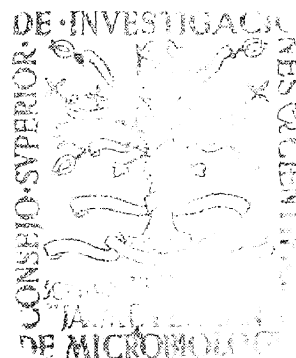


Microbiología Española

Revista

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



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

Vicedirector: Dr. Fernando Baquero, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Vocales: Dr. Jorge Francisco López-Tello, Dr. Antonio Portolés, Profesor Agustín Pumarola, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó y Dr. Gonzalo Sierra.

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

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Calle de Joaquín Costa, 32 MADRID-6 (España)

Suscripción (4 números): España, 300 PTA; extranjero, 400 PTA

Número: España, 85 PTA; extranjero, 120 PTA

RECOMENDACIONES A LOS AUTORES

"Microbiología Española" publicará fundamentalmente trabajos y notas de investigación, dentro del campo de la Microbiología, y también trabajos doctrinales que se estimen de interés especial. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquiera otra revista. Los que aparezcan en "Microbiología Española" podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, deberán estar escritos a máquina, en papel de tamaño holandesa, por una sola cara, a doble espacio y márgenes de 2 cm a cada lado como mínimo. Los dibujos, con tinta china y en papel vegetal; las cifras, letras y leyendas, a lápiz. Para orientación de los autores, las dimensiones de la caja son $18 \times 11,5$ cm.

En la cabecera de la primera página se harán constar: Centro en que se ha realizado el trabajo, título (conciso), nombre del autor (o inicial) en letras minúsculas y apellido, en mayúsculas. Al pie de la página deberá figurar la dirección postal del autor.

En líneas generales, los trabajos de investigación constarán de: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Resumen en la otra lengua y Bibliografía. Las notas y trabajos doctrinales se redactarán con arreglo a su naturaleza.

Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. Cuando se adopten abreviaturas no corrientes deberán advertirse en el texto. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización, para los textos en español.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. Los datos se presentarán en forma de cuadro o de figura; cuadros y figuras, independientemente, estarán numerados y citados en el texto.

El resumen en la otra lengua, de un máximo de doscientas palabras, deberá contener el título del trabajo, un breve esquema del mismo y las conclusiones (abreviadas, en su caso).

La bibliografía se reducirá a la que esté directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabetizadas, se ajustarán al siguiente orden: Revistas: apellido del autor, inicial del nombre, año, título del trabajo, nombre abreviado de la revista (según Chemical Abstracts), número del tomo o volumen y páginas inicial y final.

Libros: apellido del autor e inicial del nombre [en su caso, del recopilador ("editor")], año, título de la obra, tomo o volumen, capítulo (en su caso), página, editorial y población.

Los autores recibirán pruebas que deberán devolver en el plazo máximo de diez días para los residentes en España, y en el de veinte, para el extranjero. Transcurridos dichos plazos sin devolución de pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha de envío se anulará. Las modificaciones hechas por el autor que excedan del 2 % del texto serán abonadas por él.

Cada autor tendrá derecho a treinta separatas gratuitas; si deseara más, deberá indicarlo por escrito cuando devuelva las pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

La responsabilidad de los conceptos escritos corresponde a los autores.

Los trabajos se enviarán al Secretario de "Microbiología Española", Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo Rector de la Revista.

I N D I C E

	Página
Obtención y estudio ultraestructural de las formas L inducidas por glicocola en <i>Pseudomonas viridiflava</i> , por M. Rubio-Huertos y M. ^a Dolores Hernández	83
Las podredumbres bacterianas del tabaco en España, por M. Durán-Grande	103
Observaciones relativas a la existencia de "flora" de levaduras no esporógenas, resistente a condiciones adversas de medio ambiente, por E. Feduchy, con la colaboración técnica de Pilar Marcilla	135
Variaciones en la beta-lactama-resistencia de <i>Staphylococcus</i> y <i>Pseudomonas</i> cultivados en quimostato, por V. Campos, R. Corripio y A. Portolés	157
Conservación de bacteriófagos de estafilococo, por E. J. Perea y M. V. Borobio	167

C O N T E N T S

	Page
Ultrastructure of transient L form induced by glycine in <i>Pseudomonas viridiflava</i> , by M. Rubio-Huertos and M. ^a Dolores Hernández	83
Bacterial rot of the tobacco plant in Spain, by M. Durán-Grande	103
Observations relatives to the existence of "flora" of the asporogenous yeasts, resistant to the adverses conditions of the ambient, by E. Feduchy with the technical assistance of Pilar Marcilla	135
Varitions in the beta-lactame resistance of <i>Staphylococcus</i> and <i>Pseudomonas</i> species growing in a chemostat, by V. Campos, R. Corripio and A. Portolés	157
Conservation of staphylococcal bacteriophages, by E. J. Perea and M. V. Borobio	167

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA
SECCION DE VIRUS VEGETALES

OBTENCION Y ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS FORMAS L INDUCIDAS POR GLICOCOLA EN *PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA*

por

M. RUBIO - HUERTOS y M.^a DOLORES HERNÁNDEZ

INTRODUCCION

El estudio de variantes bacterianas de fase L nos da un material útil para comprender la biología molecular de la división celular, ya que la formación de variantes de fase L en bacterias, tanto gram-negativas como gram-positivas, va acompañada de una pérdida de organización de la pared celular, fundamental para el proceso de división de las bacterias normales. También, en las formas L reversibles, el análisis del proceso de reversión de la fase L a la normal puede ayudar a la comprensión de los mecanismos de formación de la pared celular en bacterias.

Por otra parte, la gran semejanza entre formas L y micoplasmas, dado el interés de estos últimos como patógenos, hace deseable un más profundo estudio de las formas L comparativamente con los micoplasmas, pues es posible que los micoplasmas no sean otra cosa que formas L espontáneas de bacterias patógenas.

Por todo lo anterior, hemos emprendido este trabajo de inducción de formas L en una bacteria patógena para las plantas, bacteria de la cual no se conocen hasta el presente las formas L.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismo

Pseudomonas viridiflava (Burkholder), núm. 2.012 de la colección de bacterias fitopatógenas de Harpenden (Inglaterra). Bacilos gram-negativos, móviles, de 0,75-1,5 μ . Produce pigmento verde, fluorescente, en cultivo líquido.

Medios de cultivo

Para que conserve la patogenicidad y todas las características descritas, es conveniente resembrarlas en el medio caldo agar-judías: se compone de un medio base de judías verdes, añadido en un 10 % al caldo común agar.

Medio base de judías verdes

1 kg de judías verdes se tritura en turmix, añadiendo 2 l de agua destilada. Una vez trituradas, se filtran por doble gasa, se esterilizan a 120 °C durante 20 min, en caliente, se vuelve a filtrar por papel de filtro y se esteriliza de nuevo a 115 °C, 20 min.

Placas agar-judía + glicocola

Preparar una solución de glicocola en la proporción necesaria en agua destilada, 4, 6, 8 y 10 % y esterilizarla a 100 °C, durante 20 min.

Añadir a las placas de agar-judía, en caliente, la cantidad necesaria de esta solución de glicocola para que queden en la proporción anterior.

Placas de agar-judía + glicocola + suero

Las placas de agar judía con la glicocola, al tanto por ciento deseado, se dejar enfriar a una temperatura de 45°-50 °C y se añade el suero.

Si se emplea el suero DIFCO se pone en la proporción que se indique y si se trata de suero normal de caballo, en la proporción del 10 %.

Obtención de la fase L

a) Se sembró *Pseudomonas viridiflava*, procedente de cultivo en agar-judía, en tubos de agar-judía, inclinados y después de una incubación a 24 °C, de 2 h, se les añadió 2-4 cm³ de solución estéril de glicocola al

4, 6, 8 ó 10 %, en agua destilada. En el agar inclinado se forma un gradiente de concentración de glicocola y se ve a qué altura se forman las colonias L y con ello se calcula aproximadamente la concentración óptima de glicocola para poner en placas de Petri.

b) Resiembra en placas de Petri; se empleó medio agar-judía y medio agar-judía + suero y concentraciones de glicocola de 8 y 10 %.

Microscopia normal y electrónica

Los elementos componentes de colonias L se observaron en un fotomicroscopio Zeiss II.

Para microscopia electrónica se fijaron *in situ* las colonias con glutaraldehído, al 2 %, en tampón de Palade, con 1 % de cloruro cálcico, durante 30 min; se lava bien con tampón, 4 veces durante 2 h y luego se realiza una posfijación con ácido ósmico al 2 % en tampón de Palade y cloruro cálcico, para lo que tomamos con una espátula las colonias de la superficie del agar donde han crecido y los reunimos en un pocillo, donde ponemos unas gotas de agar para que al enfriarse queden incluidas las colonias L formando un bloque, éste se corta en trozos pequeños que se sumergen en el osmio y a las 2 h, en frío (4 °C), se sacan y se deshidratan en una serie de acetonas de concentración creciente. Después se incluyeron en durcupán y endurecieron en estufa a 45 °C y 65 °C. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo LKB con cuchillas de vidrio y los cortes se tiñeron con citrato de plomo (5). Las observaciones se realizaron con microscopios electrónicos Elmiskop I y Phillips 300.

RESULTADOS

Colonias L

En los tubos de agar-judía inclinados, a los que se añadió glicocola al 6 %, aparecen, a las 24-30 h, colonias normales, es decir, blancas, lisas y de bordes enteros, y junto al borde de la solución con glicocola aparecen algunas colonias confluentes y de aspecto mucoso.

En los tubos con el medio anterior y con glicocola al 8 y 10 %, en el mismo tiempo, las colonias son muy mucosas y transparentes, de bordes lisos. Estas colonias se resiembran en placas de Petri agar-judía con 10 %

de glicocola y se obtienen en 24-36 h colonias redondas, de bordes lisos, transparentes y muy mucosas; no aparecen colonias normales.

Composición de las colonias L

Tomas de las colonias mucosas y transparentes, crecidas en los tubos inclinados y observadas al microscopio de fase, mostraron elementos heterogéneos: formas bacilares normales, largos filamentos móviles y formas esféricas. En las colonias obtenidas por resiembra en placa de las colonias anteriores, el número de formas esféricas, grandes, formó el 90 % de los elementos, estando compuesto el resto en su mayoría por filamentos y restos celulares (*figura 1*).

Resiembras

Colonias L aisladas en placa con glicocola al 10 %, se resembraron cada 3 días en nuevas placas con glicocola al 10 % y de cada 3 resiembbras se hizo otra resiembra en medio de cultivo sin glicocola, es decir, en placas de agar-judía sin glicocola, para ver si las colonias seguían en forma L o revertían a la forma normal. Al cabo de 8 resiembbras en medios con glicocola y 3 en medio normal, tanto en la primera como en la última resiembra en medio sin glicocola, las colonias en 30 h fueron del tipo normal y los elementos que las componían eran bacilares normales.

Microscopia electrónica

Una vez obtenidas las colonias mucosas se fijaron en glutaraldehído-osmio, según se ha descrito anteriormente, y los cortes ultrafinos obtenidos se examinaron en un microscopio electrónico.

Se observaron diferentes formas que describiremos según la secuencia de formación.

Las formas de transición entre las formas normales y L aparecen a las pocas horas de acción de la glicocola sobre las formas normales en fase logarítmica de crecimiento. Se caracterizan porque todavía poseen una gran parte de pared celular rígida y solamente en un extremo o en un lado de la célula se empieza a formar un cuerpo globoso. Son típicas de estas formas la de porra o la de "conejito" y se puede observar que la mayoría del citoplasma con su ADN correspondiente, pasa al engrosamiento (*figuras 2-3*). Otras formas de transición son los filamen-



Figura 1. Formas esféricas de colonias L. Microscopio de contraste de fases



Figura 2. Formación apical de una forma esférica. Microscopio electrónico. $\times 46.200$

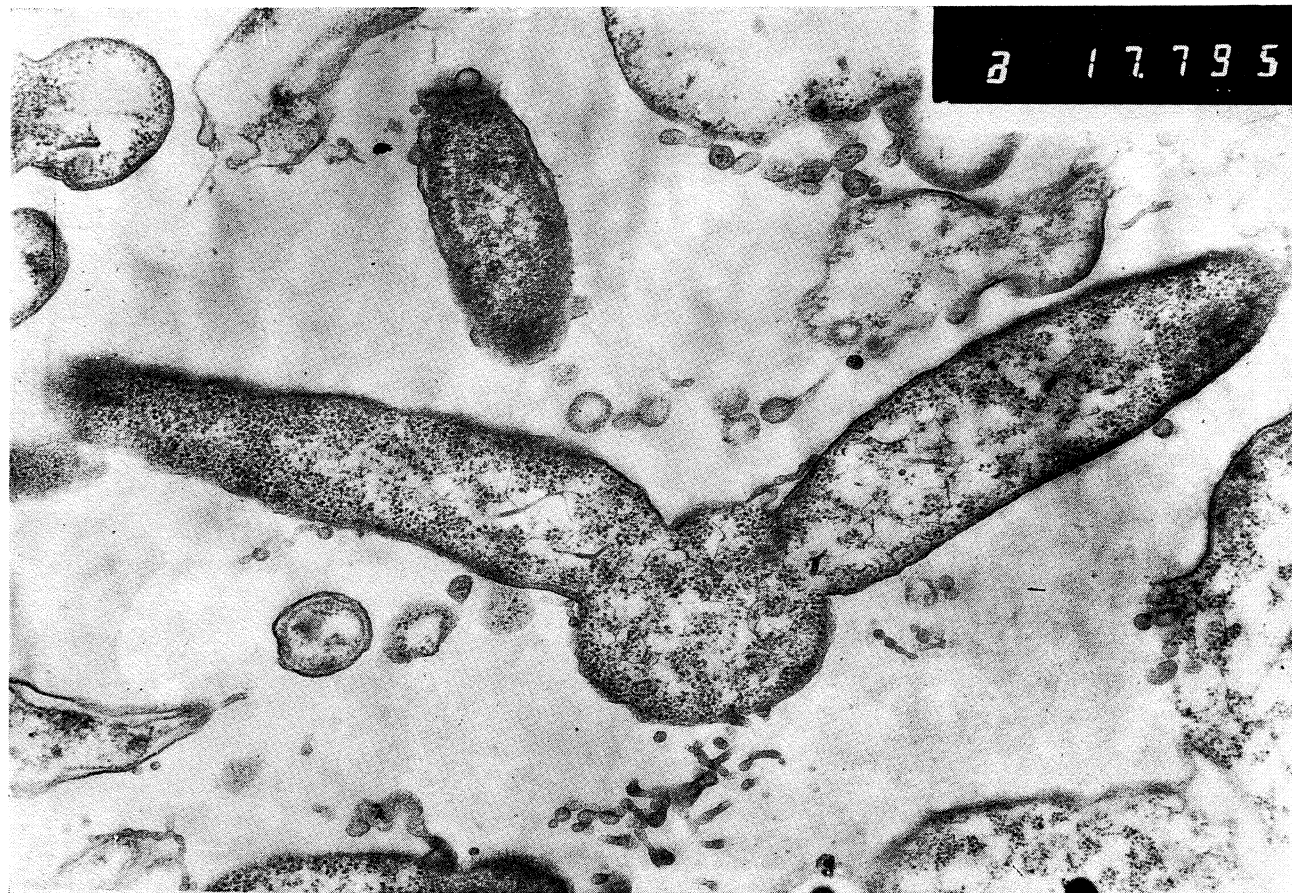


Figura 3. Forma en "orejas de conejo", formación lateral de elemento esférico. $\times 35.000$

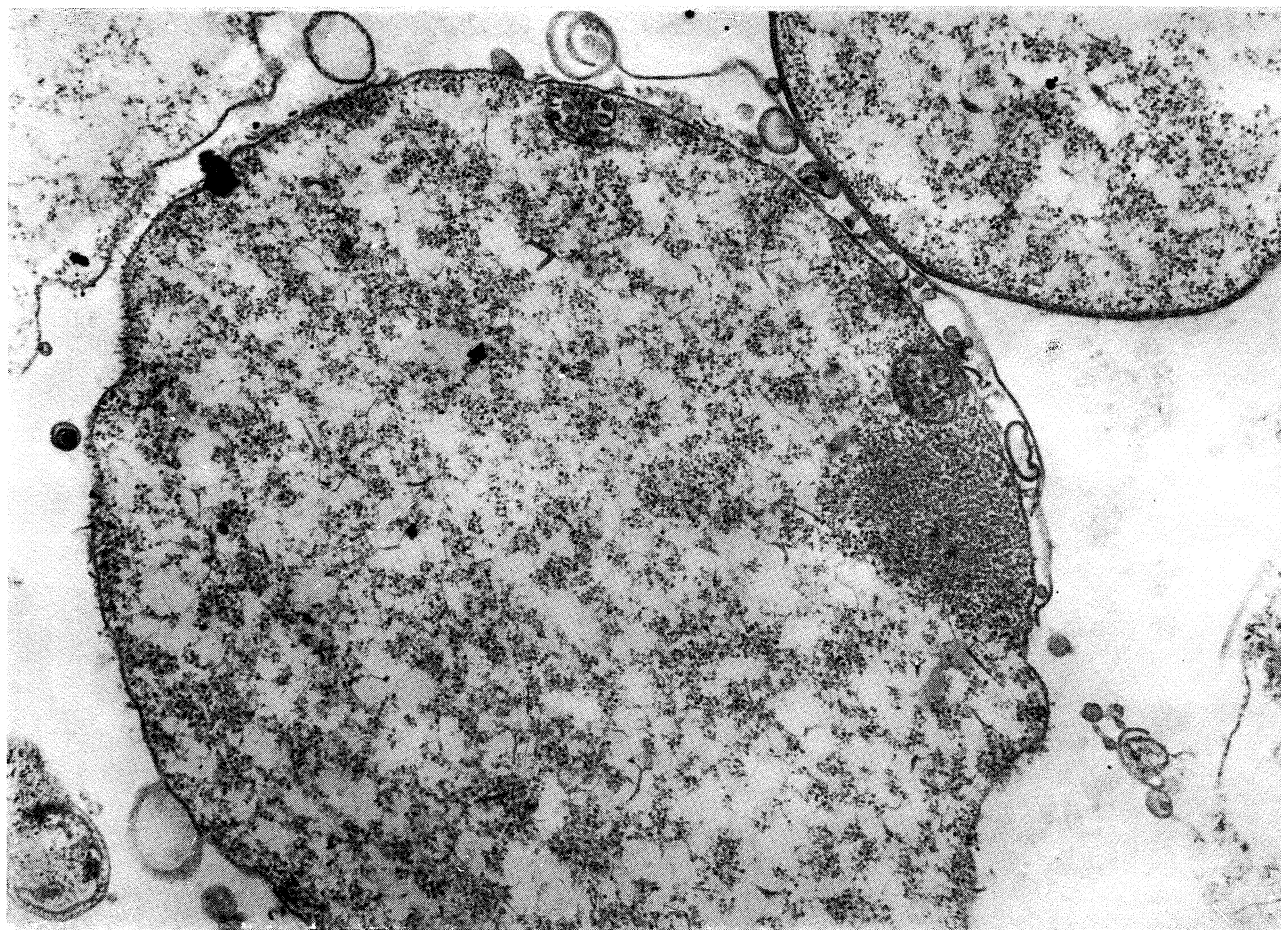


Figura 4. Forma L grande: está rodeada por una sola membrana, pero le quedan restos de pared celular que se están desprendiendo. $\times 41.800$

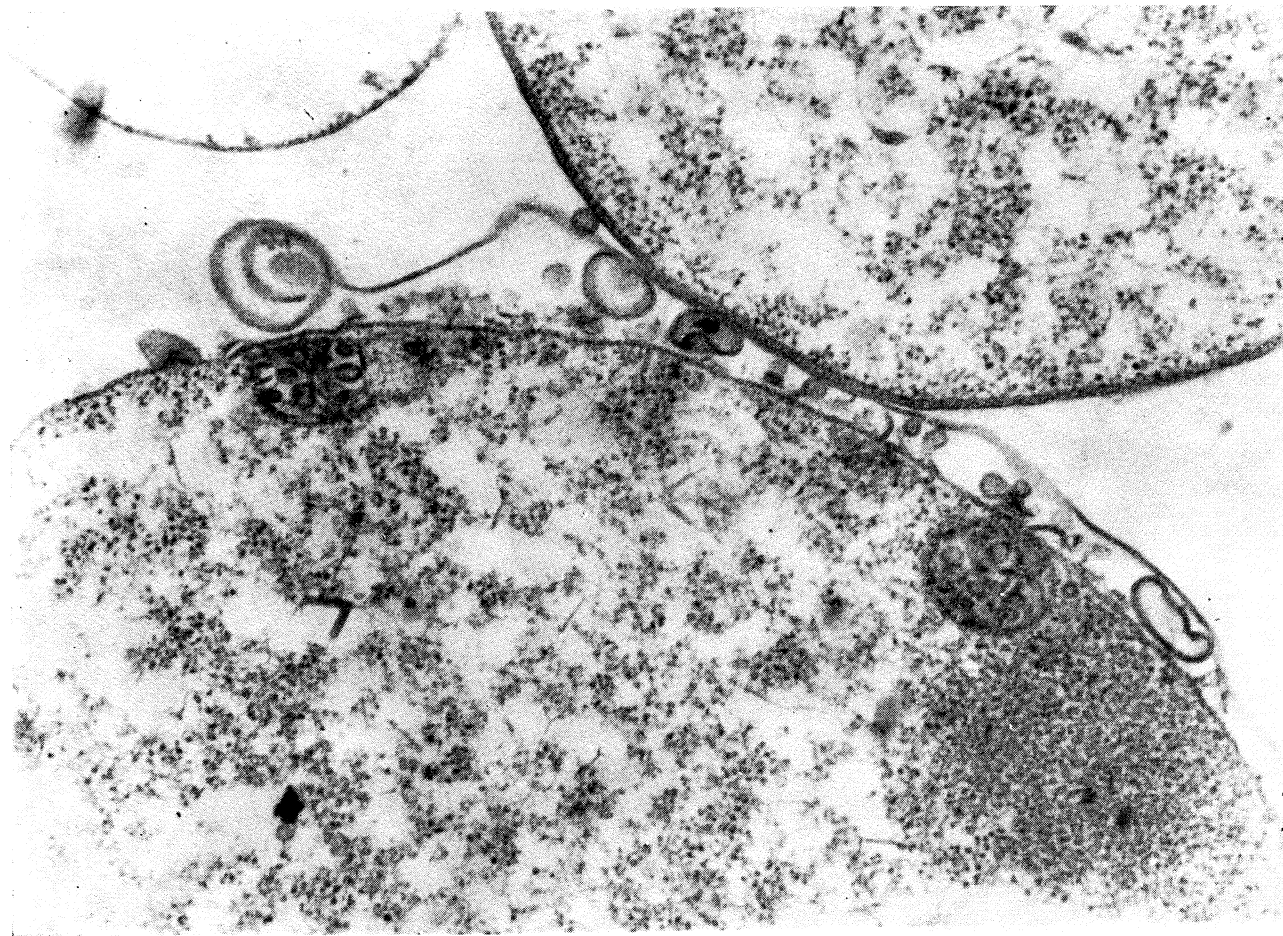


Figura 5. Zona aumentada de la figura 4, donde se ven los restos de pared celular y formación de vacuolas. Una forma intermedia, junto a ella, muestra poseer todavía membrana y pared celular. $\times 66.000$

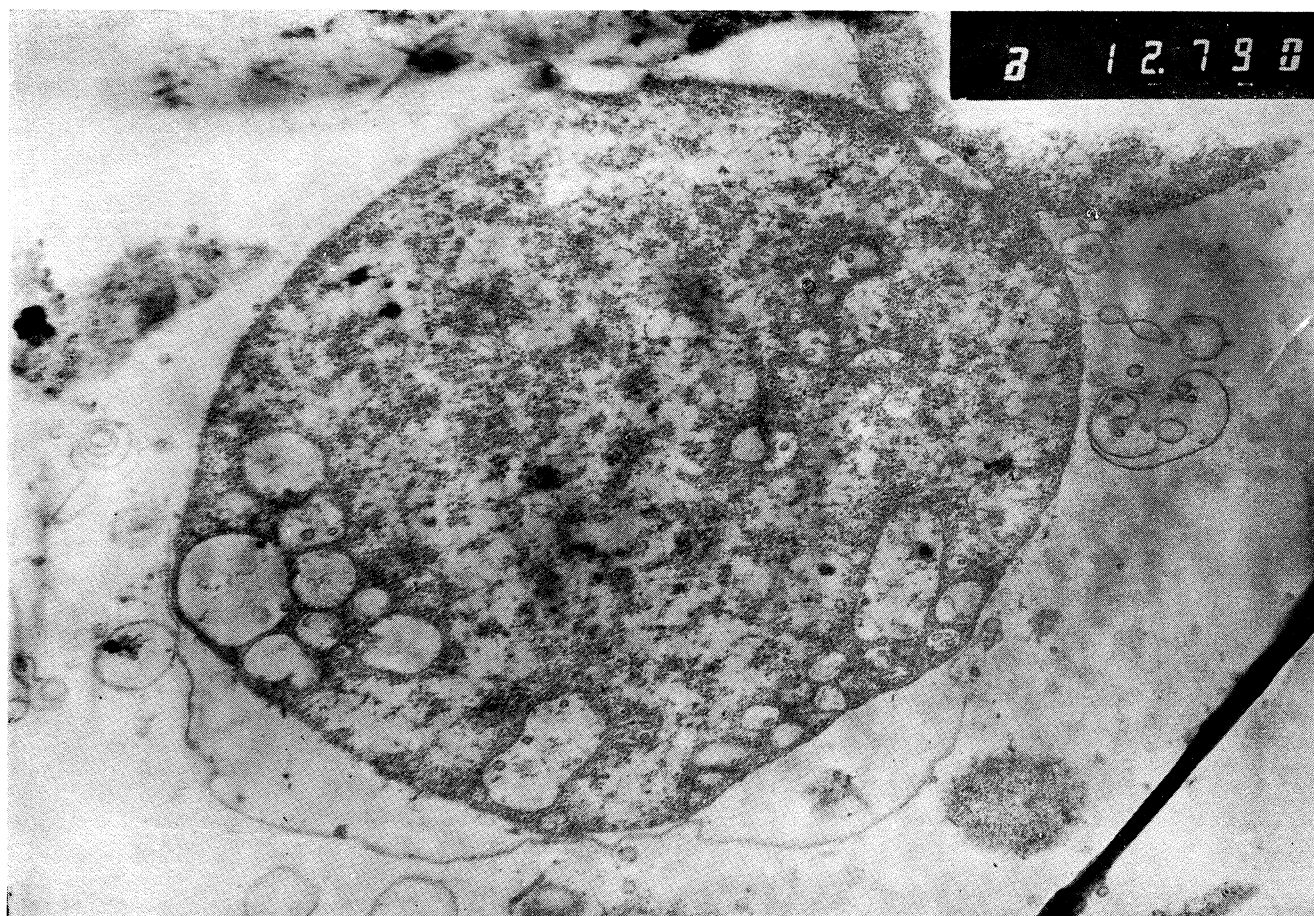


Figura 6. Forma L muy grande, con restos de pared celular y grandes vacuolas limitadas por membrana. $\times 30.000$

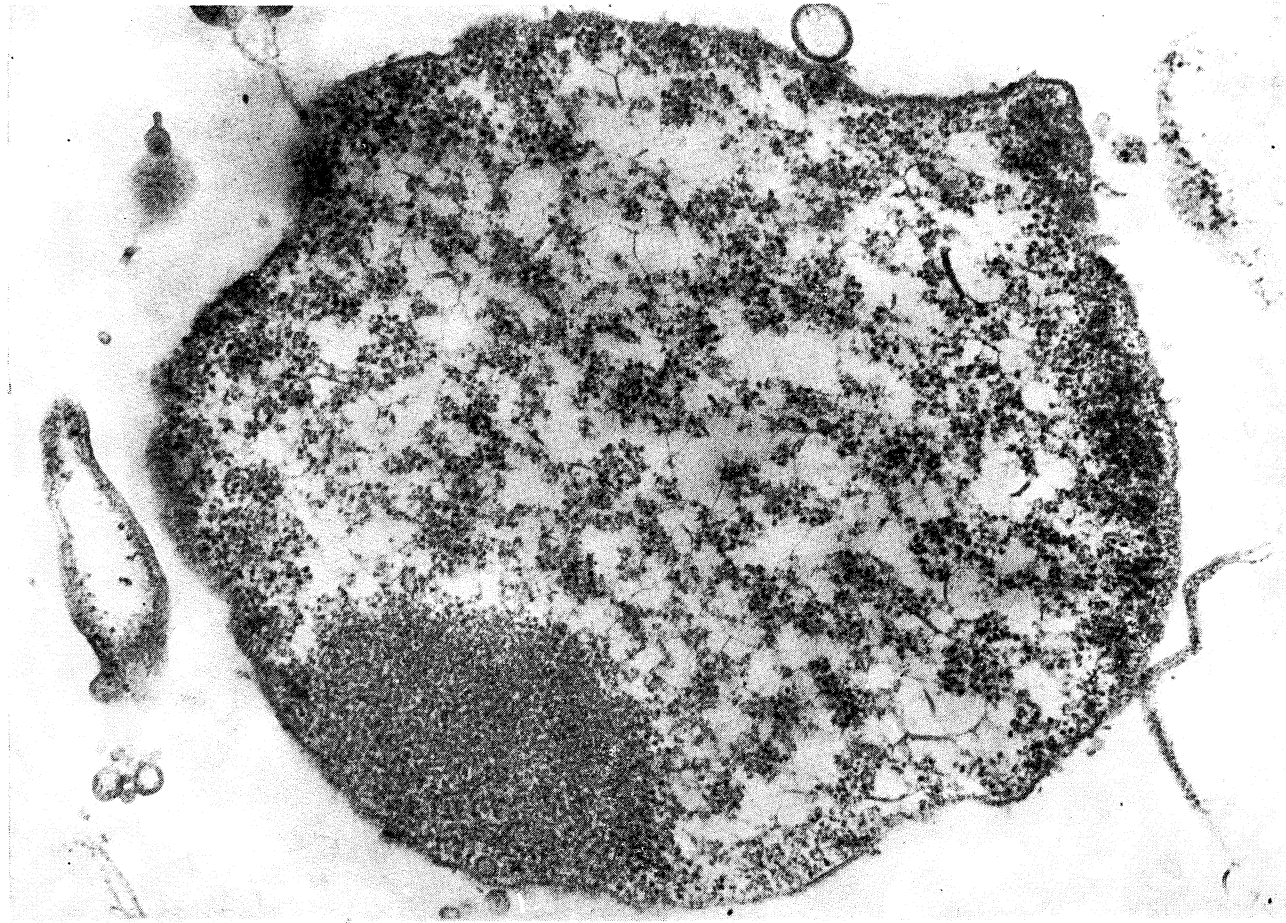


Figura 7. Forma L, rodeada de una sola membrana y con un acúmulo de ribosomas en un lado. $\times 61.000$

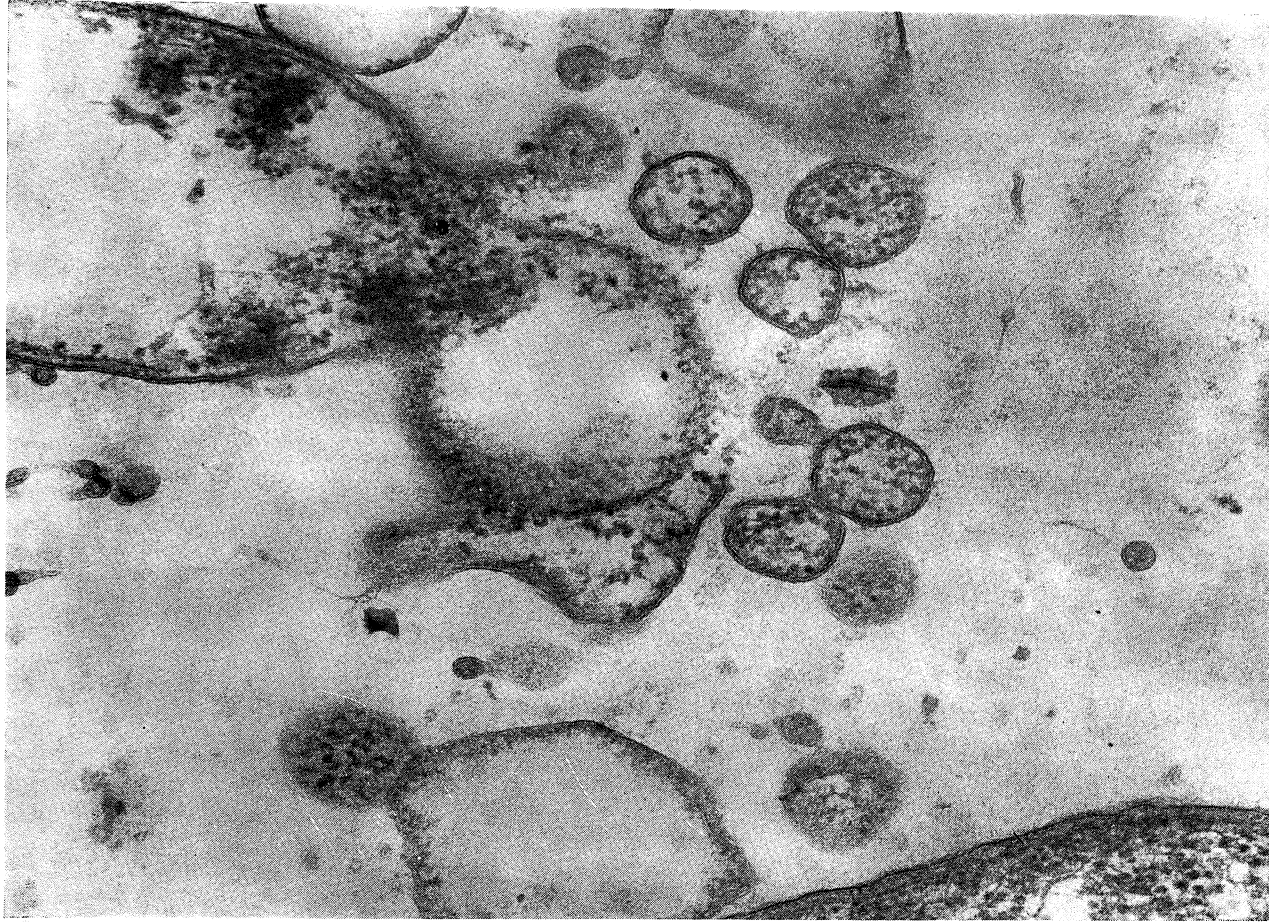


Figura 8. Restos de clulas y varios cuerpos elementales rodeados de una unidad de membrana y conteniendo ribosomas y posiblemente ácidos nucleicos. $\times 88.000$

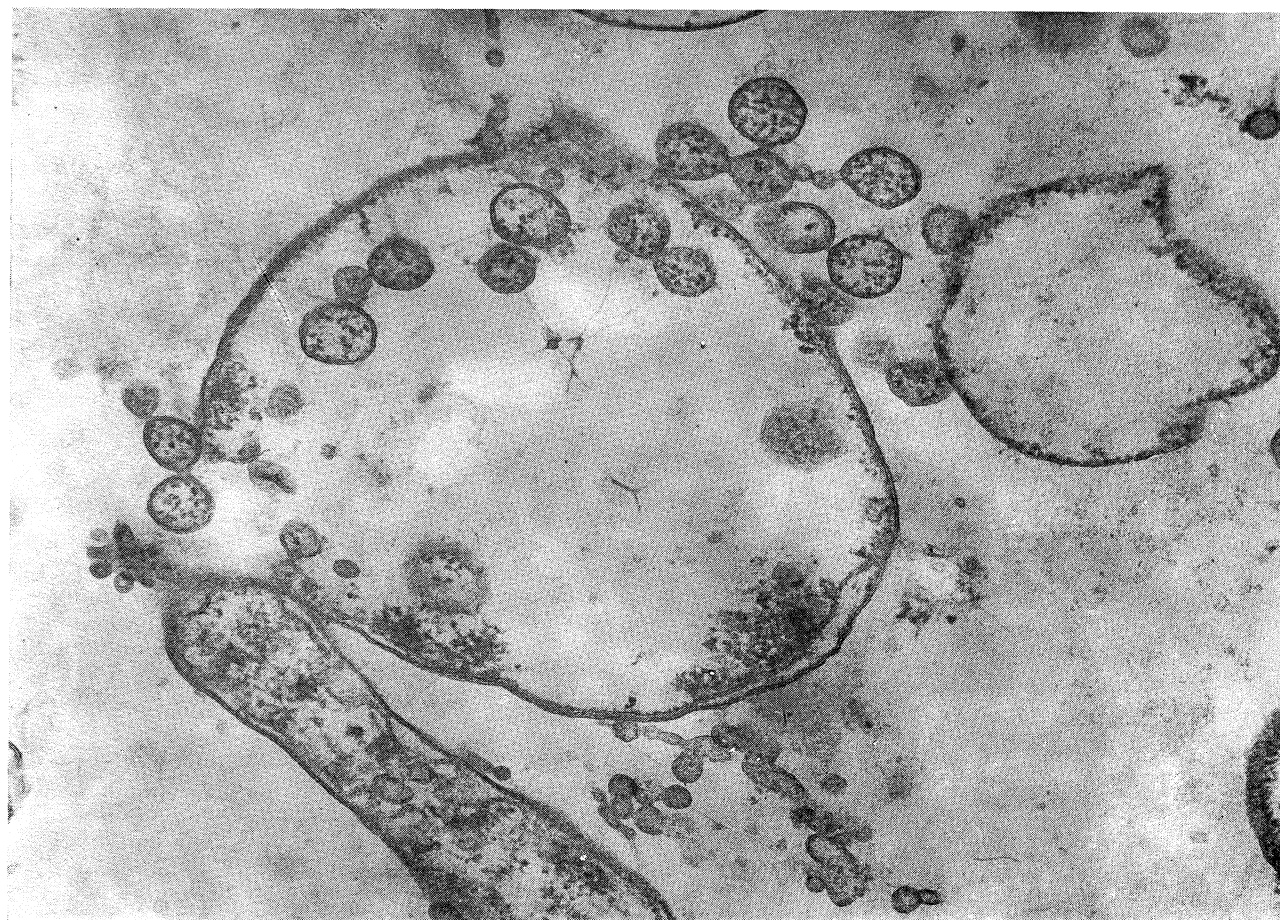


Figura 9. Una forma L grande, vaciándose de su contenido en cuerpos elementales. $\times 66.000$

tos, que se forman al producirse la inhibición de la formación de tabiques transversales.

Una fase más avanzada es la caracterizada por la formación de estructuras esféricas que todavía poseen la membrana celular y otra envoltura que morfológicamente corresponde también a una unidad de membrana y que es la pared celular modificada, hecha flexible por la acción de la glicocola. Esta membrana externa, en una fase aún más avanzada, se rompe y se desprende total o parcialmente del protoplasto (*figuras 4-6*). En esta fase, los cuerpos esféricos son de gran tamaño, de un diámetro 10-30 veces mayor que la sección de la forma bacilar normal. En estas formas aparecen vacuolas limitadas por una unidad de membrana (*figura 6*) y su citoplasma es menos denso que en las formas normales, aunque se pueden observar en ellas filamentos de ADN y ribosomas como en las formas normales. En algunos casos existe una acumulación de material denso en una determinada parte de la célula, cuya composición o significado no conocemos (*figura 7*).

Más tarde aparecen células lisadas, parcial o totalmente, y en algunas se pueden observar la formación de cuerpos elementales o formas llamadas filtrables, con una membrana externa, ácido nucleico y ribosomas (*figuras 8-9*).

DISCUSION

a) Formación de colonias L

En el presente trabajo hemos comprobado que glicocola en una concentración del 8 al 10 % produce la formación de colonias mucosas, transparentes, compuestas de elementos de muy diversos tamaños, casi todos ellos de forma globular, aunque en las primeras fases se encuentran formas filamentosas y de transición entre las formas normales y las esféricas L (*figuras 2-3*).

Estas colonias corresponden a una fase L transitoria, puesto que resembradas en medios sin glicocola han pasado a la forma normal, incluso después de 5 ó 6 resiembras sobre medios con glicocola, donde se siguen multiplicando en la fase L.

La morfología de los elementos que componen las colonias tampoco varía tras varias resiembras, siendo típicos de las colonias reversibles o inestables.

Nos encontramos, pues, con una típica fase L reversible o inestable.

La mayor parte de los trabajos sobre formas L de las bacterias han sido realizados con microorganismos patógenos para el hombre o los animales, y la fase L ha sido inducida por medio de antibióticos. La comparación de estas formas L con las formas L obtenidas por nosotros con glicocola en un microorganismo patógeno de plantas no es muy adecuada, ya que, aunque la acción de los antibióticos que actúan sobre la pared celular bacteriana sea muy similar a la de la glicocola en gran concentración, no es exactamente la misma y por ello nos vamos a referir principalmente a los trabajos que han sido realizados con glicocola como agente inductor de la fase L.

Dienes y Bullivant (2) fueron los primeros que observaron la acción de la glicocola sobre bacterias gram-negativas, obteniendo cultivos en fase L de las mismas, pero sin conseguir cultivos estables, es decir, no reversibles a la forma normal, de dichas bacterias.

En 1962, Rubio-Huertos y Beltrá (7) consiguieron cultivos de formas L estables de *Agrobacterium tumefaciens*; estas formas son tan patógenas para *Phaseolus vulgaris* y *Datura stramonium* como las de *A. tumefaciens* normales, formando tumores y pudiendo ser recuperadas de ellos. Es decir, no existe tampoco una reversión *in vivo* como ocurre con otras formas L (14). En 1960, Rubio-Huertos y González (9), consiguieron, por medio de glicocola, colonias L estables de *Clostridium tetani*; también estas formas L poseían tanta o más toxicidad que las formas normales de las cuales habían sido obtenidas. Desde 1960 hasta ahora se ha trabajado muy poco con glicocola como inductor de la fase L en bacterias; por ello, los métodos, el estudio de la ultraestructura y del proceso de formación de la fase L que nosotros estudiamos no es comparable exactamente más que con fase L obtenida en *A. tumefaciens* por medio de glicocola, y de una manera menos satisfactoria, a la fase L obtenida por otros medios, principalmente antibióticos y con los micoplasmas.

b) Comparación estructural con la fase L estable obtenida por glicocola en Agrobacterium tumefaciens

La ultraestructura de estas formas L estables ha sido descrita por Rubio-Huertos y colaboradores (8).

El citoplasma y nucleoplasma de ambos tipos de forma L, las inestables del *Pseudomonas viridiflava* y las estables de *Agrobacterium tumefa-*

ciens, es muy semejante y no se encuentran diferencias entre ellos; sin embargo, las formas L estables poseen dos envolturas perfectamente definidas, una es la membrana citoplásmica con la estructura típica de una unidad de membrana y la otra corresponde a una pared celular modificada, no rígida, pero formada por 3 capas más finas que las que forman la pared celular de la bacteria normal. En las formas L del *Ps. viridiflava* esta membrana externa se conserva en algunas formas intermedias (figuras 4-6), pero más tarde se desprende y quedán las formas esféricas rodeadas de una sola envoltura con la ultraestructura de una unidad de membrana típica. Por lo tanto, existe una gran diferencias en la envoltura entre unas formas y otras.

Kurddjian y colaboradores (3) estudiaron la ultraestructura de esferoplastos de *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli* obtenidos con glicocola.

Los autores no hablan de multiplicación o formación de colonias ni de que sean formas L. La ultraestructura es muy semejante o idéntica a la encontrada por Rubio-Huertos y colaboradores en *Agrobacterium tumefaciens*, es decir, encuentran una doble membrana rodeando la célula y solamente notan que, además de ser la pared flexible, su grosor, comparado con el de la pared de la bacteria normal, es un 20 % menor.

c) Comparación con formas L obtenidas con penicilina

La ultraestructura de las formas L de *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoea* obtenidas con penicilina ha sido descrita por Roberts (6). Las formas L grandes están recubiertas de dos membranas, los cuerpos elementales sólo poseen una unidad de membrana. Sin embargo, Landman (4) encuentra que las formas L grandes, no reversibles, de *Salmonella paratyphi* B 777 tenían solamente una membrana externa.

Weibull (13) también ha obtenido formas L estables con una sola membrana, en *Proteus*.

Dienes y Bullivant (2) encontraron formas L de *Proteus* con doble envoltura y otras que solamente estaban limitadas por una sola membrana, y también los mismos autores encontraron una sola membrana en un cultivo L de *Staphylococcus*.

Como se ve, en las formas L obtenidas con penicilina, dependiendo probablemente de su estabilidad o de la estirpe de la bacteria de que pro-

vienen, unas tienen una sola membrana y otras 2 envolturas bien definidas.

d) Comparación con la ultraestructura de micoplasmas

Los micoplasmas se caracterizan por ser polimorfos y en sus colonias se pueden encontrar formas esféricas de diferentes tamaños, filamentos grandes, formas irregulares y cuerpos elementales. Todas estas formas son muy semejantes, vistas al microscopio normal, a las componentes de las colonias de forma L. Al microscopio electrónico los micoplasmas presentan un citoplasma con ribosomas y un nucleoide, generalmente difuso, exactamente como en las formas L que estudiamos; también, en algunos casos (*Mycoplasma pulmonis* (1), aparecen vacuolas en el citoplasma bordeadas por una unidad de membrana. La célula completa está rodeada por una sola unidad de membrana y algunas veces la parte externa de la membrana tiene espículas.

Estructuralmente, por lo tanto, las formas L y los micoplasmas son perfectamente comparables morfológicamente, sobre todo en el caso de *Pseudomonas viridiflava*, en que los cuerpos maduros están rodeados solamente por una unidad de membrana, y las formas grandes, esféricas, tienen vacuolas limitadas por una membrana y también cuerpos elementales.

RESUMEN

Se ha obtenido por medio de glicocola al 8 y 10 % la fase L inestable del *Pseudomonas viridiflava*. Las colonias L son mucosas, transparentes y están formadas en su mayoría por elementos esféricos y algunos filamentos. Las colonias L inoculadas a medios sin glicocola revierten a la forma normal, dando colonias blancas características.

Se ha comparado la ultraestructura de estas formas L con otras obtenidas con glicocola y penicilina y con la de los micoplasmas, encontrándose gran semejanza entre ellas, sobre todo con las formas L obtenidas con penicilina y envueltas por una sola membrana y con los micoplasmas.

SUMMARY

Ultrastructure of transient L forms induced by glycine in Pseudomonas viridiflava

The L phase of *Pseudomonas viridiflava* has been obtained by 8 to 10 % glycine added to agar-bean medium. The colonies after a few hours of incubation in glycine free medium reverted to normal colonies.

The colonies were composed mostly of spherical elements and some filaments. Electron microscopy of ultrathin sections of L colonies showed spherical forms 3 to 5 μ in diameter, smaller forms and elementary bodies; mature elements were bounded by one unit membrane. The ultrastructure of these L elements was compared with the ultrastructure of L forms obtained with penicillin, stable L forms obtained with penicillin, stable L forms obtained with glycine, and mycoplasmas.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, D. R.; HOPPS, H. E.; BERRILE, M. F., and BERUHEIM, B. E. 1965. Comparison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus and mycoplasma in tissue culture. *J. Bacteriol.*, 90, 1397.
2. DIENES, L., and BULLIVANT, S. 1967. Comparison of the morphology of PPLO and L forms of bacteria with light and electron microscopy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 143, 719.
3. KURDDJIAN, A.; RYTER, A., et MANIGAULT, P. 1966. Action de la glycine sur la structure de la paroi de différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*Escherichia coli*. *J. Microsc.*, 5, 605.
4. LANDMAN, O. E. 1969. Protoplasts, spheroplasts and L-forms viewed as a genetic system. In L. B. GUZE. *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L Forms*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
5. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208.
6. ROBERTS, R. B. 1968. *In vitro* production, cultivation and properties of L forms of pathogenic *Neisseria*. In L. B. GUZE. *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L Forms*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
7. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Formas L fijas del *Agrobacterium tumefaciens* obtenidas por medio de glicocola. *Microbiol. Españ.*, 15, 219.
8. RUBIO-HUERTOS, M.; BELTRÁ, R., and SANTAOLALLA, M. 1972. Ultrastructure of stable L phase of *Agrobacterium tumefaciens* causing tumor formation in *Phaseolus vulgaris* L. *Microbiol. Españ.*, 25, 263.

9. RUBIO-HUERTOS, M., and GONZÁLEZ, C. 1960. Morphology and pathogenicity of L forms of *Clostridium tetani* induced by glycine. Ann. N. Y. Acad. Sci., 79, 626.
10. THORSTON, K. G., and WEIBULL, C. 1958. Studies on the structure of bacterial L forms, protoplasts and protoplasts like bodies. J. Ultrastruct. Res., 1, 412.
11. TULASNE, R.; MINCK, R., et KIRN, A. 1962. Etude comparative au microscope électronique, d'un *Proteus* et des formes L des types A et B correspondantes. Ann. Inst. Pasteur, 102, 292.
12. WEIBULL, C. 1963. Size of minimal reproductive units of bacterial L forms. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113, 32.
13. WEIBULL, C. 1965. Structure of bacterial L forms and their parent bacteria. J. Bacteriol., 90, 1467.
14. WITTLER, R. G. 1967. L forms, protoplasts, spheroplasts: a survey of *in vitro* and *in vivo* studies. In L. B. GUZE. Microbial Protoplasts, Spheroplasts, and L Forms. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL TABACO «ENRIQUE ALCARAZ MIRA». SEVILLA
SECCION DE BIOLOGIA

LAS PODREDUMBRES BACTERIANAS DEL TABACO EN ESPAÑA (*)

por

M. DURÁN - GRANDE

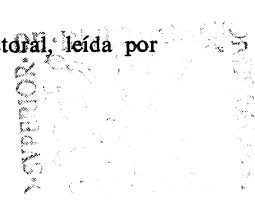
INTRODUCCION

En las distintas variedades cultivadas de *Nicotiana tabacum* 2n en nuestras zonas tabaqueras, se han presentado durante su desarrollo determinadas enfermedades, algunas de ellas ocasionadas por bacterias, enfermedades que llegan en muchas ocasiones a causar incluso la muerte de la planta (1-2, 7, 20-21, 30-31 y 47-49).

Entre las enfermedades bacterianas del tabaco, podemos distinguir dos tipos: las que causan podredumbres y las que originan manchas en las hojas seguidas de necrosis.

Las podredumbres son causadas por bacterias pertenecientes a los géneros: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Phytobacterium*; la mayoría de estas bacterias fabrican enzimas pectinolíticas que disuelven la laminilla media existente entre las células vegetales que forman una población, provocando la desorganización de los tejidos. Las manchas sobre las hojas son producidas por bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, principalmente.

(*) El presente trabajo constituye un resumen de la Tesis doctoral, leída por el autor en la Universidad de Madrid, el 3 de octubre de 1970.



Recordando el panorama histórico sobre las enfermedades bacterianas en las plantas y en el tabaco especialmente, destacamos que la primera enfermedad que se estudió a fondo en el tabaco causada por un agente bacteriano fue el “marchitamiento de Granville” o “marchitamiento bacteriano del tabaco”, descubierto en el condado de Granville (Carolina del Norte) hacia el año 1880. Según Nakamura (35), esta enfermedad ya había aparecido en el Japón en 1683, recibiendo el nombre de “neguchi”. Asimismo, Honing (15) situó su origen en Sumatra, en 1863, donde se le conocía con el nombre de “slijmziekte”. Hoy día es conocida, aunque con distintos nombres, en todas las grandes zonas tabaqueras del mundo.

El agente que la produce es el *Pseudomonas solanacearum* (Smith) (4, 25 y 40).

A partir de estas fechas se han ido descubriendo nuevas enfermedades en el tabaco. Las más importantes han sido: el “fuego salvaje” (Wolf y Foster), ocasionada por el *Pseudomonas tabaci* (Stevens); la “mancha angular de las hojas del tabaco”, originada por el *Ps. angulata* (Fromme y Murray), Holland; la “mancha foliar bacteriana de Wisconsin” (27), debida a *Ps. mellea*; el “tallo ahuecado y black leg” (26), originada por la *Erwinia aroideae* (Townsend); la “herrumbre negra” (4), causada por *Ps. pseudozoogloeae* (16), y la “enfermedad filipina bacteriana de la hoja” (6), originada por el *Ps. polycolor* (Clara).

Además de estas enfermedades bacterianas se han observado otras que ocasionan necrosis o podredumbre del tallo y del sistema vascular, atacando además los peciolo y las nerviaciones de las hojas, originando manchas foliares y posteriormente necrosis. Entre las más frecuentes, tenemos: la “podredumbre caulinar”, originada por *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter); las “podredumbres en los semilleros”, ocasionadas por el *Ps. fluorescens* (Mígula); la “podredumbre medular”, producida por *Ps. putida* (Trerisan); la “podredumbre gris o amarilla del sistema vascular”, causada por el *Ps. xanthochlora* (Schuster); “podredumbres en la zona del cuello”, causadas por el *Ps. fabae* (Yu); “manchas blancas pequeñas e irregulares sobre las hojas”, producidas por el *Ps. maculicula* (McCulloch); la “gangrena húmeda en el interior de los tallos y raíces”, ocasionada por *Erwinia carotovora* (Jones), Holland; “podredumbres en los tallos y raíces”, ocasionadas por *E. nimipressuralis* (Carter) y por *E. dissolvens* (Rossen); “tumor radical”, producido por *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Town); “pelagra”, motivada por *Bacillus caulivorus*

(Prillieux et Delacroix); la "podredumbre del cuello", originada por el *B. tabacivorus* (Delacroix), y, por último, la "ryaboukha", en Rusia, causada por el *Xanthomonas heterocea* (Vzoroff).

En España, la primera enfermedad bacteriana citada en el tabaco fue el "fuego salvaje", en 1931, por Benítez y Beneyto (2), en Torrelavega (Santander) y Tarragona; posteriormente, se ha vuelto a citar por Izquierdo-Tamayo y Durán-Grande (21).

Otras bacteriosis son: "la mancha angular de las hojas" (fuego negro), ocasionada por *Pseudomonas angulata* y citada por primera vez en España por Izquierdo-Tamayo y Durán-Grande en 1967 (21); la "roya negra", originada por *Ps. pseudozoogloeae*, citada por vez primera en 1959, por dichos autores; y por último, los mismos han citado diversos tipos de podredumbres ocasionadas por bacterias pertenecientes a los géneros *Erwinia*, *Phytobacterium* y *Xanthomonas*.

MATERIAL Y METODOS

El material utilizado lo ha constituido trozos de raíces, tallos, hojas necrosadas, etc., pertenecientes a plantas enfermas de distintas variedades de *Nicotiana tabacum* 2n, procedentes de las diferentes zonas tabaqueras de España. En el *cuadro 1* se resumen los datos necesarios para la identificación de las muestras recibidas.

El estudio realizado con las muestras comprende: la separación y aislamiento de los microorganismos productores de las necrosis y podredumbres, así como la identificación, caracterización y clasificación de las citadas estirpes bacterianas.

Las técnicas generales y específicas empleadas son las indicadas en las citas 8, 13-14, 42, 44 y 51. Para la caracterización y clasificación de las bacterias aisladas hemos consultado las citas 5, 32-33 y 37.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el trabajo de tesis se hace una descripción detallada de las características morfológicas, datos de vegetación y de cosecha de las distintas variedades cultivadas y que más tarde serían huéspedes de las bacterias estudiadas.

Cuadro 1. Resumen de los datos relativos a las muestras recibidas

Fecha de recogida			Procedencia				Variedad	Número de registro
Año	Mes	Día	Zona	Pago	Término	Provincia		
1964	V	23	1. ^a	Sabariego	Córdoba	Córdoba	Santafé y SC-14	2/64
1964	IX	16	1. ^a	I.T.T. Campo 2, parcela 77	Sevilla	Sevilla	Híbrido 254-D × Hicks	25/64
1964	IX	16	1. ^a	I.T.T. Campo 1, parcela 43	Sevilla	Sevilla	Virginia Bright A2-27-2	26/64
1964	IX	30	1. ^a	I.T.T. Campo 2, parcela 77	Sevilla	Sevilla	Híbrido 254-D × Hicks	30/64
1964	X	10	1. ^a	Vega Santa Lucía	Palma del Río	Córdoba	SC-14	38/64
1965	VIII	2	5. ^a	Entremolino	Abáigar	Navarra	Havana 142	15/65
1965	VIII	2	5. ^a	El Molino	Villatuerta	Navarra	Havana 142	16/65
1965	VIII	7	1. ^a	Lomos de Buitrago	Aznalcázar	Sevilla	Santafé	18/65
1965	VIII	10	3. ^a	Algamer	Llombay	Valencia	Santafé y F4 de los cruces r. a peronosporas	19/65
1965	IX	18	9. ^a	La Floresta	Talavera de la Reina	Toledo	W. B. Exp. 12 × Hicks	30/65
1966	VII	22	1. ^a	Vadoseco	Castro del Río	Córdoba	Santafé normal	40/66
1966	VIII	7	1. ^a	Mangante	Córdoba	Córdoba	Santafé normal	45/66
1966	VIII	7	1. ^a	Luis III	Córdoba	Córdoba	Santafé normal	46/66
1966	XI	13	5. ^a	La Cantera	Milagro	Navarra	W. Burley	60/66
1966	XI	14	5. ^a	Junto Río Ega	Igúzquiza	Navarra	Híbrido 142	61/66
1967	VIII	2	2. ^a	Comarca	Churriana	Granada	Líneas F6 de Híbridos PR.	17/67
1967	IX	23	1. ^a	Huerta de Cesti	Ecija	Sevilla	Santafé × Hicks F6	22/67

De la observación de las muestras recibidas, sacamos la conclusión de que la mayoría de las bacterias aisladas se localizan, o sobre las hojas, o en la zona medular de raíz, tallo y especialmente del cuello, ocasionando podredumbres al impedir la circulación de la savia.

Las bacterias penetran en la planta ocasionalmente por heridas existentes en ella, siendo la zona más propicia la región del cuello al estar esta zona de la planta en contacto con la superficie del suelo, en donde suelen habitar los insectos que causan las lesiones y heridas. La casi totalidad de las plantas reconocidas y atacadas de bacteriosis presentan zonas roídas en el cuello.

Los síntomas y daños observados en las distintas variedades de *Nicotiana tabacum* 2n atacadas de bacteriosis se recogen en el cuadro 2.

Las bacterias aisladas se agrupan en los siguientes géneros:

<i>Erwinia</i>	{	<i>nimipressuralis</i> <i>carotovora</i> <i>flavida</i> <i>erivanensis</i> <i>betivora</i> <i>dissolvens</i>
<i>Phytobacterium</i>	{	<i>petasitis</i> <i>saliciperda</i> <i>zingiberi</i>
<i>Pseudomonas</i>	{	<i>marginalis</i> <i>aleuritidis</i> <i>tomato</i> <i>xanthochlora</i> <i>tonelliana</i> <i>cichorii</i> <i>viburni</i> <i>chlororaphis</i> <i>calendulae</i>
<i>Xanthomonas</i>	{	<i>panici</i>

Cuadro 2. Descripción de los síntomas y daños observados en las variedades de tabaco atacadas de bacteriosis

Datos relativos a la muestra		Datos relativos a las plantas enfermas			Datos relativos a las bacterias aisladas	
Número de registro	Clase	Estado de desarrollo	Organo atacado o enfermo	Descripción de los daños y síntomas	Número de la cepa	Nombre de la estirpe bacteriana
2/64	Plantitas jóvenes recién trasplantadas	Campo y semillero	Cuello de la raíz, zona vascular	Plantas que se quiebran con mucha facilidad por el cuello, donde presentan una ligera necrosis. El anillo vascular de la zona del cuello se oscurece tomando color pardo, al mismo tiempo se endurece. Escaso desarrollo de las raíces secundarias (figuras 3-4). Todas estas plantas presentan heridas en la zona del cuello y en las raíces.	E	<i>Erwinia dissolvens</i>
40/66	Plantas adultas	Campo	Tallos, zona del cuello y médula	" "	75	<i>E. nimipressuralis</i>
"	"	"	"	" "	76	<i>E. dissolvens</i>
45/66	"	"	"	" "	81	<i>E. nimipressuralis</i>
"	"	"	"	" "	82	<i>E. dissolvens</i>
46/66	"	"	"	" "	83	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	" "	84	<i>Pseudomonas tonelliana</i>
60/66	"	"	Zona del cuello	" "	77	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	" "	78	<i>E. dissolvens</i>
61/66	"	"	Cuello, raíces y nacimiento peciolo	" "	79	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	" "	80	<i>E. dissolvens</i>
17/67	Plantas jóvenes	Campo y semilleros	Zona del cuello	" "	88	<i>Xanthomonas panici</i>

Cuadro 2 (Continuación)

"	"	"	"	"	"	89	<i>Phytobacterium saliciperda</i>
"	"	"	"	"	"	90	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	91	<i>Ps. viburni</i>
"	"	"	"	"	"	92	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	93	<i>Ps. viburni</i>
"	"	"	"	"	"	94	<i>Ps. viburni</i>
"	"	"	"	"	"	95	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	96	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	97	<i>Ps. viburni</i>
"	"	"	"	"	"	98	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	100	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	101	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	102	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	103	<i>Ps. viburni</i>
"	"	"	"	"	"	104	<i>Ps. chlororaphis</i>
"	"	"	"	"	"	105	<i>Ps. calendulae</i>
"	"	"	"	"	"	106	<i>Ps. chlororaphis</i>
"	"	"	"	"	"	107	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	108	<i>X. panici</i>
"	"	"	"	"	"	109	<i>Ps. viburni</i>
"	"	"	"	"	"	110	<i>X. panici</i>
25/64	Plantas adultas	Campo	Zona medular del tallo, zona del cuello y hojas	Los síntomas recuerdan una fusariosis. Las <i>hojas</i> pierden turgencia, se mustian, cuelgan, pierden el color verde, amarillean y se desecan, primero las basales y luego las más altas (<i>figuras 1-7</i>). El <i>tallo</i> presenta manchas necró-	P		<i>E. nimipressuralis</i>

Cuadro 2 (Continuación)

				ticas externas pardo-oscuros o negruzcas, que lo recorren longitudinalmente desde la base. La corteza y el leño toman coloración negruzca. El parénquima medular se disgrega, transformándose en una masa blanda de color negro, llegando a reabsorberse, dejando el tallo hueco y perforado. Las raíces, destruidas parcialmente. La corteza se ablanda y se transforma en una masa esponjosa, de color pardo negruzco, que puede desprenderse. Todo el sistema radicular ofrece coloración parduzca o negra (<i>figuras 1-2 y 5-7</i>).			
26/64	"	"	Zona medular del tallo	"	"	P _i	<i>Ph. petasitis</i>
30/64	"	"	Zona vascular de tallos y raíces. Hojas	Plantas con buen aspecto, incluso florecidas. Tallos y raíces con necrosis en la zona vascular, de las axilas de las hojas, en el arranque del peciolo. Los tallos presentan, además, una mancha necrótica que llega hasta el ápice (<i>figuras 3-4</i>)		T	<i>E. carotovora</i>
				Las hojas del tercio inferior presentan el limbo vaciado junto a la base de las hojas extendiéndose por el borde, hacia el tercio medio. La desecación no se extiende por la vena central (<i>figura 7</i>).			
"	"	"	"	"	"	R	<i>E. carotovora</i>

Cuadro 2 (Continuación)

38/64	Plantas adultas y troncos	"	Zona medular de tallos y raíces	"	"	M	<i>E. flavida</i>
"	"	"	"	"	"	N	<i>E. betivora</i>
"	"	"	Zona vascular nacimiento peciolo	"	"	A	<i>E. flavida</i>
"	"	"	"	"	"	A ₁	<i>Ps. marginalis</i>
18/65	"	"	Zona vascular cuello y raíces	"	"	57	<i>Ps. aleuritidis</i>
"	"	"	"	"	"	58	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	"	"	59	<i>Ps. tomato</i>
"	"	"	"	"	"	60	<i>Ps. xanthochlora</i>
"	"	"	"	"	"	61	<i>Ps. sp.</i>
"	"	"	"	"	"	62	<i>Ps. tonelliana</i>
22/67	Plantas adultas con hojas	"	Hojas	Plantas con buen aspecto, incluso florecidas. Tallos y raíces con necrosis en la zona vascular, de las axilas de las hojas, en el arranque del peciolo. Los tallos presentan, además, una mancha necrótica que llega hasta el ápice (figuras 3-4). Las hojas del tercio inferior presentan el limbo vaciado, junto a la base de la hoja, extendiéndose por el borde hacia el tercio medio. La desecación no se extiende por la vena central (figura 7).		111	<i>Ph. saliciperda</i>
"	"	"	"	"	"	112	<i>Ph. saliciperda</i>
"	"	"	"	"	"	113	<i>Ph. saliciperda</i>
"	"	"	"	"	"	114	<i>Ph. zingiberi</i>
"	"	"	"	"	"	115	<i>Ph. zingiberi</i>
"	"	"	"	"	"	116	<i>Ph. zingiberi</i>

Cuadro 2 (Conclusión)

15/65	Plantas adultas	"	Zona medular de la raíz	Plantas con raíces desecadas y necrosadas con partes roídas. Médula necrosada y hueca. Hojas con manchas oscuras. El cuello presenta zonas roídas.	51	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	"	52	<i>E. dissolvens</i>
16/65	"	"	"	"	53	<i>E. nimipressuralis</i>
"	"	"	"	"	54	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	"	55	<i>E. erivanensis</i>
"	"	"	"	"	56	<i>E. erivanensis</i>
19/65	"	"	Hojas	Hojas con manchas amarillentas, tipo viruela, que necrosan rápidamente, afectan al tercio medio e inferior.	63	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	"	64	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	"	65	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	"	66	<i>E. dissolvens</i>
"	"	"	"	"	67	<i>Ps. tonelliana</i>
"	"	"	"	"	68	<i>Ps. cichorii</i>
30/65	Plantas adultas con hojas	"	"	"	69	<i>E. erivanensis</i>
"	"	"	"	"	70	<i>E. erivanensis</i>
"	"	"	"	"	71	<i>E. nimipressuralis</i>
"	"	"	"	"	72	<i>E. nimipressuralis</i>



Figura 1. Plantas de Virginia Bright A2, 27-2, con síntomas de bacteriosis

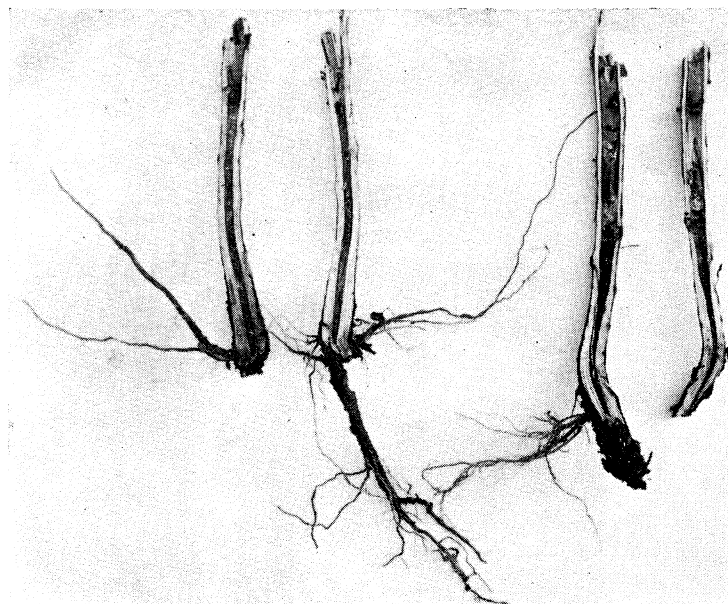


Figura 2. Plantas de Virginia Bright A2, 27-2, mostrando el ennegrecimiento del parénquima medular en la base de los tallos y vaciamiento de la médula

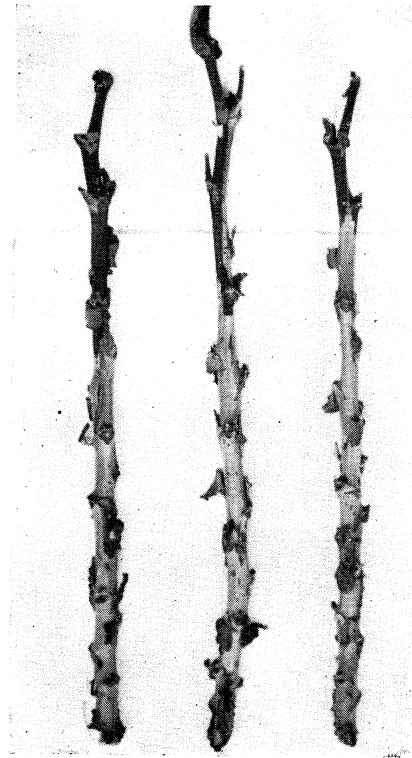


Figura 3. Variedad SC-14. Tallos con manchas necróticas en su parte superior y ápice

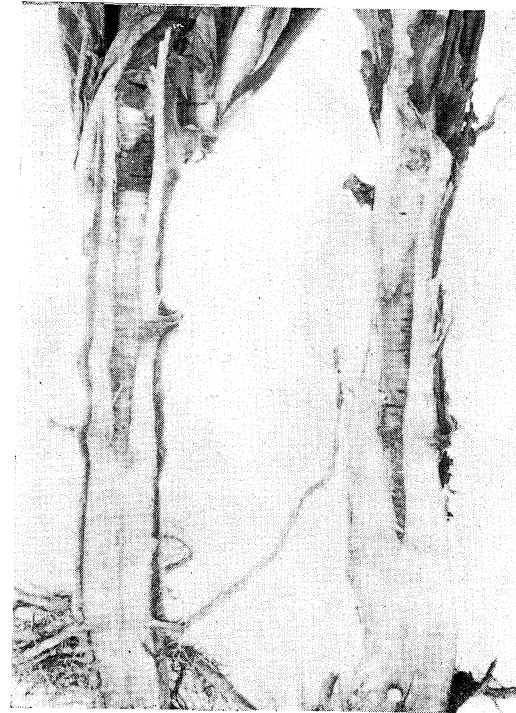


Figura 4. Variedad SC-14. Tallos mostrando la médula negruzca y agrietada



Figura 5. Híbrido 254-D x Hicks. Raíces y cuello con necrosis en la región vascular

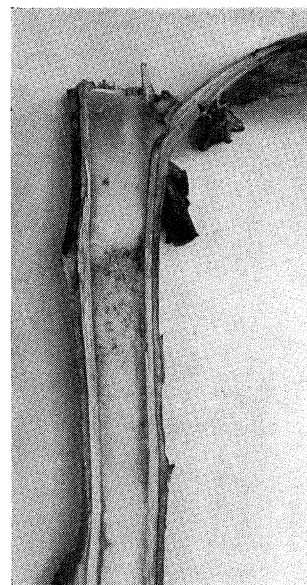


Figura 6. Híbrido 254-D x Hicks. Tallo y nacimiento de peciolo, con necrosis en la zona vascular de la axila de las hojas en el arranque de los peciolo

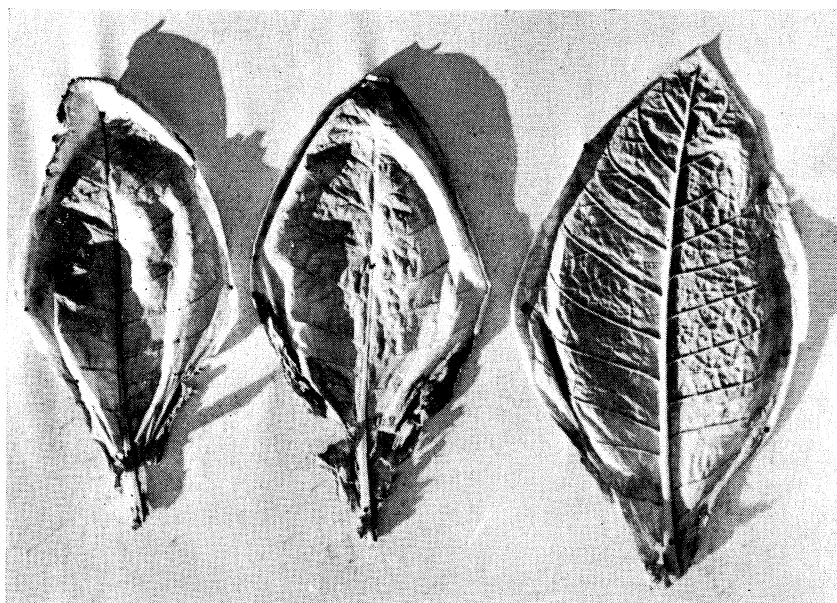
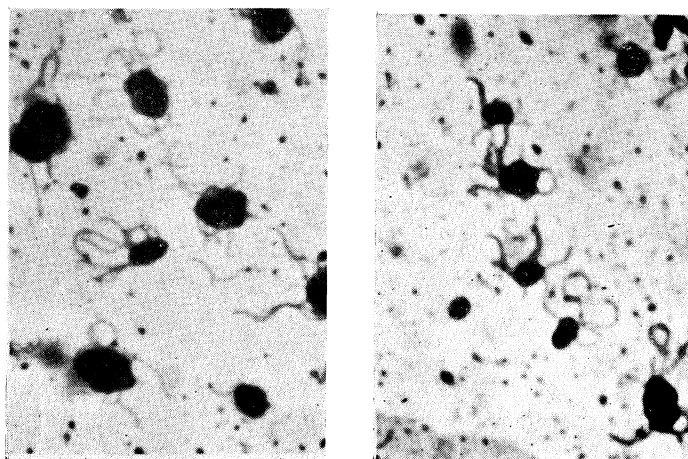


Figura 7. Híbrido 254-D $\times$ Hicks. Hojas mostrando desecación o "vacío" en la base del limbo y los bordes hasta el tercio medio



Figuras 8-9. *Erwinia nimipressuralis*. Microfotografías correspondientes a la especie bacteriana *P.* Obsérvense los flagelos. Mordiente de Casares Gil. Coloración con nitrato de plata amoniacal según Fontana-Tribondeau. $\times 2.000$

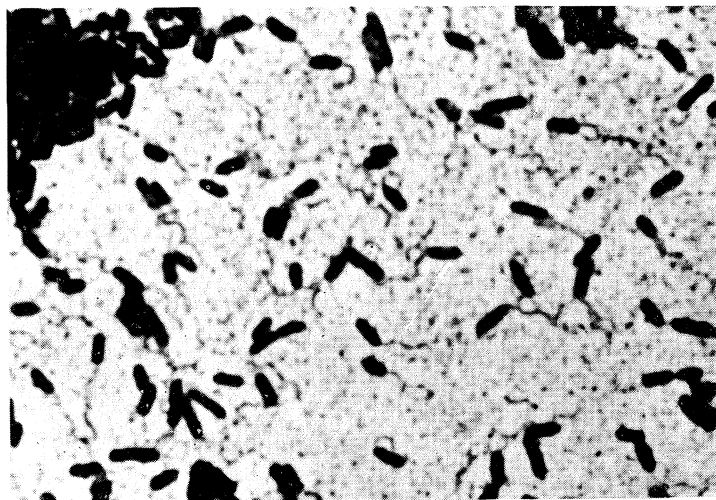


Figura 10. Xanthomonas panici. Cepa 110-B. Obsérvense los flagelos polares. Mordiente y tinción como en la figura 8. $\times 2.000$

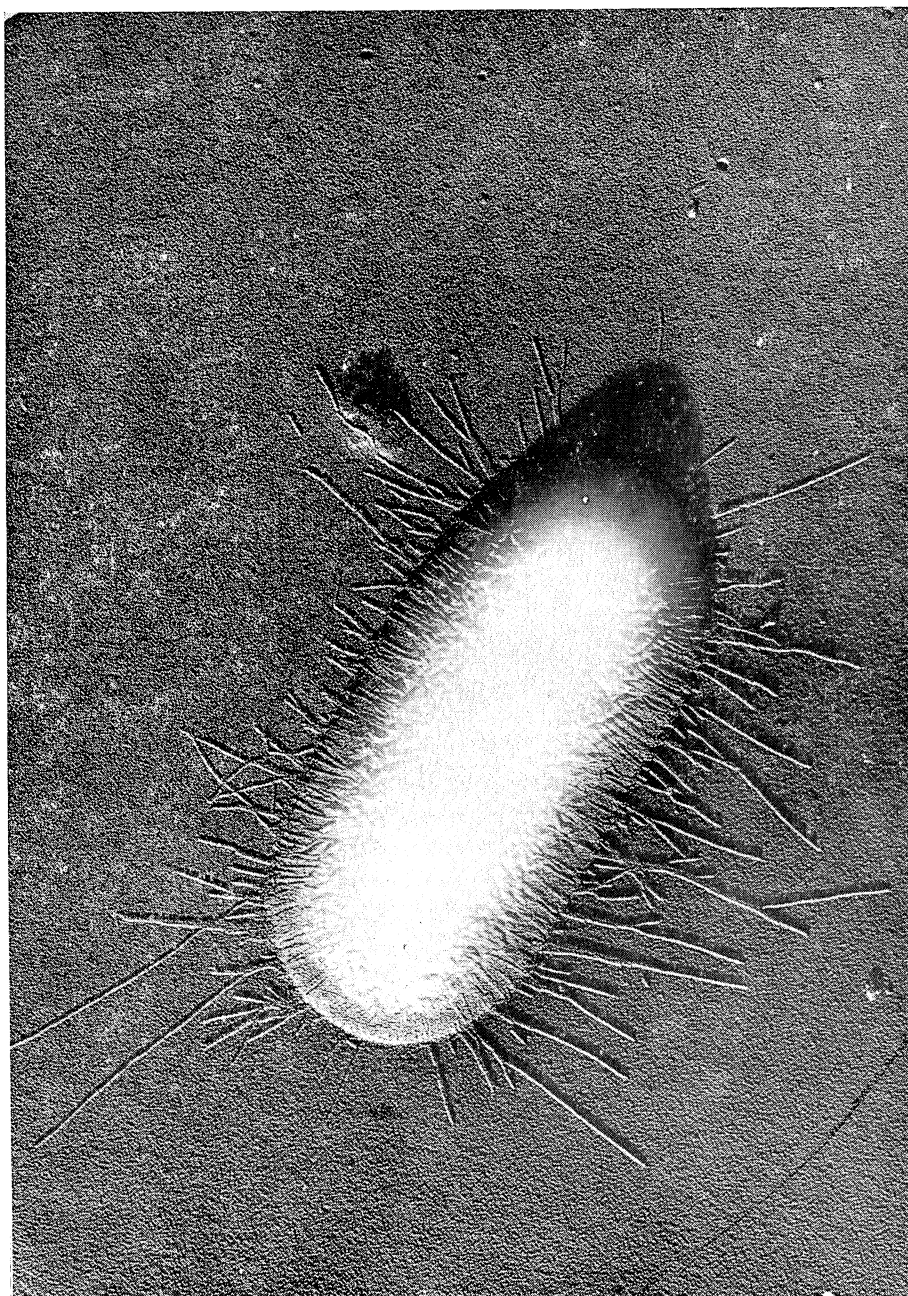


Figura 11. E. nimipressuralis. Microfotografía electrónica correspondiente a la cepa P mostrando los flagelos peritricos. $\times 36.000$

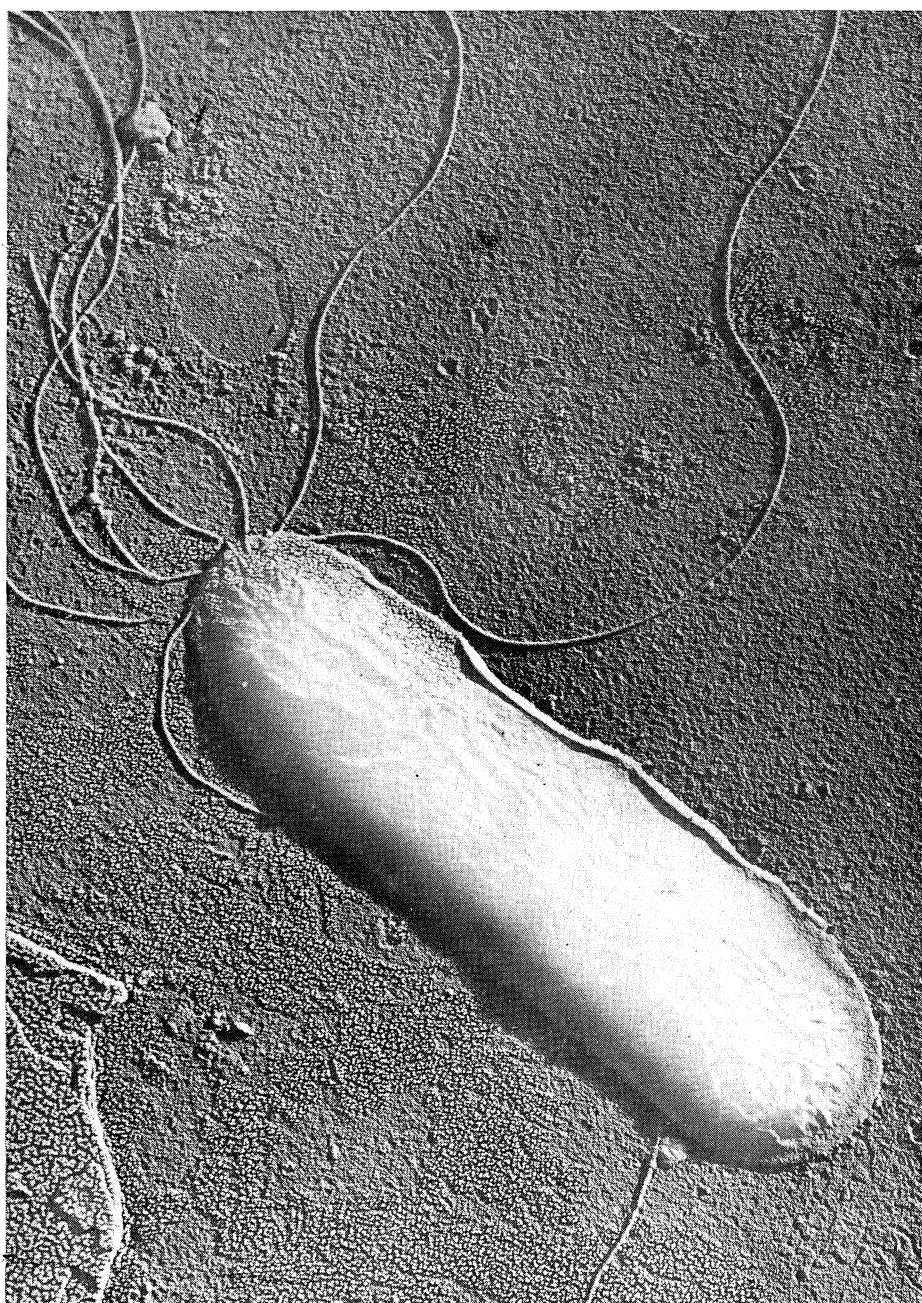


Figura 12. X. panici. Microfotografía electrónica correspondiente a la cepa 110-B. Obsérvense los flagelos polares. $\times 33.600$

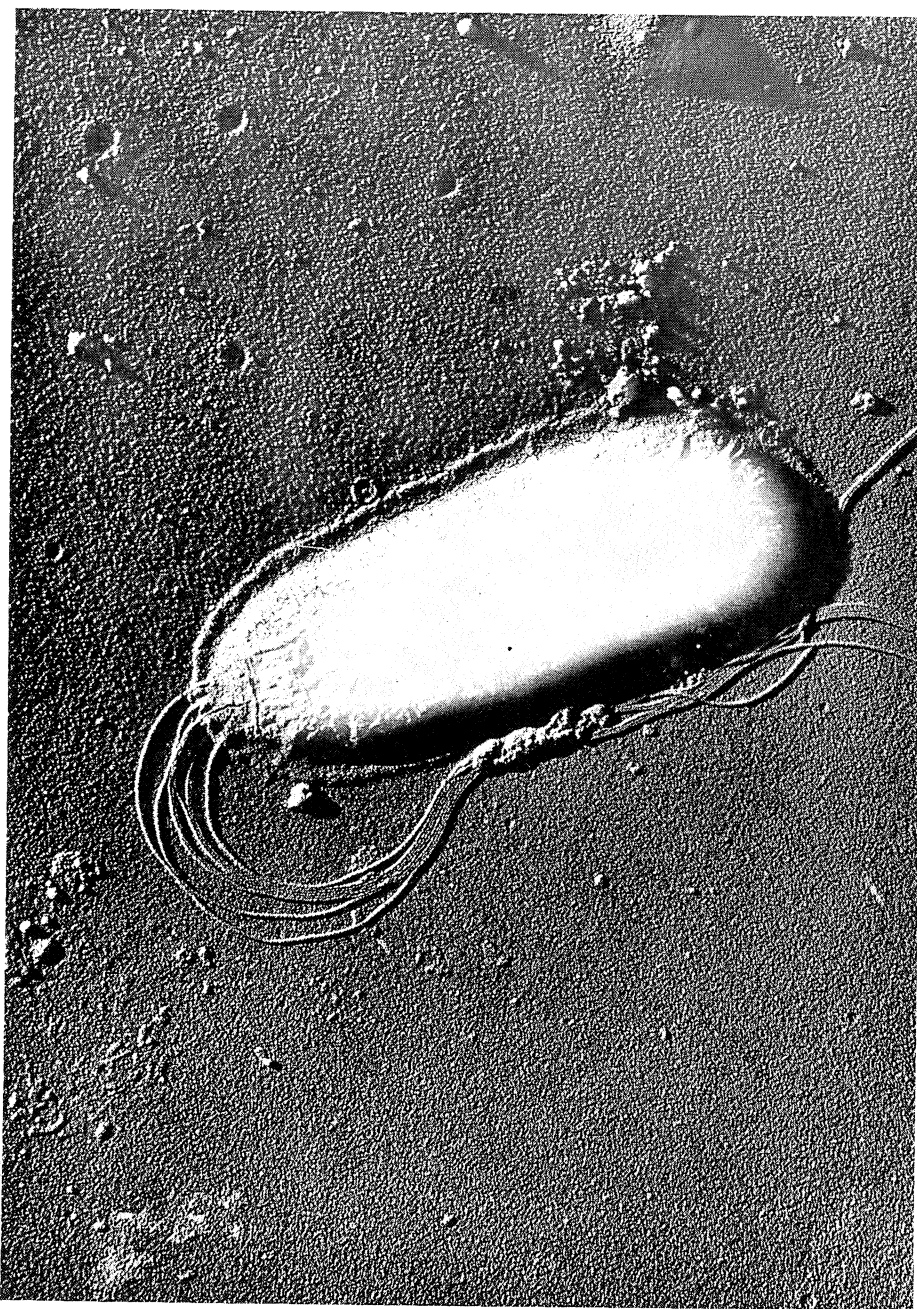


Figura 13. X. panici. Microfotografía electrónica correspondiente a la cepa 88-B. Obsérvense los flagelos polares. $\times 36.000$

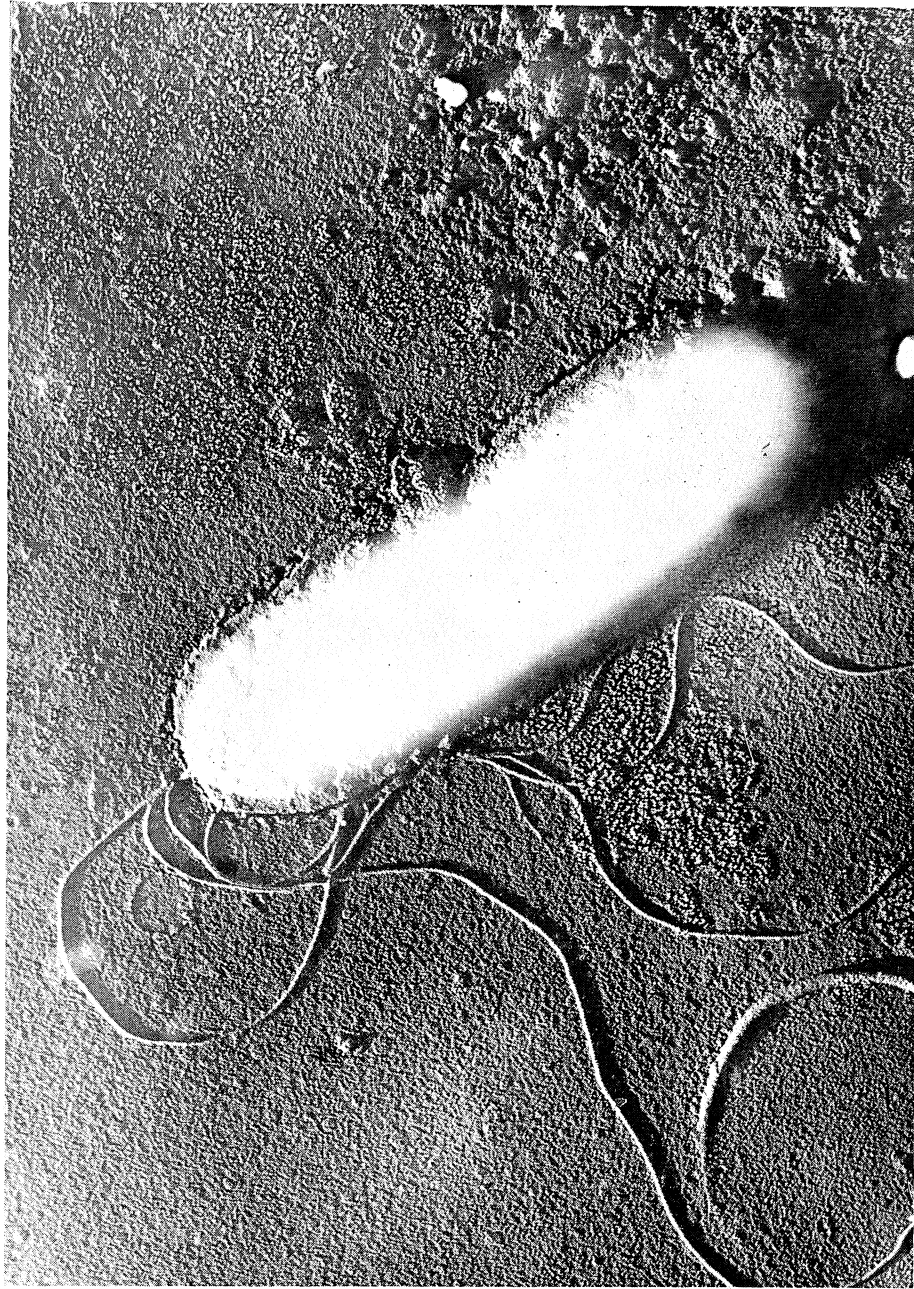


Figura 14. Pseudomonas viburni, Microfotografía electrónica correspondiente a la cepa 94-B. Obsérvense los flagelos polares. $\times 31.200$

Los resultados obtenidos del estudio de las bacterias enumeradas en el *cuadro 2*, pueden resumirse de la forma siguiente: los caracteres morfológicos varían más o menos de unos géneros a otros. Las *Erwinia nimipressuralis*, *carotovora*, *flavida*, *dissolvens*, *betivora* y *erivanensis*, son bacilos cortos, más o menos gruesos, algunos casi cocoides, con los extremos redondeados. La longitud oscila entre 0,7-1,4 μ y su diámetro entre 0,3-0,9 μ . Son muy móviles y poseen de 3-6 flagelos peritricos. Gram-negativos, asporulados. Generalmente se encuentran aislados, o asociados en diplobacilos.

Los *Pseudomonas* aislados presentan algunos caracteres comunes, como son: gram-negativos, asporulados, viven aislados, o asociados en diplobacilos, son móviles, con 1-3 flagelos polares. En cuanto a las dimensiones, se observan algunas variaciones: los hay largos con los extremos redondeados, como los *Pseudomonas tomato*, *xanthochlora*, *tonelliana*, *viburni*, *chlororaphis* y *canlendulae*, cuya longitud oscila entre 1-3 μ , aunque algunos llegan a medir hasta 3,9 μ . El diámetro está comprendido entre 0,5-1,2 μ , y los hay cortos y gruesos relativamente, como los *Ps. marginalis*, *aleuritidis* y *cichorii*, cuya longitud oscila entre 1,1-2 μ , y su diámetro entre 0,5-0,7 μ .

Los *Phytobacterium petasitis*, *saliciperda* y *zingiberi* son gram-negativos, asporulados, aislados o asociados en diplobacilos, móviles, con 1-2 flagelos polares. Las dimensiones son: longitud entre 1,2-3 μ y diámetro entre 0,5-1,2 μ .

El *Xanthomonas panici* es un bacilo largo, con los extremos redondeados, su longitud varía entre 0,8-3 μ y su diámetro, entre 0,6-1,1. Son muy móviles y tienen de 1-3 flagelos polares. Gram-negativos, asporulados. Viven generalmente aislados o, en ocasiones, asociados en diplobacilos.

Las bacterias sembradas e incubadas a 35 °C, durante 24-48 h, y desarrolladas en caldo común, presentan una serie de caracteres comunes que podemos resumir como sigue: crecimiento abundante, turbidez entre moderada e intensa y otra serie de caracteres que muestran intensidades diferentes, como puede observarse en el *cuadro 3*.

Las colonias desarrolladas en agar común e incubadas a 30 °C, entre 24-48 h, pertenecientes a las bacterias enumeradas en el *cuadro 2*, presentan una serie de caracteres más o menos comunes: forma circular, dimensiones comprendidas entre 0,1-3 mm de diámetro; los bordes enteros,

Cuadro 3

Estirpes bacterianas	Vegetación superficial	Sedimentos	
		Aspecto	Cantidad
<i>Erwinia nimipressuralis</i>	Velo abundante, tenue y frágil	Floculoso	Escasa
<i>E. carotovora</i>	Velo tenue con anillo	Floculoso	Escasa
<i>E. flavida</i>	Sin velo o tenue	Floculoso	Abundante
<i>E. dissolvens</i>	Velo tenue con anillo	Floculoso	Abundante
<i>E. betivora</i>	Membrana fina	Floculoso	Escasa
<i>E. erivanensis</i>	Sin velo	Floculoso	Abundante
<i>Pseudomonas marginalis</i>	Velo frágil	Floculoso	Abundante
<i>Ps. aleuritidis</i>	Membranoso	Floculoso	Abundante
<i>Ps. tomato</i>	Velo tenue	Floculoso	Abundante
<i>Ps. xanthochlora</i>	Velo tenue		Ninguna
<i>Ps. tonelliana</i>	Velo tenue	Floculoso	Abundante
<i>Ps. cichorii</i>	Velo tenue	Viscoso	Escasa
<i>Ps. viburni</i>	Sin velo	Floculoso	Moderada
<i>Ps. chlororaphis</i>	Velo	Viscoso	Moderada
<i>Ps. calendulae</i>	Sin velo		Ninguna
<i>Xanthomonas panici</i>	Membranoso	Viscoso	Abundante
<i>Phytobacterium petasitis</i>	Velo tenue, frágil	Viscoso	Abundante
<i>Ph. saliciperda</i>	Película que se desprende	Viscoso	Escasa
<i>Ph. zingiberi</i>	Película que se desprende	Viscoso	Escasa

elevadas, superficie lisa, color blanco sucio o gris y por transparencia acarameladas, y por último, traslúcidas y brillantes.

Por último, en el *cuadro 4*, resumimos las principales reacciones bioquímicas, que han servido de base para la identificación de las distintas estirpes bacterianas aisladas.

En algunas ocasiones nuestras descripciones no coinciden exactamente con las recogidas por Prevot (37) y Bergey (5), diferenciándose en algunas reacciones, a nuestro juicio, de poca importancia para su caracterización. Estas diferencias nos han hecho considerar algunas cepas como variantes de una especie colectiva, apuntando la posibilidad de que pueda tratarse de razas o formas de adaptación al tabaco.

Cuadro 4. Principales reacciones fisiológicas de las bacterias aisladas

Especies bacterianas	Número de la cepa	Pigmentos	Nitratos	Gelatina	Caseína	Almidón	Arabinosa	Glucosa	Galactosa	Xilosa	Levulosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Celobiosa	Manitol	Glicerol
<i>Erwinia nimipressuralis</i>	P	No pigmentado	R	N.L	N.H	N.H	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A
" "	53	"	N.R	"	"	"		A				A+G	A+G	A			
" "	71	"	R	"	"	"		A+g				A+G	A+G	A+G			
" "	72	"	R	"	"	"		A+g				A+G	A+G	A+G			
" "	75	"	N.R	"	"	"	A+G	A+G		A+G		A+G	A+G	A+G			
" "	81	"	R	"	"	"	A	A+G				—	A+G	A+G			
<i>E. carotovora</i>	T	No pigmentado	R	L	H	H(?)	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G
" "	R	"	R	L	H	H(?)	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G
<i>E. dissolvens</i>	51	No pigmentado	N.R	N.L		H	—	A+G				A+G	A+G	A+G			
" "	52	"	"	"		"		A+G				A+G	A+G	A+G			
" "	54	"	"	"		"		A				A+G	A+G	A			
" "	58	"	"	"		"		A+G				A+G	A+G	A			
" "	63	"	"	"		"		A+G				A+G	A+G	A+G			
" "	64	"	"	"		"		A+G				A+G	A+G	A+G			
" "	65	"	"	"		"		A+G				A+G	A+G	A+G			
" "	66	"	"	"		"		A+G				A+G	A+G	A+G			
" "	76	"	"	"		"		A+G				A+G	A+G	A+G			
" "	77	"	"	"		"	A+G	A+G				A+G	A+G	A			
" "	78	"	"	"		"	A	A+G				A	A	A			
" "	79	"	"	"		"	A	A+G				A	A	A			
" "	80	"	"	"		"	A	A+G				A	A+G	A			
" "	82	"	"	"		"		A				—	A+G	A+G			
" "	83	"	"	"		"		A+G				A+G	A+G	A+G			
<i>E. flavida</i>	M	No pigmentado	N.R	L	N.H	N.H	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	—
" "	A	"	"	"	"	"	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	—
<i>E. betivora</i>	N	No pigmentado	R	L	N.H	H	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	A+G	—
<i>E. erivanensis</i>	55	No pigmentado	N.R	L	N.H	H	—	A				A+G	A+G	A			
" "	56	"	"	"	"	"		A				A+G	A+G	A			
" "	69	"	"	"	"	"		A				A+G	A+G	A			
" "	70	"	"	"	"	"		A+G				A+G	A+G	A+G			
<i>Pseudomonas marginalis</i>	A ₁	Verde azulado	R	L	H	N.H	A	A	A	—	A	A	A	—	—	—	—
<i>Ps. aleuritidis</i>	57	Fluoresc. verdosa	R	N.L		H		A				A	—	A			
<i>Ps. tomato</i>	59	"	R	L		H		A				A	—	A			

R = Reducido. N.R = No reducido. L = Licuada, N.L = No licuada. H = Hidrolizada, N.H = No hidrolizada. A = ácido. G = gas, g = indicios de gas.

Cuadro 4 (Conclusión)

Especies bacterianas	Número de la cepa	Pigmentos	Nitratos	Gelatina	Caseína	Almidón	Arabinosa	Glucosa	Galactosa	Xilosa	Levulosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Celobiosa	Manitol	Glicerol
<i>Ps. xanthoclora</i>	60	"	R	L		N.H		A				A	—	—			
<i>Ps. tonelliana</i>	62	"	N.R	N.L		H		A				A	—	A			
" "	67	"	"	"		"		A				A	—	A			
" "	84	"	R	"		"		A				—	A	—			
<i>Ps. cichorii</i>	68	"	N.R	N.L		H		—				A	—	—			
<i>Ps. viburni</i>	91	"	N.R	N.L	N.H	N.H	A	A	A			—	—	—			
" "	93	"	"	"	"	"	A	A	A			—	—	—			
" "	94	"	"	"	"	"	A	A	A			—	—	—			
" "	97	"	"	"	"	"	A	A	A			—	—	—			
" "	103	"	"	"	"	H. débil	A	A	A			—	—	—			
" "	109	"	"	"	"	N.H	A	A	A			—	—	—			
<i>Ps. chlororaphis</i>	104	"	R	L	H	H. débil	A	A	A			—	—	—			
" "	106	"	"	"	"	"	A	A	A			—	—	—			
<i>Ps. calendulae</i>	105	"	N.R	N.L	N.H	N.H	A	A	A			—	—	—			
<i>Xanthomonas panici</i>	88	Oscuro que difunde al medio	R	L	H	N.H	—	—	—			—	—	—			
" "	90	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	92	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	95	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	96	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	98	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	100	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	101	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	102	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	107	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	108	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	110	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
<i>Phytobacterium petasitis</i>	P ₁	No pigmentado	R	N.L	H	N.H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Ph. saliciperda</i>	89	No pigmentado	R	N.L	H	N.H	—	—	—			—	—	—			
" "	111	"	"	"	N.H	"	—	—	—			—	—	—			
" "	112	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	113	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
<i>Ph. zingiberi</i>	114	No pigmentado	R	L	H	N.H	—	—	—			—	—	—			
" "	115	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			
" "	116	"	"	"	"	"	—	—	—			—	—	—			

De todas las estirpes aisladas y enumeradas anteriormente hay algunas que se han aislado reiteradamente en el tabaco, éstas se reparten entre los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Phytobacterium* y *Xanthomonas*.

Las bacterias pertenecientes al género *Erwinia*, subgénero *pectobacterium* (Valdés) son productoras de podredumbres blandas, ya que fabrican enzimas pectinolíticas, que atacan la laminilla media existente entre las células, disolviéndola y, por lo tanto, ocasionando la desorganización del tejido.

Entre las *Erwinia* aisladas, destacan tres altamente patógenas: la *E. dissolvens*, la *E. carotovora* y la *E. nimipressuralis*. Estas tres *Erwinia* se diferencian porque la *E. dissolvens* hidroliza el almidón y no licúa la gelatina; *E. nimipressuralis* no hidroliza el almidón, ni licúa la gelatina, y, por último, *E. carotovora*, que no hidroliza el almidón y sí licúa la gelatina (5 y 37).

La *Erwinia dissolvens* (Burkholder, 1948), se ha citado como patógena en el maíz (Rossen, 1922). Nosotros la hemos aislado de diversas variedades de tabaco cultivadas en distintas localidades: Abáigar, Villatuerta, Milagro e Igúzquiza (Navarra); Aznalcázar (Sevilla), Castro del Río (Córdoba) y Llombay (Valencia), y durante varios años consecutivos.

Nuestras cepas se diferencian de las descritas en los manuales (5 y 37) en caracteres muy significativos, como son la reducción de nitratos y la producción de indol. Posiblemente se trata de unas formas de adaptación al tabaco.

La *Erwinia nimipressuralis* (Carter) sólo se había aislado hasta ahora de ciertas especies de *Ulmus*: *U. pumila*, *U. fulva*, *U. procera* y *U. americana* (5), en el año 1945. Estos *Ulmus* presentaban una podredumbre húmeda y negra. Nosotros la hemos aislado durante varios años consecutivos, de distintas variedades de tabaco procedentes de las localidades de Sevilla, Castro del Río (Córdoba), Talavera de la Reina (Toledo) y Villatuerta (Navarra).

La morfología de estas bacterias, como puede apreciarse en las figuras 8-9 y 11, es la de un bacilo corto y grueso con flagelos peritricos.

Hay que hacer notar que nuestras cepas presentan diferencias con las descritas por Prevot (37) y en el Bergey (5), como puede apreciarse en el cuadro 5. De este cuadro se deduce que de todas las estirpes aisladas, las reseñadas con la letra P y con los números 71-B, 72-B y 81-B coinciden exactamente con los de *Erwinia nimipressuralis*, descrita por Carter, pero las cepas 53-B y 75-B difieren en algunos caracteres, por lo que se su-

giere la posibilidad de que *E. nimipressuralis* esté relacionada con el *Bacillus tabacivorus*, especie, por otra parte, no bien estudiada por Delacroix en 1906 (7), considerándosele una forma de adaptación al tabaco.

Erwinia carotovora (Jones) Holland, es una especie considerada patógena para infinidad de plantas, entre ellas el tabaco. Al parecer existe una serie de formas no bien conocidas que se relacionan con *E. carotovora*, tales como *E. flavida* (Fawcett) Magrou, *E. erivanensis* (Kalantarian),

Cuadro 5

Cepas	Nitratos	Almidón	Acetoína	Indol	Rojo de metilo	SH ₂	Glucosa	Lactosa	Sacarosa
P	R	N.H	—	—	—	—	A+G	A+G	A+G
53-B	N.R	N.H	+	—	—	+ débil	A	A+G	A
71-B	R	N.H	+	+ débil	—	—	A+g	A+G	A+G
72-B	R	N.H	+	"	—	—	A+g	A+G	A+G
75-B	N.R	N.H	+	+	—	—	A+G	A+G	A+G
81-B	R	N.H	+	+	—	—	A+G	A+G	A+G
<i>E. nimipressuralis</i>	R	H débil	+	—	+	+	A+G	A+G	A+G

E. betivora (Takimoto) Magrou, *E. phytophthora*, por lo que se tiende a considerarla como una especie colectiva (49), de las que todas las demás serían formas adaptativas.

La morfología de estas bacterias es más o menos parecida a *Erwinia nimipressuralis* (figuras 8-9 y 11).

En cuanto a las reacciones fisiológicas, nuestras bacterias presentan algunas variaciones con las descritas por Burkholder (5) y Prevot (37).

Otras de las bacterias aisladas y en gran número es la *Xanthomonas panici* (*Bacterium panici*) Elliot (1923), responsable principal de las podredumbres de la vega granadina, perteneciente a la zona 2.^a Estaríamos ante una forma de adaptación al tabaco, ya que dicha especie se cita originariamente como aislada del mijo (*Panicum miliaceum*).

La morfología de estas bacterias, así como la distribución de sus flagelos polares puede observarse en las figuras 10 y 12-13.

En cuanto a los caracteres fisiológicos, nuestras cepas tienen la particularidad de no fermentar ningún azúcar, característica que las diferencian de los demás *Xanthomonas* citados como patógenos para el tabaco y otras solanáceas. Entre los *Xanthomonas* citados destacan el *X. heterocea* (12, 47 y 52-53) y el *X. vesicatoria* (45). Sin embargo, con el descrito por Prevot (37), sólo existe una única diferencia, consistente en que las nuestras no hidrolizan el almidón y el descrito por Prévot lo hidroliza débilmente.

Entre los *Pseudomonas* aislados, solamente dos, el *P. viburni* y el *P. tonelliana* merecen el calificativo de patógenos.

El *Pseudomonas tonelliana* (5 y 10) se ha señalado como patógeno en las adelfas (*Nerium oleander*). Dada la abundancia de esta planta en las márgenes de nuestros ríos y en muchos parques y jardines, no es extraño que pueda encontrarse ocasionalmente en las plantas de tabaco.

En los tabacos, le hemos aislado de raíces, cuellos y hojas necróticas de plantas procedentes de Aznalcázar (Sevilla), Castro del Río (Córdoba), Llombay (Valencia) y Córdoba (capital).

La especie *Pseudomonas viburni* (Thornberry y Anderson, 1931; Stapp, 1935) fue aislada primeramente de *Viburnum* (lantanas, bolas de nieve) y hoy se considera altamente patógena para un gran número de plantas. La morfología de esta bacteria, así como la distribución de sus flagelos polares pueden observarse en la figura 14.

El único carácter que diferencia nuestras cepas de las descritas por los autores citados anteriormente es el de que las nuestras producen indol y las descritas por ellos no lo producen.

Esta especie se considera sinérgica, al venir asociada siempre a *Xanthomonas panici*.

Los restantes *Pseudomonas* y *Phytobacterium* aislados ocasionalmente y en escaso número nos llevan a considerarlos como especies contaminantes circunstanciales o como saprofitos.

CONCLUSIONES

1) De las cepas aisladas, unas se consideran responsables de las alteraciones y lesiones sufridas por las plantas, mientras que otras se consideran contaminantes o saprofitas.

2) Las estirpes bacterianas aisladas reiteradamente, pertenecen a las cubacterias y se encuadran en uno de los cuatro géneros siguientes: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Phytobacterium*.

3) Entre las *Erwinia* aisladas destacan tres, principalmente: *E. dissolvens*, *E. nimipressuralis*, y *E. carotovora*.

4) La *Erwinia dissolvens* era conocida como patógena en el maíz; nosotros la hemos aislado de plantas de tabaco enfermas procedentes de los términos municipales de Abáigar, Villatuerta, Milagro e Igúzquiza (Navarra); Aznalcázar (Sevilla), Castro del Río (Córdoba), Córdoba (capital) y Llombay (Valencia). Creemos que es suficiente para considerarla como patógena también para el tabaco en España.

5) La *Erwinia nimipressuralis* sólo se había aislado hasta ahora de troncos de *Ulmus* americana, en 1954. Nosotros también la hemos aislado suficiente número de veces de plantas enfermas de tabaco como para considerarla patógena de esta planta en España; Sevilla, Castro del Río (Córdoba), Talavera de la Reina (Toledo), Villatuerta (Navarra) y Córdoba. Conviene advertir que nuestras cepas presentan algunas diferencias con las características típicas, por lo que puede pensarse en formas de adaptación. Se sugiere la posibilidad de su relación con el *Bacillus tabacivorus*, especie incompletamente descrita por Delacroix en 1906.

6) *Erwinia carotovora* es una especie ampliamente patógena en muchas plantas, incluido el tabaco. Con *E. carotovora* están relacionadas una serie de formas incompletamente conocidas, como *E. flavida*, *E. erivansensis*, *E. betivora* y *E. phytophthora*. A *E. carotovora* se pretende considerarla como una especie colectiva, de la que todas las demás serían formas adaptativas.

7) Particular interés tiene también el aislamiento de numerosas cepas de *Xanthomonas panici*, de tallos necrosados y zonas medulares de plantas de tabaco, procedentes, en su mayor parte, de la vega del Genil, en la provincia de Granada. En el tabaco y otras solanáceas se han citado ya otros *Xanthomonas*. También hemos aislado el *X. panici* de plantas enfermas procedentes de nuestros campos de experimentación en este Instituto (Sevilla), en el año 1964.

8) Otras cepas aisladas como presuntas fitopatógenas en el tabaco corresponden al género *Pseudomonas*. De entre ellas destacan el *Ps. vi-*

burni ampliamente aislado de plantas enfermas procedentes de la vega del Genil (Granada), al parecer acompañando a *Xanthomonas panici*.

9) Los restantes *Pseudomonas* aislados lo han sido ocasionalmente y en escaso número de cepas, por lo que nos inclinamos a considerarlas como contaminantes, circunstanciales o saprofitos; talcs son: *Ps. marginalis*, *Ps. aleuritidis*, *Ps. tomato*, *Ps. xanthochlora*, *Ps. cichorii*. Unicamente *Ps. tonelliana* parece tener alguna significación por haberse aislado reiteradamente y de localidades diversas: Córdoba, Aznalcázar (Sevilla), Castro del Río (Córdoba) y Llombay (Valencia).

10) También se han aislado varias cepas del género *Phytobacterium* a las que tampoco concedemos mucha significación por su carácter aislado y circunstancial: *Ph. petasitis*, *Ph. saliciperda* y *Ph. zingiberi*.

11) A la vista de los resultados y observaciones nos inclinamos a pensar que la mayoría de las estirpes bacterianas patógenas causantes de podredumbres blandas penetran en la planta por heridas existentes en ella. Ello lo demuestra el hecho de que la zona más propicia para la infección, es la región del cuello de la raíz; esta región está en contacto con la superficie del suelo, en donde suelen habitar los insectos que causan las heridas. Por otra parte, casi todas las plantas observadas presentan zonas roídas en el cuello.

12) También hemos observado que la misma estirpe bacteriana puede atacar diversos órganos de la planta, aunque los efectos que causen sobre cada uno de ellos sean distintos.

13) La morfología de las especies bacterianas aisladas es muy semejante, pues presentan forma bacilar con los extremos redondeados. Su longitud varía entre 0,7-2 μ , y su diámetro entre 0,4-1 μ aunque no faltan formas que llegan a tener hasta 3 μ de longitud. Estas medidas se han tomado en cultivos de menos de 24 h. Todas son gram-negativas, asporuladas, móviles, con flagelos peritricos en el caso de las *Erwinia* y polares en los demás casos.

14) Las colonias desarrolladas sobre agar común, sembradas en placas de las distintas estirpes bacterianas, presentan los mismos caracteres, salvo muy ligeras diferencias.

15) Los efectos y lesiones producidos por las distintas bacterias sobre los distintos órganos de las plantas de tabaco son muy análogos.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestra gratitud al Prof. Dr. Dimas Fernández-Galiano Fernández por hacernos el honor de apadrinar esta Tesis doctoral, así como por sus orientaciones y consejos. Al Prof. Dr. Antonio Izquierdo Tamayo, Maestro y amigo, bajo cuya dirección hemos realizado el trabajo.

Asimismo, al Dr. Ing., Caridad Igelmo, Ex-Director del I.T.T. de Sevilla; al Prof. Dr. Julio Pérez Silva, al Dr. Antonio Arroyo Merino. A los Ingenieros-Jefes y Peritos de las diversas zonas tabaqueras. A D. Manuel Delgado, a la Sra. María Luisa Vilches Román y, por último, al Departamento de Microscopia Electrónica, del C. S. I. C., de Madrid.

RESUMEN

Se exponen brevemente las bacteriosis sufridas por el tabaco en el mundo desde 1880, luego se estudian los diferentes aspectos de las bacteriosis que se desarrollaron sobre las distintas variedades de plantas cultivadas de *Nicotiana tabacum* 2n en las diversas zonas tabaqueras de España, durante los años 1964 a 1967.

Los daños y lesiones originados por las distintas bacterias sobre los diversos órganos de la planta son muy análogos; o "podredumbres blandas", cuando se desarrollan sobre la zona medular de tallos y raíces, o "manchas" seguidas de necrosis, cuando afectan a las hojas.

Las bacterias causantes de las podredumbres penetran en la planta por heridas existentes en ella, siendo la zona más propicia la región del cuello.

Las estirpes aisladas y caracterizadas se agrupan en cuatro géneros: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Phytobacterium* y *Xanthomonas*.

Entre las bacterias consideradas como patógenas para el tabaco en España destacamos: *Erwinia nimipressuralis*, *E. dissolvens*, *E. carotovora*, *Pseudomonas viburni*, *Ps. tonelliana* y *Xanthomonas panici*.

E. nimipressuralis, *E. dissolvens* y *X. panici* han sido citadas por primera vez por nosotros como patógenas para el tabaco.

Los restantes *Pseudomonas* y *Phytobacterium* aislados se consideran como contaminantes y saprofitos.

La morfología de las especies aisladas, así como el aspecto de las colonias desarrolladas sobre agar común son muy semejantes.

SUMMARY

Bacterial rot of the tobacco plant in Spain

Brief report on the bacteriosis suffered by tobacco plants all over the world since 1880, followed by a survey of the different aspects of the bacteriosis developed by the different kinds of cultivated *Nicotiana tabacum* 2n grown in the different tobacco plant zones in Spain during the years 1964-1967.

The damage and lesions originated by the different bacteria on various organs of the plant are very similar; either "soft rot" when they take place on the pith zone of the stems and roots or "spots" followed by necrosis when the leaves are affected.

The bacteria originating the rot enter into the plant through wounds, being the neck the most propitious zone.

The isolated and characterized strains are grouped in four kinds: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Phytobacterium* and *Xanthomonas*.

Among the bacteria considered as pathogenous for the tobacco plant in Spain, we would like to emphasize; *Erwinia nimipressuralis*, *E. dissolvens*, *E. carotovora*, *Pseudomonas viburni*, *Ps. tonelliana*, and *Xanthomonas panici*.

E. nimipressuralis, *E. dissolvens* and *X. panici* have been mentioned by us for the first time as pathogenous for the tobacco plant.

The other isolated *Pseudomonas* and *Phytobacterium* are considered as contaminant and saprophytic.

The morphology of the isolated kinds and the aspect of the colonies developed on common agar are very similar.

BIBLIOGRAFIA

1. BENÍTEZ, J., y ALCARAZ, E. 1931. Notas prácticas sobre la podredumbre de la raíz. Rev. Tabacos, 4, 20.
2. BENÍTEZ, J., y BENEYTO, R. 1931. Wildfire. Rev. Tabacos, 7-8, 15.
3. BRAUN, A. C. 1937. A comparative study of *Bacterium tabacum* Wolf and Foster and *Bacterium angulatum* Fromme and Murray. Phytopathology, 27, 283-304.

4. BREDÁ, J. van. 1897. De slijmziekte bij de tabak in Deli. Teysmannia Deel, 8, 528-50.
5. BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D., and SMITH, N. R. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
6. CLARA, F. M. 1930. A new bacterial disease of tobacco in the Philippines. Phytopathology, 20, 691-706.
7. DELACROIX, G. 1906. Recherches sur quelques maladies du tabac en France. Ann. Inst. Nat. Agron., Ser. II, V, 141.
8. Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Sección de Biológicas, de Madrid. 1968. Guión de Clases Prácticas de Microbiología.
9. DURÁN-GRANDE, M. 1967. Algunas observaciones sobre la rizosfera del tabaco. An. Inst. Nac. Invest. Agron., XVI, 23.
10. FERRARIS, T. 1930. Tratado de Patología y Terapéutica Vegetales (traducción de M. Benlloch, J. del Cañizo y A. Caballero). Salvat Editores, S. A., Barcelona.
11. FROBISHER, M. 1964. Microbiología Médica (traducción). 3.^a ed. Salvat Editores, S. A., Barcelona.
12. GHIMPU, V. 1941. Bolile si Insectele Daunatoare Tutunului. Monitorul Oficial si imprimeriile statului, Bucuresti.
13. GIRARD, H., y ROUGIEUX, R. 1964. Técnicas de Microbiología Agrícola (traducción de Horacio Marcos). Editorial Acribia, Zaragoza.
14. HARRIGAN, W. F., y E. McCANCE, M. 1968. Métodos de Laboratorio en Microbiología (traducción de la Dra. Isabel García Acha y el Prof. Julio Rodríguez Villanueva). Editorial Academia, León.
15. HONING, J. A. 1910. De corzaak der slijmziekte en proeven ter bestrijding. Deli Proefsta. te Medan, Meded., 5, 1-19.
16. HONING, J. A. 1914. De Zwarte roest der Deli-tabak. Deli Proefsta. te Medan, Meded., 8, 107-111.
17. HUNGER, F. W. T. 1901. De slijmziekte veroorzaakt door *Bacillus solanacearum* Smith. Overzicht der ziekten en beschadigingen van het blad bij Deli-tabak. As Lands Plantentuin, Meded. 47, 20-25.
18. IZQUIERDO-TAMAYO, A. 1956. Estudios sobre la flora bacteriana del tabaco. An. Inst. Nac. Invest. Agron., V, núm. 1.
19. IZQUIERDO-TAMAYO, A., y DURÁN-GRANDE, M. 1965. Estudios sobre la flora bacteriana del tabaco. IV. Evolución de las poblaciones microbianas de los tabacos extremeños. Bol. Inst. Nac. Invest. Agron., cuad. 375.
20. IZQUIERDO-TAMAYO, A., y DURÁN-GRANDE, M. 1967. Notas sobre bacteriosis del tabaco. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Nat. Secc. Biol., 65.
21. IZQUIERDO-TAMAYO, A., y DURÁN-GRANDE, M. 1967-68. Enfermedades y parásitos del tabaco en España. Bol. Patol. Veg. Entomol. Agr., XXX.
22. IZQUIERDO-TAMAYO, A., et GONZÁLEZ-CANCHO, F. 1955. La flore microbienne du tabac. Actes I Congr. Sci. Int. Tab., II, 458-65.
23. IZQUIERDO-TAMAYO, A., y MEDEIROS-ALVAREZ, A. 1959. Estudios sobre la flora bacteriana del tabaco. III. Microflora de los tabacos del Norte de España, Granada, Extremadura y Sevilla. Bol. Inst. Nac. Invest. Agron., cuad. 296.

24. IZQUIERDO-TAMAYO, A.; MEDEIROS-ALVAREZ, A., y COTA-GALÁN, R. 1958. Estudios sobre la flora bacteriana del tabaco. II. Observaciones sobre la multiplicación de bacterias inoculadas al tabaco y modificaciones que producen en el mismo. Bol. Inst. Nac. Invest. Agron., cuad. 264.
25. JANSE, J. M. 1892. Nota over eene ziekte der tabak op Sumatra. Teysmannia Deel, 3, 352-63.
26. JOHSON, J. 1914. The control of insects and diseases of tobacco. Wis. Agr. Exp. Sta. Bull., 237, 34.
27. JOHSON, J. 1923. A bacterial leaf spot of tobacco. J. Agr. Res., 23, 481-93.
28. KELMAN, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. N. C. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull., 99, 194.
29. LOGAN, C. 1963. Simple method of differentiating *Erwinia carotovora* variety *atroseptica* from *Erwinia carotovora* variety *aroideae*. Nature, 199, 623.
30. LUCAS, G. B. 1959. Les maladies du tabac a Panama. Coresta, 4, 103.
31. LUCAS, G. B. 1965. Diseases of Tobacco. The Scarecrow Press Inc., New York.
32. MAGROU, J., et PREVOT, A. R. 1948. Etudes de systématique bactérienne. IX. Essai de classification des bactéries phytopathogènes et espèces voisines. Ann. Inst. Pasteur, 75, 99.
33. MAGROU, J., et PREVOT, A. R. 1948. Étude taxonomique des bactéries phytopathogènes. C. R. Acad. Sci., 226, 1229-30.
34. MORGAN, O. D. 1959. La "jambe noire" du tabac dans le Maryland. Coresta, 3, 89.
35. NAKAMURA, H. 1948. Tobacco Plant Pathology. Asakura Shoten Press, Tokyo.
36. PATEFF, P. 1928. Wildfire a new bacterial leaf spot disease on tobacco in Bulgaria. Rev. Inst. Rec. Agr. Bulgaria, 4, 101-12.
37. PRÉVOT, A. R. 1961. Traité de Systématique Bactérienne. Dunod, París.
38. SALLE, A. J. 1965. Bacteriología (traducción de Ignacio Rodrigo García). Editorial Gustavo Gili, S. A.
39. SANTA MARÍA, J., y GARCÍA-ASER, C. 1965. Aplicación da coloración negativa con ácido fosfotúngstico en Taxonomía bacteriana. Bol. Inst. Nac. Invest. Agron., cuad. 376.
40. SMITH, E. F. 1896. A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov sp.) U.S. Dept. Agr., Div., Veg. Physiol. Pathol., Bull., 12, 1-28.
41. SMITH, E. F. 1920. An Introduction to Bacterial Diseases of Plants. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
42. SMITH, N. R.; GORDON, R. E., and CLARK, F. E. 1952. Aerobic sporeforming bacteria. U. S. Dep. Agr. Monograph., n 16.
43. Society of American Bacteriologists. 1923. Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria. Biotech Publications, Geneva, N. Y.
44. Society of American Bacteriologists. 1957. Manual of Microbiological Methods. Mc Graw-Hill Book Co., New York.
45. SRINIVASAN, M. C. 1962. Deux nouvelles bacteries phytopathogenes pour les Verbenacees. Proc. Indiana Acad. Sci., 57-2, 88-96.

-
46. STAPP, C. 1930. Bakterielle Tabakkrankheiten und ihre Erreger Angew. Bot., 12, 241-71.
 47. TIRELLI, M. 1953. Patología del Tabacco. vol. I, parte 2.^a. Augusto Vallerini Editore, Roma.
 48. TROTTER, A. 1935. La malattie batteriche del tabacco. Boll. Tec. Regio Ist. Sper. Coltiv. Tab. Leonardo Angeloni, XXXII, 101-39.
 49. URQUIJO, P. J.; RODRÍGUEZ-SARDIÑA, y G. SANTAOLALLA. 1961. Patología Vegetal Agrícola, Salvat Editores, S. A. Barcelona.
 50. UYEDA, Y. 1905. *Bacillus Nicotiana* sp. nov. die Ursache der Tabakwelkrankheit oder Schwarzbeinigkeit in Japan. J. Imp. Agr. Exp. Sta. Japan, 1, 30-57.
 51. VERA, L. C. Técnicas Generales y Experimentación Bacteriológica. El Ateneo, Buenos Aires.
 52. VZOROFF, V. I. 1930. Infectious rust of tobacco (*Nicotiana tabacum*). Bul. North Caucasus Plant Prot. Sta., 6-7, 261-72.
 53. WOL, F. A. 1957. Tobacco Diseases and Decays. Duke University Press, Durham, North Carolina.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL
SECCION DE LEVADURAS

OBSERVACIONES RELATIVAS A LA EXISTENCIA DE «FLORA» DE LEVADURAS NO ESPOROGENAS, RESISTENTE A CONDICIONES ADVERSAS DE MEDIO AMBIENTE

por

E. FEDUCHY, con la colaboración técnica de PILAR MARCILLA

INTRODUCCION

En los estudios realizados sobre la "flora" de levaduras de los mostos de uva, en la fase de iniciación de la fermentación y durante las primeras horas de la misma, se ha observado un dominio de levaduras apiculadas (género *Kloeckera*) con relación a otras formas, elípticas, redondas o redondeadas, alargadas, etc., correspondientes a diferentes géneros o especies, como *Saccharomyces*, *Torula*, *Candida*, etc.

Este dominio de levadura apiculada en la primera fase de la fermentación, ha sido puesto de manifiesto repetidas veces en estudios realizados por diferentes autores (1-2, 3 y 8), referentes a la flora de levaduras de varias regiones vinícolas (4 y 6-7).

Dicho dominio de levadura apiculada en los comienzos de la fermentación no puede explicarse considerando como causa la de que también existe una mayor proporción de levadura apiculada en la superficie del fruto y raspones, pues las observaciones, al microscopio, de preparaciones de centrifugados de agua de lavado de la superficie del racimo y del mosto

recién obtenido por el estrujado del fruto, realizando ambas operaciones en condiciones convenientes de asepsia, permiten comprobar la ausencia casi completa de levaduras apiculadas características, que se destacan por una típica forma de limón. Sin embargo, su presencia era forzosa, pues a las pocas horas, su desarrollo en el mosto avanzaba rápidamente, considerándose por ello que pasaron desapercibidas, probablemente debido a que su aspecto en esta fase de condiciones adversas de medio ambiente no presenta la forma típica de limón, ni en la primera de su desarrollo inicial, sino que su aspecto es elíptico, pequeño, que puede confundirse con las elípticas típicas, que también en esta fase, aún difícil de su vida, en la que están adheridas por la pruina a la superficie del fruto, se encuentran con aspecto raquíutico o espuruladas, esperando el momento favorable de la liberación del mosto para nutrirse y consumir su desarrollo una vez sumergidas en el mismo.

Al observar la vitalidad de la levadura apiculada, que es la primera en desarrollarse, y apreciar su aspecto débil y su falta de poder esporógeno, y también el de adoptar formas durables que aseguren su conservación en las condiciones adversas de medio, las que indudablemente ha de soportar, se presenta la interrogación de cómo pudieron mantenerse con vida durante todo el año. Ya hace tiempo que eminentes autores como Guillermond (7) se preocuparon por encontrar una explicación a estas observaciones; este autor alude a investigaciones de varios biólogos que encuentran levaduras no esporógenas, pero en fase vegetativa sobre otros frutos y sobre hojas frescas.

En Andalucía occidental, en donde se presenta la "crianza" más típica, la de vinos con velo de levadura en fase aeróbica, levadura de "flor" buena, que es la que da origen a las características de aroma y sabor apreciados en los vinos denominados "finos", es creencia popular muy generalizada que la levadura inverna en plantas barrileras que nacen en las vecinas marismas, y que los vientos del Levante, cuando soplan en vísperas de vendimia, son los que favorecen la siembra sobre los frutos de la vid, de levaduras típicas de la fermentación, y de la "crianza" posterior de estos vinos.

Al iniciar este trabajo se persiguió, en primer lugar, seguir las observaciones hasta el momento final en el que ya no se acusen levaduras capaces de revivir y especialmente fijando la atención en las levaduras apiculadas, tomando como fuente de estos cultivos las hojas y sarmientos que que-

daron después de la vendimia, lo que se continuó hasta la caída de las hojas, ya completamente secas; continuando después con las de nueva brotación, hasta las proximidades de la nueva vendimia.

Durante el desarrollo de este trabajo y al observar, como luego se expone, la extraordinaria vitalidad de levaduras apiculadas en condiciones rigurosamente adversas, se hicieron una serie de siembras en bloque de yeso, según técnica para comprobar la facultad de esporulación de las levaduras, con el fin de poner en evidencia de manera indudable la resistencia de estas levaduras del género *Kloeckera* no esporógenas. Después de más de 6 meses, en completa sequedad y en este medio adverso, sin materia alimenticia alguna, se pudo comprobar, al sembrarla en extracto de malta, que a los pocos días de incubación revivían otra vez.

Considerando estas observaciones como de verdadero interés, se hizo una comunicación previa, que fue publicada en esta Revista (5).

A continuación hacemos un resumen de los cultivos y observaciones, evitando la exposición de otros muchos muy numerosos que se siguieron con análogos resultados a los expuestos.

MATERIAL Y METODOS

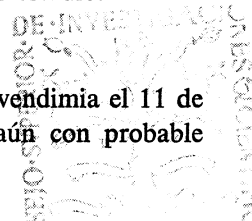
Toma de muestras de hojas de la viña

La toma de muestras comenzó a los pocos días de terminada la vendimia, en ese año fue el 11 de octubre, realizando esta toma en el viñedo de experiencias del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, que se encuentra en la finca El Encín (pasado Alcalá de Henares) y en la viña de la Escuela de la Vid, en la Casa de Campo de Madrid, lugares aislados en los que no hay peligro de contaminación por ambiente de bodegas, y especialmente la primera, separadas de la población.

Antes de detallar las muestras recogidas, el fin perseguido en cada nueva cosecha, las observaciones y aislamiento de la "flora", recuento de formas y clasificación de levaduras, exponemos a continuación un resumen de dichas muestras recogidas, y su catalogación para el estudio.

1.ª serie

Muestra I. Esta muestra fue recogida al terminar la vendimia el 11 de octubre. Las hojas estaban frescas y en el ambiente aún con probable



presencia de levaduras correspondientes a la "flora" que había estado presente en la superficie del futo y en el jugo de uvas estrujadas durante la vendimia, de las que habían quedado residuos que impregnarían algunas hojas, tallo y tierra.

Muestra II. Fue cosechada a los 4-5 días de la anterior, o sea, el 15-16 de octubre, que corresponde al 6.º y 7.º días después de la vendimia, fecha en la que los residuos favorables para el desarrollo de levadura, que pudieron quedar en el medio, ya estarían más secos.

Muestra III. Una serie de 4 muestras, cosechadas del 21 al 26 del mismo mes de octubre, con el fin de realizar nuevas comprobaciones de las observaciones efectuadas en el estudio de las muestras I y II y de su evolución, pues ya comenzó a sorprender la actuación de la levadura apiculada y su rápida multiplicación cuando pasaba a medio favorable, comenzando por ello a deducirse que la causa de su abundante presencia en la fase inicial de los mostos es debida probablemente a esta rápida multiplicación.

Muestra IV. Otras 4 muestras, tomadas ya el 6 y 7 de noviembre, con el fin de confirmar la dificultad de conservación de apiculadas en medio adverso. En efecto, se necesitaron varios días para la aparición y desarrollo y multiplicación de algunas de ellas, aun en medio de cultivo favorable (extracto de malta), apareciendo aisladamente en alguna de las muestras.

Aquí se dio por terminada la primera etapa de toma de muestras, y se aplaza su continuación hasta el mes de septiembre, semanas antes de la vendimia, para comprobar la aparición de levaduras apiculadas antes de la maduración del fruto.

También en el curso del invierno y primavera se tomaron algunas muestras de residuos de hojas secas de la cepa, y de las hojas frescas de arbustos perennes como el aligustre, que estaba contiguo al viñedo, las que a continuación se reseñan en la segunda serie.

2.ª serie

Muestra V. Muestras tomadas durante varios días de invierno, de hojas frescas de aligustre.

Muestra VI. Muestras de hojas jóvenes de la viña, tomadas el 11 y 12 de junio.

Muestra VII. Muestras con presencia de fruto en la cepa, aún no maduro. Primeros indicios de aparición de levadura apiculada.

Muestra VIII. Muestras tomadas con presencia de fruto ya maduro, con las que se acaba el ciclo, acusándose ya franca aparición de levadura apiculada.

Técnicas seguidas para el lavado de las hojas, observación de la "flora" separada, su recuento, cultivo, aislamiento y clasificación

Infusión de las muestras de hojas en agua estéril: las diferentes muestras de hojas cosechadas, se llevan cada una a un matraz estéril de volumen conveniente para contener ampliamente el volumen de hojas respectivo, adicionando después a cada matraz, aproximadamente, 1/5 de un volumen de agua estéril. Se agitan enérgicamente durante 1/2 hora (en varios momentos) y se remueven también y estrujan las hojas con una varilla de vidrio gruesa.

Medios de cultivo y aislamiento

Se empleó extracto de malta, como medio de enriquecimiento del agua de lavado y primer rejuvenecimiento de la "flora" en ella contenida.

Agar de malta fue el empleado para realizar los aislamientos en colonia, con siembras procedentes del agua de lavado de las hojas y enriquecida con malta, las siembras se repitieron en varios días sucesivos. Para la clasificación se aplicó la de Lodder y Kreger van Rig.

RESULTADOS

Relación de las siembras de aislamiento y de las observaciones de la "flora" procedente de los diferentes lotes de hojas cosechadas, antes expuestos

Muestra núm. I

Como se ha indicado, estas hojas fueron cosechadas al terminar la vendimia, hacia el 12 de octubre.

Las infusiones en agua fría estéril se realizaron en matraces de 1 l, con el volumen aludido de 1/5 del volumen. Para la observación de la

“flora” extraída por el agua, después de la agitación y removido enérgico con la varilla de vidrio, se tomó una muestra que fue centrifugada, haciendo una preparación en fresco de una suspensión del peso suficientemente densa para una observación al microscopio del conjunto de la “flora”.

Aspecto de lo observado al microscopio. Se apreciaron células de levadura de contorno rugoso y con corpúsculo refringente que parece espora, otras con contenido muy granulado, células pequeñas de aspecto apiculadas y otras numerosas, aún más pequeñas, con forma elíptico-rugosa, que son posibles apiculadas, con el aspecto que frecuentemente presentaba en levadura vieja, elíptica, pequeña. También se apreciaban células elípticas alargadas con dos o tres masas rugosas en su interior.

Con el fin de acelerar la aparición de las colonias en los aislamientos en agar de malta procedentes de las aguas de lavado, se adicionaron unos 20 ml de extractos de malta a los matraces con la infusión acuosa de las hojas.

Se realizaron los aislamientos siguientes: 1) aislamiento inicial del agua de infusión con reciente adición del extracto de malta; 2) aislamiento del mismo líquido, después de 24 h de incubación a 25 °C.

Las observaciones de los aislamientos fueron las siguientes: primero se realizó un recuento de las colonias aparecidas en las cajas correspondientes, después de observar las diferencias de aspecto de las colonias y confirmar esta primera impresión con observaciones al microscopio de preparaciones tomadas de varias colonias de cada tipo.

Se hizo un recuento de las colonias de cada uno de estos tipos, y una siembra de cada una de las mismas, en extracto de malta, para una posterior observación y clasificación.

Los resultados correspondientes a estas dos primeras series de aislamientos fueron:

1) Aislamiento del líquido inicial sin incubación. Colonias del tipo 1, 74 % corresponden a *Saccharomyces veroneae*; colonias del tipo 2, 15,8 % corresponden a *Candida pulcherrima*; colonias del tipo 3, 7,4 % corresponden a *Hansenula suaveolens*; colonias del tipo 4, 2,8 % corresponden a *H. anomala*.

2) Aislamiento, procedente del líquido (agua + malta), después de 24 h a 25 °C. Como se ha indicado, en esta fase se inició fermentación del líquido. Las colonias aparecidas en el aislamiento en agar de malta, sembrado del mismo, fueron excesivamente numerosas, destacándose en

minoría unas blancas, convexas, de mayor tamaño (colonias núm. 3), rodeadas de innumerables colonias pequeñas de tono grisáceo (colonias núm. 1) y otras también pequeñas y numerosas, de aspecto más hialino y grisáceo (colonias núm. 2). La observación al microscopio de preparaciones en fresco tomadas de las diferentes colonias acusaron ser las núm. 3, células elípticas grandes; y apiculadas típicas, las núm. 1 y núm. 2.

Después de clasificadas las cepas correspondientes, se obtuvo el siguiente resultado: colonias núm. 1, apiculadas, *Kloeckera apiculata*, en número incontable; colonias núm. 2, apiculadas, *K. apiculata*, en número incontable; colonias núm. 3, *Saccharomyces cerevisiae*.

Muestra núm. II

Cosechada a los 6 días de la muestra anterior, cuyos resultados interesaba comprobar, especialmente la abundancia de levadura apiculada en ella conservada después de su permanencia durante unas horas en medio más favorable (con adición de extracto de malta a la infusión acuosa); con lo que se puso de manifiesto un rejuvenecimiento y multiplicación de levaduras apiculadas, después de haber pasado varios días sin presencia de fruto en el viñedo y ahora se trató de confirmar.

Para resaltar más la diferencia se hicieron dos series de aislamientos en agar de malta: 1) tomando directamente del agua de infusión y de la misma forma que la vez anterior; 2) otra serie de aislamientos en el mismo medio, fueron realizados a partir de una siembra del agua de infusión en extracto de malta, y tomada después de 24 h de incubación, a 25 °C.

En los aislamientos de la primera serie se observaron los resultados siguientes: entre las colonias nacidas dominaron casi por completo unas de color rosado-amarillento, brillantes y jugosas, que en días posteriores van tomando coloración negruzca. Al microscopio, la preparación acusa células elíptico-lanceoladas, de mayor tamaño que el corriente de las levaduras. Estas colonias se desarrollaron rápidamente en la superficie del agar, tomando contacto unas con otras y cubriéndola casi por completo.

Entre esta masa de colonias rosa-negras, se acusaban también algunas de aspecto jugoso, blancas y brillantes. Al microscopio acusaban las preparaciones de ellas tomadas, células ovoide-redondeadas, de contenido celular granulado.

En la clasificación de las cepas que luego se realizó, se clasificó a las

de estas últimas colonias como *Torulopsis glabrata*. En cuanto a las rosa-do-negruczas, por su aspecto se las catalogó entre las levaduras-moho, que se salen de los límites de la clave de Lodder, por lo que su clasificación ofreció dificultades, pero pudimos comprobar la identidad de sus características con las de otra aislada en nuestra Sección del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, por el Dr. Ing. Fernández González, en los trabajos que llevaba sobre la resistencia de levaduras en la acción de las irradiaciones "gamma" en mosto, con el fin de una esterilización, identificándose la cepa en cuestión con la *Pullularia pullulans*.

En otra caja del mismo aislamiento, se acusó también un dominio de *Pullularia* y colonias blanco-marfil, de células de levadura de forma elíptica, que después de clasificadas se catalogaron como *Saccharomyces cerevisiae*.

La proporción de ambas colonias, según recuento fue: colonias rosa-do-negras, 84 % de *Pullularia pullulans*; colonias blanco-marfil, 16 % de *Saccharomyces cerevisiae*.

Nuevos aislamientos procedentes de agua de infusión de otro lote de hojas de la misma fecha, acusaron mayor proporción de colonias blanco-crema que de las rosa-negras de *Pullularia*.

El recuento y clasificación dieron el siguiente resultado: colonias blanco-crema, 75 %, de *Saccharomyces cerevisiae*; colonias rosa-negruczo, 5 %, de *Pullularia pullulans*.

Aquí la *Saccharomyces cerevisiae* dominó en el campo, pero en ninguno de los dos aislamientos se acusaron la aparición y dominio de la levadura apiculada con incontable número de colonias, como en las siembras de la cosecha anterior de hojas.

Repitiendo 24 h después, la toma para siembra de aislamiento, de la misma agua con las hojas aún en infusión y por lo tanto con 24 h más de contacto e incubación, se obtuvo el resultado siguiente: colonias de levadura apiculada, número incontable y presencia entre ellas de colonias de *Saccharomyces ellipsoideus*.

Este resultado puso de manifiesto que con el mayor número de horas de infusión en agua de las hojas dislaceradas, fue enriquecida en materias alimenticias que favorecieron el desarrollo de las levaduras apiculadas, que según norma es más rápido y dominante en las primeras fases que las de otros géneros.

Muestra núm. III

Corresponden a la serie de muestras cosechadas del 21 al 30 de octubre, aplicándose como se ha expuesto a nuevos estudios de comprobación de la actuación de la levadura apiculada en relación con otros géneros de levadura, estudio seguido sin interrupción de toma de muestras para comprobar el momento en el que se manifiesta un cambio sensible en la proporción de la “flora”, especialmente en lo que a la levadura apiculada se refiere.

Los lotes de las hojas cosechadas fueron 4. Las siembras y los resultados observados fueron los siguientes.

Primer lote de hojas. Cosechado el 21 de octubre. Siembra en agar de malta tomando unas gotas del agua de infusión recién obtenida. Se apreciaron 5 tipos de colonias.

Colonias núm. 1. Color rosado, aspecto jugoso brillante, al microscopio la preparación de ella tomada, acusa células pequeñas, ovales-redondeadas, en proporción de un 6,66 %. (Probable *Torula*, que fue perdida.)

Colonias núm. 2. Grandes, blanco-marfil, un 3,43 %, clasificadas como *Saccharomyces cerevisiae*.

Colonias núm. 3. Tamaño mediano, color rosa salmón. Células elíptico-alargadas y elípticas un 3,23 %. *Rhodotorula palida*.

Colonias núm. 4. Color crema, brillantes, aspecto miceliar que invade la superficie con gran mayoría, un 83 %. Levadura-moho.

Colonias núm. 5. Colonias blancas, compactas, están cubiertas por la anterior, un 3,35 %.

Siembras en malta del agua de infusión de las hojas. Aislamientos en agar malta, después de 24 h de incubación de la siembra anterior.

Se obtuvieron las siguientes colonias: colonias pequeñas de levaduras apiculadas, en gran mayoría (incontables), *Kloeckera apiculata*; colonias de mayor tamaño, de color blanco-marfil, *Saccharomyces cerevisiae*; colonias de mayor tamaño, algo grisáceas, *Sac. cerevisiae*.

Resultados ambos de acuerdo con las observaciones anteriores.

2.º lote de hojas. Cosechadas el 23 de octubre. Las siembras de aislamiento en agar de malta, procedentes del agua de infusión de estas hojas, acusaron colonias de dos aspectos:

Caja A: colonias blancas, compactas, lisas, formadas por células redondas, un 16 %; colonias de aspecto céreo, color crema, brillantes, de con-

tornos miceliares, formados por células alargadas con los polos apiculados presentando forma de lanceta, un 84 %.

Las primeras colonias, que por el aspecto de las células parecían ser de *Torula*, fueron rápidamente invadidas por las segundas, de aspecto miceliar, impidiendo su toma para estudio y clasificación. Las segundas colonias, de levadura-moho, se clasificaron como de *Pullularia pullulans*.

Caja B: también sembrada como la anterior de infusión de hojas, pero de diferente envase.

Las colonias desarrolladas presentaron como dominantes, colonias color crema, jugosas aunque algo sumergidas en el agar; al microscopio, acusaron las preparaciones, células de forma elíptico-oval, de aspecto vigoroso. La clasificación las identificó como *Saccharomyces oviformis*.

Como consecuencia de la flora desarrollada en las siembras en agar de malta, procedentes de estas aguas de infusión de las hojas, y al no observar levaduras apiculadas, y sí el dominio de las de *Saccharomyces oviformis* más potentes, se pensó en la posibilidad de que fueran dominadas por éstas las levaduras apiculadas y más en un medio como es el solidificable, aún no suficientemente favorable para el rejuvenecimiento de las más débiles, en competencia con las más vigorosas.

Para aclarar esta cuestión se hicieron a partir de otro lote (núm. 3) de hojas en infusión, nuevas observaciones previas, al microscopio, del agua de infusión, y de la siembra de ésta en extracto de malta, como a continuación se expone.

3er. lote. Cosechado el 26 de octubre. La observación, al microscopio, del agua de infusión de estas hojas acusó campos con levaduras de tamaño relativamente pequeño, con contenido celular granulado o rugoso, algunas de ellas con corpúsculos de grasa o esporas. Otras presentaban formas apiculadas, pequeñas y otras células elípticas más pequeñas aún, que pueden ser apiculadas, paralizadas en la fase de un desarrollo, en el que aún no se aprecia la forma característica.

Se sembró en extracto de malta de esta agua de infusión, y después de 24 h de incubación a 25 °C se observaron campos con células de aspecto redondeado, alargadas, ovales, al parecer rejuvenecidas o más turgentes, pero su contenido celular continuó presentando rugosidades, corpúsculo graso, esporas. Se aprecian varias formas de levaduras apiculadas entre las elípticas, pero en la siguiente proporción, no dominante: apiculadas, 29 %; elípticas, 71 %.

Nueva observación a las 48 h de incubación; el líquido acusa más sensible enturbiamiento y al microscopio dominio franco de levaduras apiculadas y otras elípticas pequeñas, que probablemente son también apiculadas en fase inicial.

4.º lote. Cuatro días después del lote anterior de la serie (III), se cosecha éste. Las hojas van presentando coloraciones rojizas y las aguas de infusión también toman tinte rosado; para nuevas comprobaciones de los anteriores resultados se repitieron con esta infusión las resiembras y observaciones siguientes.

En el cultivo de aislamiento en agar de malta, a partir del agua de infusión, se acusa nuevamente un dominio de levadura-moho, apareciendo junto a las demás colonias de *Pullularia pullulans* otras también de aspecto céreo y forma estrellada, de desarrollo miceliar, y algunas colonias de *Saccharomyces cerevisiae* y ninguna de apiculada.

El recuento de colonias acusa: colonias rosa-negra, de *Pullularia pullulans*, un 11 %; colonias estrelladas blancas (moho-levadura), un 55,7 %; colonia convexas, blancas, jugosas, *Saccharomyces cerevisiae*, un 3,6 %; colonias pequeñas, rosas, *Rhodotorula minuta*, un 29,7 %.

Después de 48 h de incubación de la siembra en extracto de malta del agua de infusión, tampoco se acusó presencia de levaduras apiculadas.

Cuatro días después, en un nuevo aislamiento, se acusó un dominio de levadura apiculada.

Ya en estas fechas se comenzó a manifestar un empobrecimiento en la fase inicial, de levaduras apiculadas, pero después de cierto tiempo, ya más largo, de incubación y en un medio como el extracto de malta en el que no se alcanza con la fermentación una riqueza de consideración en alcohol, el desarrollo de las levaduras apiculadas sigue manifestándose francamente, aunque con más retraso.

Muestra núm. IV

Ya en los primeros días de noviembre (el 6-7), cuando después de las primeras heladas las hojas están casi secas. Se hizo la infusión acuosa, dislacerado de las hojas, y siembras en extracto de malta de la misma.

Después de 24 h de incubación, como en los ensayos anteriores, se hicieron las siembras de aislamiento; las observaciones de las colonias aparecidas acusaron los siguientes resultados: colonias de *Candida pul-*

cherrima, un 6,5 %; colonias de *Pullularia pullulans*, un 75,8 %; colonias de bacterias, un 15,5 %; colonias de *Kloeckera apiculata*, un 2,2 %.

Aunque en pequeña proporción, aparecen aún levaduras apiculadas, y en la primera fase de rejuvenecimiento de la flora de la hoja.

Transcurridos 10 días, se hicieron nuevos aislamientos del líquido anterior en incubación, y se apreció un dominio de colonias de levaduras apiculadas.

Ante la presencia de levadura apiculada en fecha tan avanzada, se continuó durante varios días tomando muestras de hojas y repitiendo las infusiones acuosas y siembras en malta, acusándose siempre, aunque con más o menos tardanza, aparición de levadura apiculada.

Transcurridos varios días más, ya a fines de noviembre, cuando ya no se apreciaban más que hojas completamente secas en las cepas, se hizo una nueva infusión de éstas y cultivo de la misma en malta, observando lo siguiente.

A las 24 h, a 25 °C de temperatura, la siembra en malta de agua de infusión, acusó al microscopio, franca presencia y desarrollo de levadura apiculada. Con ello pudo comprobarse que en los últimos restos de hojas pendientes de la cepa se conserva la presencia de levadura apiculada capaz de desarrollarse en un medio favorable.

Nueva serie de observaciones de la "flora" de levaduras presente en las hojas de la vid, a partir de la brotación

Muestra núm. V

Después de las observaciones y estudio de la "flora" de levaduras procedentes de las hojas de la vid, desde el momento en que terminó la vendimia y hasta que ya completamente secas desaparecieron de los sarmientos, fase esta última en la que como se ha expuesto, aún pudimos durante varios días observar levaduras apiculadas, capaces de revivir y multiplicarse en medio favorable, se consideró de interés completar el ciclo de observaciones, para conocer el momento en el que la levadura apiculada hace su franca aparición.

Durante varios días de invierno se trató de encontrar posible presencia de levaduras apiculadas en hojas perennes de aligustres próximos al viñedo, pero no se observó presencia de levaduras. Posteriormente se tomaron las muestras siguientes.

Muestra núm. VI

1.ª Cosecha de la 2.ª serie. A primeros del mes de junio, se volvió a tomar muestras de hojas, realizando la infusión en agua en la forma antes expuesta, y la siembra de esta infusión en extracto de malta.

La observación de los primeros aislamientos a partir del agua de infusión, acusó una serie de colonias en las que dominaron los mohos y “levadura-moho”, con algunas colonias casi cubiertas por ella en una proporción de 1,6 %, las que observadas y clasificadas, acusaron ser de *Torulopsis aerea* (M. F.).

Después, del extracto de malta sembrado también se hicieron aislamientos en agar de malta, acusando colonias de levadura en una proporción de un 5 %, las que fueron clasificadas como *Candida rugosa* y *C. mycodermica*, el resto de las colonias eran de mohos y bacterias.

Se repitieron los aislamientos en días sucesivos, sembrando también del agua de infusión de las hojas directamente, o de la siembra de ésta en malta, después de incubación 24-48 h, a 25 °C.

En las colonias aparecidas siguieron dominando las de mohos, levaduras-moho y bacterias. Las de levadura acusaron una proporción de un 6 % del total. Conservadas durante el mes de agosto en cámara frigorífica para su posterior clasificación, no pudo realizarse por avería de aquélla, que estropeó los cultivos.

Entre las colonias de levadura-moho, se acusó la siempre dominante *Pullularia pullulans* y también colonias de *Geotrichum* en un 1,5 %. Otras cepas de primeros de julio acusaron un 94 % de colonias de bacterias y un 6 % de levadura, en las que figuraban un 3 % de *Rhodotorula*, unas de color rosa vivo y otras más pálidas, el 3 % restante fueron clasificadas como *Candida*.

En muestras de días sucesivos, siguen escaseando las levaduras; la última muestra tomada en esta época fue el 22 de julio, en la que se observaron formas de levadura redondeada y francamente esporulada (perdidas).

Dada la temperatura ambiente de esta época, se comprende que sea principalmente soportada por levaduras esporuladas.

Muestra núm. VII

A mediados de septiembre se hizo una nueva recogida de hojas y observaciones del agua de infusión, tomando de posos de centrifugación de la misma. Acusó presencia de numerosas formas de levadura, redondas,

elípticas, algunas con corpúsculos que parecían esporas, también formas típicas series de *Schizosaccharomyces* y pululando entre ellas numerosas bacterias.

En los aislamientos en agar de malta, dominan las colonias de levadura-moho, rosa-negruzcas (de *Pullularia*) y otras color crema, de células con formas alargadas, ricas en corpúsculos grasos.

Muestra núm. VIII

Nueva aparición de levadura apiculada. Ya el día 24 de septiembre, con los frutos de la cepa ya casi maduros, se cosechó nuevo lote de hojas, se hizo la infusión en agua estéril y del poso de centrifugado de la misma, se sembró en agua de malta. A las 24 h, el líquido se enturbió e inició fermentación. La observación al microscopio acusó abundante número de *levaduras apiculadas*.

Con ello se cerró el ciclo y se puso de manifiesto la posibilidad de resistencia de estas débiles levaduras, que no es inverosímil que las permita mantenerse en el medio ambiente, sin necesidad de estar sobre frutos maduros o jugos de flores, como se ha supuesto pasan el año.

Su desaparición durante unos meses puede explicarse por ser más difícil encontrarlas debido a evidente desaparición de gran parte de ellas.

Ensayos en el laboratorio de su resistencia a medio adverso. Como ya se comunicó en el año 1966, se pudo comprobar que siembras de cultivo de levaduras *Kloeckera apiculata* en placas de yeso —la que era humedecida en el momento de la siembra, para depositar más fácilmente el trocito de masa de levadura, tomado con la aguja de siembra de cultivo desarrollada en estría, sobre agar de malta— en días sucesivos fue quedando la placa de yeso completamente seca, y la siembra de levadura con aspecto de laminilla adherida a la superficie, completamente seca y algunas aún de no mal aspecto. Al microscopio se acusaban muy adelgazadas las apiculadas. Pasados 40-50 días, y en nuevos ensayos más de 8 meses, al sembrar un trocito de la lámina de levadura seca tomada del yeso, en extracto de malta, se acusó enturbiamiento y comienzo de fermentación a los 3-4 días de este rejuvenecimiento, presentando al microscopio el aspecto de células típicas apiculadas (F_2).

Para confirmar lo observado de resistencia sin esporas ni formas durables al medio externo ingrato, se ensayaron también siembras de otras

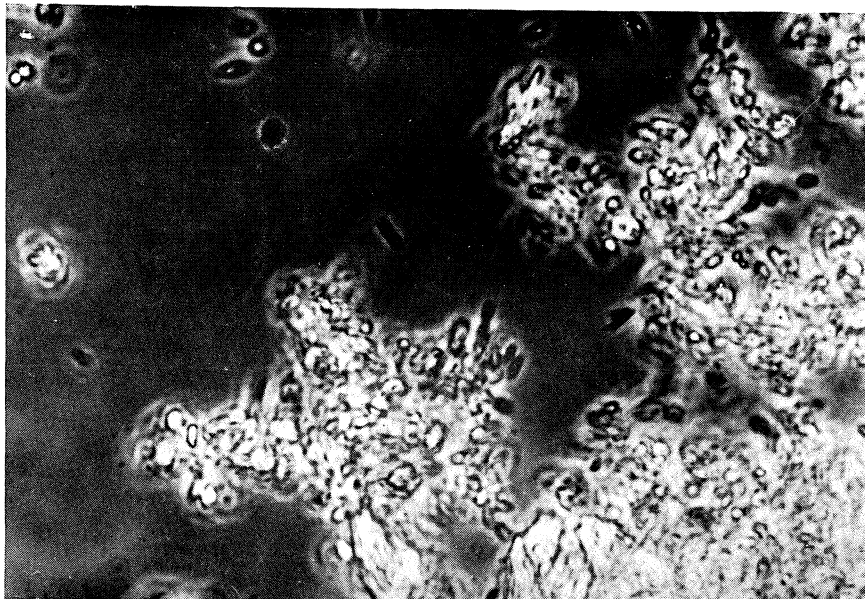


Figura 1. Kloeckera apiculata en yeso, después de 10 meses de sembrada. Se aprecian partículas de yeso aprisionando típicas células epiculadas, y algunas sueltas. $\times 1.500$

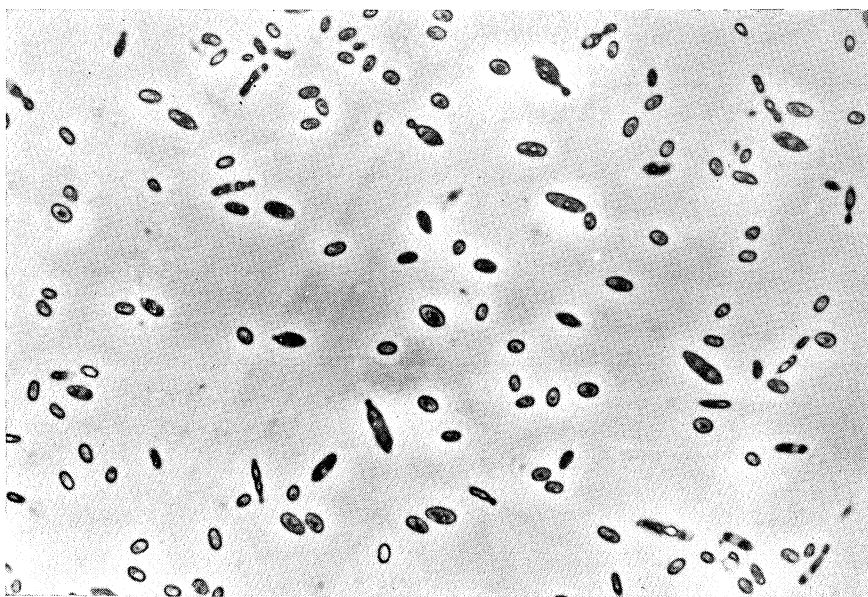


Figura 2. K. apiculata rejuvenecida en malta y procedente de placa de yeso de 10 meses. Las células nacidas en malta son de tamaño inferior a las iniciales jóvenes de las que se sembró el yeso. $\times 1.500$

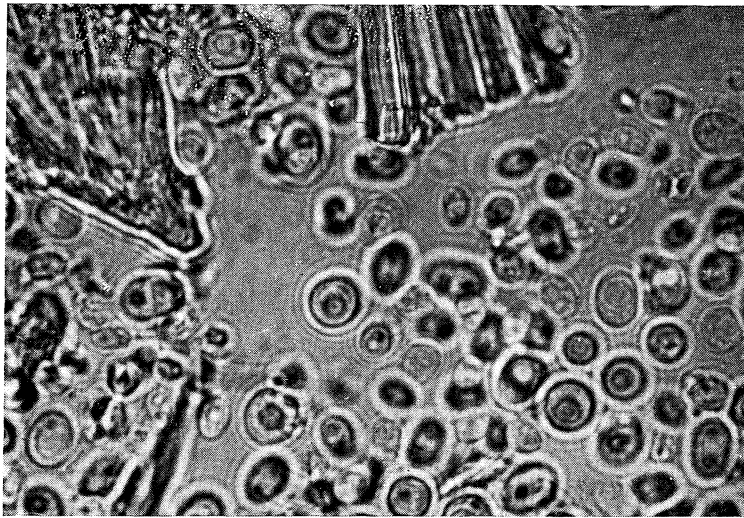


Figura 3. Candida pulcherrima de placa de yeso después de un año de siembra. Se aprecian cristales del yeso, y las células de levadura, con el corpúsculo graso característico. $\times 1.500$

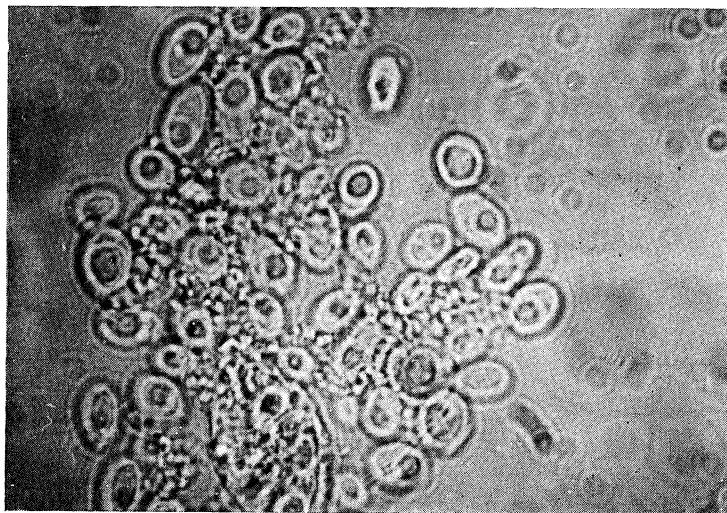


Figura 4. Células de C. pulcherrima procedentes de la siembra en yeso de un año, rejuvenecidas en malta, en donde acusó franco desarrollo, pero el tamaño de las células es menor que el de las que se sembraron inicialmente en yeso. $\times 1.500$

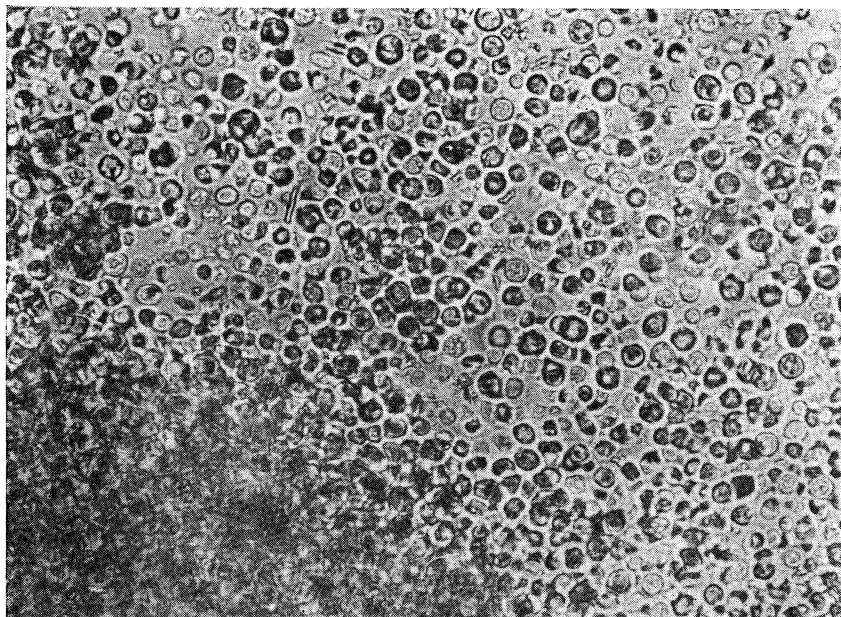


Figura 5. Torula aeris (M y F) en yeso, a los 6 meses de sembrada. Se aprecian masas de yeso con levaduras y levaduras sueltas de aspecto seco. $\times 1.000$

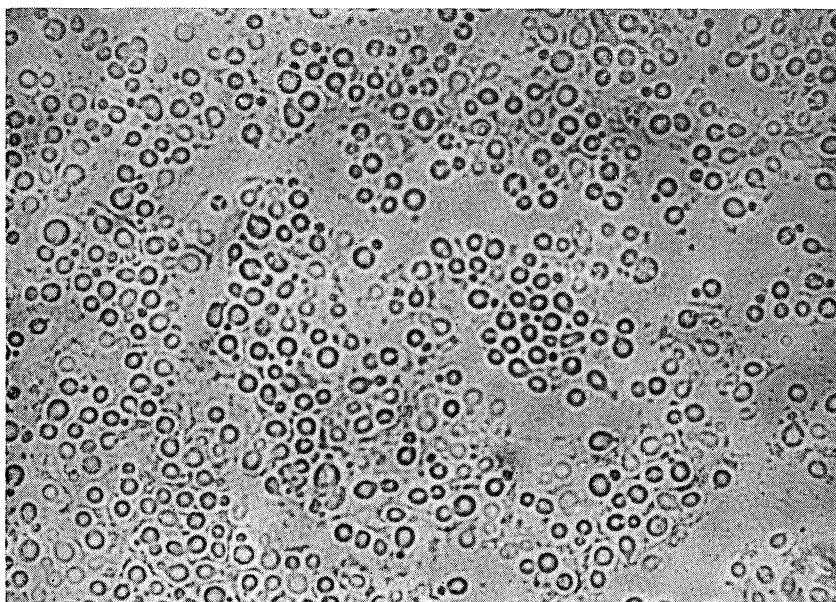


Figura 6. T. aeris (M y F). Células de yeso de 6 meses de siembra y rejuvenecidas en malta. Acusó franco desarrollo, pero el tamaño es inferior a las de la siembra inicial en yeso. $\times 1.000$

levaduras no esporógenas de los géneros *Rhodotorula*, *Candida* y *Torulopsis*.

Pasado el mismo tiempo en placa de yeso, revivieron también en el extracto de malta.

Todo lo observado acusa una rara resistencia que no se sospechaba en levaduras no esporógenas y sin formas durables. No nos hemos decidido a su publicación hasta haber realizado comprobaciones que parecen evidentes y que interesa continuar ensayando con mayor número de géneros y especies.

DISCUSION

Por los resultados obtenidos, se ha podido comprobar que en días lejanos de la vendimia en los que ya no pudo existir restos de fruto, sino que también las hojas que quedan estaban secas, pudieron aislarse levaduras no esporógenas y entre ellas se señalan como de más interés las de *Kloeckera apiculata*, que además de no esporógenas son las menos resistentes a condiciones adversas de medio.

Por la importancia de esta observación, como se indicó anteriormente, ya se hizo una comunicación de la misma con los resultados del estudio de la "flora" resistente a las condiciones adversas que supone el aislamiento de cepas de levaduras de hojas ya completamente seca, hasta los primeros días de noviembre.

La comprobación en el laboratorio de varias de las cepas aisladas y clasificadas como anascosporógenas, de una resistencia a condiciones adversas de medio, ha sido realizada con las siembras en placas de yeso, sin ninguna materia alimenticia, pudiendo comprobar después de varios meses, que la laminilla seca que se desprendió del yeso, germinaba y se desarrollaba nuevamente, en extracto de malta, poniendo de manifiesto su vitalidad conservada.

Para asegurar que no hubo contaminación, se sometió a nueva clasificación, tomando muestras de la laminilla desarrollada en la malta.

Con todo lo expuesto, se hace suponer la conservación en medio ambiente, en el suelo, en troncos, etc., de alguna de las levaduras no esporógenas, que luego se encuentra presente en el momento de la madurez del fruto.

AGRADECIMIENTO

A la Sta. Ramona de la Vega y a D. José Luis Marcilla, por su eficaz ayuda.

RESUMEN

Se ha podido comprobar la presencia de levaduras vivas y no esporógenas, en siembras procedentes de hojas de la vid, tomadas en diferentes fases de éstas, hasta la de práctica sequedad. Como comprobación de esta resistencia de levadura no esporógena, se repitió su siembra en placas de yeso, acusando varias de ellas vitalidad después de más de 8 meses (*).

SUMMARY

Observations relatives to the existence of "flora" of the asporogenous yeasts, resistant to the adverses conditions of the ambient

Living cells of non sporogenic yeasts were found in grape-vine leaves. Samples taken at various leaves stages, including dryness, were cultivated in appropriated media. Control of this yeast resistance was again proved in solid gypsum media, where survience of cultures remained after 8 months.

BIBLIOGRAFIA

1. CASTELLI, T. 1953. Gli agenti della fermentazione vinaria de la Sicilia occidentale. Pubbl. Centr. Reg. Sper. Ind. Enol. Marsala, núm. 4.
2. CASTELLI, T., e IÑIGO, B. 1958. Los agentes de la fermentación vinícola en la región manchega y zonas limítrofes. Cuad. Ferment. Ind., núm. 13.
3. DOMERQ, S. 1956. Etude et classifications des levures du vine de la Gironde. Thèse doctoral, Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux.
4. FEDUCHY, E. 1966. Observaciones relativas a los procedimientos y técnicas seguidas en el estudio de la "flora" de levaduras vínicas de localidades españolas. Microbiol. Españ., 19, 131-71.

(*) El estudio de levaduras aludidas, como no esporógenas y nacidas de placas de yeso después de varios meses, será objeto de una publicación posterior.

5. FEDUCHY, E. 1966. Posibilidad de conservación de levaduras apiculadas (género *Kloeckera*) en condiciones adversas de medio ambiente (comunicación previa). Microbiol. Españ., 19, 69-74.
6. FEDUCHY, E., y SANDOVAL, J. A. 1960. Contribución al estudio de los vinos típicos españoles, y de la "flora" de levaduras con ellos relacionada. Cuad. Inst. Nac. Invest. Agron., núm. 297.
7. GUILLERMOND, A. 1912. Les Levures.
8. PEYNAUD, E., et DOMERQ, S. 1953. Etudes des levures de la Gironde. Ann. Inst. Nat. Rech. Agron., 4, 265-300.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA DE INFECCIONES BACTERIANAS

VARIACIONES EN LA BETA-LACTAMA- RESISTENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS* Y *PESUDOMONAS* CULTIVADOS EN QUIMOSTATO

por

V. CAMPOS, R. CORRIPIO y A. PORTOLÉS

INTRODUCCION

De acuerdo con el hecho de que la actividad inhibitoria de la síntesis de pared celular resulta condicionada a la posibilidad de división bacteriana, hemos encontrado incrementos de sensibilidad a la penicilina en *Staphylococcus aureus*, que eran paralelos a su tasa de multiplicación (2). También en sentido inverso, en *Bacillus subtilis*, cuyo ciclo de división resultaba prolongado por haber entrado en estado de competencia transformante, se han observado definitivos aumentos de resistencia a la penicilina, tanto en cultivos ordinarios (6) como sobre quimostato (5).

En relación con la producción de 3-5-2-6-penicilin-amido-beta-lactam-hidrolasa, molécula responsable de esta acción antagonista frente a la penicilina, ya habíamos comprobado algunas variaciones que parecían depender del tiempo de duplicación (TD), tanto en *Staphylococcus aureus* (3), como en *Pseudomonas aeruginosa* (8); en los resultados obtenidos, se encontraron algunos datos que merecían un estudio más detenido y sistemático entre estas dos bacterias, tan diversas en sus características y comportamientos microbiológicos.

En el presente trabajo se estudian comparativamente las variaciones de resistencia a la penicilina de estafilococos y *Pseudomonas* en la fase exponencial de crecimiento, controlando además la influencia que la constante de multiplicación bacteriana tiene en las oscilaciones de concentración mínima inhibidora (CMI) y en las variaciones de producción enzimática, origen de esta resistencia a los antibióticos.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias

Para este estudio se emplearon un total de 66 estirpes penicilinasas-positivas: 37 de *Staphylococcus aureus* coagulasa-positivos y 29 de *Ps. aeruginosa* altamente productoras de oxifeniloxazonas. Todas las estirpes fueron aisladas de procesos infecciosos, no conociéndose el tratamiento antibiótico previo a que las bacterias fueron sometidas. Además se utilizaron como control dos estirpes de *St. albus* penicilinasas-negativas.

Antibióticos e inductores de amidasas

Se utilizaron los antibióticos siguientes: penicilina G, ampicilina y cefalotina. Como sustrato inductor de penicilin-hidrolasas (3-5-1-11-penicilin-amido-hidrolasa) se empleó acetamida sódica. Para el estudio de los antibiotipos se utilizaron además: tetraciclina, estreptomina, kanamicina, eritromicina, oleandomicina, polimixina y gentamicina.

Medios de cultivo

Las bacterias se aislaron sobre placas de agar-sangre y se mantuvieron sobre tubos inclinados de agar común. Para las determinaciones de CMI se utilizó medio penassay, de Difco, a pH 6,8. El medio de cultivo para la experiencia en quimostato contenía 0,2 % de glucosa como factor limitante. En los casos que era requerido se añadían concentraciones del 0,2 % de acetamida como inductor.

Técnicas

Con independencia de las propiamente bacteriológicas de aislamiento, identificación y mantenimiento de los cultivos, que se efectuaron según

los métodos habituales, la determinación de la CMI se realizó en medio líquido, en presencia de resazurina (7), a partir de inóculos directamente obtenidos del quimostato y sobre una concentración bacteriana del orden de 10^5 células/ml.

Para cultivo continuo utilizamos un sistema de quimostato simple semejante al de Rosenberg y Elsdén (9) y otro modificado, con doble quimostato, que fue usado para las experiencias con acetamida. Para este cultivo continuo se emplearon quimostatos con un volumen de trabajo de 250 y 500 ml para las experiencias en que no se modificaba el TD entre ambos, mientras que cuando se querían conseguir TD muy lentos se usaban quimostatos con capacidad 10 veces superior al primero.

La determinación de penicilinasa en placa fue realizada por el método de Foley y Perret (4) y su determinación cuantitativa por un método yodométrico normalmente usado en el laboratorio (2). La producción de amidasas fue valorada por la técnica de Birnbaum (1), expresándose en microgramos de NH_3 /ml de células.

RESULTADOS

En primer lugar, mediante las pruebas bacteriológicas y por la determinación de la CMI frente a distintos antibióticos, se establecieron grupos bacterianos de acuerdo con su antibiotipo. Así se distinguieron bacterias con elevada resistencia polivalente a los antibióticos, y otros dos grupos en que además de su acusada resistencia a la penicilina se caracterizaban por su resistencia incrementada al grupo de los macrólidos o al de los oligosacáridos.

1. Variaciones de CMI frente a la penicilina

Seleccionando una estirpe de cada grupo, se estudian las variaciones de resistencia a la penicilina condicionadas por el tiempo de duplicación de las bacterias cultivadas en quimostato. En la *figura 1* se indican valores medios obtenidos en las tres series de experiencias efectuadas para estafilococos y *Pseudomonas*.

Dentro de cada especie no se observan variaciones atribuibles a diferencias por antibiotipo. En las experiencias de control efectuadas sobre *Staphylococcus* sensibles a la penicilina, no observamos variaciones significativas condicionadas por la constante de multiplicación.

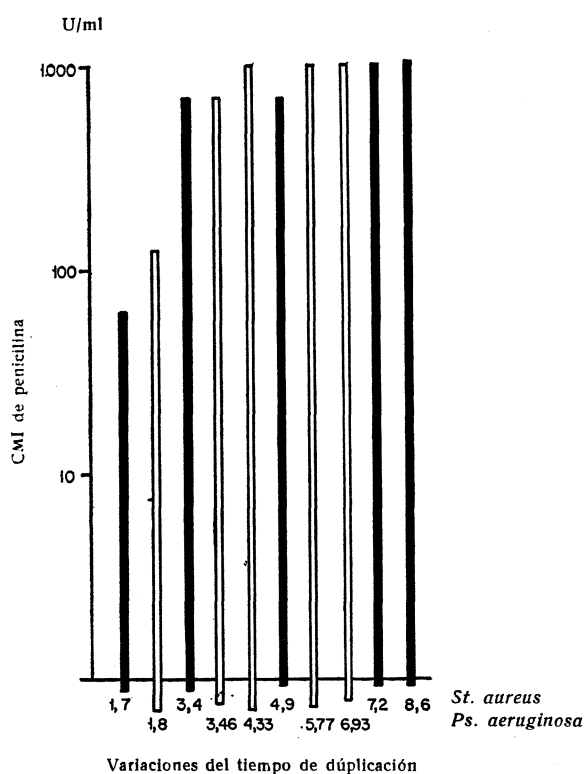


Figura 1. Variaciones en los niveles de CMI frente a penicilina en *Staphylococcus* y *Pseudomonas* en función del TD

2. Variaciones en la producción de penicilinas

En primer lugar se estudian las variaciones de actividad penicilínica en el medio sin penicilina, para distintos tiempos de duplicación, determinándolos después de 8 generaciones en cada paso, que es cuanto se suponía el cultivo estabilizado. Los resultados obtenidos aparecen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Variaciones en la actividad enzimática de *Staphylococcus* y *Pseudomonas* a distintos TD, en ausencia de penicilina en el medio

Bacterias	Tiempos de duplicación			
	1,5	3,5	5,5	7,5
<i>St. aureus</i>	87	75	75	64
<i>Ps. aeruginosa</i>	230	217	212	200

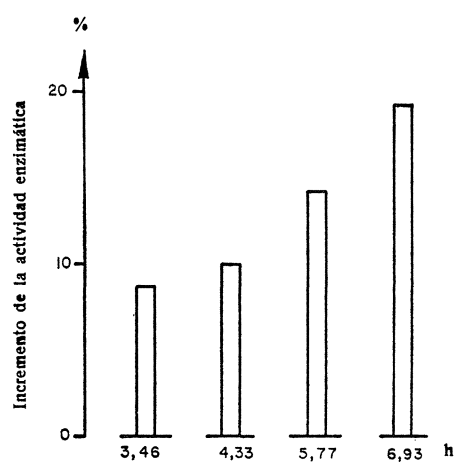
3. Variaciones en la producción de amidasa

Interesados por conocer las variaciones en la producción de amidasas y la influencia que ello puede tener en la resistencia frente a distintos antibióticos beta-lactámicos, se han realizado experiencias con *Pseudomonas*, cultivándolos en un sistema continuo de doble quimostato, sobre el que la bacteria crecía con el mismo TD, pero era sometida a la inducción enzimática, en el segundo quimostato, con 0,2 % de acetamida. Los resultados que se indican en el *cuadro 2* dan idea de la influencia que el TD, en presencia y ausencia de acetamida, tiene para la hidrólisis enzimática, de tres distintos antibióticos beta-lactámicos.

Por otra parte, con vistas a la producción continua de amidasas, se ha estudiado la capacidad de adaptación en este sistema de doble quimostato, pero modificando los tiempos de duplicación de 3 a 7 h (en el quimostato productor de biomasa), hasta un tiempo de duplicación tan lento como de 18,4 h, en un segundo quimostato que contenía 0,2 % de acetamida. Los resultados obtenidos se expresan en la *figura 2*.

DISCUSION

Al examinar las variaciones de CMI, a partir de inóculos tomados del quimostato con diferentes TD, se pudo comprobar que la sensibilidad a la penicilina es mayor para las bacterias cuya multiplicación era más activa (TD $\approx$ 1,75 h en la *figura 1*). Las diferencias parecen producirse como resultado de la interacción bacteria-antibiótico, durante las primeras horas del ensayo de sensibilidad (período equivalente a 2 ó 3 genera-



TD iniciales en el primer quimostato (sin acetamida)

Figura 2. Variaciones en la actividad amidásica (μg de NH_3/mg celular) cuando se aumenta el TD hasta 18,4 h en el segundo quimostato (con acetamida)

Cuadro 2. Variaciones en la actividad amidásica frente a distintos substratos, de *Ps. aeruginosa*, cultivados en un sistema de doble quimostato con y sin acetamida como inductor

Procedencia de las bacterias	Tiempos de duplicación				Actividad hidrolítica medida frente a
	6,93	5,77	4,33	3,46	
Primer quimostato sin acetamida como inductor	23	50	62	83	Acetamida
	217	183	130	107	Penicilina
	650	350	330	193	Ampicilina
	465	383	285	283	Cefalotina
Segundo quimostato con 2 g/l de acetamida como inductor	68	305	370	387	Acetamida
	183	170	115	95	Penicilina
	680	407	410	287	Ampicilina
	395	297	255	257	Cefalotina

ciones) antes de que se produzca la estabilización del TD en las nuevas condiciones de cultivo normal en tubos. En el fenómeno no influye el antibiotipo o grado de resistencia a otros antibióticos distintos de los beta-lactámicos; así, en los *Staphylococcus* sensibles a la penicilina, las variaciones condicionadas por la constante de multiplicación apenas tienen interés, haciéndose algo más patentes las diferencias para los TD más elevados.

Cuando las modificaciones de la resistencia a la penicilina, en función del TD, se estudian en relación con las diferencias de concentración enzimática intracelular (*cuadro 1*), las variaciones de nivel enzimático de penicilinasas son muy pequeñas, aunque parece observarse una tendencia de signo inverso a la encontrada en los resultados anteriores; así, las concentraciones intracelulares de beta-lactamasa para TD de 1,5 h, resultan ligeramente más elevadas que para los de 7,5 h en ambos tipos de bacterias. Esto podría interpretarse según señalábamos en ocasiones precedentes (8), como si la enzima intracelular estuviera en una forma precursora, que es algo distinta a la que se encuentra extracelularmente y que esta diferencia se acusa en su capacidad para iniciar la reacción hidrolítica.

Cuando el proceso se estudia en presencia del antibiótico (*figura 2*) los resultados varían, debido a que se trata de un tipo de enzima intracelular modificada por el inductor y que es igual al extracelular, originado por poblaciones bacterianas perfectamente resistentes a las dosis antibióticas que existen en el medio. En estos casos, una vez estabilizado el cultivo y la producción de la enzima después de 20 generaciones, parece que existe un máximo para un TD determinado, que es distinto para cada bacteria.

En cuanto a la influencia que la producción de amidasa (inducida por acetamida) podría tener en la resistencia de *Pseudomonas* frente a algunos antibióticos beta-lactámicos (*cuadro 2*), vemos que es prácticamente nula en el caso de penicilina y cefalotina, pero con cierta influencia para la ampicilina. Si comparamos los resultados obtenidos al pasar de un primer quimostato, donde las bacterias crecen en un medio normal, al segundo, conteniendo una molécula capaz de inducir la producción de amidasa sin modificar los TD, vemos que la actividad hidrolítica específica de los extractos celulares para la acetamida aumenta de 3 a 6 veces, dependiendo del TD; si se mide esta actividad frente a los tres antibióticos que se consideran, resulta nula para penicilina y cefalotina, mientras que se observan incrementos variables, frente a la ampicilina, según los TD.

Al resumir de un modo tabulado estas variaciones, nos encontramos con resultados que se recogen en el *cuadro 3*.

Cuadro 3

Medidos sobre	Incrementos de actividad enzimática hidrolítica para TD de			
	3,46	4,33	5,77	6,93
Acetamida	4,60	5,90	6,10	2,900
Ampicilina	0,48	0,21	0,16	0,046

Como puede verse, también esta actividad específica cuando se mide sobre el sustrato inductor, tiene un máximo para un TD determinado, mientras que si esta acción hidrolítica se mide sobre otra molécula no se observa este efecto.

La influencia del TD en esta capacidad de adaptación se pone claramente de manifiesto cuando se modifican rápidamente las condiciones de multiplicación celular. En la *figura 2* se observa que pasando de TD de 3 a 7 h (en el primer quimostato) a un TD mucho más lento (18,4 h), los incrementos van siendo proporcionalmente mayores a medida que es menor la diferencia entre las velocidades de multiplicación de ambos quimostatos. Esto parece demostrar que en la producción enzimática mediante cultivo continuo simple sería aconsejable empezar por TD rápidos, en los que se seleccionarían individuos hiperactivos, e ir disminuyendo lentamente el flujo del medio hasta llegar a TD largos, en los que se obtengan los máximos de actividad enzimática.

RESUMEN

Sobre sistemas de cultivo continuo con uno y dos quimostatos se estudian las variaciones de CMI frente a penicilina y la producción de enzimas beta-lactama-hidrolíticas, comprobando la influencia que el TD tiene en el fenómeno.

En cuanto a la actividad enzimática, se observa un máximo de producción para un TD determinado, que es de 1,5 h para ambas bacterias.

La actividad amidásica, por sí sola, no parece tener influencia en la resistencia a penicilina y cefalotina, aunque se observan ligeros incrementos en la acción hidrolítica frente a la ampicilina. La actividad específica frente a acetamida es tanto mayor cuanto menor es la diferencia existente entre el TD a que se produce la biomasa y el TD en el que se mantiene sobre el sustrato inductor.

SUMMARY

Variations in the beta-lactame resistance of Staphylococcus and Pseudomonas species growing in a chemostat

On a continuous culture device with one and two chemostates, beta-lactame resistance levels as well as the production of their specific enzymes were studied.

A marked influence of the different doubling times used in the experiments was observed and a maximum of enzymatic activity against the antibiotics appeared at 1.5 h DT.

When the amidase activity was only considered, any influence for the penicillin and cephalotine inactivation did not appear although some increasing in the hydrolytic activity against ampicillin was observed.

The specific activity, against acetamide molecule increased parallelly to the differences between the TD of the first biomass producer and TD where the substrate was acting as an inducer.

BIBLIOGRAFIA

1. BIRNBAUM, S. M. 1955. *Methods Enzymol*, II, 397-400.
2. CAMPOS, V. 1968. Estudio de la producción de beta-lactamasa estafilocócica en función de la modalidad del cultivo. Tesis doctoral, Universidad de Madrid.
3. CAMPOS, V.; PORTOLÉS, A., e HIDALGO, A. 1968. *Rev. Clin. Españ.*, 111, 259-62.
4. FOLEY, J. M., and PERRET, J. C. 1962. *Nature*, 195, 287-88.
5. LÓPEZ, R.; PÉREZ-UREÑA, M. T.; ESPINOSA, M., and PORTOLÉS, A. 1972. *Arch. Mikrobiol.*, 82, 206-12.
6. NESTER, E. W. 1964. *J. Bacteriol.*, 87, 867-75.
7. PORTOLÉS, A. 1960. *Laboratorio*, 29, 21-30.
8. PORTOLÉS, A., y CORRIPIO, R. 1972. *Antibiot. Quimiot.*, II, 21-22.
9. ROSEMBERG, R. F., and ELSDEN, S. R. 1960. *J. Gen. Microbiol.*, 22, 726-39.

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
CLINICA «PUERTA DE HIERRO», DE LA SEGURIDAD SOCIAL. MADRID
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA

CONSERVACION DE BACTERIOFAGOS DE ESTAFILOCOCO

por

E. J. PEREA y M. V. BOROBIO

INTRODUCCION

Ya en 1926, D'Herelle estudió la acción del aire líquido sobre los bacteriófagos de estafilococo. Con posterioridad, otros autores han experimentado la congelación y liofilización como medio de conservación de estos bacteriófagos.

El uso de bacteriófagos de estafilococos liofilizados para la lisotipia ha sido preconizado por varios autores (4 y 10).

La realización de la lisotipia de estafilococos de una manera continuada presenta el gran inconveniente de la inestabilidad de las soluciones de bacteriófagos por lo que, pasado un corto período de tiempo, el título de bacteriófagos de la solución es inferior al necesario para realizar la lisotipia.

Hemos estudiado la curva de mortalidad a la temperatura de $+ 4^{\circ}\text{C}$ de los distintos bacteriófagos utilizados para la lisotipia de estafilococos y el encontrar que el título descendía rápidamente para algunos de ellos, nos ha llevado a buscar otros métodos de conservación más idóneos.

Describimos en este trabajo un estudio comparativo de la supervivencia bacteriofágica por las técnicas de liofilización y congelación a $- 25^{\circ}\text{C}$ y $- 80^{\circ}\text{C}$ en relación con la conservación a $+ 4^{\circ}\text{C}$. Asimismo, hemos

ensayado el posible papel protector de la lactosa en el proceso de congelación, ya que en la liofilización de las bacterias actúa dando una mayor tasa de supervivencia a concentraciones del 5 al 10 % (5).

A continuación efectuamos la descripción de las técnicas y la exposición de resultados.

CONSERVACION A +4 °C

Material y métodos

Los 23 bacteriófagos que se utilizan para la lisotipia de estafilococo son los usados en este estudio y que podemos clasificarlos, bien basándonos en su espectro lítico o en grupos serológicos (15), de la siguiente forma:

Grupos líticos

- I. 29, 52, 52A, 79, 80.
- II. 3A, 3C, 55, 71.
- III. 6, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84 y 1.380.
- IV. 42D.
- V o inclasificables. 187, 81.

Grupos serológicos

- A. 3A, 3C, 6, 42E, 47, 54, 75, 81.
- B. 29, 52, 52A, 53, 55, 71, 79, 80, 83A, 85.
- F. 42D, 77, 84.
- L. 187.

Hemos empleado las siguientes técnicas (1 y 14): la multiplicación de estos bacteriófagos sobre sus cepas propagadoras ha sido realizada en superficie, en medio N. B. de Difco, con agar al 14 % y cloruro sódico al 0,5 %, con pH final de 6,8. Los bacteriófagos son suspendidos en ese mismo medio sin agar. Utilizamos timol para mantener la pureza de las suspensiones. Las titulaciones las realizamos en superficie, utilizando para las diluciones pipetas graduadas de 0,2 ml.

Resultados

El estudio de la curva de mortalidad de los bacteriófagos mantenidos a $+4^{\circ}\text{C}$ nos pone de manifiesto que las soluciones, que en general tenían de 10^8 a 10^{10} bacteriófagos/ml, después de 10 semanas, su título descendió a 10^2 bacteriófagos/ml, por término medio. Los valores extremos encontrados corresponden a los bacteriófagos: 47, 71 y 81, que llegaron a dicho título (10^2 bacteriófagos/ml) al cabo de 16 semanas, y la muerte más rápida la registraron los bacteriófagos: 42D, 75 y 77, que alcanzaron ese título en sólo 6 semanas.

Observamos que un descenso del pH por debajo de 6,5 acelera la muerte de los bacteriófagos.

Con el medio N.B. núm. 2, de Oxoid, obtenemos resultados algo inferiores a los antes descritos.

En la actualidad, nuestro trabajo se centra en el estudio de la conservación de los bacteriófagos a esa temperatura, pero utilizando para suspenderlos el medio P. M. (12), que ha dado excelentes resultados en la conservación de bacteriófagos de *Pseudomonas putida* (18) y cuya fórmula es la siguiente:

CINa	8,7 g
Gelatina	20 mg
1M SO_4Mg	1 ml
0,5M Cl_2Ca	2 ml
1M tris a pH 7	10 ml
Agua destilada, c. s. p.	1.000 ml

CONGELACION

Hemos elegido las temperaturas de congelación de -24°C y -80°C por ser ambas inferiores al punto eutéctico del cloruro sódico (-20°C) para evitar así que queden cavidades con soluciones concentradas entre los cristales formados por el agua al congelarse. Estas soluciones hipertónicas también cristalizan a temperaturas más bajas, evitándose así estas altas concentraciones que, junto a los cristales formados, dañan a los bacteriófagos (3).

La inactivación de los bacteriófagos durante la congelación se puede

producir de dos formas (13): inactivación, con liberación de su material genético (ADN en el caso de los bacteriófagos estafilocócicos). Este tipo de inactivación es la que se produce al descongelar rápidamente las soluciones de bacteriófagos, rompiéndose éstos por choque osmótico. Se han aislado (7) mutantes resistentes al choque osmótico (OS) cuya mutación está localizada en el gen 24 del mapa genético del bacteriófago T₄. El otro tipo de inactivación se hace sin liberación de material genético y es posible que ésta sea debida a una destrucción de la capacidad de fijación del bacteriófago, como se ha visto por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio con el bacteriófago T₃ (21).

La destrucción de los bacteriófagos se produce, si los descongelamos lentamente, a temperaturas entre —10 °C y —20 °C, estando en relación con la temperatura eutéctica del medio en que están suspendidos (17).

Es conocida la utilidad de la adición de glicerol, dimetilsulfóxido y proteínas para la congelación, ya que estas sustancias, al aumentar la heterogeneidad química del sistema, facilitan la solidificación amorfa y vítreo más que la cristalización, evitándose con ello la formación de cristales y la concentración de sales.

Campbell-Renton (2), en un detallado estudio, encontró que la adición a las suspensiones de bacteriófagos de peptona, suero de carnero, goma acacia y caldo nutritivo tenían un efecto protector para la supervivencia, mientras que el cloruro sódico, a determinadas concentraciones, tiene efecto deletéreo. Este autor demuestra que la supervivencia en congelación y liofilización es diferente para cada clase de bacteriófagos, estableciendo que puede ser un criterio suplementario de clasificación su sensibilidad a la liofilización y congelación.

Hemos añadido lactosa a una concentración del 10 % para ver si esta sustancia puede ejercer una función protectora en el proceso de congelación (11 y 20).

Material y métodos

Se han empleado las técnicas antes mencionadas, siendo recogidos los bacteriófagos en N.B. y N.B. adicionado de lactosa al 10 %, ambos con pH 6,8.

Se comprobó que la adición de este disacárido no ejercía efecto deletéreo sobre los bacteriófagos.

Siempre hemos utilizado suspensiones de bacteriófagos muy jóvenes, obtenidas en reciente multiplicación, pues, como ya D'Herelle puso de manifiesto, los bacteriófagos estafilocócicos envejecidos son destruidos por la congelación, mientras que los jóvenes sobreviven a ella.

Una vez determinado el número de partículas bacteriofágicas/ml de las dos suspensiones, en N.B. con y sin lactosa, se tomaron 8 muestras de 0,5 ml de cada una de ellas y se pusieron en hubos de hemólisis Pyrex; 4 tubos de cada una de las suspensiones se congelaron a -25°C , en un congelador Kelvinator, S. A., y las 8 restantes, a -80°C , en un congelador Cooling, S. A.

Al cabo de 6 meses, aproximadamente, fueron descongeladas las muestras, agitando en baño María a 37°C , determinándose inmediatamente el título de todas ellas.

LIOFILIZACION

Hay dos tipos esenciales de liofilización: en uno se encuentra el producto a liofilizar a la temperatura ambiente y el equilibrio térmico se establece entre el frío producido por la evaporación del líquido y el calor de la habitación.

En el otro método, el producto a liofilizar se mantiene en un recipiente de temperatura controlable, en el que se ejerce el vacío. La evaporación se controla por el calentamiento progresivo de este recinto, que al principio está enfriado.

Nosotros hemos utilizado este segundo sistema para la liofilización de los bacteriófagos estafilocócicos.

Shade y Caroline (16) encuentran en la liofilización de bacteriófagos que la inactivación de éstos se produce en el momento de la desecación, no influyendo la congelación inicial en la muerte de los bacteriófagos. También demuestran que las variaciones del pH no intervienen en la supervivencia y que el cloruro sódico, en concentraciones que van del 0,18 al 1,46 %, tienen un efecto indiferente. Igualmente, la adición de gelatina, lactosa, peptona y goma acacia tampoco tienen efecto protector.

También hemos de tener en cuenta el papel que desempeña la temperatura, el pH, la composición y el volumen de la solución empleada en la rehidratación, ya que puede reducirse la letalidad de la regeneración con la elección adecuada de estas condiciones. Las lesiones que se producen en

el bacteriófago T₂ durante la rehidratación, se localizan en el aparato de fijación del bacteriófago (6), mientras que las producidas en la crío-desecación afectarían a la cápside, esencialmente, y las podríamos denominar lesiones primarias (19).

Técnica

Para la liofilización hemos empleado sucesivamente dos aparatos fabricados, uno, por Alto Vacío, S. L., y otro, por Terruzzi, S. A. Con ambos hemos obtenido resultados similares.

Cada bacteriófago suspendido en N.B. se distribuye en 4 tubos, a razón de 0,5 ml en cada uno de ellos. Son congelados rápidamente por inmersión en una mezcla de alcohol y nieve carbónica, durante 10 min. Esta mezcla produce una temperatura de -70°C .

A continuación se ponen los tubos en la cámara de liofilización.

Las características de la operación de liofilización con estas máquinas han sido: temperatura en la platina del criostato o del producto a liofilizar, a -30°C , y temperatura de la cámara de condensación, de unos -50°C . El vacío ha sido aproximadamente de 60μ de mercurio. La liofilización la hemos realizado en 48-72 h.

Al final del proceso de liofilización, producimos un calentamiento lento de la platina del criostato hasta la temperatura ambiente, para conseguir así eliminar los restos de humedad que quedan en el liofilizado.

En general, la primera parte de la liofilización se debe hacer a -25°C y en la fase terminal llega a 30°C . Lo esencial es el paso de 0° a 4°C , que debe hacerse sólo cuando no quede agua para descongelarse (11).

Los tubos con el liofilizado se llenan, previo vacío, con nitrógeno seco filtrado por un filtro millipore, se cierran con un tapón de goma y se lacran con epiceína.

Hemos conservado los liofilizados a una temperatura constante de 20°C , temperatura ambiente del hospital.

La regeneración la hemos realizado con suero salino, en cantidad suficiente hasta completar el volumen inicial de N.B.

Los tiempos en que se ha hecho la regeneración han sido 8 meses y 2 años, aproximadamente, después de haber sido liofilizados.

En los 23 bacteriófagos utilizados se estudió el espectro lítico después de regenerados y descongelados respectivamente, observando las lisis producidas por cada uno de ellos sobre todas las cepas propagadoras,

para poner de manifiesto las posibles alteraciones sufridas, tanto en el curso de congelación como de la liofilización y que hubieran afectado a su especificidad de lisis (1).

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA LIOFILIZACION Y CONGELACION

Expresamos el descenso sufrido en la solución de bacteriófagos original por el número de unidades que descendió su exponente (*cuadro 1*). Así, el bacteriófago 29, que tenía un título de 1×10^9 bacteriófagos/ml y que después de la liofilización descendió a 1×10^4 , lo representamos por 5, que es el descenso del exponente.

El cero no significa que la solución no modificara el título de bacteriófagos/ml, sino que el descenso sufrido no llegó a ser una unidad del exponente. En todos los casos hemos tomado los valores medios de las 4 muestras.

DISCUSION

En la conservación a $+4^\circ\text{C}$ nuestros resultados no coinciden plenamente con los de otros autores (1) que han observado cómo las diluciones para lisotipia sólo mostraban un descenso significativo al cabo de 4 ó 6 semanas, mientras que en nuestra experiencia encontramos que son utilizables para lisotipia durante 2 ó 3 semanas, a lo sumo.

Si exceptuamos los bacteriófagos 47 y 84, que sufren una reducción similar en su título, tanto en congelación como en liofilización, el resto de ellos muestra una menor tasa de mortalidad en congelación. Dentro de esta última, el comportamiento varía en relación con la temperatura utilizada.

Así, a -25°C encontramos siempre una mortalidad superior que a -80°C , exceptuando los bacteriófagos 30, 55, 6, 42E, 53, 54, 83A y 1.380, que demuestran un bajo descenso independientemente de la temperatura empleada. No hallamos efecto protector por parte de la lactosa más que en los bacteriófagos 42D, 52A, 71 y 187.

La congelación a -80°C no muestra diferencias significativas que nos hagan suponer que la lactosa al 10 % ejerza un papel protector.

Cuadro 1

Bacterió- fagos	Liofiliza- ción	Congelación			
		— 25 °C		— 80 °C	
		N.B.	N.B. lac. 10 %	N.B.	N.B. lac. 10 %
<i>Grupo I</i>					
29	5	3	2	2	0
52	5	3	3	1	1
52A	7	3	1	2	1
79	4	5	5	1	1
80	7	2	2	1	1
<i>Grupo II</i>					
3A	5	2	2	1	0
3C	4	0	1	1	1
55	7	2	1	1	1
71	6	3	1	1	2
<i>Grupo III</i>					
6	4	0	1	1	1
42E	4	0	0	0	0
47	2	2	2	2	1
53	3	1	1	1	1
54	4	1	1	1	1
75	4	3	2	2	0
77	4	3	2	1	1
83A	5	1	1	1	1
84	3	3	4	1	2
85	6	2	1	1	1
1.380	5	1	1	0	1
<i>Grupo IV</i>					
42D	3	2	0	0	1
<i>Grupo V</i>					
81	3	4	5	1	1
187	5	4	1	1	1

El comportamiento en la liofilización y congelación de los bacteriófagos no guarda relación con su clasificación serológica, agrupación por espectro lítico, ni requerimiento de calcio (1), pudiendo concluir con Campbell-Renton (2) diciendo que la resistencia de un bacteriófago a la congelación y desecación puede constituir un criterio suplementario para su diferenciación y clasificación.

Los resultados obtenidos al regenerar varias muestras procedentes de una misma liofilización tras 8 meses y 2 años de almacenamiento, respectivamente, nos manifiestan sólo ligeras diferencias en sus títulos, deduciéndose, por tanto, que después de la destrucción inicial debida al proceso de liofilización no sufren una posterior deterioración.

Si el título de la solución a liofilizar es igual o inferior a 1×10^6 bacteriófagos/ml tras el proceso de liofilización no encontraremos supervivientes al regenerar las muestras. Un comportamiento similar hemos observado en la congelación.

Los resultados obtenidos al verificar el espectro lítico de todos los bacteriófagos después de estas operaciones de conservación, no pusieron de manifiesto alteración alguna, manteniéndose constante dicho espectro en todos los casos.

Si bien la congelación a -80°C se ha mostrado más efectiva, la dificultad de disponer de un congelador que alcance esta temperatura hace que la congelación a -25°C pueda ser el método más conveniente en muchos casos.

De lo anteriormente expuesto se deduce que la congelación es un método de más fácil realización y más eficaz que la liofilización para conservar los bacteriófagos de estafilococo. Esto nos permitirá simplificar el empleo continuado de la lisotipia de estafilococo.

RESUMEN

Se describe un estudio comparativo de la conservación de los bacteriófagos de estafilococo utilizados en lisotipia a la temperatura de $+4^\circ\text{C}$, congelación a -25°C y -80°C y liofilización.

Se ensaya el posible protector de la lactosa al 10 % en la congelación.

Se pone de manifiesto la superioridad de la congelación sobre los otros métodos estudiados.

SUMMARY

Conservation of staphylococcal bacteriophages

We describe a comparative study of conservation of staphylococcal bacteriophages used in lysotyping at a temperature of $+4^{\circ}\text{C}$, freezing at -25°C and -80°C , and freeze drying.

We test the possible protector function of 10 % lactose in the freezing.

We show the superiority of freezing over the other studied methods.

BIBLIOGRAFIA

1. BLAIR, J. E., and WILLIAMS, R. E. O. 1961. Bull. W. H. O., 24, 771-84.
2. CAMPBELL-RENTON, M. L. 1941. J. Pathol. Bacteriol., 55, 371-84.
3. DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S., y WOOD, W. B. 1970. Tratado de Microbiología, 346-47. Ealvat Editores, S. A., Barcelona.
4. DOOLEY, E. S. 1961. J. Lab. Clin. Med., 57, 807-12.
5. GREAVES, R. I. N. 1961. En L. REY. Traité de Lyophilisation. Hermann Ed., Paris.
6. LEACH, R. H., and SCOTT, W. 1959. J. Gen. Microbiol., 295-97.
7. LEIBO, S. P., and MAZUR, P. 1969. Virology, 38, 558-66.
8. LEPINE, P. 1935. C. R. Acad. Sci., 201, 172.
9. LEPINE, P. 1961. En L. REY. Traité de Lyophilisation. Hermann Ed., Paris.
10. MORA, E. C., and EISENSTARK, A. 1958. J. Lab. Clin. Med., 21, 802-4.
11. MORENO LÓPEZ, M. Comunicación personal.
12. NIBLACK, A. 1969. Ph. D. Thesis. University of Illinois.
13. PANIGEL, J.; HUPPERT, J., et BARBU, E. 1957. Ann. Inst. Pasteur, 93, 183-93.
14. PEREA, E. J. 1971. Tesis doctoral, Universidad de Madrid.
15. ROUNTREE, P. 1949. J. Gen. Microbiol., 3, 164-73.
16. SHADE, A. L., and CAROLINE, L. 1944. J. Bacteriol., 48, 243-44.
17. STEELE, P. R. M.; DAVIES, J. D., and GREAVES, R. I. N. 1969. J. Hyg. 67, 107-14.
18. VICENTE, M. Comunicación personal.
19. VIEU, J. F. 1970. Bull. Inst. Pasteur, 68, 1259-74.
20. VIEU, J. F. Comunicación personal.
21. WALWICK, E. R.; BRADY, J. J., and RAY, R. E. 1967. Appl. Microbiol., 15, 885-92.

Depósito legal: M. 702 - 1968.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid