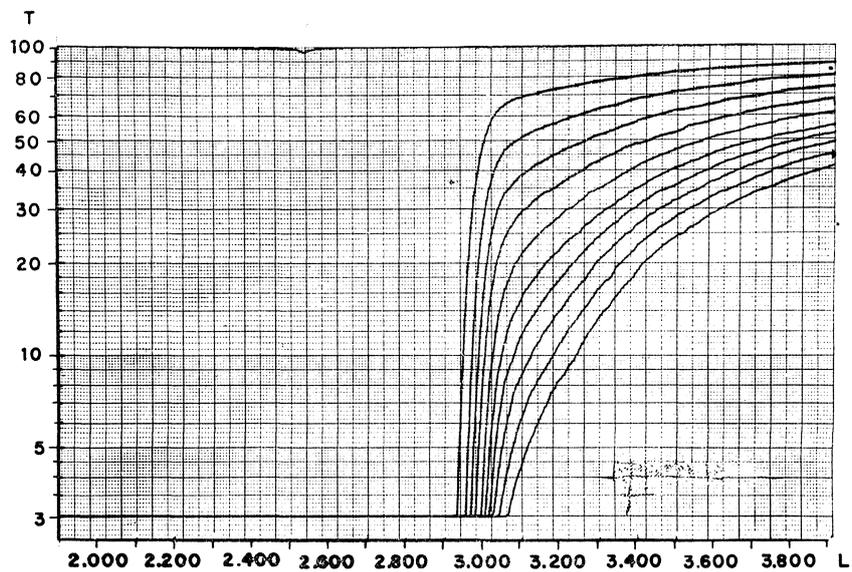


Figura 9. Curvas de transmitancia en función de la longitud de onda. Metacrilato

tro gráfico obtenemos las curvas correspondientes a cada plástico y espesor en función de las distintas longitudes de onda de la banda (*figuras 4-9*).

Anteriormente a la realización de esta experiencia sistemática hemos efectuado un estudio previo, con el fin de comprobar si el material y método cumplían la ley de Lambert y si los fenómenos ópticos secundarios no interferían la calidad de los resultados, habiendo podido comprobar que las correspondientes absorciones se disponen en funciones lineales, lo que nos demuestra el cumplimiento de la citada ley y la escasa importancia de las interferencias ópticas. En los *cuadros 14-15* expresamos los coeficientes de absorción calculados, así como sus errores absolutos y relativos; a partir de estos coeficientes y teniendo en cuenta la ley de Lambert, podremos calcular las transmisiones para cada plástico y espesor.

Partiendo de las mediciones espectrofotométricas y por medio del cálculo de correlación, queda demostrado que la absorbancia es función lineal del espesor, con lo que se cumple la ley de Lambert:

$$E = E_0 \cdot e^{-\alpha_\lambda z}$$

de donde:

$$A_\lambda = K_\lambda z \quad \text{con: } K_\lambda = \alpha_\lambda \log e$$

es decir, que la relación entre la absorbancia y el espesor, para una longitud de onda dada, es lineal.

Los coeficientes de correlación difieren de 1 en menos de una diezmilésima en el 80 % de los casos y de algunas milésimas en el resto, o sea que quedan demostradas la linealidad y la correlación directa.

La energía que llega a un pocillo a través de determinado plástico es la suma de los productos de las energías de cada una de las zonas consideradas por la transmisión que para esta zona presenta la citada lámina de plástico. Los *cuadros 16-17* expresan en  $\mu W/cm^2$  esta energía, para cada espesor y plástico. En ellas la columna N hace referencia simplemente al número de láminas de plástico que supone cada espesor; las columnas z expresan el espesor en diezmilésimas de centímetro, para los sucesivos plásticos que en el título superior se indican; finalmente, en las columnas E se relacionan las correspondientes energías calculadas. Esta dependencia entre la energía transmitida y el espesor del plástico utilizado, se hace patente en la *figura 10*. En ella se observa que a pesar de los enormes espesores del metacrilato, éste permite el paso de energía en cantidad suficientemente importante como para presumir que es el que reúne mejo-

Cuadro 14

$\lambda$	Cloruro de polivinilo			Polietileno			Polipropileno		
	$\alpha_\lambda$	$\pm \Delta\alpha_\lambda$	$\frac{\Delta\alpha_\lambda}{\alpha_\lambda}$	$\alpha_\lambda$	$\pm \Delta\alpha_\lambda$	$\frac{\Delta\alpha_\lambda}{\alpha_\lambda}$	$\alpha_\lambda$	$\pm \Delta\alpha_\lambda$	$\frac{\Delta\alpha_\lambda}{\alpha_\lambda}$
2.389	2.555,87	11,50	0,45	166,02	1,86	1,12	151,05	2,05	1,36
2.464	633,42	3,93	0,62	143,06	1,67	1,17	126,34	1,68	1,32
2.483	449,14	2,46	0,57	138,85	1,46	1,05	123,72	1,73	1,40
2.537	253,42	1,80	0,71	133,92	1,45	1,08	115,87	1,65	1,42
2.576	200,42	1,26	0,63	130,42	1,33	1,02	113,36	1,44	1,27
2.654	160,72	2,38	1,48	123,58	1,32	1,07	96,89	1,19	1,23
2.700	157,52	2,14	1,36	118,49	1,10	0,93	91,78	1,06	1,15
2.753	153,08	2,14	1,40	114,44	1,10	0,96	87,89	0,97	1,10
2.804	136,20	1,72	1,26	113,56	1,14	1,00	82,80	0,99	1,19
2.894	75,43	0,88	1,17	99,75	0,87	0,87	69,17	0,76	1,10
2.926	59,59	0,66	1,10	96,69	0,78	0,81	63,90	0,69	1,09
2.967	44,99	0,42	0,94	92,70	0,67	0,72	58,09	0,57	0,98
3.022	36,27	0,30	0,82	90,42	0,68	0,75	51,90	0,45	0,87
3.129	30,33	0,23	0,75	83,88	0,56	0,67	41,29	0,31	0,75
3.200	26,57	0,21	0,80	82,20	0,59	0,72	37,03	0,26	0,70
3.300	23,65	0,16	0,67	77,16	0,65	0,84	33,99	0,24	0,72
3.400	19,55	0,14	0,71	73,50	0,78	0,92	32,51	0,21	0,64
3.500	16,74	0,11	0,65	70,46	0,57	0,81	30,74	0,22	0,73
3.600	15,70	0,10	0,63	67,56	0,56	0,83	29,40	0,18	0,60
3.700	14,25	0,10	0,69	53,97	0,37	0,68	28,64	0,17	0,58
3.800	12,76	0,09	0,74	62,77	0,41	0,66	26,80	0,18	0,69
3.900	12,39	0,08	0,62	61,11	0,37	0,61	27,12	0,19	0,71

Cuadro 15

$\lambda$	Acetato de celulosa			Triacetato de celulosa			Metacrilato		
	$\alpha_\lambda$	$\pm \Delta\alpha_\lambda$	$\pm \frac{\Delta\alpha_\lambda}{\alpha_\lambda}$	$\alpha_\lambda$	$\pm \Delta\alpha_\lambda$	$\pm \frac{\Delta\alpha_\lambda}{\alpha_\lambda}$	$\alpha_\lambda$	$\pm \Delta\alpha_\lambda$	$\pm \frac{\Delta\alpha_\lambda}{\alpha_\lambda}$
2.389									
2.464									
2.483									
2.537				976,30	5,86	0,60			
2.576				506,57	3,80	0,75			
2.654				247,53	2,20	0,89			
2.700				114,21	0,72	0,63			
2.753				62,08	0,84	1,36			
2.804	2,417,71	15,23	0,63	53,26	0,67	1,25			
2.894	1,358,53	7,88	0,58	27,49	0,19	0,72			
2.926	472,95	3,26	0,69	22,54	0,17	0,76	44,99	2,02	0,45
2.967	115,68	0,82	0,71	18,74	0,15	0,80	5,46	0,72	1,32
3.022	41,45	0,34	0,83	16,44	0,11	0,65	0,26	0,21	0,94
3.129	23,14	0,19	0,80	13,47	0,09	0,67	1,43	0,10	0,73
3.200	19,55	0,15	0,79	11,70	0,07	0,59	1,22	0,08	0,67
3.300	16,58	0,12	0,74	9,99	0,06	0,63	0,97	0,06	0,60
3.400	14,48	0,09	0,63	9,26	0,06	0,64	0,81	0,06	0,72
3.500	12,99	0,09	0,72	8,68	0,07	0,76	0,69	0,06	0,81
3.600	12,07	0,07	0,60	8,27	0,05	0,62	0,60	0,04	0,65
3.700	11,51	0,07	0,64	8,01	0,05	0,68	0,53	0,04	0,82
3.800	10,98	0,08	0,71	7,69	0,05	0,71	0,46	0,03	0,76
3.900	10,57	0,09	0,82	7,62	0,06	0,77	0,41	0,02	0,64

Cuadro 16

N	Cloruro de polivinilo		Politeno		Polipropileno	
	z	E	z	E	z	E
1	109,05	25,327	40	73,964	70,35	58,574
2	218,10	3,371	80	44,339	140,70	28,165
3	327,15	1,190	120	26,639	211,05	13,779
4	436,20	0,591	160	16,042	281,40	6,852
5	545,25	0,346	200	9,683	351,75	3,480
6	654,30	0,217	240	5,860	422,10	1,808
7	763,35	0,140	280	3,555	492,45	0,963
8	872,40	0,093	320	2,163	562,80	0,528
9	981,45	0,062	360	1,319	633,15	0,298
10	1.090,50	0,041	400	0,807	703,50	0,163

Cuadro 17

N	Acetato de celulosa		Triacetato de celulosa		Metacrilato	
	z	E	z	E	z	E
1	94,95	0,207	129,65	12,134	1.944,55	1,188
2	189,90	0,699	259,30	5,355	3.889,10	0,657
3	284,85	0,467	388,95	3,128	5.833,65	0,411
4	379,80	0,341	518,60	2,064	7.778,20	0,279
5	474,75	0,260	648,25	1,439	9.722,75	0,198
6	569,70	0,203	777,90	1,043	11.667,30	0,145
7	664,65	0,160	907,55	0,777	13.611,85	0,107
8	759,60	0,127	1.037,20	0,591	15.556,40	0,080
9	854,55	0,101	1.166,85	0,456	17.500,95	0,060
10	949,50	0,080	1.296,50	0,355	19.445,50	0,045

res condiciones para su esterilización. Todo lo contrario sucede con el acetato de celulosa, que ocupa la otra posición extrema y presenta energías transmitidas de igual magnitud que las del metacrilato, para espesores 20 veces inferiores. Los otros cuatro ocupan posiciones intermedias de difícil comparación.

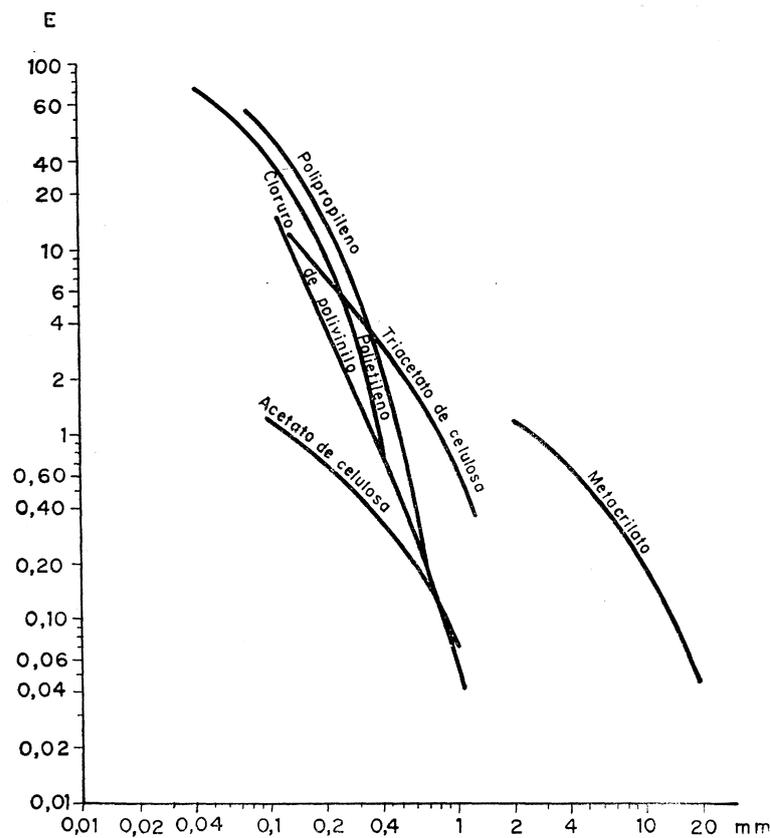


Figura 10. Energía transmitida a través de los plásticos en función del espesor

### COMPARACION DE RESULTADOS

A partir de los resultados biológicos (porcentajes de supervivencia del germen patrón expuesto a las radiaciones ultravioletas a través de los distintos plásticos y espesores) o de los resultados físicos (porcentajes de

transmisión para cada uno de los plásticos en función de sus espesores y longitudes de onda) y teniendo un conocimiento preciso de la energía radiante ultravioleta de acción germicida y de la curva de letalidad en nuestro sistema, podremos confeccionar unos cuadros que nos expresen los tiempos y energías necesarios para producir esterilidad en cada uno de los plásticos y espesores. En los *cuadros 18-19* se citan estos valores de tiempo y energía obtenidos a partir de los resultados biológicos, y en los *cuadros 20-21* dichos valores obtenidos a partir de los resultados físicos.

De la comparación de dichos cuadros resulta de forma evidente la coincidencia de resultados en las dos vías resolutivas, dentro de ciertos márgenes previstos en los cálculos de error.

En la *figura 11* se expresan las curvas correspondientes a cada uno de los distintos plásticos en función de los espesores y de la energía germicida transmitida, estableciendo asimismo relación con los tiempos y energías totales de aplicación necesarios para obtener letalidad total.

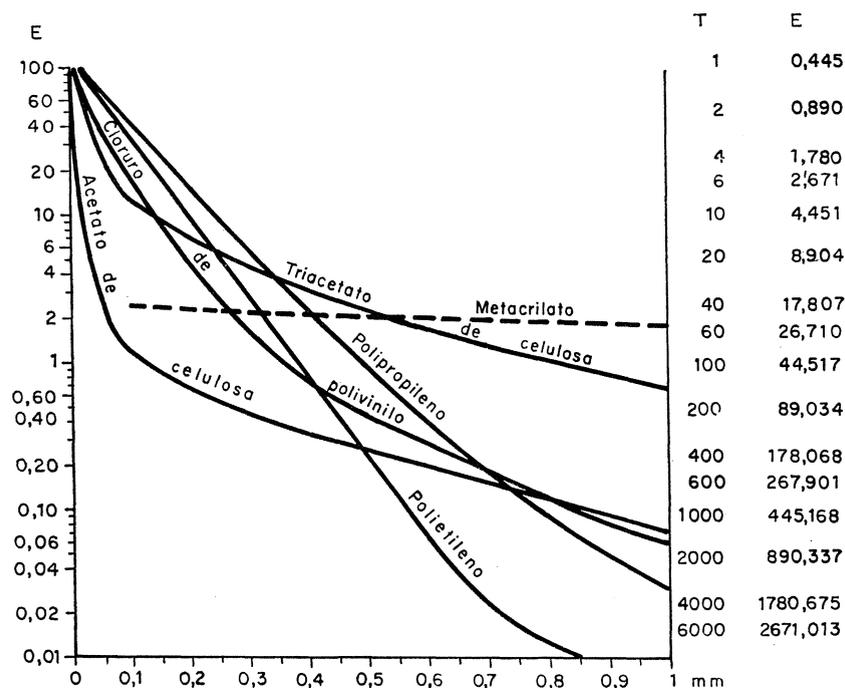


Figura 11. Estudio comparativo de la energía transmitida a través de los plásticos

Cuadro 18

Cloruro de polivinilo			Politeno			Polipropileno		
Espesor 0,0001 cm	Horas y minutos	<i>J</i>	Espesor 0,0001 cm	Horas y minutos	<i>J</i>	Espesor 0,0001 cm	Horas y minutos	<i>J</i>
109,05	5,27	2,423	40	1,11	0,525	70,35	1,29	0,659
218,10	25,18	11,260	80	2,02	0,902	140,70	3,05	1,369
327,15	76,46	34,171	120	3,20	1,484	211,05	6,17	2,800
436,20	141,43	63,086	160	5,25	2,412	281,40	12,16	5,457
545,25	219,06	97,538	200	9,13	4,101	351,75	25,10	11,200
654,30	321,15	143,009	240	14,44	6,562	422,10	52,22	23,309
763,35	431,55	192,276	280	26,27	11,774	492,45	87,33	38,977
872,40	658,54	293,335	320	42,10	18,770	562,80	171,57	76,544
981,45	618,17	275,243	360	71,18	31,742	633,15	282,52	126,370
1.090,50	1.479,15	658,779	400	103,52	46,243	703,50	343,14	152,797

Cuadro 19

Acetato de celulosa			Triacetato de celulosa			Metacrilato		
Espesor 0,0001 cm	Horas y minutos	<i>J</i>	Espesor 0,0001 cm	Horas y minutos	<i>J</i>	Espesor 0,0001 cm	Horas y minutos	<i>J</i>
94,95	79,19	35,313	129,65	7,23	3,289	1.944,55	68,14	30,375
189,90	128,35	57,244	259,30	16,36	7,387	2.889,10	120,31	53,652
284,85	208	92,593	388,95	28,18	12,597	5.833,65	172,36	76,837
379,80	243,19	108,317	518,60	42,47	19,045	7.778,20	233,52	104,108
474,75	322,24	143,520	648,25	62,31	27,829	9.722,75	330,40	147,200
569,70	384,8	171,002	777,90	88,9	39,244	11.667,30	311,17	138,570
664,65	310,12	138,094	907,55	122,59	54,749	13.611,85	451,21	200,928
759,60	444,41	197,958	1.037,20	159,12	70,873	15.556,40	485,19	216,051
854,55	507,6	225,761	1.166,85	173,56	77,429	17.500,95	601,48	267,903
949,50	427,49	190,453	1.296,50	244,38	108,904	19.445,50	820,38	385,323

Cuadro 20

Cloruro de polivinilo				Politeno			Polipropileno		
Esesor 0,0001 cm	Horas y minutos	J		Esesor 0,0001 cm	Horas y minutos	J	Esesor 0,0001 cm	Horas y minutos	J
109,05	5,53	2,620		40	1,13	0,543	70,35	1,32	0,686
218,10	26,47	11,921		80	2,02	0,906	140,70	3,12	1,427
327,15	75,51	33,769		120	3,23	1,509	211,05	6,33	2,916
436,20	152,45	67,996		160	5,38	2,555	281,40	13,10	5,865
545,25	260,54	116,143		200	9,19	4,150	351,75	25,56	11,548
654,30	416	185,187		240	15,24	6,858	422,10	49,56	22,227
763,35	644,47	287,050		280	25,24	11,304	492,45	93,44	41,730
872,40	970,39	432,103		320	41,44	18,579	562,80	170,58	76,109
981,45	1,455,58	648,153		360	68,26	30,487	633,15	302,55	134,851
1.090,50	2.201,43	980,133		400	111,52	49,796	703,50	521,48	232,286

Cuadro 21

Acetato de celulosa			Triacetato de celulosa			Metacrilato		
Espesor 0,0001 cm	Horas y minutos	<i>J</i>	Espesor 0,0001 cm	Horas y minutos	<i>J</i>	Espesor 0,0001 cm	Horas y minutos	<i>J</i>
94,95	74,47	33,293	129,65	7,26	3,312	1.944,45	75,59	33,826
189,90	129,09	57,490	259,30	16,51	7,504	3.889,10	137,24	61,165
284,85	193,18	86,050	388,95	28,51	12,847	5.833,65	219,38	97,975
379,80	264,43	117,846	518,60	43,44	19,470	7.778,20	323,33	114,034
474,75	247,12	154,560	648,25	62,44	27,926	9.722,75	455,55	202,957
569,70	444,41	197,958	777,90	86,33	38,529	11.667,30	622,33	277,142
664,65	564,11	251,160	907,55	116,11	51,719	13.611,85	843,39	375,566
759,60	710,47	316,422	1.037,20	152,45	67,996	15.556,40	1.128,23	502,320
854,55	893,46	397,876	1.166,85	197,58	88,126	17.500,95	1.504,30	669,761
949,50	1.128,23	502,320	1.296,50	254,17	113,199	19.445,50	2.006	893,013

## CONCLUSIONES

Del estudio crítico y comparativo de todos los datos obtenidos en nuestro trabajo, podemos concluir con lo siguiente:

Los plásticos estudiados son transparentes, dentro de amplios márgenes, a la radiación ultravioleta de acción germicida.

Su transparencia disminuye exponencialmente con el espesor, de acuerdo con la ley de Lambert, específicamente para cada longitud de onda. En conjunto, la relación entre energía que se transmite y espesor es de carácter exponencial.

El grado de transparencia viene sujeto a la longitud de onda de la radiación y a las características estructurales y constitucionales de cada plástico.

En general, para espesores suficientemente pequeños, la transparencia es excelente para todos los plásticos y en especial para el polietileno y el polipropileno. Para espesores mayores, sólo merecen atención los que presentan el metacrilato y el triacetato de celulosa, a los cuales sigue, en muchísima menor importancia, el acetato de celulosa y el cloruro de polivinilo.

Existe, por tanto, posibilidad de esterilización de los plásticos estudiados por transparencia a la radiación ultravioleta de acción germicida, dentro de ciertos márgenes de tiempo y espesor.

## RESUMEN

La marcada acción germicida de las radiaciones ultravioletas, y la posible transparencia de los materiales plásticos a dichas radiaciones, inducen a considerar como factible su empleo en la esterilización de recipientes herméticos, constituidos por tales materiales.

El estudio del problema se plantea bajo dos ángulos distintos, microbiológico y físico, cuyo punto de entronque común es la curva de letalidad del sistema de trabajo. En el aspecto microbiológico, se obtienen porcentajes de supervivencia para tiempos dados de exposición, por recuentos sistemáticos de gérmenes viables después de haber sido expuesta la suspensión a las radiaciones ultravioletas, a través de opérculos de plástico. Por el estudio físico, se hallan las transmisiones de los plásticos, a diferen-

tes longitudes de onda y para distintos espesores, lo que permite conocer la energía transmitida a través de ellos en función del espesor.

Ambos métodos son soluciones completas al problema y en sus últimas consecuencias son coincidentes dentro de sus márgenes de error. Comprobada la concordancia de resultados, se estima por discusión de ellos, si son suficientemente representativos como para concluir con la capacidad esterilizante del método.

### SUMMARY

The marked germicide action of U.V. radiations and the possible transparency of plastic materials to these radiations, induce to consider as feasible their use in the sterilization of hermetical containers, constituted for such materials.

The study of the problem has two different aspects Microbiological and Physical, their common junction point being the lethality curve of the working system. In the microbiological aspect survival percentages are obtained, for given exposure times, through systematic counts of viable germs after the suspension has been exposed to U.V. radiations, through plastic operculums. Through the physical study the transmissions of plastics are found, at different wave lengths and for different thicknesses, which permits to know the energy transmitted through them as a function of thickness.

Both methods constitute complete solutions to the problem, and in their last consequences they coincide within their error margins. After checking the agreement of results, it is estimated through the discussion of same, whether they are sufficiently representative to determine the sterilizing capacity of the method.

### BIBLIOGRAFIA

1. AUTIAN, J. 1960. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 18, 329.
2. AUTIAN, J. 1961. *Drug Std.*, 101.
3. AUTIAN, J., y colaboradores. 1963. *J. Pharm. Sci.*, 52, 1.
4. BARKMAN, R., y colaboradores. 1960. *Fr. Pharm.*, 11, 65.
5. BONET-MAURY, P. 1963. *Ann. Pharm. Fr.*, 21, 2.
6. BRAUN, J. 1963. *Fármaco Ed. Prat.*, 18, 285.

7. DEL POZO, A., y FAULI, C. 1965. *Galénica Acta*, XVIII, 107.
8. DENOEL, A., y colaboradores. 1960. *J. Pharm. Belg.*, 11, 384.
9. DORROIS, Y. 1961. *Labo-Pharma*, 84, 23.
10. *Drug Std.* 1960. 103.
11. GALBRAITH, A. D., y KITCHEN, E. A. 1962. *Tappi*, 45, 173.
12. JAMINET, F., y colaboradores. 1960. *Rev. Port. Farm.*, X, 178.
13. JAWETZ, E.; MELNICK, J. L., y ADELBERG, E. A. 1964. *Rev. Med. Microbiol.*
14. KELWETTER, A., y MACARELLI, E. 1963. *Farmaco*, 18, 475.
15. KIM, H. K., y AUTIAN, J. 1960. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, Comunicación personal.
16. KUMINS, C. A., y ROTEMAN, K. 1961. *J. Cienc. Polimérica*, 55, 683.
17. LOT, F. 1963. *Moniteur*, 561, 423.
18. MAJOR, C. J., y KAMMERMEYER, K. 1962. *Mod. Plastics*, 39, 135.
19. MECARELLI, E. 1962. *Farmaco, Ed. Prat.*, XVII, 5, 300.
20. MONICA, P. 1961. *Corriere Farm.*, 3, 43.
21. MYERS, A. W.; MEYER, J. A.; STANNETT, V., y SZWARC, M. 1961. *Tappi*, 44, 58.
22. PAGANI, G. 1960. *Farmaco Ed. Prat.*, 2, 116.
23. PARLIMAN, J. H. 1961. *Farmaco Ed. Prat.*, 34, 112.
24. PETENELLA, G. 1963. *Farmaco Ed. Prat.*, XVIII, 347.
25. RODENYS, A. 1963. *J. Pharm. Belg.*, sept-oct., 504.
26. THOMAS, J. J., y colaboradores. 1962. *J. Pharm. Belg.*, 17, 59.
27. VENTIN, M. 1962. *Comunicaciones, Reunión Científica de Microbiólogos Españoles*, Madrid.
28. VENTIN, M. 1963. *Comunicaciones libres y a las ponencias de la II Convención Bienal de la Industria Farmacéutica Nacional*, Madrid.
29. VENTIN, M. 1963. *Comunicaciones libres y a las ponencias de la II Convención Bienal de la Industria Farmacéutica Nacional*, Madrid.
30. VENTIN, M. 1964. *Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino*, Ferrara-Venecia.

LABORATORIOS ALTER  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN  
SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA

## VALORACION DE CLORANFENICOL CON *BACILLUS CEREUS*

por

F. FERNÁNDEZ

### INTRODUCCION

En los procedimientos microbiológicos para valorar el cloranfenicol se emplea corrientemente como germen de ensayo la *Sarcina lutea* (1-2). También ha sido utilizado el *Bacillus subtilis* (7).

Desde hace años manejamos en nuestro laboratorio una raza de *Bacillus cereus* aislada e identificada por nosotros, para valorar las tetraciclinas. Habiendo ensayado dicho organismo frente al cloranfenicol, pudimos observar que daba lugar a magníficos halos de inhibición, con una sensibilidad suficiente como para que pudiera emplearse en la valoración de dicho antibiótico por el método de difusión en agar.

En este trabajo presentamos el procedimiento llevado a cabo para obtener una curva patrón, junto con el estudio estadístico subsiguiente.

### MATERIAL Y METODOS

El inóculo se prepara a partir de una suspensión de esporas. Dicha suspensión puede obtenerse por el procedimiento que indica la Farmacopea Británica (1) y la cantidad que se añade al medio de ensayo se averigua la primera vez mediante tanteo y esto sirve de orientación para todas las veces que se use la misma suspensión. El medio de ensayo es el medio A

de la Farmacopea Británica, ajustado a pH 6,6 y se utiliza en una sola capa. El tampón empleado para efectuar las disoluciones fue de fosfatos 1 %, pH 6, habiéndose obtenido previamente una solución en alcohol, de 10 mg/cm<sup>3</sup>, como indica la Farmacopea de los Estados Unidos (9).

Los demás detalles técnicos en lo que se refiere al empleo de placas grandes, confección de los pocillos, etc., son análogos a los descritos en un trabajo publicado anteriormente (3).

Para la curva patrón se emplearon cinco concentraciones diferentes, en progresión geométrica, lo cual nos permite el empleo de coeficientes polinomiales u ortogonales en el cálculo estadístico. En este caso, la relación entre las concentraciones fue de 1,3, siendo la más pequeña de 38,53  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  y la mayor de 110  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

El planteo utilizado para distribuir las distintas concentraciones fue en forma de cuadrado latino, con cinco lecturas para cada concentración.

La temperatura de incubación fue la de 30 °C, durante un período de, aproximadamente, dieciocho horas.

El crecimiento del germen en las placas fue perfectamente homogéneo y los halos de inhibición que se obtuvieron resultaron nítidos y de borde bien definido.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el *cuadro 1* pueden verse los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones.

*Cuadro 1*

Concentraciones, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	38,53	50,01	65,10	84,61	110,00
Logaritmos de las concentraciones	1,5858	1,6997	1,8136	1,9275	2,0414
Coefficientes polinomiales	-2	-1	0	+1	+2
Resultados en milímetros	18,3	19,8	21,4	23,2	24,8
	18,6	19,8	21,6	23,2	24,8
	18,2	20,0	21,8	23,3	24,6
	18,2	20,0	21,9	23,1	25,0
	18,0	20,1	21,6	23,4	25,0
Totales	91,3	99,7	108,3	116,2	124,2
Medias	18,26	19,94	21,66	23,24	24,84

Como en otras ocasiones, vamos a emplear coeficientes polinomiales en vez de los logaritmos de las concentraciones.

Para el estudio estadístico de los resultados expuestos en el *cuadro 1* nos servimos de las mismas fórmulas y procedimientos que en trabajos anteriores (2-6).

*Cálculo de la línea de regresión*

Debido a que empleamos coeficientes polinomiales, el coeficiente de regresión viene dado por la fórmula

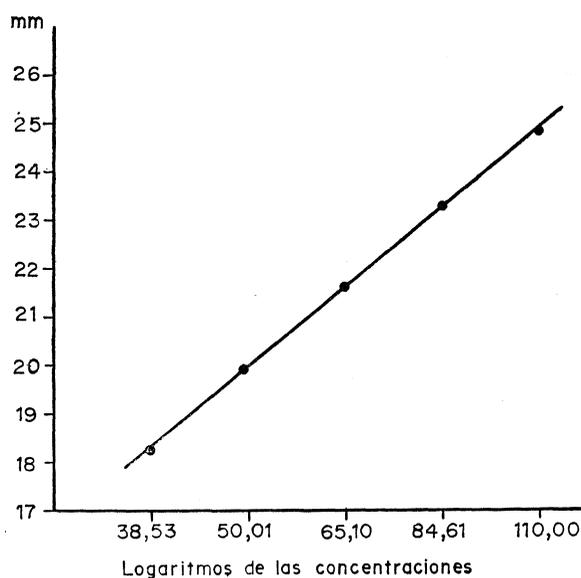
$$b = \frac{S(XZ)}{S(X^2)}$$

El valor calculado para b es de 1,646. Esto quiere decir que la ecuación para la línea de regresión será:

$$Z = \bar{Z} + 1,646 X$$

$$Z = 21,588 + 1,646 X$$

En la *figura 1* puede verse la línea de regresión correspondiente a la ecuación anterior.



*Figura 1*

*Análisis de la varianza*

En el *cuadro 2* puede verse el análisis de varianza efectuado teniendo en cuenta las fuentes de variación que se reseñan.

*Cuadro 2*

Fuentes de variación	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Razón de la varianza (F)	
				Calculada	P=0,95
Total	136,0834	24			
Entre concentraciones	135,5064	4	33,8766		
Regresión	135,4658	1	135,4658	4777,98	4,35
Desviación de la linealidad	0,0406	3	0,01015	0,358	3,10
Error experimental	0,5670	20	0,02835		

Como se observa, la regresión es altamente significativa, ya que el valor calculado para F es muy superior al valor tabulado, y no existe desviación significativa en la linealidad, ya que el valor calculado es menor que el tabulado. Como el valor de F para la desviación de la linealidad es de 0,358 y en las tablas para F no se encuentran valores menores a la unidad, tomamos el valor inverso, 2,79, para el que corresponde un valor tabulado de 5,70. Esto quiere decir que aunque las variaciones encontradas para la linealidad son menores que las que podrían esperarse del error experimental, no lo son tanto que esto deba atribuirse a defecto en la técnica del ensayo.

*Comentario final*

Para las valoraciones rutinarias, utilizamos un ensayo del tipo  $2 \times 2$  con las concentraciones de 40 y 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , o bien las de 50 y 100  $\mu\text{g}$ . En cada placa pueden incluirse 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, seguimos las fórmulas e indicaciones de la Farmacopea Británica.

## CONCLUSIONES

A la vista de lo anteriormente expuesto, puede valorarse el cloranfenicol con el *Bacillus cereus* Alter, 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 convenientes.

## RECONOCIMIENTO

Mi agradecimiento, en primer lugar, para la Dirección Técnica de Alter, S. A., por las facilidades dadas para la publicación de este trabajo. Agradezco también la colaboración entusiasta de la Srta. Marina López de Carrión, a cuyo cargo corrió la parte práctica de las experiencias realizadas.

## RESUMEN

Se estudia la valoración microbiológica de cloranfenicol con *Bacillus cereus* Alter, por el método de difusión en agar y mediante el empleo de pocillos. Las concentraciones utilizadas para la obtención de una curva patrón estaban comprendidas entre  $38,53 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  y  $110 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Se produjeron 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 cinco concentraciones ensayadas. Se describe el análisis estadístico llevado a cabo, que comprende el cálculo de la regresión y el análisis de varianza de los resultados obtenidos.

## SUMMARY

The microbiological assay of chloramphenicol with *Bacillus cereus* Alter is studied by the agar cup diffusion method. Clear, well defined inhibition zones of an appropriated 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. 1968. Biological assay of antibiotics, 1.313.
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 estreptomina y derivados con *Bacillus licheniformis* Alter. Microbiol. Españ., 17, 209.
4. FERNÁNDEZ, F. 1966. Valoración de neomicina con *Bacillus licheniformis*. Microbiol. Españ., 19, 281.
5. FERNÁNDEZ, F. 1969. Valoración microbiológica de cloruro de benzalconio en placa de agar. Microbiol. Españ., 22, 169.
6. FERNÁNDEZ, F., y PIÑA, M. 1968. Valoración de ácido fusídico con *Bacillus licheniformis*. Microbiol. Españ., 21, 39.
7. SMITH, D. G.; LANDERS, C. B., y FORGACS, J. 1950. Cylinder plate assay for chloromycetin in body fluids and tissue extracts. J. Lab. Clin. Med., 36, 154.
8. U. S. Food and Drug Administration. Compilation of regulations for certification of antibiotics drugs. 1962, Apartado 146 d. 301.
9. U. S. Pharmacopoeia. 1965. Biological tests and assays. Antibiotics microbial assays, 832.

CIUDAD UNIVERSITARIA. MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

PRODUCCION DE RIBOFLAVINA  
POR *EREMOTHECIUM ASHBYII* GUILLIERMOND,  
EN JUGO DE *AGAVE* sp.

por

A. SANCHEZ - MARROQUIN (\*), SARA MANRIQUE y LILIA VIERNA

INTRODUCCION

Diversos substratos han sido recomendados para la biosíntesis de riboflavina por *Eremothecium ashbyii* (7, 9, 18-19, 21, 24-25 y 42) con rendimientos que han permitido, en algunos casos, la explotación comercial del proceso. Existe, sin embargo, el inconveniente de que con frecuencia se originan cepas no flavinogénicas, estables, de escasa producción (2, 12, 37 y 43).

Por otra parte, las cepas activas se conservan difícilmente, excepto mediante liofilización (20) aunque con resultados muy pobres (8) o por pases sucesivos a varios medios (17) o cultivo en medios especiales (13).

El rendimiento más alto hasta ahora alcanzado con *Eremothecium ashbyii*, 2.480  $\mu\text{g/ml}$ , es el de Moss y Klein (28) en un medio a base de melazas de caña de azúcar, lentejas y sales, manteniendo el pH estable a 7,0 mediante el suministro gradual de las melazas. La adición de lípidos beneficia los rendimientos (32-33 y 35). En producto seco, los rendimientos que se encuentran señalados en la información científica son de 30 a 60 mg/ml en medios a base de harina de maní y carbohidrato (7) y de 4,000  $\mu\text{g/g}$  en medios con portadores sólidos, como el salvado de trigo (25).

---

(\*) Dirección actual: Facultad de Ciencias (UCV). Departamento de Tecnología. Apartado 59097. Caracas (Venezuela).

Aun cuando la fisiología de esta levadura y la bioquímica del proceso, especialmente desde el punto de vista enzimático, se conocen mejor ahora (1, 4, 14, 19, 23, 29-31 y 39), el conocimiento no ha derivado hacia alguna aplicación especial por lo que respecta al mejoramiento de la producción industrial y los adelantos hasta ahora logrados son indudablemente de base empírica en su mayoría.

En el presente trabajo se estudia un nuevo sustrato, el jugo de *Agave* sp. llamado "aguamiel" en México, para la biosíntesis de riboflavina por *Eremothecium ashbyii* y se ensayan algunos medios para la conservación de las cepas con el propósito de lograr la menor variación posible.

Los principales datos acerca de la obtención del aguamiel de *Agave*, su composición y características generales los hemos consignado en otro trabajo (36).

## MATERIALES Y METODOS

### *Microorganismo y medios de conservación*

La especie estudiada es *Eremothecium ashbyii*, cepa Y-1363, proporcionada por el Dr. L. J. Wickerham (Northern Utilization Research and Development Division, U. S. Dept. of Agriculture, Peoria, Ill.). Se conservó en los medios de Gorodkova, Hanus y Munk (17), Golysheva (13) y Fraile y Zurita (12) que se indican en el cuadro 1, y en los medios 6 y 7 a base de aguamiel, sustrato que se utilizó luego en las pruebas de fermentación. Las siembras se hicieron en tubos con los medios sólidos y se incubaron a 28 °C durante cuatro-seis días. Periódicamente se resembraban las cepas, y durante un lapso de observación de ciento ochenta días se tomaron porciones del cultivo, para inocularlas a placas de Petri que contenían los mismos medios y poder estimar la flavinogénesis en las colonias desarrolladas después de una incubación a la misma temperatura durante cuatro días. El color anaranjado o amarillo dorado de las colonias se tomó como índice de una buena flavinogénesis para comparar los medios de conservación y las fermentaciones.

### *Preparación del inóculo*

Una porción del cultivo, tomada con asa, se diluyó en 10 ml de agua estéril o solución salina y de aquí se tomaba 1,5 ml de la suspensión para sembrarla en 50 ml del medio de germinación, cuya composición era se-

Cuadro 1. Estimación de la flavinogénesis en 7 medios sólidos de conservación

Componentes	Medio 1 McLaren (*)	Medio 2 Hanus (17)	Medio 3 Gorodkova	Medio 4 Golysheva (13)	Medio 5 Fraile (12)	Medio 6	Medio 7
Peptona	1,0	0,8	0,25		0,5		
Glucosa	1,0				1,0		3,0
Sacarosa		2,0	1,0	2,0		2,0	
Extracto de carne							
Extracto de levaduras	0,1	1,0					
Cloruro sódico			0,50				
Tiamina	0,1						
Caldo técnico				2,0			
"Corn steep"						1,0	1,0
Aceite de maíz						0,1	0,1
Agua destilada	100	100	100	100	100	100	100
Flavinogénesis (**)	+++	++	+	+++	++	+++	+++

(\*) 1952. J. Bacteriol, 63, 223.

(\*\*) + a +++: intensidad relativa del color, de amarillo intenso a anaranjado.

4 Cuadro 2. Rendimientos de riboflavina en 8 medios de fermentación seleccionados, por una de las cepas más activas de *E. ashbyii*

Componentes	Medios							
	1	2	13	14	24	18	25	27
Aceite de maíz, g	0,05	0,05	0,5	0,5	0,5	1,5	0,5	0,5
Aguamiel (5° Brix), ml	50	50	50	50		50		50
Carbonato cálcico, g		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	50	
Cerelesa, g	0,25				50		0,05	
Fosfato monopotásico, g				0,25		0,25		
Harina de soja, g	1,5							
"Corn steep" (54 % sólidos), g		0,5	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
"Tween 80", g							1,0	
Propionato sódico								0,01 M
Flavinogénesis	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
Riboflavina ( $\mu\text{g/ml}$ )	750	1.800	2.100	1.398	1.410	988	815	890
pH final	5,7	6,7	6,0	6,8	6,3	6,2	7,1	6,7

Aguamiel: tindalizada y luego esterilizada con el medio (115 °C, treinta minutos), matraces de 250 ml con 50 ml de medio. Inóculo: 2 ml (4 %) del cultivo de *E. ashbyii* en medio 2, incubado en agitación, cuarenta y ocho horas, 300 r/m. Temperatura: 28 °C. Tiempo: seis días.

mejante al de Gorodkova, pero con sacarosa en vez de glucosa y contenido en erlenmeyeres de 250 ml. El pH de este medio era de 5,8. Los matraces se llevaron a agitación mecánica a 28 °C durante cuarenta y ocho-setenta y dos horas, y del cultivo obtenido se tomaron partes alícuotas para sembrar los medios de fermentación en proporción de 1,5 a 3 %, según el caso. En algunos experimentos, el cultivo de los medios de germinación se pasaba a uno de prefermentación mantenido cuarenta y ocho horas a 28 °C en agitación y de aquí al de fermentación en proporción de 1-3 %.

#### *Fermentaciones*

Las fórmulas de los medios de fermentación, que también se utilizaron en los de prefermentación, se indican en el *cuadro 2*. El pH inicial fue de 5,8-6,5. Las fermentaciones en matraces se realizaron con agitación a 300 r/m, durante cinco-siete días, a 28 °C. En las efectuadas en tanques, la agitación se efectuó a 350-500 r/m y se administró, además, aire estéril en proporción que varió según el experimento, indicándose en los cuadros correspondientes su magnitud.

#### *Geometría de los tanques*

Los de 25 l tenían las características siguientes:  $D_i = 0,15$  m;  $D_t = 0,27$  m;  $H_1 = 0,315$ ; 4 "baffles"; 1 difusor tubular y 2 impulsores de paleta. El de 300 l las siguientes:  $D_i = 0,17$  m;  $D_t = 0,66$  m;  $H_1 = 0,70$  m; 2 "baffles", 1 difusor tubular y 2 impulsores de paleta.

#### *Esterilización*

La de los medios contenidos en los matraces se efectuó en autoclave a 120 °C, durante veinte-treinta minutos. La de los tanques se hizo por medio de las líneas de vapor, durante dos horas.

#### *Valoraciones*

La estimación de la flavinogénesis en las placas de Petri se hizo por comparación visual del color desarrollado, y la de los medios líquidos de fermentación por el mismo procedimiento y por observación a la luz ultravioleta de onda larga, seleccionando las de mayor fluorescencia verde-

azul cuando el color original en las placas era amarillo intenso o anaranjado.

Para la cuantificación de la riboflavina en los substratos seleccionados se siguió el método fluorométrico (5) mediante fotofluorómetro de Beckman, a 363 m  $\mu$ , comparando con patrones de riboflavina qp. Las muestras se hidrolizaron previamente en autoclave, a 100 °C, durante treinta minutos, a pH 4,5-4,7 (regulador de acetatos). Las muestras hidrolizadas se diluyeron luego para las determinaciones. Para algunas de las muestras se utilizó fluorómetro de Coleman, modelo 12, comparando con riboflavina Hoffman-La Roche (0,4  $\mu$ g/ml). Ocasionalmente, los resultados se verificaron por el método microbiológico (5).

El pH se determinó en un potenciómetro de Beckman. Los azúcares reductores totales, por el método de Somogyi (41).

El peso del micelio se obtuvo centrifugando una parte alícuota, lavando una vez con HCl 0,1N y dos veces con agua destilada y secando finalmente a 90 °C, durante toda la noche.

La viscosidad aparente se calculó según el método de Metzner y Otto (27), de las mediciones de esfuerzo cortante y gradiente de la fuerza practicadas con viscosímetro rotacional de Brookfield, modelo LTV, y de los requerimientos de potencia de los agitadores.

La estimación de la intensidad de la absorción de oxígeno (OAR) en los fermentadores se practicó de acuerdo con el procedimiento de Cooper y colaboradores (10) y la modificación de Bartholomew y colaboradores (6). El cálculo del coeficiente específico de la absorción de oxígeno (Kv) se efectuó según estos mismos investigadores.

### *Concentrado*

El material obtenido en el tanque de 300 l se sometió a evaporación a 92 °C y 1 kg de presión hasta 49,7 % de sólidos. El producto se desecó luego en secador de rocío de Swenson y se molió en un molino eléctrico, obteniéndose un polvo marrón-dorado muy fino, que se conservó en refrigeración durante algún tiempo. Finalmente, se sometió a análisis próximo (5) y determinación de riboflavina.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En las pruebas de flavinogénesis se reveló luego la variabilidad de la cepa original al cambiar el color de las colonias, pues no siempre era posible duplicar los rendimientos a igualdad de color o de condiciones. No obstante, las pruebas de flavinogénesis en placas de Petri fueron la mejor guía para la selección y pronto se comprobó que existía una relación estrecha entre el color naranja o dorado (y aun el amarillo intenso) y la actividad, pues los rendimientos fueron casi siempre superiores en los cultivos derivados de colonias de ese color, hecho ya observado repetidas veces (3, 12 y 17).

En los medios líquidos de fermentación, el color y la fluorescencia fueron también buenos indicadores de la producción de la vitamina, pues se observó una aceptable correlación.

Respecto a la validez de los medios utilizados para conservar las cepas flavinogénicas (*cuadro 1*), no fue posible establecer una jerarquización definitiva, pues al comparar la media del porcentaje de colonias anaranjadas y los intervalos de confianza, según Snedecor (40), para la distribución en T de Fisher, no se obtuvieron datos significativos y, por tanto, creemos que tienen prácticamente el mismo valor los medios 1, 4, 5, 6 y 7.

Suponemos, en cambio, basándonos en algunas observaciones, que existen ciertos factores biológicos relacionados con el ciclo de la levadura, p. e., la fase de producción de ascas y ascosporas o bien factores bioquímicos. Entre éstos estarían: a) el cambio de la respiración terminal del tipo citocromo al tipo flavoproteína con sobreproducción del grupo flavínico, como supone Kapralek (23); b) la incorporación de adenina para constituir el anillo de purina, intermediario obligatorio de la biosíntesis de la vitamina (26 y 38-39), siendo este intermediario probablemente la isoaloxazina (34); y c) la presencia de activadores de la síntesis como ciertos ácidos grasos y agentes tensioactivos (29-31), biotina (11 y 37), diamino-uracilo (15-16), serina (14) y lípidos (32-33 y 35).

Al relacionar la flavinogénesis con el rendimiento real de riboflavina en 45 medios de fermentación de diferentes formulaciones, fue posible seleccionar seis (*cuadro 2*), que mostraron rendimientos superiores a los medios 1 y 24 tomados como referencia, ya que contienen cerelesa en vez del aguamiel.

Los medios 2, 13 y 14, que dieron los rendimientos máximos en ma-

traces, contenían propiamente los materiales que pueden considerarse fundamentales para la buena producción de la vitamina, o sea, aceite de maíz y "corn steep liquor". Estos datos y otros más, derivados del estudio particular de la influencia de la concentración de esos componentes, revelaron que la fórmula 13 conducía a resultados un poco más constantes, tomando en cuenta la variabilidad habitual de la cepa, y siempre superiores a los de los otros medios. Asimismo, se puso de manifiesto que los rendimientos altos coincidían con un pH final superior a 6,0.

Por otra parte, en estudios previos para estudiar la influencia del inóculo, la temperatura y el pH inicial en los 6 medios seleccionados, se apreció que los máximos rendimientos ocurrieron cuando la concentración de inóculo de cuarenta y ocho-setenta y dos horas, en los medios 2 ó 13, era de 1 a 4 %; la temperatura, de 28 °C y el pH inicial, de 5,8-6,4, a una agitación de 250-350 r/m, durante cinco-siete días. Por tanto, los experimentos siguientes se efectuaron dentro de esos límites.

El *cuadro 3* muestra la influencia de la procedencia y la edad del inóculo en los rendimientos de riboflavina en pruebas efectuadas en uno de los medios de fermentación seleccionados, el núm. 2, en condiciones óptimas. Cuando el inóculo procedía de placas con los medios 4 ó 6, los rendimientos eran superiores a los obtenidos cuando procedía del medio de McLaren o de la cepa conservada en suelo estéril, pero decrecían con el tiempo que se había utilizado para la conservación hasta un período de ciento ochenta días. Al término de este lapso, la reducción de los rendimientos en los

*Cuadro 3. Influencia de la edad del inóculo de 3 procedencias en el rendimiento de riboflavina ( $\mu\text{g/ml}$ )*

Edad (*)	Inóculo del medio 1	Inóculo del medio 4	Inóculo del medio 6	Inóculo conservado en suelo
48 horas	790	860	969	815
30 días	687	820	949	698
180 días	407	711	817	215

(\*) Tiempo en que los cultivos se estuvieron resemebrando periódicamente. Medio 2 de fermentación, en las mismas condiciones que se indican en el cuadro 2. Las cifras se refieren al promedio de 3 determinaciones.

medios 1, 4 y 6 fue prácticamente de la misma significación, en tanto que la observada en la cepa conservada en suelo era mucho más notable. Sin embargo, hay que aclarar que en este caso la cepa no se sembró ni una sola vez durante los ciento ochenta días, en tanto que en los otros casos se hacían resiembras cada mes o dos meses.

Finalmente, la cinética del proceso se estudió en fermentadores de 25 l con el medio que ofreció resultados más constantes, o sea, el núm. 13, empleando la cepa conservada en el medio 6, seleccionando una subcepa de buena flavinogénesis en placas del mismo medio.

El proceso, llevado a tanques de 300 l, mostró un comportamiento semejante y rendimientos comparables a los de los fermentadores de 25 l.

Los resultados se muestran en el *cuadro 4* y *figura 1*. Como puede apreciarse, el pH final superior a 6,0 fue nuevamente un buen indicador del rendimiento de riboflavina y de la marcha correcta de la fermentación. A las setenta y dos horas, coincidiendo con el máximo desarrollo del hongo, la producción está ya en su fase acelerada para llegar al máximo a las ciento veinte horas. En la fase definitiva de la síntesis, el coeficiente específico de la absorción de oxígeno alcanza su máximo de 0,18 g mol/h l atm. La viscosidad, en cambio, se altera poco y aparentemente no guarda relación estrecha con la biosíntesis, pero, por otra parte, dicha viscosidad, así como el contenido real de azúcar en el aguamiel y algunas de las características físicoquímicas, varían con el lote de aguamiel utilizado y estos factores quizá también tengan que ver en la inconstancia de los resultados a igualdad de condiciones.

*Cuadro 4. Datos sobre la cinética del proceso en el medio 13 (fermentador de 25 l con 5 l de medio)*

Horas	pH	Porcentaje de reductores	Vitamina B <sub>2</sub> µg/ml	Viscosidad cm/s	Peso de micelio g/100 ml
0	6,2	4,8			
48	6,4	2,9	330	30	0,64
72	6,6	1,14	1.700	35	1,27
96	6,9	0,60	2.600	32	1,19
120	7,3	0,18	2.700	25	0,81

Condiciones: las que se indican en la figura 1.

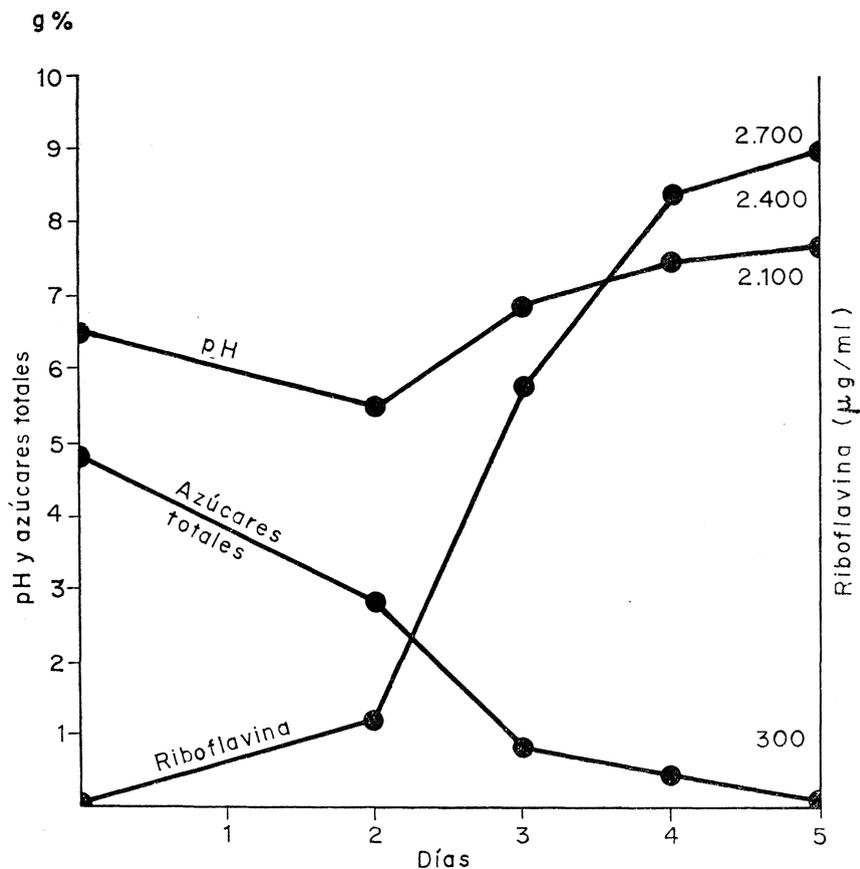


Figura 1. Cinética de la producción de riboflavina en fermentador de 25 l con el medio 13

Finalmente, comparando con otros los rendimientos obtenidos en el presente trabajo, según los datos del *cuadro 5*, resultan ligeramente superiores al máximo consignado en la bibliografía en un sustrato diferente (28). Sin embargo, la cifra de 2.700  $\mu\text{g/ml}$ , que se anota en el cuadro, se alcanzó solamente en un experimento. La cifra más frecuente, según los resultados obtenidos en idénticas condiciones, en experimentos posteriores, es de 2.000  $\mu\text{g/ml}$ , comparable, de todas formas, con los rendimientos más altos logrados en otros sustratos (3, 12, 18, 22, 24, 28 y 32).

Cuadro 5. Rendimientos máximos de riboflavina por *E. ashbyii*, en diversos medios

Medios	Riboflavina $\mu\text{g/ml}$	Días	Referencia
Melazas, lentejas, succinato amónico, cloruro sódico	2.480	7	Moss y Klein (28)
Azúcar morena, neopeptona, extracto de carne, germen de trigo	1.800	7	Pat. Ingl.
Glucosa, extracto de malta, caseína	1.200	4	Phelps (32-33)
Masa de trigo malteada (12,1)	1.000		James (22)
Glucosa, maltosa, harina de trigo y "stillage"	1.350	7	Larsen (24)
Cerelosa (2,5 %), harina de soja (3,0 %) o harina de maní (5 %) (cepa mutante)	1.000	5 ½	Arrieta (3)
Sacarosa, suero de leche, leche descremada	2.200	6	Hendrickx (18)
Cerelosa (3 %), harina de girasol (4. %) o harina de maní (3 %)	1.400	5	Fraile (12)
Aguamiel, "corn steep", aceite de maíz, carbonato cálcico	2.700	5	Este trabajo

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Se presenta un estudio de la producción de riboflavina por *Erethothecium ashbyii* NRRL Y-1363 en diversos medios a base de jugo de *Agave* sp. ("aguamiel") en matraces y en fermentadores de 25 y 300 l, con sistemas de aireación y agitación.

2. En las pruebas de flavinogénesis en placas de Petri se puso de manifiesto la relación estrecha entre la pigmentación anaranjada de las colonias y la producción de la riboflavina en los diversos medios de fermentación estudiados, sin que se hayan apreciado diferencias ostensibles respecto a la efectividad de los medios de conservación empleados, pues todos ocasionaron una reducción en la producción de la vitamina al cabo de ciento ochenta días.

3. Los medios que contenían, además del aguamiel, "corn steep liquor" y aceite de maíz, dieron los rendimientos más altos en todas las condiciones estudiadas.

4. Se seleccionó como el mejor sustrato el siguiente (gramos en 100 ml de aguamiel): aceite de maíz, 1,0; "corn steep", 2,0;  $\text{CaCO}_3$ , 0,10. Inoculado con 1 a 4 % de un cultivo de setenta y dos horas de *Eremothecium ashbyii* en el mismo medio, a 28 °C, en agitación, los rendimientos en fermentadores de 25 y 300 l pueden ser hasta de 2.700  $\mu\text{g/ml}$  a las ciento veinte horas en las condiciones siguientes: temperatura, 28 °C; pH inicial, 5,8-6,4; inóculo, 3,0 %; OAR 21 a 26 mM/l h;  $K_v$ , en torno a 0,18 g mol/h l atm; tiempo de fermentación, cinco-seis días.

5. La cinética del proceso en estas condiciones indica un consumo casi total, desde las setenta y dos horas, de los azúcares presentes, coincidente con el máximo crecimiento de la levadura. Después de esta fase se inicia la producción de la vitamina, siendo particularmente acelerada a las noventa y seis-ciento veinte horas. La viscosidad, en cambio, no parece guardar relación con la biosíntesis.

6. Los rendimientos de riboflavina logrados en este trabajo son comparables a los mejores señalados en la bibliografía científica actual.

#### SUMMARY

1. A study of riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* NRR Y-1363 in different media based on *Agave* sp. ("aguamiel") juice in Erlenmeyer flasks and in 25 and 300 l fermenters with aeration and agitation systems, is presented.

2. For the flavinogenesis tests in Petri dishes, the narrow relationship between the brightest orange pigmentation of the colonies and the riboflavin production was shown without presenting ostensible differences with respect to the effectiveness of the conservation medium used as all caused a reduction in the production of the vitamin after 180 days.

3. The media containing corn steep liquor and corn oil as well as "aguamiel" gave highest riboflavin yields under the conditions studied.

4. The following was selected as the best substrate (grams in 100 ml

of "aguamiel"): corn oil 1.0; corn steep, 2.0; CaCO<sub>3</sub>, 0.10. Inoculated with 1 to 4 % culture of 72 hours of *Eremothecium ashbyii* in the same medium at 28 °C, the riboflavin yields in 25 and 300 l fermenters can be as high as 2700 µg/ml under the following conditions: initial pH, 5,8-6,4; temperature, 28 °C; inoculum, 3,0 %; OTR 21 to 26 mM/l hr; Kv, around 0,18 g mol/l atm; fermentation time, 5-6 days.

5. The kinetics of the process under these conditions indicates an almost complete consumption of the sugars after 72 hours which coincides with the maximum growth of yeast. After this phase, the production of the vitamin is initiated and is particularly accelerated at the 96-120 hour period. The viscosity, on the other hand, does not seem to show any relation to the biosynthesis.

6. The riboflavin yields obtained in this study are comparable to the best cited in present day scientific bibliographies.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALI, S. N., y KHALIDI, U. A. S. 1966. *Biochem. J.*, 98, 182.
2. ARRAGON, G.; MAINIL, J.; REFAIT, R., y VELU, H. 1946. *Ann. Inst. Pasteur*, 72, 300.
3. ARRIETA, L. 1960. *Anales Fac. Quim. Farm. Univ. Chile*, 12, 248.
4. ASAI, M.; MASUDA, T., y KURVADA, S. 1961. *Chem. Pharm. Bull.*, 9, 496 y 530.
5. Association of Official Agricultural Chemists. 1955. *Methods of Analysis*, 824. Edit. Board, Washington, D. C.
6. BARTHOLOMEW, W. H.; KAROV, E. O., y SFAT, M. R. 1950. *Ind. Eng. Chem.*, 42, 1.801.
7. BEESCH, S. C., y FRAZER, B. W. 1953. U. S. Patent 2,647,074.
8. BENEDICT, R. G. y colaboradores. 1961. *Appl. Microbiol.*, 9, 256.
9. Commercial Solvents Corporation. 1949. Engels Patent 623,082.
10. COOPER, C. M.; FERNSTROM, G. A., y MILLER, M. 1944. *Ind. Eng. Chem.*, 36, 504.
11. DULANEY, E. L., y GRUTTER, F. H. 1950. *Mycologia*, 42, 717.
12. FRAILE, E. P., y ZURITA, V. E. 1965. *Rev. Farm. (Buenos Aires)*, 107, 57; *Ion*, 25, 537.
13. GOLYSHEVA, M. G., y colaboradores. 1965. *Mikrobiologiya*, 34, 661.
14. GOODWIN, T. W., y PENDLINGTON, S. 1954. *Biochem. J.*, 57, 631.
15. GOODWIN, T. W., y TREBLE, D. H. 1957. *Biochem. J.*, 67, 10.
16. GOODWIN, T. W., y TREBLE, D. H. 1959. *Progr. Ind. Microbiol.*, 1, 139.
17. HANUS, J., y MUNK, V. 1959. Patente Checoslovaca 80.867.

18. HENDRICKX, H. 1961. Mededel. Landbouwhogeschool Opzoekingssta. Stadt Gent, 26, 84.
19. HICKEY, R. J. 1952. U. S. Patent 2,605,210; 1953. J. Bacteriol., 66, 27.
20. HOSTALEK, Z. 1957. J. Gen. Microbiol., 17, 267.
21. HOTTA, K. 1958. Bitamin, 14, 54.
22. JAMES, R. M. 1950. U. S. Patent 2,498,549.
23. KAPRALEK, F. 1962. J. Gen. Microbiol., 29, 403.
24. LARSEN, H. 1952. U. S. Patent 2,615,829.
25. MARTIN, J. 1949. U. S. Patent 2,491,927.
26. McNUTT, W. S., y RAPER, K. B. 1958. Mycologia., 80, 951.
27. METZNER, A. B., y OTTO, R. E. 1961. Am. Ind. Chem. Eng. J., 7, 3.
28. MOSS, A. R., y KLEIN, R. 1947. Engels Patent 615,847.
29. OSMAN, H. G., y CHENOUDA, M. S. 1965. Can. J. Microbiol., 11, 625.
30. OSMAN, H. G., y SOLIMAN, M. H. M. 1963. Arch. Mikrobiol., 46, 247.
31. OSMAN, H. G., y SOLIMAN, M. H. M. 1963. Arch. Mikrobiol., 46, 255.
32. PHELPS, A. S. 1949. U. S. Patent 2,473,817.
33. PHELPS, A. S. 1949. U. S. Patent 2,273,818.
34. PLAUT, G. W. E. 1954. J. Biol. Chem., 208, 513; D. W. GREENBERG (ed.). 1961. Metabolic Pathways. Academic Press, Nueva York.
35. RUDERT, F. J. 1945. U. S. Patent 2,374,503.
36. SÁNCHEZ-MARROQUÍN, A., y HOPE, P. H. 1953. Agr. Food Chem., 1, 246.
37. SCHOPFFER, W. H. 1944. Helv. Chim. Acta., 27, 1.017.
38. SHAVLOVSKII, G. M., y colaboradores. 1966. Mikrobiologiya, 35, 458.
39. SMITH, C. G.; CONNELLY, C., y SMEAD, M. 1962. J. Biol. Chem., 237, 3.207.
40. SNEDECOR, G. M., y COCHRAN, W. (Edit.). Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology. Iowa State Univ. Press., Iowa.
41. SOMOGYI, M. 1952. J. Biol. Chem., 195, 19.
42. TABENKIN, B. 1950. U. S. Patent 2,493,274.
43. ZALESSKAYA, M. I. 1950. Mikrobiologiya, 19, 127.

CIUDAD UNIVERSITARIA. MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

PRODUCCION DE RIBOFLAVINA POR *ASHBYA*  
*GOSSYPII* (ASHBY & NOWELL) GUILL. EN JUGO  
DE *AGAVE* sp.

por

A. SANCHEZ - MARROQUIN (\*), SARA MANRIQUE y LILIA VIERNA

INTRODUCCION

Aunque la mayor parte de la riboflavina comercial es obtenida mediante cultivos de *Eremothecium ashbyii*, es posible también emplear otros microorganismos para tal objeto. Así *Ashbya gossypii* resulta de gran interés al respecto desde los trabajos de Wickerham y colaboradores (21), Tanner y colaboradores (19) y otros investigadores (7-8, 10, 12-13, 16-17 y 20), ya que presenta la ventaja de que sus cultivos son relativamente más estables y los rendimientos más constantes, aunque generalmente de menor cuantía que los de *E. ashbyii*.

Ambas levaduras crecen bien en cultivo sumergido aun cuando sus requerimientos nutritivos son diferentes (15). Se distinguen entre sí, principalmente, en que *Ashbya gossypii* no se presenta en su fase levaduriforme sino exclusivamente micelial y en que sus ascosporas derivan de células originalmente plurinucleadas (21).

Los primeros rendimientos de riboflavina alcanzados con esta especie fueron relativamente bajos, pero más tarde se logró mejorarlos hasta lo-

---

(\*) Dirección actual: Facultad de Ciencias (UCV), Departamento de Tecnología. Apartado 59097. Caracas (Venezuela).

grar cifras que hacen posible la industrialización del proceso, especialmente si el producto se destina a suplemento de forrajes.

El objeto del presente trabajo es precisamente utilizar la referida especie para fermentar un substrato barato, el jugo de *Agave* en su forma de "aguamiel", cuando por causa de su bajo contenido de azúcares no puede emplearse en la elaboración de "pulque", bebida alcohólica producida en México. La obtención de concentrados de riboflavina para mejorar forrajes podría ser una aplicación, como lo sugerimos en un trabajo previo en el que se utilizó la especie *Eremothecium ashbyii* con el mismo propósito (14).

## MATERIALES Y METODOS

### *Microorganismos*

Se utilizó la cepa NRRL Y-1096 de *Ashbya gossypii* proporcionada gentilmente por el Dr. L. J. Wickerham. Para conservarla se empleó un medio de la siguiente composición: sacarosa 2,0 g; "corn steep liquor", 1,0 g; aceite de maíz, 0,1 ml; aguamiel, 100 ml; pH, 6,2, ó bien, el medio PDA. Se ensayó asimismo una mezcla de este organismo y *Eremothecium ashbyii* NRRL Y-1363.

### *Fermentaciones*

El inóculo se preparó de manera semejante a como lo hicimos en otro trabajo (14) y se aplicó a los medios de fermentación en proporción de 1 a 3 %. Estos se prepararon en cantidades de 50 ml en erlenmeyeres de 250 ml. La incubación se efectuó a 28 °C durante seis días, a una agitación de 250-350 r/m. Las fermentaciones se llevaron luego a mayor escala en fermentadores de 25 y 300 l, cuya geometría se describe en ese mismo trabajo (14). Se ensayaron diversas condiciones de operación y flujo de aire, pero sólo se presentan en los cuadros los resultados óptimos.

Entre los componentes de los 42 medios de fermentación estudiados figuraron muchas fuentes nitrogenadas y sales minerales en diferentes proporciones, seleccionándose solamente los de rendimientos superiores a 800 µg/ml, que son los que se registran en los cuadros de resultados.

*Determinaciones químicas*

Se efectuaron en la misma forma previamente descrita (14), e igualmente las estimaciones de viscosidad, peso micelial y absorción de oxígeno. Las referentes a la composición del concentrado se practicaron conforme a métodos convencionales de la AOAC (1).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el *cuadro 1* puede apreciarse la composición de los seis medios de fermentación que fueron seleccionados de acuerdo con los máximos rendimientos. Estos oscilaron de 978 a 1.315  $\mu\text{g/ml}$ . Ensayos repetidos realizados con tres de esos medios, núms. 2, 13 y 24, revelaron que el

*Cuadro 1. Composición de los medios seleccionados y rendimiento de riboflavina por A. gossypii*

Componentes	2	13	24	25	26	27
Aceite de maíz, g	0,05	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
"Corn steep" (54 % sólidos), g	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Aguamiel (5.º Brix), ml	50,0	50,0		50,0	50,0	50,0
Cerelesa (5.º Brix), ml			50,0			
Carbonato cálcico, g	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Extracto de levadura, g						0,5
Propionato sódico					0,01 M	0,01 M
"Tween 80", g				1,0		
Rendimiento de riboflavina, $\mu\text{g/ml}$	1226	1315	1280	1019	978	1106

Matraces de 250 ml con 50 ml de medio. Temperatura: 28 °C. Agitación: 250 r/m. Inóculo: 3 % de un cultivo de cuarenta y ocho horas en medio 2. Tiempo: seis días. pH inicial: 6,2.

núm. 13 ofrecía mayor constancia, por lo cual se seleccionó para los demás experimentos. Se confirma, según los datos del mismo *cuadro 1*, la efectividad de dos componentes esenciales para la biosíntesis de la vita-

mina: el aceite de maíz y el "corn steep liquor", que ya han sido utilizados con éxito por otros investigadores (4-6 y 9). Al agregarles diversos materiales orgánicos que han resultado efectivos en el caso de *Eremothecium ashbyii*, o enriquecer el contenido original de azúcares con otros carbohidratos (sacarosa, glucosa, cerelesa), o bien sales diversas, incluyendo fosfatos, los rendimientos no sufrieron cambio cuantitativo alguno de significación. Por el contrario, en general, disminuyeron o fueron prácticamente iguales a los de los seis medios seleccionados que se indican en ese cuadro. Sin embargo, y de manera semejante a lo que observamos con *Eremothecium* (14), los resultados de experimentos de igual tipo, pero realizados con aguamieles de diferente procedencia o diferentes características fisicoquímicas, no solían concordar, lo que sugiere que sería necesario estandarizar la materia prima para lograr uniformidad en los rendimientos.

La mezcla de extracto de levadura 0,25 % y propionato sódico 0,01 M dio resultados comparables a la simple adición de 0,5 % de "tween 80", pero ligeramente inferiores a los del medio básico sin modificación. Este último agente impide en cierta forma la flavinogénesis, pero no afecta a la maduración de las ascas ni al metabolismo de la glucosa (2). Smith y colaboradores (18) ya han señalado la influencia favorable de los agentes

Cuadro 2. Modificaciones al medio 13 seleccionado y rendimiento de riboflavina por *A. gossypii*

Medio	Materiales agregados al medio 13 basal (3 %)	Flavino-génesis	Riboflavina $\mu\text{g/ml}$	pH final
13 <sub>A</sub>	Harina de soja, 1,5	+	650	5,7
13 <sub>B</sub>	Harina de maíz, 1,5	+	620	5,6
13 <sub>C</sub>	Fosfato amónico, 0,05	++	879	6,1
13 <sub>D</sub>	Sulfato amónico, 0,05	++	802	6,3
13 <sub>E</sub>	Peptona comercial, 0,5	+++	1.414	6,9
13 <sub>F</sub>	Fosfato dipotásico, 0,05	++	795	6,8
13 <sub>G</sub>	Urea comercial, 0,50	+++	817	7,1
13 <sub>H</sub>	Gelatina comercial, 0,50	++	991	7,0

Condiciones: las mismas del cuadro 1.

Cuadro 3. Rendimiento de riboflavina en 6 medios por *A. gossypii* y mezcla de éste y *E. ashbyii*

Medio	2		13		24		25		26		27	
Microorganismo (*)	A	AE	A	AE	A	AE	A	AE	A	AE	A	AE
pH final	6,7	6,7	6,7	7,3	6,4	6,1	6,4	6,4	6,7	7,0	7,3	7,3
Flavinogénesis	++	+++	+++	++	+	+	++	+	++	++	+	+
Riboflavina ( $\mu\text{g/ml}$ )	998	1.000	1.080	929			1.060	920	811	870		

(\*) A = *Ashbya gossypii*. AE = *A. gossypii* + *Eremothecium ashbyii*.  
 Esterilización en autoclave: quince minutos a 121 °C. pH inicial: 6,1. Temperatura: 28 °C. Agitación: 350 r/m. Tiempo: seis días. Inóculo: A, 1 % de cultivo de veinticuatro horas; AE, 1 % de cada uno, de cultivos respectivos de veinticuatro horas.

Cuadro 4. Influencia de algunas fuentes nitrogenadas añadidas al medio 13, en los rendimientos de riboflavina

Fuente de nitrógeno	Flavinogénesis		Riboflavina		pH final	
	A	AE	A	AE	A	AE
Urea						
0,25	++	++			6,7	6,7
0,50	++	++			7,3	6,4
1,0	+++	+++	814	791	7,0	7,3
Sulfato amónico						
0,25	++	+			6,7	6,7
0,50	++	++			6,7	6,7
1,0	+++	+++	827	780	6,7	6,7
Gelatina (comercial)						
0,25	+	+			6,7	7,0
0,50	++	++			6,6	7,1
1,0	+++	++	918	876	6,7	7,1
Nitrato amónico						
0,25	+	+			6,7	6,7
0,50	+	+			7,0	6,7
1,0	+	++	328		6,7	6,7

Condiciones y anotaciones: iguales a las del cuadro 3.

Cuadro 5. Resultados obtenidos con *A. gossypii* en fermentadores de 25 l con 5 l de sustrato

Medio	pH inicial	pH final	Riboflavina ( $\mu\text{g/ml}$ )
13	6,2	7,0	1.440
13 <sub>F</sub> (sulfato amónico)	6,2	6,7	840
13 <sub>H</sub> (gelatina comercial)	6,2	7,3	1.040
13 <sub>C</sub> (fosfato amónico)	6,2	7,1	1.600
13 <sub>E</sub> (peptona)	6,2	7,3	2.350

Temperatura: 28 °C. Agitación: 350 r/m. Aire: 0,5  $\alpha/\alpha/\text{min}$ . Inóculo: 3 %. Tiempo: seis días.

Cuadro 6. pH, viscosidad y riboflavina durante la fermentación

Horas	pH		Viscosidad (cm/1)		Riboflavina ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	A	AE	A	AE	A	AE
48	4,1	4,0				
72	5,1	6,0	36,0	32,0	150	168
96	5,8	7,0	33,0	36,0	1.116	1.164
120	7,1	7,3	34,5	30,0	1.226	1.800
144	7,5	7,4	30,3	19,0	1.275	1.907

Inóculo: A, *A. gossypii*; AE, *A. gossypii* y *Ermothecium ashbyii* asociados. Temperatura: 28 °C. Agitación: 480 r/m. Aire: 2 p<sup>3</sup>/min (cuarenta y ocho horas), 4 p<sup>3</sup>/min (resto). Inóculo: 1 %. Tanque de 25 l con 5 l de sustrato (medio 13). OAR = 0,6 mM/1 min.

Cuadro 7. Resultados obtenidos en fermentadores de 300 l con 100 l del medio 13 + fosfato amónico 0,05 %

Horas	pH	Porcentaje le reductores	Riboflavina $\mu\text{g/ml}$	Peso de micelio g/100 ml
0	6,2	4,6		
48	5,4	1,9	330	1,25
72	5,6	0,44	1.700	1,66
96	6,9	0,48	2.000	2,07
144	7,3	0,18	2.150	1,19

Temperatura: 28 °C. Agitación: 500 r/m. Aireación: 0,5 v/v min. pH inicial: 5,8. Inóculo: 3 % de un cultivo de *A. gossypii* de cuarenta y ocho horas en el medio 2.

tensioactivos no iónicos en la síntesis de riboflavina por *Ashbya gossypii*, al facilitar su excreción a través de la pared celular. La adición de otros materiales orgánicos (*cuadros 2 y 4*) no representó ventaja alguna, excepto la peptona en proporción de 0,5 %, la gelatina (0,5 %) y el fosfato amónico (0,05 %). La influencia de la gelatina podría deberse a su contenido de glicina, substancia que aumenta los rendimientos (7) quizá debido a su papel de precursor en la biosíntesis de la riboflavina (11). Las mezclas de *A. gossypii* y *Eremothecium ashbyii* dieron, en términos generales, mejores resultados que *A. gossypii* sola (*cuadro 3*) en casi todos los medios seleccionados.

En fermentadores de 25 l, utilizando el medio 13 y cuatro de las modificaciones más prometedoras (*cuadro 5*), se obtuvieron rendimientos aceptables, excepto en el caso del sulfato amónico como fuente nitrogenada.

Por razones económicas, se escogerían entonces los medios 13 y 13 c (fosfato amónico).

En el medio 13 simple (fórmula del *cuadro 1*) se estudiaron asimismo los principales cambios químicos y el crecimiento en términos de productividad, empleando como inóculo *Ashbya gossypii* y además, una mezcla de *Ashbya* y *Eremothecium* en los mismos fermentadores de 25 l. Los datos de los *cuadros 6-7* indican que el máximo de producción riboflavínica se logra a los seis días, cuando ya los azúcares se han agotado prácticamente y el pH es superior a 7,0. La intensidad de la absorción de oxígeno en este fermentador fue de 0,6 mM/l min. La viscosidad, como en el caso de *E. ashbyii* (14), parece no influir en los rendimientos. Nuevamente, la mezcla de las dos levaduras dio mejores resultados: 1907  $\mu\text{g/ml}$  a los seis días.

El mismo medio 13, pero añadido de 0,05 % de fosfato amónico (medio 13 c), fermentado en tanques de 300 l, mostró rendimientos un poco más altos (2.150  $\mu\text{g/ml}$ ) en las condiciones indicadas en el *cuadro 7*. Los azúcares propiamente desaparecen a las setenta y dos horas y entonces se acelera notablemente la biosíntesis de la vitamina. El agotamiento de los carbohidratos presentes coincide con la aceleración del crecimiento, dando una imagen semejante a las curvas de cinética de Tanner y colaboradores (19) y Pfeifer y colaboradores (10).

Si se comparan los resultados del presente trabajo con los datos de rendimientos que se encuentran en los informes publicados (*cuadro 8*) vemos que sólo son inferiores a los logrados por Malzahn y colaboradores (7-8) en substratos más elaborados.

Cuadro 8. Rendimientos comparados de riboflavina por *A. gossypii*

Referencia	Substrato	Riboflavina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Días
Smiley y Stone (16)	Glucosa, "stillage", residuos de rastro, levadura de cerveza, propionato sódico	1.200	6-7
Pridham y Raper (12-13)	Glucosa, peptona, "corn steep", sales	1.760	6
Malzahn y colaboradores (7)	"corn steep", peptona, aceite de soja, glicina	5.000	6-7
Este trabajo	Aguamiel, "corn steep", aceite de maíz, $\text{CaCO}_3$ , acetato amónico	2.150	6
Cyanamid Co. British Patent 760, 072 (3)		2.000	7
Malzahn y colaboradores (8)	Colágeno hidrolizado, lípidos, "corn steep", solubles de destilería, levadura de cerveza	4.187	6-7

El producto obtenido al evaporar y luego secar el contenido total del tanque, como lo indicamos en otro trabajo (14), tiene una aceptable proporción de proteína y algunas vitaminas del complejo B aparte de la riboflavina (cuadro 9).

Su aspecto general es excelente, su digestibilidad *in vitro* (pepsina) es de 95 % y los resultados logrados en pruebas de aceptabilidad en pollos son satisfactorios. Posteriormente se emprenderán los estudios bromatológicos correspondientes.

Cuadro 9. Composición del concentrado

Determinaciones	Porcentaje (en peso)
Humedad	6,0
Proteína	20,1
Grasa	1,7
Cenizas	12,5
Fibra	1,3
Riboflavina	2,8
	$\mu\text{g/ml}$
Acido pantoténico	310
Niacina	285
Tiamina	580

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. La producción de riboflavina por *Ashbya gossypii* y mezclas de ésta y *Eremothecium ashbyii* en substratos a base de "aguamiel" (jugo de *Agave* sp.) en matraces de 250 ml y fermentadores de 25 y 300 l, ha sido estudiada en este trabajo, bajo diferentes condiciones de operación.

2. Se encuentra que el mejor sustrato, tomando en cuenta razones económicas, es el siguiente (gramos en 100 ml de aguamiel): aceite de maíz 1,0; "corn steep liquor", 2,0, y  $\text{CaCO}_3$ , 0,1. Los rendimientos de riboflavina en este medio varían de 1.275 a 1.907  $\mu\text{g/ml}$ , según las condiciones.

3. La adición de una mezcla de extracto de levadura 0,25 % y propionato sódico 0,01 M dio resultados comparables a los de la simple adición de "tween 80", pero ligeramente inferiores a los del medio básico sin modificación. La adición de otros materiales orgánicos no representó ventaja alguna, excepto la peptona en proporción de 0,5 %, la gelatina (0,5 %) y el fosfato amónico (0,05 %). En este último caso, el rendimiento máximo alcanzado fue de 2.150  $\mu\text{g/ml}$  a los seis días en tanques de 300 l, comparable a los resultados logrados por otros investigadores, excepto Malzahn y colaboradores (7-8), que han llegado a obtener hasta el doble de rendimiento en substratos más elaborados.

Las condiciones óptimas para la fermentación en este mismo medio fueron: temperatura, 28 °C; agitación, 500 r/m; aireación, 0,5 v/v min; pH, 5,8; inóculo, 3 %.

4. La cinética de la biosíntesis muestra que al agotarse los azúcares a las setenta y dos horas se inicia la aceleración del crecimiento de la levadura y la producción de la riboflavina. El máximo rendimiento se obtiene cuando la intensidad de la absorción de oxígeno en el fermentador corresponde a 6 mM/l min y el pH está alrededor de 7,0. La viscosidad parece no guardar relación con la biosíntesis de la vitamina.

5. El concentrado seco obtenido de los caldos de fermentación contiene 20 % de proteína, 2,8 % (en peso) de riboflavina, otras vitaminas del complejo B y poca fibra cruda. Las pruebas de digestibilidad en pollos son satisfactorias. La digestibilidad es de 95 %.

## SUMMARY

A study was made of the riboflavin production by *Ashbya gossypii* and a mixture of this species and *Eremothecium ashbyii* in several substrates with "aguamiel" (non fermented *Agave* juice) as the basic material.

The best fermentation medium in both cases seems to be (g in 100 ml aguamiel): corn oil 1,0, corn steep liquor 2,0 and CaCO<sub>3</sub> 0,1, the riboflavin yields being 1,275 to 1,907 µg/ml.

By adding a mixture of yeast extract 0,25 % and sodium propionate 0,01 M the yields were similar to those with 0,5 % tween 80, but lower than those of the unmodified basal medium. The addition of some other organic compounds gave no better results except 0,5 % peptone, 0,5 % gelatin and 0,05 % ammonium phosphate, the latter yielding up to 2,150 µg/ml riboflavin in 300 l tanks at the end of 6 days.

Best conditions for the fermentation in 25 and 300 l fermenters were: temperature 28 °C, agitation 500 r/m, aeration 0,5 v/v min, pH 5.8 and inoculum 3 %.

The kinetics of the biosynthesis showed that at the total consumption of sugars at 72 hours the growth of the yeast increases as well as the riboflavin production.

The maximum production was reached when the oxygen transfer rate in the fermenter was around 0.6 mM/l min and the final pH around 7.0. Viscosity does not seem to have anything to do with the biosynthesis.

The riboflavin yields here obtained are comparable to most of the known results reached by other workers using the same species, but lower than those of Malzahn *et al.* (7-8) in more elaborated substrates.

The dried product composition shows 20 % protein, 2,8 % (by weight) riboflavin, a low fiber content and some amounts of B complex vitamins. The acceptability tests in chickens were satisfactory. Pepsin digestibility *in vitro* was around 95 %.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Association of Official Agricultural Chemists. 1955. Methods of Analysis, 824. Edit. Board, Washington, D. C.
2. CERLETTI, P.; STROM, R.; GIORDANO, M. G.; BARRA, D., y GIOVENCO, S. 1965. J. Biochem., 57, 773.

3. Cyanamid Co. 1956. British Patent 760,072. Cit. por HANSON (6).
4. GOODWIN, T. W. 1959. *Progr. Ind. Microbiol.*, 1, 139.
5. GOODWIN, T. W. 1963. *The Biosynthesis of Vitamins and Related Compounds*, cap. II. Academic Press, Nueva York.
6. HANSON, A. M. En: J. H. PEPPLER, 1967. *Microbial Technology*, 232. Reinhold Publ., Nueva York.
7. MALZAHN, R. C.; PHILLIPS, R. F., y HANSON, A. M. 1959. U S Patent 2,876,169.
8. MALZAHN, R. C.; PHILLIPS, R. F., y HANSON, A. M. 1963. *Abstr. 63rd Meeting Am. Chem. Soc.*, 21.
9. PHELPS, A. S. 1949. U. S. Patent 2,473,818.
10. PFEIFER, V. F.; TANNER (Jr.), F. W.; VOJNOVICH, C., y TRANFLER, D. H. 1950. *Ind. Eng. Chem.*, 42, 1.776.
11. PLAUT, G. W. E. 1954. *J. Biol. Chem.*, 208, 513.
12. PRIDHAM, T. G., y RAPER, K. B. 1950. *Mycologia*, 42, 603.
13. PRIDHAM, T. G., y RAPER, K. B. 1952. *Mycologia*, 44, 452.
14. SÁNCHEZ-MARROQUÍN, A.; MANRIQUE, S., y VIERNA, L. 1969. *Microbiol. Españ.*, 23, 113.
15. SCHOPFER, W. H. 1944. *Helv. Chim. Acta*, 27, 1.017.
16. SMILEY, K. L.; SABOLOV, M.; AUSTIN, F. L.; RASMUSSEN, R. A.; SMITH, M. G.; VAN LANEN, J. M.; STONE, L., y BORUFF, C. S. 1951. *Ind. Eng. Chem.*, 43, 1.380.
17. SMILEY, K. L., y STONE, L. 1955. U. S. Patent 2,702,265.
18. SMITH, C. G.; SMITH, G. A., y PAPADOUPOULOU, Z. 1961. *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 344.
19. TANNER (Jr.), F. W.; VOJNOVICH, C., y VAN LANEN, J. M. 1949. *J. Bacteriol.*, 58, 737.
20. VAN LANEN, J. M.; SMILEY, K. L., y STONE, L. 1954. U. S. Patent 2,666,014.
21. WICKERHAM, L. J.; FLICKINGER, M. H., y JOHNSTON, R. M. 1946. *Arch. Biochem.*, 9, 95.

## HETEROGENEIDAD COLONIAL DE *CITROBACTER* *INTERMEDIUM* C<sub>3</sub>, EN RELACION CON LA SEGREGACION DE ALANINA

por

S. HERNÁNDEZ

### 1. INTRODUCCION

El *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub>, cuando crece en un medio con glucosa como única fuente de carbono y energía, y amoníaco como fuente de nitrógeno, acumula aminoácidos en el mismo. En orden decreciente, alanina, glutamato, aspartato y aminoácidos básicos. Al final del crecimiento, la alanina llega a constituir una fracción molar del 71 %, representando un 2 % de los sólidos totales presentes en el medio. La concentración de glutamato decrece a lo largo del tiempo en favor de la alanina. Esto constituye un primer indicio de que la formación de estos aminoácidos (alanina-glutamato) es secuencial, siendo el glutamato el primer eslabón. La importancia cuantitativa de la alanina ha permitido definir el proceso como una producción directa de alanina por fermentación (1-2).

Guinea puso a punto una técnica para detectar glutamato a nivel colonial. Alrededor de las colonias de *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> segregadoras de este aminoácido se origina un halo visible de crecimiento de una cepa auxotrófica glutamato-dependiente. Con esta técnica es posible distinguir colonias que condicionan la formación de un halo notable, denominadas A, de otras que no originan crecimiento (no segregadoras), denominadas C; y por último, un tipo intermedio, con escaso halo, tipo B (4-5).

Esta heterogeneidad colonial se mantiene estable a lo largo de los sucesivos subcultivos; se ha demostrado que cualquier tipo de colonia da una descendencia que evoluciona rápidamente a las referidas condiciones de equilibrio (4 y 6).

En el presente trabajo se lleva a cabo el análisis colonial respecto a la segregación de alanina, relacionándose los resultados obtenidos con los relativos a la segregación de glutamato.

## 2. MATERIAL Y METODOS

### 2.1. Cepas bacterianas utilizadas y medios de mantenimiento y ensayo

El aislamiento y los caracteres taxonómicos y culturales de la cepa C<sub>3</sub> de *Citrobacter intermedium* se han descrito (1). Se han llevado a cabo diversas modificaciones del medio M<sub>1</sub>, descritas en el apartado 3. Consisten fundamentalmente en la adición de intermedios metabólicos. En este caso se han esterilizado soluciones de los mismos mediante un filtro Seitz EK, antes de ser incorporados al resto del medio ya estéril (5).

El *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8081, cepa auxotrófica para la alanina, empleada para la titulación de este aminoácido (7), se mantiene en Bactolactobacilli-agar AOAC (Difco); para la obtención de fuertes inóculos puede utilizarse Bactolactobacilli broth (Difco), centrifugando y lavando posteriormente. El medio de ensayo utilizado para detectar alanina, medio que contiene todos los elementos necesarios para el crecimiento de *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8.081, excepto la alanina, viene preparado por la casa Difco con el nombre de Bactoalanine assay medium. Se utiliza a razón de 10,5 g/100 ml de agua destilada, esterilizándose en autoclave, ya intubado, durante cinco minutos, a 120 °C.

El *Leuconostoc mesenteroides* P-60 ATCC 8.042, cepa auxotrófica para el glutamato (6), se desarrolla sobre el medio Bactoglutamic inoculum broth (Difco), incubándose a 37 °C (3). El medio de ensayo utilizado para detectar glutamato, medio que contiene todos los elementos necesarios para el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* P-60, excepto el glutamato, viene preparado por la casa Difco con el nombre de Bactoglutamic assay broth. Se utiliza a razón de 10,5 g/1000 ml de agua destilada, esterilizándose en autoclave, ya intubado, durante cinco minutos, a 120 °C (4).

### 2,2. Técnica de revelado de glutamato

El fundamento del método del análisis colonial con *Leuconostoc mesenteroides* P-60 y la técnica bajo la cual se ha llevado a cabo para el estudio de la segregación de glutamato se consigna en dos trabajos de Guinea (4-5).

### 2,3. Técnica de revelado de alanina

La técnica utilizada para poner de manifiesto la segregación de alanina a nivel colonial está basada en la descrita para la demostración de glutamato.

El procedimiento de revelado es el que se expone seguidamente.

Se obtienen colonias separadas de *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> sobre placas de medio M<sub>1</sub>, por extensión sobre las mismas de 0,1 ml de una suspensión adecuada de dicha cepa. Cuando las colonias han alcanzado un diámetro conveniente, aproximadamente de 1 mm, se extiende sobre la placa un volumen de 12 ml de medio de ensayo (Bactoalanine assay medium) solidificando con Bacto-agar Difco doble concentrado. A estos tubos, fundidos al baño maría y enfriados alrededor de 50°-60 °C, se adiciona el contenido de otros tubos en el que en 6 ml de Ringer 1/4 se ha suspendido un asa de *P. cerevisiae*, a partir de un cultivo sólido en medio de mantenimiento. Al mezclarse ambos, la cepa auxotrófica para la alanina queda perfectamente dispersada, de tal modo que puede desarrollarse en cualquier punto del medio con tal que encuentre alanina suficiente. Este extremo ha sido comprobado, así como la no interferencia de los demás componentes utilizados.

Una vez solidificado el medio con la suspensión del pediococo, se incuban las placas a 37 °C, observándose el crecimiento de este microorganismo allí donde se ha acumulado alanina segregada por las colonias de *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> (6).

### 2,4. Traslado de colonias

Se utiliza la técnica de traslado de colonias desde placas con crecimiento a placas estériles. Se procede según el método del tampón de Lederberg (4 y 6). Los tampones se preparan mediante el relleno y recubrimiento de placas de Petri, de tamaño adecuado, con un tejido desgastado.

Previa esterilización de estos tampones, se apoyan suavemente sobre la placa en la que se han desarrollado las colonias y luego se trasladan sobre placas estériles. El mismo tampón puede dar hasta tres réplicas y excepcionalmente cuatro sin perder un excesivo número de colonias. Estas placas se incuban hasta que las colonias adquieren un tamaño conveniente. De esta manera se puede seguir el crecimiento de una misma colonia en dos o más placas distintas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Revelados de alanina

Una vez efectuada la técnica descrita en 2,3, se incuban las placas a 37 °C durante treinta-treinta y cinco horas. Se observa el crecimiento del pediococo allí donde se ha acumulado alanina segregada por las colonias de *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub>. Este crecimiento es perceptible a simple vista como un halo cuyos límites llevan a confluir con los de otras colonias, ocupando toda la superficie de la placa. Sin embargo, la opacidad del mismo decrece radicalmente desde el borde de las colonias de *C. intermedium* C<sub>3</sub>. Aparentemente se distinguen halos más intensos en unas colonias que en otras, pero todas las colonias de *C. intermedium* C<sub>3</sub> presentan halo. El examen microscópico en estas condiciones revela microcolonias de *Pediococcus cerevisiae* de diverso diámetro, lo cual hace suponer que su crecimiento está limitado por la concentración de alanina. En las zonas del medio más alejadas de las colonias de *C. intermedium* C<sub>3</sub> sólo hay un débil crecimiento de fondo.

Alrededor de algunas colonias, el diámetro de las microcolonias de *Pediococcus cerevisiae* decrece progresivamente y en forma ostensible desde el borde de las mismas. Estas colonias corresponden a las de halo más manifiesto, en tanto que las otras muestran al examen microscópico una densidad algo mayor de microcolonias que el crecimiento de fondo, y con un diámetro sólo ligeramente superior.

Estos resultados permiten clasificar las colonias de *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> en dos tipos distintos, si bien en algunos casos resulta ambigua la diferenciación.

Se ha intentado obtener una mayor discriminación de los tipos coloniales observados. Para ello se han realizado ensayos variando la concen-

tracción de la suspensión de *Pediococcus cerevisiae* en el revelado, el tiempo del mismo y el tamaño de las colonias de *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub>. Con el fin de retardar la difusión de la alanina se ha intercalado una capa de agar-agar al 1 % (7-10 ml/placa) entre el medio M<sub>1</sub> y el medio de revelado, sin mejorar la bondad de las lecturas por visión directa de los revelados.

Para la obtención de lecturas de revelados de alanina que muestren una heterogeneidad clara, comparable a la observada para el glutamato, han debido modificarse las condiciones de revelado y especialmente las de su lectura.

Se efectúa la técnica del revelado normalmente, sobre las colonias de *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> obtenidas con un tiempo de incubación de 30 °C más corto (veintiocho-treinta horas). La lectura no puede realizarse directamente, según hemos visto, ya que cuando se detecta a simple vista el crecimiento del pediococo todas las colonias poseen halos similares a su alrededor. Para evitar esto, las colonias se examinan periódicamente al microscopio con pequeño aumento. A las dieciocho horas de incubación, no se observa alrededor de las mismas ningún signo de crecimiento de *Pediococcus cerevisiae*. A partir de las veintidós horas empiezan a advertirse microcolonias de *P. cerevisiae* alrededor de algunas colonias de *C. intermedium* C<sub>3</sub>. Poco más tarde puede alcanzarse un óptimo para diferenciar colonias segregadoras y no segregadoras de alanina.

### 3.2. Análisis comparativo de colonias segregadoras de glutamato y alanina

De una placa de M<sub>1</sub> sobre la que se han desarrollado colonias pequeñas de *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub>, se pasan, mediante la técnica del traslado de colonias, a otras placas de M<sub>1</sub> estériles. Se incuban a 30 °C hasta que las nuevas colonias alcancen el tamaño adecuado. Se revela una placa para un aminoácido y la réplica para el otro. Al quedar las colonias en idéntica disposición sobre las placas, son fácilmente identificables y pueden compararse sus lecturas.

Una buena lectura con perfecta diferenciación colonial en el caso del revelado con *Leuconostoc mesenteroides* para el glutamato, se corresponde con un resultado equivalente para la misma placa revelando con *Pediococcus cerevisiae* para la alanina.

### 3,3. Ensayos de inhibición cruzada

Se disponen placas de M<sub>1</sub> al que se ha adicionado 20 µg/ml de alanina y otra serie paralela también con M<sub>1</sub> con igual cantidad de glutamato monosódico.

El método de traslado de colonias se utiliza para la obtención de placas que contienen ambos aminoácidos con la misma población colonial.

Revelando las placas de M<sub>1</sub>-alanina con *Leuconostoc mesenteroides* P-60, cepa auxotrófica para el glutamato, y las de M<sub>1</sub>-glutamato con *Pediococcus cerevisiae*, cepa auxotrófica para la alanina, veremos la influencia de un aminoácido sobre la segregación del otro.

Puede concluirse que la presencia de un aminoácido no inhibe la segregación del otro, en ambos casos. Por otra parte, se confirman los resultados señalados en 3,2, en cuanto a correspondencia entre colonias segregadoras y no segregadoras para glutamato y alanina.

### 3,4. Análisis colonial sobre medios especiales

Cuando el *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> crece sobre medio M<sub>1</sub> al que se adiciona α-cetoglutarato, el revelado con *Leuconostoc mesenteroides* P-60 pone de manifiesto que las colonias presentan todas idéntico halo de crecimiento, y equivalente al de las colonias A. El α-cetoglutarato hace desaparecer la heterogeneidad colonial y pone de manifiesto que en estas condiciones todas las colonias acumulan glutamato a su alrededor (4).

Aquí se ha llevado a cabo una experiencia semejante revelando con *Pediococcus cerevisiae*, en un medio M<sub>1</sub> al que se ha sustituido la cuarta parte de glucosa por su equivalente molar de α-cetoglutarato sódico. Se ha efectuado un control simultáneo de las mismas colonias, obtenido por calco, sobre M<sub>1</sub> normal, para asegurarse de la presencia de colonias menos segregadoras de alanina.

En todos los casos ha podido verificarse que este tipo de colonias llega a formar un halo de *Pediococcus cerevisiae* equivalente al de las colonias más segregadoras cuando ha crecido en presencia de α-cetoglutarato.

Por otra parte, el análisis colonial efectuado a *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub>, con *Leuconostoc mesenteroides* cuando crece en medio M<sub>1</sub> al que se añade glioxilato, muestra una pluralidad colonial comparable a la que se halla sobre M<sub>1</sub> (4).

Un desarrollo colonial sobre  $M_1$  se traslada por caldo sobre un medio igual, en el que la cuarta parte de la glucosa se ha sustituido por su equivalente molar de glioxilato sódico. Ambas placas se revelan con *Pediococcus cerevisiae*. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que la presencia de glioxilato no modifica el pluralismo colonial.

#### 4. DISCUSION Y CONCLUSIONES

El revelado con *Pediococcus cerevisiae* puede considerarse como una verificación directa de la producción de alanina a nivel de colonia. Pone de manifiesto además que la segregación de alanina no se lleva a cabo uniformemente por todos los individuos de la población. Existen individuos no segregadores o menos segregadores, cuyo desarrollo hasta colonia lleva como consecuencia el acúmulo a su alrededor de suficiente menos cantidad de alanina como para diferenciarles bien claramente de otras colonias del mismo cultivo.

Este resultado coincide con el hallado por Guinea, que en experiencias análogas, utilizando la cepa auxotrófica glutamato-dependiente de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8.042, mostró una heterogeneidad colonial estable en los mismos cultivos respecto a la segregación de glutamato.

No obstante, en el caso del revelado de alanina no se logran resultados tan claros para la heterogeneidad colonial como en el análisis del glutamato. Esto puede explicarse por la distinta concentración de aminoácidos, mucho mayor en la alanina (2). También por la mayor sensibilidad del *Leuconostoc mesenteroides*, reflejada en las técnicas de valoración de aminoácidos (3). Puede deberse asimismo a diferencias en la velocidad de difusión de ambos aminoácidos.

Los resultados obtenidos con el revelado separado de las mismas colonias, con una y otra cepa auxotrófica, sugieren la identidad entre ambos fenómenos. Esto es, las colonias que acumulan poco o nada alanina a su alrededor no acumulan glutamato y viceversa. Se considera que este resultado es importante por cuanto plantea la posibilidad de que todo el fenómeno de segregación de aminoácidos en *Citrobacter intermedium*  $C_3$  obedezca a un mismo mecanismo.

Las experiencias indicadas en 3,4 confirman la identidad de la segregación de alanina y glutamato. El  $\alpha$ -cetoglutarato introducido en el medio de crecimiento produce una conversión fenotípica de las formas no se-

gregadoras en uno y otro caso. El glioxilato no modifica el pluralismo colonial. Se hace, pues, más consistente la hipótesis de que la producción de los dos aminoácidos esté encadenada y sea consecuencia de un mismo mecanismo primario que diferenciaría los elementos segregadores de los no segregadores.

### RESUMEN

El *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> (C) es una cepa caracterizada por acumular una considerable cantidad de aminoácidos extracelularmente, durante su crecimiento en un medio mineral con glucosa.

Se ha puesto a punto una técnica microbiológica para demostrar la producción de alanina a nivel de colonia. Se ha hallado una heterogeneidad colonial, en cuanto a esta segregación, del tipo de la observada para la segregación de glutamato utilizando una técnica similar (4-5).

Mediante traslado de colonias se estudia la heterogeneidad colonial para ambos aminoácidos en la misma colonia. También cuando el crecimiento tiene lugar en medios con distintos intermediarios metabólicos. Se efectúan asimismo ensayos de inhibición cruzada.

Del resultado de estas experiencias puede concluirse que la segregación de alanina y glutamato obedece a un mismo mecanismo.

### SUMMARY

*Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> is a bacterial strain characterized by the extracellular accumulation of a considerable amount of amino acids during its growth in a mineral medium with glucose (1-2).

A microbiological technique has been developed to reveal alanine surrounding colonies. As previously pointed out for glutamate (4-5) this method shows two different colonial types, a highly and a poorly segregated one.

The amino acid types surrounding the same bacterial colonies have been examined by the replication plating method in media tested for glutamate and alanine respectively. Furthermore, the colonial analysis has also

been made after the addition of  $\alpha$ -cetoglutarate, glioxilate, glutamate or alanine. The colonies segregators fraction remained unchanged. This suggests a unique mechanism for the segregation of both amino acids.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. CLOTTET, R.; GUINEA, J., y PARÉS-FARRÉS, R. 1968. Segregación de aminoácidos por una cepa de *C. intermedium*. Microbiol. Españ., 21, 155.
2. CLOTET, R.; GUINEA, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1969. Producción de alanina por fermentación con *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub>. Rev. Españ. Fisiol., 25, 41.
3. Difco. 1965. Microbial Assay of Vitamins and Amino Acids. Difco Laboratories, Detroit, Michigan.
4. GUINEA, J. 1966. Estudio sobre la segregación de aminoácidos por *Escherichia intermedia* C<sub>3</sub> y su condicionamiento genético. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona.
5. GUINEA, J. 1970. Análisis colonial de la producción de ácido glutámico en *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub>. Microbiol. Españ., 23, 13.
6. HERNÁNDEZ, S. 1968. Segregación de glutamato en *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> como propiedad determinada por la presencia de un factor episómico. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona.
7. STEEL, B. F.; SAUBERLICH, H. E.; REYNOLDS, M. S., y BAUMANN, C. A. 1949. Media for *Leuconostoc mesenteroides* P-60 and *Leuconostoc citrovorum* 8081. J. Biol. Chem., 177, 533.

## INCIDENCIA DE GERMESES MINERALIZADORES DE FOSFATOS EN SUELOS DE VEGA Y SECANO DE LA PROVINCIA DE GRANADA

por

J. M. BAREA, A. RAMOS y V. CALLAO

### INTRODUCCION

La mineralización biológica de fosfatos orgánicos y su posible relación con la Agricultura, ha motivado numerosas investigaciones. Estos estudios han sido recientemente recopilados en un trabajo de revisión (3).

Consideramos de gran interés, entre los múltiples aspectos de este tema, estudiar la incidencia de tales gérmenes en suelos de cultivo.

Greaves y Webley (5) investigaron la presencia de estos gérmenes en la rizosfera de ciertos pastizales, consignando las cifras de incidencia de mineralizadores.

Diversos autores, entre ellos Kotelev (7) y Pisemskaya (9), estudian la incidencia de solubilizadores de fósforo orgánico en los suelos, desde el punto de vista de una respuesta a la inoculación con fosfobacterinas.

Ramos y colaboradores (12) tratan la incidencia de población fúngica solubilizadora de fosfatos dedicando un apartado a la mineralización de glicerofosfato.

Pretendemos estudiar la incidencia de este grupo de gérmenes del fósforo en suelos de cultivo de la provincia de Granada, realizando unas experiencias encaminadas a investigar la influencia que las condiciones de cultivo (regadío, secano, fase de cultivo, abonado con materia orgánica) tienen sobre la presencia cuantitativa de dichos microorganismos en los suelos agrícolas.

## MATERIAL Y METODOS

Partimos de muestras de suelos tomadas en parcelas de vega y secoano de la provincia de Granada.

Las características agrícolas más importantes y las condiciones en que se cultivan son las siguientes:

*Parcela núm. 1.* Secano sin cultivar. Finca de "Las Viñas", Casa-Nueva, término municipal de Pinos-Puente (Granada).

*Parcela núm. 2.* Secano cultivado. Parcela análoga a la de la experiencia anterior, situada en la misma finca. Toma de muestras: cuarenta días después de la recolección del fruto.

*Parcela núm. 3.* Secano en pleno cultivo (floración). La misma parcela de la experiencia anterior. Toma de muestras: en la rizosfera del suelo.

*Parcela núm. 4.* Vega sin abonado orgánico. Finca de "Las Escribanas", Anzola, término municipal de Pinos-Puente (Granada). Toma de muestras: en la rizosfera del suelo.

*Parcela núm. 5.* Vega con abonado orgánico (estercolado). Parcela análoga a la de la experiencia anterior, situada en la misma finca. Idéntico cultivo (trigo) en ambas.

Con las muestras tomadas tal como describe Pochon (10), efectuamos suspensiones-diluciones de suelo, seriadas al 1/10 y recuentos en placa.

El medio de cultivo utilizado fue el R-C (Ramos y Callao, 11) adicionado del fosfato orgánico en estudio (lecitina, glicerofosfato cálcico y fitato cálcico). La preparación de dichos fosfatos y su adición al medio de cultivo es descrita por nosotros (4).

Los gérmenes capaces de utilizar el fósforo de cualquiera de estos fosfatos, muestran un halo de solubilización en torno a su colonia. De esta forma, el recuento es doble: de un lado, microflora total, de otro, microflora solubilizadora.

El proceso general seguido está basado en técnicas recomendadas por Pochon (10) y Allen (2), expresándose los resultados por el método representativo gráfico de Lavergne (8).

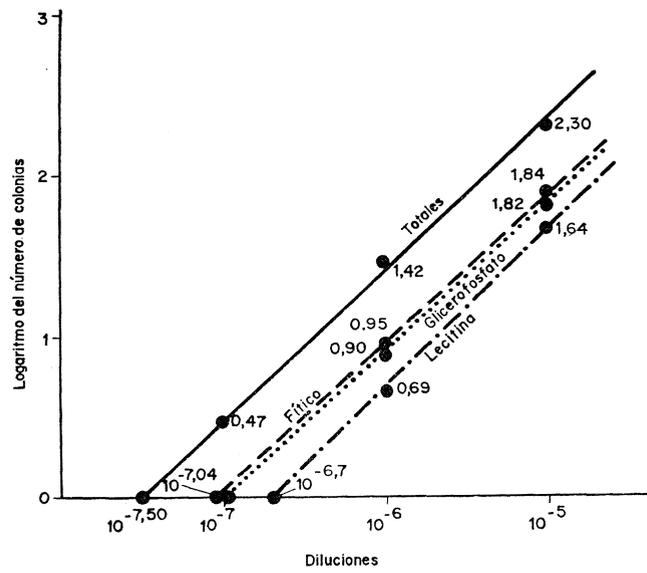


Figura 1

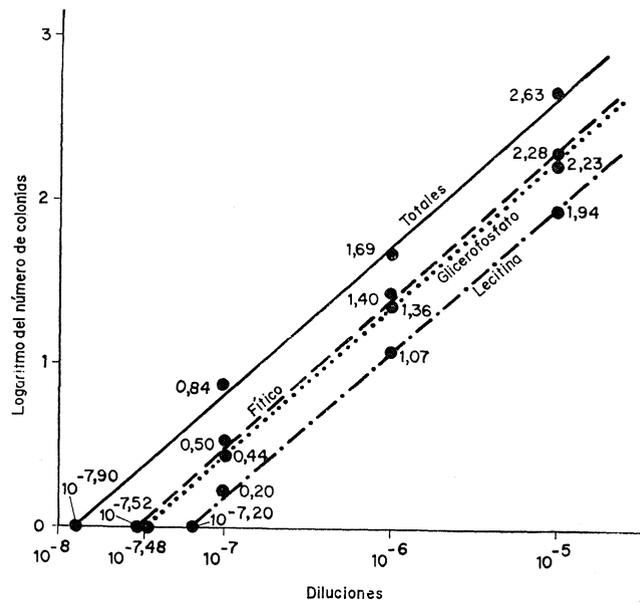


Figura 2

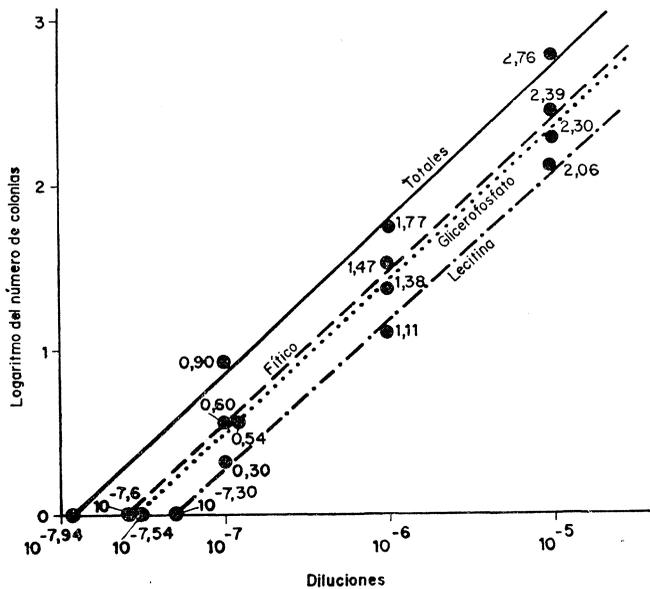


Figura 3

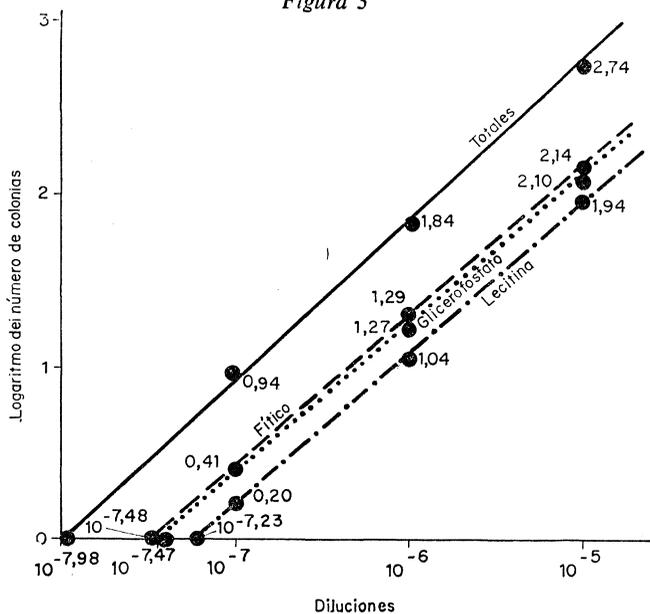


Figura 4

RESULTADOS Y DISCUSION

En las figuras 1-5, exponemos los resultados de los recuentos efectuados en las correspondientes parcelas.

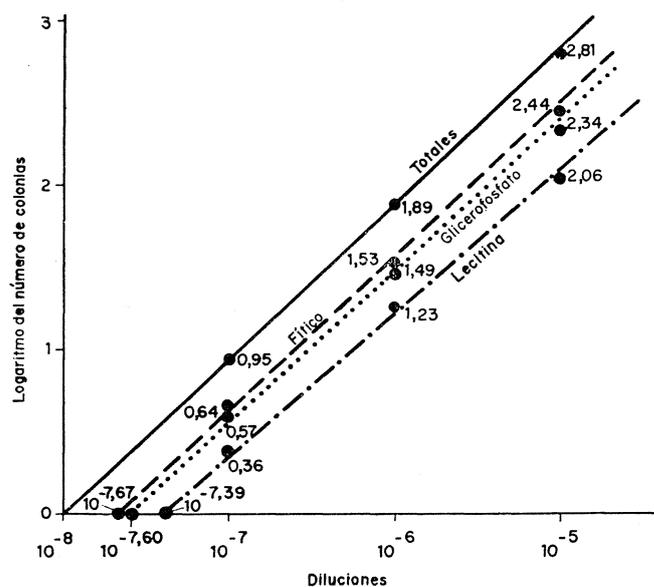


Figura 5

En el cuadro 1, resumimos los valores numéricos resultantes de la interpretación de las gráficas, referidos ya a peso seco de muestra.

Cuadro 1

Experiencia	Porcentaje de mineralizadores de			Flora total
	Lecitina	Glicero-fosfato	Fitato	Gérmenes/ gramo
1	16	34	31	33.260.000
2	20	38	42	85.000.000
3	22	40	45	97.800.000
4	18	31	32	112.300.000
5	25	40	47	116.200.000

Los estudios comparativos que realizamos, basándonos en estos datos numéricos, son significativos para  $P \leq 0,01$ .

De estos resultados experimentales se deducen las conclusiones que siguen.

a) En todos los casos estudiados, el número de gérmenes que actúan sobre glicerofosfato y fitato es sensiblemente similar, mientras que el número de microorganismos con capacidad lecitinolítica es bastante menor. Las conclusiones obtenidas por Greaves y Webley en este aspecto, son semejantes a las nuestras.

b) Consideremos ahora la influencia de la fase de cultivo; concretamente en el *cuadro 1*, los resultados en las experiencias 1, sin cultivar, y 2 y 3, en suelo cultivado, podrían orientarnos sobre esa influencia.

Es un hecho concreto que la microflora total aumenta casi en un 300 % en terreno cultivado, con respecto al no cultivado. La planta tiene una manifiesta necesidad de nutrientes y la flora microbiana experimenta una lógica estimulación para poder cooperar a proporcionárselos.

Punto muy interesante para nosotros es que la estimulación por el cultivo también se aprecia marcadamente, en el tanto por ciento de mineralizadores de fósforo con respecto a la flora total.

También se observa que tanto la microflora total como los gérmenes del fósforo en particular, se encuentran perceptiblemente incrementados en el período de floración (y principios de fructificación) (experiencia 2) comparativamente con los resultados obtenidos en el mismo suelo, una vez realizada la cosecha.

La floración es un período de plétora en cuanto a necesidad de nutrientes para la planta. El catabolismo y anabolismo del vegetal aumentan, ocurriendo, como consecuencia, una estimulación en la actividad biológica de la rizosfera.

c) Es difícil generalizar resultados en la comparación de suelos de vega y secano, debido a que este estudio, al estar influido por la constitución del complejo edáfico, requeriría unas parcelas idénticas, una con abundante regadío y otra, de secano, para hacer comparativos los resultados.

Globalmente, confirmamos que el óptimo en las condiciones hídricas parece proporcionar un lógico incremento en la microflora total; sin embargo, las cifras de tanto por ciento de mineralizadores son superiores en terreno de secano. Las grandes diferencias aportadas por el factor "suelo", nos impiden conceder significación a los resultados.

d) Las experiencias realizadas en parcelas idénticas (vega), pero ha-

biendo sido tratada una de ellas con fuerte adición de estiércol, nos permite estudiar la influencia de la materia orgánica (*cuadro 1*, experiencias 4-5).

Los fosfatos orgánicos, que tan profusamente intervienen en la composición del estiércol (13), constituyen un substrato ideal para el desarrollo de gérmenes movilizadores de fósforo orgánico, por lo que el número de estos microorganismos en la parcela estercolada se encuentra decisiva y concluyentemente incrementado.

Por esto, es lógico considerar que la presencia de materia orgánica parece ser un factor trascendental en la incidencia de este tipo de gérmenes en el suelo.

Nuestra opinión en este aspecto concuerda con las conclusiones de Somoilov (14), Karaguliam (6) y Afanas'Eva (1), entre otros autores, los cuales establecen la influencia beneficiosa de la presencia de materia orgánica en la actividad de una fosfobacterina.

#### RESUMEN

Se aplica la técnica de recuento en placa para estudiar la incidencia de gérmenes mineralizadores de fosfatos en suelos agrícolas.

La mineralización se detecta cuantitativamente por la formación de halos de solubilización.

Los resultados muestran que la incidencia de dichos microorganismos se incrementa con el cultivo y presencia de materia orgánica en el suelo.

#### SUMMARY

The standard plate count method is applied to the study of the incidence of the microorganisms decomposing organophosphorus compounds in soils.

Mineralization is detected and quantitated by using a plate technique.

The results show that the incidence of such microorganisms is increased with the cultivation and presence of organic matter in soils.

## BIBLIOGRAFIA

1. AFANAS'EVA, A. L., y ANDRANOVA, T. M. 1959. Experiment on the use of phosphobacterin on soils of Omsk region. *Udobr. Urozhai*, 5, 44-47.
2. ALLEN, O. N. 1951. *Experiment in Soil Bacteriology*. Burgess Publishing Minneapolis, Minnesota.
3. BAREA, J. M. 1969. Estudio sobre gérmenes del suelo capaces de mineralizar los fosfatos orgánicos. I. Introducción y revisión bibliográfica. *Ars Pharm.*, X, 117-28.
4. BAREA, J. M.; RAMOS, A., y CALLAO, V. Contribución al estudio *in vitro* de la mineralización bacteriana de fosfatos. Pendiente de publicación.
5. GREAVES, M. P., y WEBLEY, D. M. 1965. A study of the breakdown of organic phosphates by microorganisms from the root region of certain pastures grasses. *J. Appl. Bacteriol.*, 28, 454-65.
6. KARAGULIAN, S. A. 1958. Application of phosphobacterin in Armenia. *Biol' i Selskokhoz. Nauki*, 11, 81-88.
7. KOTELEV, V. V. 1956. The application of bacterial fertilizers to the Kalarash region. *Izv. Moldavsk. Filiala Akad. Nauk. SSSR*, 5, 77-85.
8. LAVERGNE, D. 1954. Signification et interprétation de la numération sur plaques des germes telluriques. *Ann. Inst. Pasteur*, 86, 503-10.
9. PISEMSKAYA, V. A., y KOCHOUNOVA, T. A. 1956. The use of bacterial fertilizers for winter wheat under the arid condition of the Stravopol'Border region. *Byul. Nauchn-Tekhn. Inform. Stravopol Nauchn-Issled. Inst. Selskokhoz.*, 1-2, 52-53.
10. POCHON, J. 1954. *Manual Technique d'Analyse Microbiologique du Soil*. Masson et Cie, Paris.
11. RAMOS, A., y CALLAO, V. 1967. El empleo de solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana. *Microbiol. Españ.*, 20, 1-12.
12. RAMOS, A.; CALLAO, V., y CARVALHO, P. C. T. de. 1968. La solubilización de fosfatos por hongos del suelo. *Microbiol. Españ.*, 21, 23-37.
13. SAUCHELLI, V. 1965. *Phosphates in Agriculture*. Reinhold Publishing Corporation, Nueva York.
14. SOMOILOV, I. I.; BEREZOBA, E. F., y colaboradores. 1953. The effectiveness of and conditions required for the application of phosphobacterins. *Selskokhoz. Mikrobiol.*, 8, 173-92.

## CONGRESO DE VIROLOGIA

Se proyecta celebrar el II Congreso Internacional de Virología en Budapest, del 5 al 11 de septiembre de 1971.

Todas las personas interesadas pueden dirigirse a:

Dr. I. Dömök, Registrar  
2nd International Congress for Virology  
MOTESZ  
Apród-u.1,  
Budapest I (Hungria)

Depósito legal: M. 702. - 1958.

---

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15. Madrid