

---

VOLUMEN 28. 1975

ENERO - JUNIO. NUMEROS 1 - 2

# *Microbiología Española*

*Revista*

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



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

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 López Tello, Dr. Antonio Portolés, Prof. 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, estarán 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; no deberán de exceder de 10 holandesas. 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.

## INDICE

	Página
Efecto de la debariomicina sobre <i>Candida albicans</i> y <i>Debariomyces kloeckeri</i> , por F. Lanzuela, G. Pérez-Silva, E. Ronda y D. Rodríguez ... ..	1
Modificaciones en la composición antigénica de <i>Arthrobacter simplex</i> ATCC 6946 en presencia de la sustancia S de Reichstein, por R. M. Martín ... ..	13
Identificación de <i>Pseudomonas</i> de interés clínico, por J. Repáraz y A. del Moral ... ..	27
Enumeración y caracterización de la flora desnitrificante quimioorganótrofa en una pradera experimental, por J. Vives y R. Parés.	43
Localización y liberación de fosfatasa alcalina del <i>Pseudomonas fluorescens</i> , por V. Morales, P. Díaz-Rubio, C. García del Amo y A. Santos-Ruiz ... ..	55
Enumeración de desnitrificantes quimiolitótrofos y de reductores de sulfatos en una pradera experimental, por J. Vives y R. Parés ...	69
Congreso Intenacional de Virología ... ..	75
Bibliografía, por M. Rodríguez-Rebollo, L. Vilas, C. González y F. Baquero ... ..	77

---

## CONTENTS

	Page
Effect of debariomicine on <i>Candida albicans</i> and <i>Debariomyces kloeckeri</i> , by F. Lanzuela, G. Pérez-Silva, E. Ronda and D. Rodríguez ... ..	1
Modification of the antigenic composition of <i>Arthrobacter simplex</i> , ATCC 6946, in presence of Reichstein's substance S, by R. M. Martín ... ..	13
Identification of <i>Pseudomonas</i> of clinical importance, by J. Repáraz and A. del Moral ... ..	27
Count and identification of chemoorganitrophic denitrifying bacteria in an experimental field, by J. Vives and R. Parés ... ..	43
Localization and liberation of alkaline phosphatase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> , by V. Morales, P. Díaz-Rubio, C. García del Amo and A. Santos-Ruiz ... ..	55
Count of chemolithotrophic denitrifying bacteria and sulphate reducing in an experimental field, by J. Vives and R. Parés ... ..	69
International Congress for Virology ... ..	75
Bibliography, by M. Rodríguez-Rebollo, L. Vilas, C. González and F. Baquero ... ..	77

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)  
DEPARTAMENTO DE PROTOZOLOGIA  
SECCION DE ECOLOGIA

## EFFECTO DE LA DEBARIOCIDINA SOBRE *CANDIDA ALBICANS* Y *DEBARIOMYCES KLOECKERI*

por

F. LANZUELA, G. PÉREZ-SILVA, E. RONDA y D. RODRÍGUEZ

### INTRODUCCION

El antibiótico debariocidina, descrito por Pérez Silva y Lahoz (6), es activo frente a varias especies de levaduras de los géneros *Candida*, *Debaryomyces* y *Saccharomyces*.

En trabajos posteriores realizados en nuestro laboratorio se describen el aislamiento, la purificación y diversas propiedades químicas de la sustancia antibiótica (2-3). El objeto del presente trabajo es dar cuenta de algunas propiedades biológicas de dicho antibiótico. A este respecto hemos de señalar que la levadura *Candida albicans* junto con *Debaryomyces klockeri*, son las más sensibles a la debariocidina y, por ello, las más idóneas para investigar el modo de acción del antibiótico.

En este trabajo damos cuenta de los resultados de las experiencias *in vivo* realizadas con debariocidina, así como de la interacción de ésta con algunas proteínas.

### MATERIAL Y METODOS

Los microorganismos empleados en este trabajo eran: una estirpe de *Candida albicans*, aislada en el Departamento de Bacteriología Infantil de la Residencia Sanitaria "La Paz", de Madrid; *Debaryomyces klockeri*

Guilliermond and Péju, procedente de la Colección Española de Cepas Tipo, de Salamanca, y la estirpe de *Bacillus subtilis* IJFB<sub>2</sub>, procedente de nuestra colección.

Se empleó el medio XIII, descrito en otro trabajo (3), para el cultivo de *Bacillus subtilis*. Agar-Sabouraud y agar-malta para el mantenimiento de *Candida albicans* y *Debariomyces kloeckeri*, y para el cultivo de estos microorganismos se utilizaba el medio XIII suplementado con 1 % de agua de malta.

A fin de exaltar la virulencia de la estirpe de *Candida albicans* se inyectaba una suspensión de dicha levadura a un conejo, por vía intravenosa, en la vena marginal de la oreja. A los tres días sobrevénia la muerte del animal y se le extraían los riñones en condiciones asépticas, se colocaban en una placa de Petri y se lavaban exteriormente con solución de penicilina-estreptomina. Esta solución se preparaba mezclando 100.000 U.I. de penicilina y 0,1 g de estreptomina en 10 ml de agua bidestilada y completando el volumen a 1.000 ml, con solución fosfatada salina. Una vez eliminada la envoltura serosa, se trituraba el resto en condiciones asépticas, en un mortero con arena y se preparaba una suspensión con solución salina estéril. De esta suspensión se hacían siembras por agotamiento en agar-Sabouraud.

La debariocidina empleada en este trabajo fue obtenida en forma de polvo amorfo, siguiendo el procedimiento descrito en otro trabajo (3).

El suero de conejo se extraía en el momento de realizar las experiencias, a partir de animales sanos.

La técnica empleada para el ensayo de la actividad de la debariocidina es la descrita en trabajos previos (3 y 5).

## RESULTADOS

### *Acción de la debariocidina sobre cultivos de Candida albicans y Debariomyces kloeckeri*

Para estudiar el efecto que la debariocidina causaba sobre el desarrollo de la levadura *Debariomyces kloeckeri*, se incubó ésta en presencia de concentraciones diferentes del antibiótico, y el desarrollo de la misma se determinaba midiendo la turbidez del cultivo. Para este fin se dispusieron matraces de 100 ml provistos de tubuladura lateral, a los que se

añadían 20 ml de medio de cultivo, y cada uno se inoculó con 0,5 ml de un cultivo en medio líquido de 24 h de *D. kloeckeri*.

Unos matraces servían de testigo, a otros se les añadía 0,1 ml de una solución de debarioidina y, finalmente, otros llevaban 1 ml de solución de dicho antibiótico. La solución de debarioidina empleada tenía una concentración de 1.400  $\mu\text{g/ml}$ . Se midió la turbidez inicial de dichos cultivos y se incubaron durante 24 h a 25 °C, en agitación. Al final del período de incubación se observó que una cantidad de debarioidina de 1.400  $\mu\text{g}$  inhibía por completo el desarrollo de la levadura.

Los resultados encontrados se exponen en el *cuadro 1*, que representan el promedio de 5 experiencias; los números entre paréntesis expresan la desviación típica.

*Cuadro 1. Acción de la debarioidina sobre cultivos de Debariomyces kloeckeri*

Debarioidina $\mu\text{g}/\text{matraz}$	Densidad óptica		Inibición %
	Inicial	Final	
	0,02 (0)	0,50 (0,007)	
140	0,02 (0)	0,22 (0,02)	56
1.400	0,02 (0)	0,02 (0)	100

Experiencias análogas se hicieron con cultivos de *Candida albicans*, extendiendo las lecturas de turbidez hasta las 48 h. Los resultados observados se exponen en el *cuadro 2*.

*Cuadro 2. Acción de la debarioidina sobre cultivos de Candida albicans*

Debarioidina $\mu\text{g}/\text{matraz}$	Densidad óptica				
	Tiempo de incubación				
	0 h	18 h	24 h	40 h	48 h
	0,02	0,14	0,62	1,00	1,50
70	0,02	0,06	0,10	0,13	0,14
140	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
1.400	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

La sensibilidad de *Candida albicans* para la debarioidina es mucho mayor que para *Debariomyces kloeckeri*. La dosis mínima inhibitoria es inferior a 3,5  $\mu\text{g/ml}$  para *C. albicans* y superior a 7  $\mu\text{g/ml}$  para *D. kloeckeri*.

Se realizaron otras experiencias con *Debariomyces kloeckeri* añadiendo 1.400  $\mu\text{g}$  de debarioidina a diferentes tiempos de incubación, junto a un testigo, al que no se añadía antibiótico.

En el cuadro 3 se expresa la densidad óptica de los cultivos tras la adición de la debarioidina a las 0, 8 y 10 h de la incubación.

Cuadro 3. Densidad óptica de cultivos de *Debariomyces kloeckeri* a diferentes tiempos de incubación, en presencia o ausencia de debarioidina

Adición de debarioidina	0	5	7	8	9	10	11	26
0 h	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
8 h	0,06	0,06	0,07	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
10 h	0,06	0,06	0,08	0,10	0,14	0,24	0,26	0,30
Testigo	0,06	0,06	0,08	0,10	0,15	0,25	0,46	0,58

Estos resultados indican que la debarioidina ejerce una acción micostática, ya que impide el crecimiento de la levadura desde el mismo momento en que las células se ponen en presencia de dicha sustancia antibiótica.

Dada la gran sensibilidad de *Candida albicans* para la debarioidina, se llevaron a cabo una serie de pruebas *in vivo*. Tales experiencias se detallan a continuación.

#### Pruebas de toxicidad en ratón

Para estas pruebas se emplearon 20 ratones ( $20 \pm 2$  g de peso), que se dividieron en lotes de 5, a los que se les administró debarioidina por las vías oral, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa.

##### a) Vía oral

Para este fin se mezclaron 25 ml de una solución acuosa de anti-

biótico (185 mg) con el alimento que se dividió en cinco porciones y se les dio a cada uno de los 5 ratones (primer lote) que habían sido mantenidos en ayunas desde el día anterior y en jaulas independientes. Todos los animales tomaron sus respectivos 37 mg de antibiótico en menos de 2 días y no mostraron ninguna anomalía durante el período de observación, que fue de 15 días.

*b) Vía intraperitoneal*

Los ratones del segundo lote recibieron una dosis de 0,11 mg de antibiótico/g de peso del animal, en días alternos, durante 30 días, sin que ellos manifestasen síntomas de intolerancia. Durante esta experiencia, dos hembras tuvieron crías normales, puesto que no presentaban ninguna anomalía anatómica ni fisiológica.

*c) Vía intramuscular*

Los ratones del tercer lote recibieron diariamente, en la masa muscular del muslo, 0,2 ml de solución de antibiótico (dosis de 0,07 mg/g de peso) durante 7 días, sin que se observase en ellos ninguna anomalía.

*d) Vía intravenosa*

A cada uno de los ratones del cuarto lote se les inyectó en la vena caudal, tres dosis, de 0,1 ml cada una, de solución de antibiótico (0,037 mg/g de peso) en días alternos. Los ratones tampoco manifestaron ninguna anomalía durante el período de observación posterior.

*Pruebas de toxicidad en conejo*

Se realizaron pruebas similares con 11 conejos (2 kg  $\pm$  0,25 kg de peso), de los cuales, 8 recibieron dos dosis diarias, por vía intramuscular, en el muslo, de 3 ml de solución de antibiótico, prolongándose este tratamiento durante 10 días. Cada dosis de 3 ml contenía 11,1 mg de antibiótico.

Los tres conejos restantes recibieron una dosis diaria de 3 ml de solución de antibiótico, por vía intravenosa, prolongándose este tratamiento durante 6 días. La dosis de 3 ml contenía 11,1 mg de antibiótico.

En ningún caso se observaron anomalías durante los 15 días de ob-

servación posteriores al tratamiento, por lo que podemos considerar a la debarioidina como atóxica, al menos en las dosis que hemos empleado.

#### *Pruebas de protección*

Como es sabido, el conejo es uno de los animales más sensibles a *Candida albicans*, y por ello se eligió este animal para las pruebas *in vivo*.

Se emplearon 10 conejos ( $2 \pm 0,25$  kg de peso) a los que se les inyectó, en la vena marginal de la oreja, una dosis de 3 ml de una suspensión opalescente de un cultivo de 24 h de *Candida albicans*.

A uno de estos conejos se le administró cada 24 h, por vía intraperitoneal, 6 ml de solución de antibiótico, repartidos en dos dosis de 3 ml cada una. Otro conejo recibió 6 ml de solución de debarioidina por vía intravenosa, igualmente repartidos en dos dosis diarias. 3 conejos recibieron 6 ml diarios por vía intramuscular y también repartidos en dos dosis de 3 ml. El tratamiento con debarioidina se inició 24 h antes de la inoculación con *Candida albicans*, continuándose cada día hasta la muerte de los animales. Cada dosis de 3 ml contenía 11,1 mg de antibiótico.

En todos los casos estudiados, los 10 conejos murieron a los 3 días siguientes de la inyección de *Candida albicans*. Tanto los 5 conejos no tratados con debarioidina como los tratados, presentaban en la autopsia las siguientes características: pulmones con zonas neumónicas, hígado necrosado con disminución de tamaño, intestino congestionado, vejiga normal, riñones edematosos, bazo de tamaño normal, muy oscuro, y estómago congestionado con zonas necróticas.

#### *Interacción entre suero y debarioidina*

Para comprobar si había una inhibición del antibiótico por las proteínas del suero de conejo, se mezclaron diferentes concentraciones de suero y de antibiótico. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 40 min y se determinó su actividad frente a *Debariomyces kloeckeri*.

Estas soluciones se preparaban mezclando solución acuosa de debarioidina y suero en las proporciones 1:1, previa dilución correspondiente del suero con agua destilada estéril para que tuviera una concen-

tración final de 10, 25 y 50 %. La concentración final de debarioidina, en todos los casos, era de 0,7 mg/ml.

Los resultados observados se exponen en el *cuadro 4*.

*Cuadro 4. Halos de inhibición causados por 0,1 ml de las mezclas de suero fresco de conejo y debarioidina*

Suero %	Halo de inhibición mm
	34 (1,92)
10	29 (1,22)
25	22 (1,41)
50	0

Promedio de 5 experiencias. Cada pocillo contenía 70  $\mu$ g de debarioidina. Los números entre paréntesis indican la desviación típica de los valores experimentales.

*Efecto de otras proteínas sobre la debarioidina*

Para estudiar este efecto se utilizaron diferentes soluciones de proteínas que se mezclaban (en la relación 1:1, en volumen) con una solución acuosa de debarioidina. Esta última solución contenía 1,4 mg/ml de antibiótico. Las proteínas ensayadas fueron: solución acuosa al 10 % de extracto de carne (Difco); solución acuosa al 5 % de caseína (Difco); solución acuosa al 10 % de extracto de levadura (Difco); solución acuosa al 5 % de ovoalbúmina (Merck); solución acuosa al 10 % de gelatina (Riedel); solución acuosa al 5 % de bactopectona (Difco) y suero fresco de conejo.

Estas mezclas se incubaban a 37 °C durante 40 min y se comparaban las actividades de 0,1 ml de cada una de ellas frente a *Debariomyces kloeckeri*. Como testigo se incubaba, en las mismas condiciones, una mezcla de debarioidina-agua (1:1, en volumen), manteniendo así una concentración final de 0,7 mg/ml de antibiótico.

Los resultados de estos experimentos se exponen en el *cuadro 5*, en el que se recoge el promedio de 10 experimentos.

*Cuadro 5. Efecto de algunas proteínas sobre la actividad de la debarioidina*

Proteínas añadidas	Halo de inhibición mm
	30 (1,87)
Extracto de carne (10 %)	32 (1,41)
Caseína (5 %)	31 (1,23)
Extracto de levadura (10 %)	31 (1,32)
Bactopeptona (5 %)	31 (1,25)
Ovoalbúmina (5 %)	29 (1,44)
Suero fresco de conejo	0

La cantidad de debarioidina puesta en cada pocillo fue de 70  $\mu$ g. Los números entre paréntesis expresan la desviación típica de los valores experimentales.

Con el fin de observar si la acción del suero era contrarrestada de alguna manera por otras proteínas, se mezclaron volúmenes iguales de suero fresco de conejo con soluciones acuosas de bactopeptona al 5 %; esta solución se mezcló, a su vez, con un volumen igual de debarioidina, de concentración 1,4 mg/ml. La mezcla suero-bactopeptona-debarioidina (1:1:2, en volumen) resultante se incubó a 37 °C, durante 40 min, y se tomaron muestras de 0,1 ml para determinar su actividad frente a *Debariomyces kloeckeri*.

De modo análogo se prepararon mezclas de suero-extracto de carne-debarioidina (1:1:2, en volumen). En el *cuadro 6* se exponen los halos de inhibición causados por 70  $\mu$ g de debarioidina (testigo), y la misma cantidad de antibiótico mezclado con bactopeptona-agua, suero-bactopeptona, extracto de carne-agua, suero-extracto de carne, y suero-agua, respectivamente.

Cuadro 6. Efecto de mezclas de suero de conejo y otras proteínas sobre la actividad de la debarioidina

Sustancias añadidas a la debarioidina	Halos de inhibición mm
Testigo	30 (1,48)
Bactopeptona-agua	33 (1,23)
Suero-bactopeptona	28 (1,52)
Extracto de carne-agua	33 (1,38)
Suero-extracto de carne	28 (1,42)
Suero-agua	22 (1,26)

Promedio de 5 experiencias. Los números entre paréntesis expresan la desviación típica de los valores experimentales.

## DISCUSION

La sensibilidad de *Candida albicans* para la debarioidina es mucho mayor que para *Debariomyces kloeckeri*, ejerciendo sobre ambas un efecto micostático que no va acompañado de lisis.

Las experiencias con animales ponen de manifiesto que, a diferencia de otros péptidos antibióticos, la debarioidina no es tóxica al administrarse por diferentes vías, al menos en las dosis empleadas en nuestras experiencias.

Como es sabido, el conejo es uno de los animales más sensibles a *Candida albicans*, y por ello resulta imprescindible en un estudio de este tipo. Según Cantrell y Widra (1) los ratones no son sensibles a dicha levadura, a no ser que sean tratados previamente con cortisona. Nosotros, en ningún caso conseguimos provocar candidiasis a dichos animales. Sin embargo, las pruebas de protección en conejos dieron resultados negativos, lo cual podría ser debido a que el antibiótico es excretado de modo rápido, ya que es altamente soluble y dializable.

Investigaciones que se realizan en la actualidad en nuestro laboratorio nos permitirán establecer si existe tal excreción rápida, al mismo tiempo que pensamos obtener diferentes derivados, que, manteniendo la acti-

vidad, disminuyan la solubilidad, consiguiendo de esta forma un mayor tiempo de permanencia en el animal.

No cabe duda de que las proteínas del suero inhiben al antibiótico, cosa que no ocurre con otras proteínas ensayadas. Es también significativo el hecho de que las mezclas de estas proteínas con las del suero contrarresten de alguna manera la acción inhibitoria del mismo. A este respecto hemos de señalar que la debariocidina se comporta de modo análogo a la hamicina, estudiada por Maniar (4). Otro aspecto que consideramos de interés es el estudio del efecto de la debariocidina asociada a otros antibióticos.

#### AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al Dr. F. Baquero por habernos cedido la estirpe *Candida albicans*. Asimismo, damos las gracias a la Srta. Angeles Moya por su eficaz ayuda en la realización del trabajo.

#### RESUMEN

El antibiótico debariocidina ejerce una acción micostática sobre *Candida albicans* y *Debariomyces kloeckeri*. No es tóxico para el ratón y conejo en las dosis empleadas por nosotros y no protege al conejo de candidiasis.

La debariocidina es inhibida por proteínas del suero y, en parte, esta inhibición se puede contrarrestar con otras proteínas.

#### SUMMARY

*Effect of debariocidine on Candida albicans and Debariomyces kloeckeri*

Debariocidine is a micostatic agent for *Candida albicans* and *Debariomyces kloeckeri*.

Debariocidine is not toxic for mice and rabbits at least with the tested dosis, although does not protect the rabbits against experimental candidiasis.

Debariocidine is inhibited by some serum proteins and this inhibition could partially be neutralized by other proteins.

### BIBLIOGRAFIA

1. CANTRELL, H. F., and WIDRA, A. 1964. Experimental candidiasis in cortisone-treated mice. *J. Bacteriol.*, 87, 1532.
2. LANZUELA, F. 1970. Aislamiento y purificación de un nuevo antibiótico producido por *Bacillus subtilis*. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.
3. LANZUELA, F.; PÉREZ-SILVA, J., y RODRÍGUEZ, D. 1971. Purificación y propiedades químicas del antibiótico debarioidina. *Microbiol. Españ.*, 24, 209-19.
4. MANIAR, A. C. 1965. Mode of action of hamicyn. *Antimicrob, Ag. Chemother.*, 349-52.
5. PÉREZ-SILVA, J., y GIL, R. 1960. Estudios sobre la debarioidina. I. Acción *in vitro* sobre levaduras aisladas de enfermos tratados con antibióticos. *Microbiol. Españ.*, 13, 323-25.
6. PÉREZ-SILVA, J., y LAHOZ, R. 1958. Nota previa acerca de un nuevo antibiótico. *Microbiol. Españ.*, 11, 255-63.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (TENERIFE)  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

MODIFICACIONES EN LA COMPOSICION  
ANTIGENICA DE *ARTHROBACTER SIMPLEX*  
ATCC 6946 EN PRESENCIA DE LA SUSTANCIA S  
DE REICHSTEIN

por

R. M. MARTÍN

INTRODUCCION

El estudio de las transformaciones de esteroides por microorganismos ha despertado gran interés, desde los primeros trabajos realizados por Mamoli y Vercellone (6), en 1937, principalmente por las posibilidades que presentan con respecto a la obtención de preparados con actividad farmacológica, más accesibles, bien desde el punto de vista económico, bien desde un punto de vista estrictamente químico, por las dificultades que entraña la consecución de alguno de ellos mediante las técnicas clásicas de la Química Orgánica.

Todo ello determinó que numerosos grupos de investigadores comisionados por las grandes compañías farmacéuticas, dirigiesen sus esfuerzos hacia este campo tan prometedor, que se tradujo en la aparición de un sinnúmero de trabajos, de los cuales, una gran mayoría está protegida por patentes, lo que demuestra la gran importancia que llegaron a alcanzar.

Iizuka y Naito (5) y Charney y Herzog (1), realizaron una revisión de estos trabajos muy completa, recogiendo prácticamente todo lo que se había realizado hasta 1967. Desde esta época hasta nosotros, raro es el volumen de una revista dedicada al campo microbiológico, bioquímico o de la química orgánica, que no traiga entre sus páginas algún trabajo dedicado a esta temática.

En nuestro laboratorio estamos desarrollando una línea de investigación en este sentido, aprovechando los estudios que realiza el Instituto de Investigaciones Químicas de Tenerife sobre los esteroides, terpenos y sapogeninas de plantas canarias, ensayando la acción de diversos microorganismos sobre compuestos aún no estudiados en este aspecto.

Por otro lado, dado que mantenemos una línea de investigación sobre la modificación de la estructura antigénica de diversas especies bacterianas frente a condiciones externas diversas, y viendo que no se había realizado ningún trabajo sobre las modificaciones que sobre esta estructura puedan realizar los substratos transformables y que tampoco se había estudiado la estructura antigénica de las bacterias que estamos utilizando, pensamos realizar este estudio, uniendo estas dos líneas de investigación.

Un sistema que elegimos para nuestros primeros estudios fue *Arthrobacter simplex* ATCC 6946, como bacteria, frente a la sustancia S de Reichstein, como substrato, ya que, siendo un sistema ampliamente estudiado por diversos investigadores, entre los que podemos destacar a Sutter y colaboradores (9), y siguiendo muy de cerca sus indicaciones, evitábamos la aparición de resultados inesperados, diferentes, que pudiesen afectar a la reproductibilidad y fiabilidad de los resultados obtenidos.

Por otro lado, no buscamos un estudio químico de la transformación, sino, solamente, ver en qué forma se veía afectada la estructura antigénica de la bacteria en presencia de un substrato, con los consiguientes fenómenos de inducción y represión. De esta forma, dejamos un poco a un lado la descripción de las técnicas puramente químicas, nombrando solamente los pasos seguidos, para una mejor comprensión del texto y de la metódica empleada.

## MATERIAL Y METODOS

### *a) Bacteria elegida*

*Arthrobacter simplex*, ATCC 6946.

### *b) Medios y condiciones de cultivo*

Siguiendo los datos proporcionados por Herzog y colaboradores (4), utilizamos un medio de cultivo sólido para la reconstitución de la cepa bacteriana obtenida, liofilizada, de la colección de cultivos. Este medio es agar-dextrosa, al que añadimos 1 % de extracto de levadura Difco, sembrando por estría en placa y dejando crecer durante un mínimo de 24 h, a 30 °C.

A partir de aquí, recogemos un asa que pasamos a un medio de cultivo líquido, de enriquecimiento, para la obtención de una buena masa microbiana, compuesto por 3 g de extracto de levadura Difco; 4,49 g de fosfato monopotásico; 8,83 g de fosfato disódico heptahidratado, y agua del grifo, c.s.p. 1 litro. Incubamos a 30 °C, durante 18-24 h.

Una vez pasado este tiempo, recogemo 1 ml, del medio crecido, que consideramos inóculo estandar, y lo pasamos a matraces de 250 ml, con 100 ml cada uno del medio que denominamos de transformación, compuesto por 1 g de extracto de levadura Difco en 1 l de agua del grifo. Incubamos a 30 °C durante otras 18-24 h, en agitador orbital, a unas 158 r/m.

En este momento se puede proceder a la adición del sustrato esteroide.

### *c) Adición del sustrato*

A los matraces anteriores les añadimos 50 mg de la sustancia S de Reichstein, disueltos en 2 ml de metanol, y mantenemos la incubación, en las mismas condiciones anteriores, otras 48 h. En este momento se puede proceder a la extracción de los esteroides.

### *d) Extracción de los esteroides*

Se procede mediante el empleo de acetato de etilo, en ampollas de decantación, repitiendo por tres veces la extracción y separando la capa orgánica de la acuosa, que deseamos.

*e) Extracción de la masa microbiana para los estudios antigénicos*

Aquí hemos de hacer la salvedad de que, según el uso a que estén destinados estos extractos, procederemos de una muestra microbiana diferente. Así, para aquellos extractos antigénicos destinados al estudio de la bacteria, antes de la adición de esteroides, hemos de extraerla a partir del medio de enriquecimiento, al final de la fase exponencial de crecimiento. En aquellos otros que destinamos al estudio de la acción del sustrato, recogeremos la masa microbiana al final del crecimiento en el medio de transformación, en el punto que lo hacíamos para la extracción de esteroides.

Para la obtención de la masa microbiana, procederemos a la centrifugación del medio crecido, a 6.000 r/m, durante 15 min, lavado del sedimento microbiano con acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ , nueva centrifugación, nueva adición de acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ , centrifugación, adición de acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  y reposo durante 8 h en congelador. A su término, procederemos a la última centrifugación, recogida del sedimento y desecación, en desecador de cloruro cálcico, en vacío, y tratamiento del polvo seco, para la preparación de los extractos antigénicos.

*f) Estudio químico de los esteroides*

Dado que la finalidad de este trabajo no es el estudio químico de la transformación, sino comprobar la veracidad de su existencia, ya que nuestro objetivo es ver de qué forma actúa ésta sobre la estructura antigénica de la bacteria que estudiamos, solamente indicaremos el estudio químico realizado, sin entrar en detalles.

A partir de la capa orgánica, producto de la extracción realizada con acetato de etilo, realizamos una cromatografía en capa fina, sobre silicagel, con la mezcla benceno-acetato de etilo como eluyente, al 60:40 de polaridad. Una vez desarrollada la cromatografía, revelamos con *oleum* y observamos a la luz ultravioleta, produciendo fluorescencia las manchas correspondientes al producto de partida y al de transformación. Como control colocamos un punto de la sustancia de partida.

Para la identificación completa del producto habría que proceder a la medición del Rf, separación, por cromatografía en columna en silicagel, recogida de fracciones, concentración en rotavapor, cristalización en metanol, determinación del punto de fusión, estudio de solubilidades frente a la serie de disolventes de polaridad creciente, así como a la determi-

nación de los espectros ultravioleta, infrarrojo, resonancia magnética nuclear y, eventualmente, a la realización del análisis elemental, rayos X y espectrometría de masas.

*g) Preparación de los extractos antigénicos*

Hemos de distinguir en este apartado los extractos antigénicos destinados a la inmunización de los conejos, de aquellos preparados para el análisis antigénico, ya que el proceso seguido es diferente.

*1) Preparados antigénicos para la inmunización*

La obtención de estos extractos se realiza a partir del polvo seco, obtenido como describimos en el apartado e), el cual lo reconstituimos con una mínima cantidad de solución salina fisiológica estéril, determinando el contenido proteico según el método de Lowry u otro adecuado. De acuerdo con este dato, ajustamos la concentración a 20 mg/ml, mediante dilución posterior con la cantidad precisa de solución salina fisiológica estéril. Añadimos, a continuación, coadyuvante incompleto de Freund, a partes iguales, con lo que nos queda la concentración proteica a 10 mg/ml de proteínas totales. De este complejo, extracto antigénico-coadyuvante, partimos para la inoculación de los animales.

*2) Preparación de los extractos para el análisis antigénico*

A partir del polvo seco bacteriano, reconstituimos con una mínima cantidad de agua desionizada y ultrasonamos para la ruptura de estructuras celulares y dializamos a través de una membrana de diálisis de acetato de celulosa (Union Carbide), determinando la concentración proteica, como anteriormente. De acuerdo con este dato, concentramos por evaporación a través de la membrana de diálisis o diluimos con agua desionizada, para ajustar la concentración proteica a 10 mg/ml. De este preparado partimos para el análisis antigénico.

*h) Pauta de inmunización seguida*

Como animal elegimos conejos machos de unos 5 a 7 kg de peso, a los que practicamos una primera sangría cero, que nos servirá como control negativo en los estudios posteriores. Esta sangría y las posteriores, las realizamos en la vena marginal de la oreja.

Las inoculaciones las realizamos en el lomo del animal, a ambos lados y de atrás adelante, siguiendo un pauta de inoculaciones en días alternos, con un total de 15 inoculaciones de 1 ml cada una y practicando sangrías parciales cada semana para el control del título del inmunosuero. Dejamos descansar al conejo una semana y, si no hemos obtenido título suficiente, que consideramos 1/32, procederemos a una segunda tanda de inoculaciones, aumentando la dosis inoculada a 2 ml/inyección, también en días alternos y hasta obtener el título deseado. Una vez obtenido, procederemos a la realización de una sangría a muerte, con la máxima recogida posible de sangre.

Los sueros obtenidos los conservamos en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *i) Obtención de inmunosueros específicos*

En una parte de nuestro trabajo necesitaremos inmunosueros específicos, preparados mediante absorciones. La técnica seguida fue la siguiente: a 0,8 partes de un inmunosuero le añadimos 0,2 ml del antígeno de reacción cruzada; incubamos 30 min, a  $37^{\circ}\text{C}$ , y centrifugamos a baja velocidad, recogiendo el sobrenadante, que será el inmunosuero absorbido.

Comprobamos frente al antígeno absorbente, mediante inmunodifusión radial, según Ouchterlony, la negatividad de la reacción, y, de no ser así, hemos de repetir la absorción hasta que se negativice la reacción.

#### *j) Técnicas inmunológicas*

##### *1) Inmunodifusión según Ouchterlony*

Utilizamos esta técnica en la comprobación del título de los inmunosueros y en el control de las absorciones. Se trata de la técnica clásica de inmunodifusión radial, sobre gel de agar, en que practicamos un pocillo central y otros circularmente, equidistantes, siendo el diámetro de los pocillos de 2 mm y la distancia entre el central y los circundantes de 4 mm (2-3 y 10).

##### *2) Inmunoelectroforesis*

Utilizamos la microtécnica de Scheidegger (8), modificada por Martínez Reja y colaboradores (7). Expresamos las bandas de precipitación obtenidas por su movilidad relativa a la albúmina, utilizando dextrano y albúmina como indicadores del punto cero y del cien.

## RESULTADOS

a) Determinación de la composición antigénica directa de *Arthrobacter simplex*

Para la determinación de esta composición procedimos al enfrentamiento, por inmunoelectroforesis, del antígeno correspondiente al *Arthrobacter simplex* antes de la adición del substrato esteroide, que denominamos ASE, frente al inmunosuero homólogo, que denominamos anti-ASE.

Los resultados obtenidos, expresados como bandas de precipitación, según su movilidad relativa a la albúmina, fueron: una banda de movilidad — 7, una de 29, una de 44, una de 55, dos bandas de movilidad 62, a y b, dos bandas de 74, a y b, y una banda de movilidad 85, con un total de 9 bandas de precipitación, que podemos ver representadas en el esquema A de la figura 1.

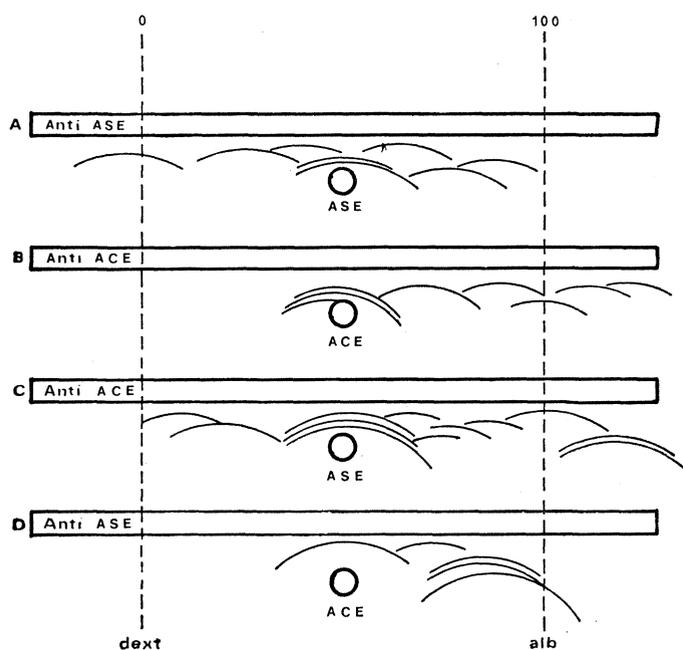


Figura 1

b) *Determinación de la composición antigénica directa de Arthrobacter simplex tras la adición de esteroides*

Procediendo de la misma forma que anteriormente, enfrentando inmunolectroforéticamente el inmunosuero anti-ACE, *Arthrobacter*, con esteroides, frente al antígeno homólogo, ACE, obtuvimos las siguientes bandas de precipitación: una banda de movilidad 44, dos bandas de movilidad 50, y bandas de precipitación correspondientes a las movilidades 56, 74, 107, 109,5 y 136,5, con un total de ocho bandas de precipitación, que representamos en el *esquema B* de la *figura 1*.

c) *Enfrentamientos inmunolectroforéticos cruzados*

Procedimos también al estudio de los enfrentamientos inmunolectroforéticos cruzados, para completar el esquema antigénico completo de esta especie, en la posibilidad de que los resultados obtenidos nos enriquecieran esta composición por la detección de algún componente que no se hubiese revelado en los enfrentamientos anteriores. Así, enfrentamos el antígeno ASE frente al inmunosuero anti-ACE y el antígeno ACE frente al inmunosuero anti-ASE.

Nos encontramos con un total de quince bandas de precipitación nuevas, las correspondientes a las movilidades: 7, una banda; 11, una banda; 55, tres bandas; 62, dos bandas; una de 68, dos de 77, tres de 85, una de 107 y dos de 118, y que recogemos en los *esquemas C-D* de la *figura 1*.

d) *Determinación de los componentes inducidos*

Para la determinación de este tipo de componentes, enfrentamos, inmunolectroforéticamente, el antígeno ACE (*Arthrobacter* con esteroides), frente al inmunosuero anti-ACE, absorbido con el antígeno ASE (*Arthrobacter* sin esteroides). Tal como representamos en el *esquema A* de la *figura 2*, obteniendo un total de nueve bandas de precipitación, de movilidad relativa a la albúmina: — 10, 44, 55, 66, 85, 96, 100, 115 y 150.

e) *Determinación de los componentes reprimidos*

Para la realización de este apartado enfrentamos, por inmunolectroforesis, el antígeno ASE frente al inmunosuero anti-ASE, absorbido con

el antígeno ACE, obteniendo un total de cinco bandas de precipitación, de movilidades relativas, 7,0; 62,70 y 118, que representamos en el esquema B de la figura 2.

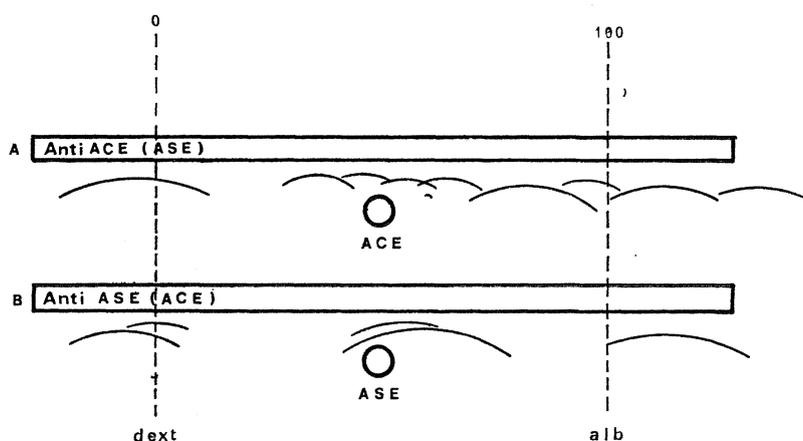


Figura 2

## DISCUSION

### a) *Determinación de la composición antigénica directa de Arthrobacter simplex ATCC 6946*

En la realización de este apartado hemos procedido al enfrentamiento directo de los sistemas homólogos, antígeno ASE frente al inmunosuero anti-ASE, con lo que obtuvimos la composición antigénica directa de esta especie bacteriana, que denominamos constitutiva.

### b) *Determinación de la composición antigénica directa en presencia del sustrato*

Aquí determinamos las variaciones que produce la presencia del sustrato en la composición antigénica constitutiva, determinando la desaparición de algunos componentes antigénicos, que consideramos reprimidos, y la aparición de otros nuevos, que consideramos inducidos por su presencia.

c) *Enfrentamientos inmunolectroforéticos cruzados*

En este tipo de enfrentamientos (*esquemas C y D de la figura 1*) vemos que aparecen algunos componentes antigénicos, no revelados en los enfrentamientos directos, pero que, al reaccionar, son comunes a ambos sistemas, por lo que podemos considerarlos como constitutivos de especie, enriqueciéndonos el espectro antigénico de esta especie bacteriana.

d) *Determinación de los componentes antigénicos reprimidos e inducidos por la presencia del substrato*

Para la realización de este estudio hemos acudido a la utilización de absorciones, con objeto de eliminar componentes comunes y que nos reaccionasen solamente aquellos componentes que estábamos buscando, según el planteamiento siguiente:

Antígeno ASE	Antígeno ACE
Componentes constitutivos	Componentes constitutivos
Componentes reprimidos	Componentes reprimidos
Inmunosuero anti-ASE	Inmunosuero anti-ACE
Componentes constitutivos	Componentes constitutivos
Componentes inducidos	Componentes inducidos

De esta manera, absorbiendo el inmunosuero anti-ASE con el antígeno ACE, eliminamos los componentes comunes, los constitutivos, obteniendo un suero inmune específico de los componentes reprimidos, por lo que al enfrentarlo al antígeno homólogo ASE obtendremos una serie de bandas de precipitación, que corresponden, precisamente, a este tipo de componentes (*esquema B de la figura 2*).

Por la misma razón, al absorber el inmunosuero anti-ACE con el antígeno heterólogo ASE, eliminamos los componentes constitutivos, obteniendo un suero inmune específico de los componentes inducidos, que,

Cuadro 1. Esquema resumen de la composición antigénica total de Arthro-  
bacter simplex

Mov.	Constitutivas	Reprimidas	Inducidas
— 10			X
— 7	X	X	
0		X	
7	X		
11	X		
29	X		
44	X		X
50	X		
50	X		
55	X		X
55	X		
55	X		
56	X		
62	X	X	
62	X		
66			X
68	X		
70		X	
74	X		
74	X		
77	X		
85	X		X
85	X		
85	X		
96			X
100			X
107	X		
109,5	X		
115			X
118	X	X	
118	X		
136,5	X		
150			X
N.º	25	5	9

al enfrentarlo al antígeno homólogo ACE, nos dará esta composición (*esquema A de la figura 2*).

De esta forma, hemos aportado en nuestro trabajo, por un lado, la composición antigénica del *Arthrobacter simplex* ATCC 6946; por otro lado, creemos aportar una metódica de trabajo sumamente sencilla y específica para la realización de estudios sobre represión e inducción por un sustrato de sistemas enzimáticos implicados en un proceso metabólico y fácilmente realizable en un laboratorio medianamente dotado.

### RESUMEN

Se determina en este trabajo la composición antigénica de *Arthrobacter simplex* ATCC 6946, en que encontramos un total de 25 componentes constitutivos, 5 reprimidos y 9 inducidos, en presencia de la sustancia S de Reichstein como sustrato y que resumimos en el *cuadro 1*.

A la vez, exponemos y proponemos una metódica de trabajo sencilla, sumamente específica y fácilmente realizable, para el estudio de la inducción y represión enzimáticas.

### SUMMARY

*Modification of the antigenic composition of Arthrobacter simplex, ATCC 6946, in presence of Reichstein's substance S*

The antigens of *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 are determined as well as the variations produced in presence of Reichstein's substance S, a steroidal substratum, which is transformed. A total of 25 components are described, 5 repressed and 9 induced. A simple, highly specific and easy method is proposed for the determination of enzymatic induction and repression.

### BIBLIOGRAFIA

1. CHARNEY, W., and HERZOG, H. L. 1967. Microbial Transformation of Steroids. Academic Press Inc., N. Y.
2. CHORDI, A.; GONZÁLEZ-CASTRO, J.; TORMO, J., y DÍAZ, R. 1962. Hemaglutinación indirecta con células formoladas en el serodiagnóstico de la hidatidosis. Rev. Med. Estud. Gen. Navarra, 6, 27-39.

3. CHORDI, A., and KAGAN, I. G. 1964. Analysis of normal sheep serum by immunoelectrophoresis. *J. Immunol.*, 93, 439-45.
4. HERZOG, H. L.; PAYNE, C. C.; TULLY-HUGHES, M.; JEVNIK-GENTLES, M.; HERSHBERG, E. B.; NOBILE, A.; CHARNEY, W.; FEDERBUSH, C.; SUTTER, D., and PERLMAN, P. L. 1962. Microbiological transformation of steroids-X, 1-dehydro analogs of cortical steroids. *Tetrahedron*, 18, 581-89.
5. IIZUKA, H., and NAITO, A. 1967. *Microbial Transformation of Steroids and Alkaloids*. University of Tokyo Press and University Park Press, State College, Penn.
6. MAMOLI, L., and VERCELLONE, A. 1937. *Bet.*, 70, 470.
7. MARTÍNEZ-REJA, P.; ALVAREZ-MORENO, C.; HERMIDA, F., and CHORDI, A. 1969. Identification by immunoelectrophoresis of bovine proteins. *J. Dairy Sci.*, 52, 1.
8. SCHEIDEGGER, J. J. 1955. Une microméthode de l'immunoelectrophorèse. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7, 103.
9. SUTTER, D.; CHARNEY, W.; O'NEILL, P. L.; CARVAJAL, F.; HERZOG, H. L., and HERSHBERG, E. B. 1957. *J. Org. Chem.*, 22, 578.
10. TORMO, J., and CHORDI, A. 1965. Immunoelectrophoretic analysis of *Ascaris suum* antigens. *Nature*, 205, 983-85.

INSTITUTO PROVINCIAL DE SANIDAD DE NAVARRA  
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA

## IDENTIFICACION DE *PSEUDOMONAS* DE INTERES CLINICO (\*)

por

J. REPÁRAZ y A. DEL MORAL

### INTRODUCCION

La identificación de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, con o sin interés clínico, representa una cuestión microbiológica apasionante. Su delimitación taxonómica y el número de especies que componen el género están muy lejos de ser admitidos unánimemente.

Conviene decir ya que desde este enfoque la bibliografía no médica es mucho más abundante y científica que la puramente clínica, lo que es en gran parte natural si tenemos en cuenta que ante la enfermedad infecciosa, en determinadas ocasiones, es necesario, o al menos conveniente, actuar con rapidez, sabiendo sacrificar la exactitud perfeccionista de un diagnóstico exhaustivo.

En el caso de *Pseudomonas* debemos admitir que no son muchos los trabajos médicos en los que se mencionen y detallen las técnicas empleadas para su identificación, si bien en una gran parte de ellos la única especie inculpada es *Ps. aeruginosa*. Y es, y en esto llevan razón, que en la mayoría de las veces el hecho es así, porque son tan evidentes las características de las que se identifican como *Ps. aeruginosa* que no re-

---

(\*) Trabajo presentado al I Simposio sobre Microbiología de Infecciones Bacterianas, Madrid, octubre, 1972.

sulta aventurado suponer que, prácticamente, todos los casos clínicos que se publican de infección por este germen o de su sensibilidad a los antibióticos son en este sentido clasificatorio bacteriológicamente correctos.

Sin embargo, a los microbiólogos clínicos que no vivimos la perentoriedad de la asistencia inmediata a un enfermo, nos preocupa saber si no se hallaran ya en nuestro medio otras especies de *Pseudomonas*, o incluso variantes atípicas o menos frecuentes que la clásica, que están pasando desapercibidas y que, además, sin duda alguna, están falseando los resultados sobre la eficacia de una determinada terapéutica, al etiquetar como gérmenes de tal o cual especie o género, bacterias que adecuadamente estudiadas se encuadrarían en el género *Pseudomonas*.

Al decir esto nos damos cuenta de que no resulta demasiado sencillo compaginar una mayor exactitud en el diagnóstico etiológico de un proceso infeccioso y la rapidez de actuación de la que hablábamos antes, o, simplemente, de la defensa de una mayor economía. No obstante, creemos que algo se puede y se debe hacer a nivel de los laboratorios medios de nuestro país, y plenamente conscientes de la limitación de nuestros conocimientos y de la modestia de nuestros medios técnicos es por lo que presentamos esta ponencia, fundamentalmente práctica, que no tiene ninguna pretensión distinta de la de ser útil a aquellos microbiólogos que por sin fin de razones tienen su camino difícilmente trazado.

#### GENERO *PSEUDOMONAS*: DEFINICION

Desde el hallazgo por Gessard en 1882 de *Bacillus pyocyaneus*, muchas han sido las definiciones propuestas, revisadas y finalmente olvidadas. La razón de ello parece estar en la ausencia de caracteres taxonómicos significativos y estables, lo cual viene a justificar la importancia, cada día mayor, que se le concede a la clasificación basada en un conjunto de caracteres, no sólo bioquímicos, sino serológicos, genéticos, patogénicos epidemiológicos, etc., frente a la más simple, pero también más incierta, de la división dicotómica. Ejemplo de esto lo tenemos en la comprobación de cómo en pocos años, desde la 7.<sup>a</sup> edición del Bergey (2) hasta ahora, el número de especies y el concepto mismo de *Pseudomonas* han variado. Por otro lado, investigadores serios en estas cuestiones recalcan una y otra vez la inutilidad, cuando no perjuicio, que

provoca la hipertrofia de géneros y especies al ser éstos pretendidamente justificados por divergencias más que discutibles.

Una rápida revisión bibliográfica confirmará lo que decimos. En 1957, el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* describe cerca de 150 especies. Dos años más tarde, Krassilnikov, y, en 1961, Prévot (25) elevan este número a varios centenares. Los trabajos de Rhodes (28), Colwell y Liston (4), Lysenko (18), Brísou (2), etc., representan otros tantos intentos de enfoque del problema. Stanier y colaboradores (30) llevan a cabo un estudio clasificatorio, basado en la diferente actividad bioquímica de los *Pseudomonas* aerobios, verdaderamente modélico. Shewan y colaboradores (29) y De Ley (6), entre otros, efectúan sus trabajos con carácter de estudio diferencial entre *Pseudomonas* y otros géneros con él relacionados. Ultimamente, y con miras de interés clínico-práctico, Pickett y colaboradores (19-23) y Gardner y colaboradores (8) se ocupan de los bacilos gram-negativos, no fermentativos, relacionados con el hombre. Más concretamente, Sutter (31) y Gilardi (10-11), entre otros, estudian detenidamente las diferentes especies de *Pseudomonas* de interés clínico.

Posiblemente, la definición más científica que hemos encontrado sobre *Pseudomonas* aerobios sea la dada por Stanier y colaboradores (30), que dice: "Bacilos unicelulares, con el eje mayor recto o curvado, pero nunca helicoidal; móviles mediante uno o más flagelos polares; gram-negativos; no forman esporas ni pedúnculos ni cubiertas; de metabolismo respiratorio, nunca fermentativo ni fotosintético; todas las especies usan oxígeno molecular como oxidante terminal, pudiendo algunas emplear la desnitrificación como mecanismo respiratorio anaerobio. Todas son quimioorganótrofas y algunas facultativamente quimiolitótrofas que utilizan  $H_2$  como fuente de energía". Estos autores completan la definición con una característica adicional, cual es el contenido en bases de su ADN, aproximadamente entre un 58 % a un 69 % mol de G + C.

Naturalmente que para los fines habituales de la microbiología clínica esta definición condiciona la realización de unas metódicas fuera del alcance común. En consecuencia, con la intención de simplificar, aunque dentro de ciertos límites, podemos ver en el *cuadro 1* las características mínimas necesarias para encuadrar a una determinada bacteria dentro del género *Pseudomonas*.

Cuadro 1. Caracteres básicos del género *Pseudomonas*


---

Bacilo recto o curvado, no helicoidal	
Gram-negativo	
No esporulado	
Aerobio, móvil (*)	
Crece a 37 °C	
Glucosa: fermentación ... ..	negativa
Glucosa: oxidación ... ..	positiva (**)
Oxidasa: positiva (***)	
Flagelo(s): polar(es)	
<i>Pseudomonas</i>	

---

(\*) *Ps. mallei* y algunas cepas de ciertas especies son inmóviles. (\*\*) Pocas especies, de interés clínico, son inertes o ligeramente alcalinizantes. (\*\*\*) La mayoría de *Ps. maltophilia* son oxidasa-negativos.

### GENEROS AFINES

Antes de pasar al estudio más detallado de algunas especies de *Pseudomonas* creemos imprescindible comentar brevemente la problemática que plantea la identificación y clasificación de ciertas bacterias pertenecientes a los que podemos llamar géneros afines al género *Pseudomonas*.

Primeramente diremos que al hacerlo vamos a tratar únicamente de aquellos bacilos, gram-negativos y no fermentativos, de interés actual en clínica humana, si bien estamos convencidos de que la patogenicidad de un germen no constituye en sí misma un carácter con valor taxonómico importante.

En segundo lugar seremos breves, pues una consideración detallada cae fuera de nuestro propósito. Consecuentemente, nos referiremos a las diferencias en cuanto a su comportamiento frente a la glucosa, presencia de oxidasa, y existencia y localización de los flagelos; caracteres básicos que como hemos visto nos han permitido llegar al género *Pseudomonas*, y solamente añadiremos pequeñas aclaraciones que nos ayuden en el diagnóstico etiológico con probabilidad mayor, pero siempre dentro de las limitaciones fácilmente comprensibles.

No nos ocuparemos de las técnicas serológicas ni ahora ni más tarde al estudiar las diferentes especies, pues, como dice Liu (18), no parece que por el momento, y a pesar de recomendar la creación de centros nacionales de referencia para el diagnóstico serológico de estos gérmenes a nivel de género, proporcione en la práctica un servicio eficaz que compense la dificultad y coste de su realización.

Estimamos oportuno indicar que la taxonomía y sinonimia de estos géneros a la luz de los conocimientos actuales es tan conflictiva, aún en el puro plano teórico, que resulta difícil, por no decir imposible, aceptar como definitivo ninguno de los esquemas que se nos ofrecen por los diferentes autores, y sí insistir, como hacen algunos de ellos, en lo aventurado que resulta definirse en esta materia.

El *cuadro 2* corresponde a un esquema simplificado que a nivel de género nos permite observar la situación y diferencias entre estos gérmenes tan íntimamente afines.

En él podemos establecer dos grandes grupos en función de su capacidad oxidativa de la glucosa. Los oxidativos pueden ser a su vez oxidasa-positivos o negativos. Estos últimos nos permiten ya quedarnos con los géneros *Acinetobacter*, *Chromobacterium* y *Xanthomonas*, a fin de diferenciarlos de una sola especie de *Pseudomonas*, *Ps. maltophilia*, que como es sabido en un gran porcentaje de sus cepas es oxidasa-negativa. La falta de movilidad y la lisinadescarboxilasa (LDC)-negativa de los *Acinetobacter*, y la LDC igualmente negativa, junto con la oxidación del gluconato positiva de los *Chromobacterium*, pueden constituir pruebas de apoyo para descartar *Ps. maltophilia*.

*Xanthomonas*, de significación patógena para el hombre muy poco clara, presenta dificultades diagnósticas a nivel de género que teóricamente hacen necesario recurrir al estudio del número de flagelos para su diferenciación. Digamos en este momento que en la definición que hemos dado al comienzo de *Pseudomonas* aerobios, va, por supuesto, incluido *Xanthomonas*. Más aún, según De Ley y colaboradores (7), *Xanthomonas* sería simplemente una especie más del género *Pseudomonas*. Así, pues, la diferenciación que consta a este respecto en el cuadro tiene bastante de artificiosa.

Cuando los bacilos no fermentativos pero sí oxidativos de la glucosa son además oxidasa-positivos, la posibilidad de confundir a *Pseudomonas* estriba fundamentalmente con el género *Flavobacterium*. En la práctica, sin olvidar el valor real del estudio de flagelos, la pigmentación



de todo este género limita dicha posibilidad sólo a las especies pigmentadas de *Pseudomonas*. El hecho de que todas éstas sean indol-negativas las separa fácilmente de *Flavobacterium*.

El segundo gran grupo lo integran aquellos que no oxidan la glucosa o lo hacen de forma débil. Dentro de él, y simplemente por ser oxidasa-negativo, podemos excluir *Acinetobacter* (concretamente, *A. lwoffii* o *Mima polymorpha*). Por el contrario, cuando esta prueba es positiva, hace que un buen procedimiento para distinguir entre una determinada especie del género *Alcaligenes* y un *Pseudomonas alcaligenes*, por ejemplo, implique la conveniencia y muchas veces la necesidad de un detenido estudio de flagelos, una vez comprobada su movilidad. Por su parte, ciertas propiedades, como pueden ser la dificultad de crecimiento, el requerimiento de medios especiales o la rápida alcalinización de la urea y algunas amidas, son propias de *Bordetella bronchiseptica*.

En el caso de que la movilidad sea negativa, podemos considerar que no nos encontramos ante un *Pseudomonas*, y el germen en cuestión pertenecerá posiblemente al género *Moraxella*, al grupo 3 de *Flavobacterium* (Pickett y Pedersen) o a la especie *Alcaligenes faecalis*. La diferenciación entre ellos y su confirmación definitiva no son propias de este trabajo.

Es pues en este segundo grupo donde se encuentran las mayores dificultades, debidas, naturalmente, a la pobreza de actividad que las especies de los diferentes géneros que lo integran muestran frente a los substratos más empleados en bacteriología clínica habitual.

## DESCRIPCION DE ESPECIES

Insistiremos una vez más en el carácter eminentemente práctico de esta exposición y en consecuencia convendremos en que algunas inexactitudes del cuadro 3 deben pasarse por alto en aras de una simplificación eficaz. Esto al margen de que en los resultados que se señalan no todos los autores están de acuerdo, siendo por ello importante realizar técnicas correctas y normalizadas para poder obtener datos comparables.

No de todas las especies citadas en el cuadro tenemos experiencia personal de laboratorio. La descripción resumida de sus características la hemos obtenido estudiando con detenimiento la bibliografía a nuestro alcance.

Cuadro 3. Algunos caracteres diferenciales entre *Pseudomonas* de interés clínico

	Número de flagelos	Fluorescencia o gluconato	LDC	Desnitrificación	SH <sub>2</sub>	Oxidación de la glucosa	Pigmento (fenazina)	42 °C	ADH	Gelatinasa	Inositol	Manitol	Lactosa	Fructosa
<i>Ps. aeruginosa</i>	1	+	-	+	-	+	✓	+	+	+	-	+	-	+
<i>Ps. fluorescens</i>	> 1	+	-	✓	-	+	✓	-	+	+	+	✓	✓	+
<i>Ps. putida</i>	> 1	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Ps. maltophilia</i>	> 1	-	+	-	-	+	-	✓	-	+	-	-	+	+
<i>Ps. cepacia</i>	> 1	-	+	-	-	+	✓	✓	-	+	+	+	+	+
<i>Ps. stutzeri</i>	1	-	-	+	-	+	-	✓	-	+	+	+	+	+
<i>Ps. pseudomallei</i>	> 1	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	✓	-	+
<i>Ps. mallei</i>	0	-	-	✓	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. putrefaciens</i>	1	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	✓	✓
<i>Ps. acidovorans</i> (*)	≥ 1	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	-	-	+
<i>Ps. alcaligenes</i> (*)	≥ 1	-	-	-	-	-	-	+	✓	✓	-	-	-	-

Flagelo(s): localización polar; V, variable; d, débil. (\*) Grupo integrado por especies muy próximas.

No consideramos oportuno en este momento, ni es nuestra misión, afirmar si realmente todas las especies que se indican son verdaderamente patógenas para el hombre. Hasta no hace demasiado tiempo ha sido clásico admitir a *Pseudomonas aeruginosa* como la única con este carácter. *Ps. mallei*, agente etiológico del muermo, ha sido incluido en el género *Pseudomonas* en un estudio de Readfearn y colaboradores (26), a pesar de su falta de flagelos. Posteriormente, esta situación taxonómica ha sido aceptada por diversos autores y rechazada por otros. El hecho de que lo hayamos incluido en este estudio, aún teniendo en cuenta su nula o escasa frecuencia, se debe a razones teóricas, e incluso podemos añadir que los argumentos que se esgrimen para incluir este germen dentro del género *Pseudomonas* no son en absoluto convincentes con los conocimientos que hoy poseemos. La inclusión de *Ps. pseudomallei* está fuera de duda, aunque geográficamente, por supuesto, no en nuestro medio, pero su clasificación como *Pseudomonas* ha estado mucho tiempo encubierta con denominaciones tales como *Loefflerella*, *Malleomyces*, *Pfeifferella pseudomallei*, etc. Hug y Ryschenkow (14) llaman la atención sobre la posible relación entre *Ps. maltophilia* y clínica humana. Gilardi (9) describe 22 cepas procedentes de muestras clínicas, 6 de las cuales dieron cultivo puro de *Ps. maltophilia* con aparente responsabilidad del proceso. Hace unos años, King (15) relacionó también con enfermedad a otra especie a la que denominó EO-1, conocida más tarde como *Ps. kingii* y considerada hoy por algunos como *Ps. multivorans* o *Ps. cepacia*.

Un breve resumen de la situación actual es lo que pretendemos con el cuadro 3.

Vemos en él 11 especies diferentes, si bien hemos de decir que *Pseudomonas acidovorans* y *Ps. alcaligenes* constituyen, para los fines de este cuadro, pequeños grupos, no muy bien conocidos y difíciles de separar, integrados por gérmenes con caracteres bioquímicos muy próximos. Así, por lo tanto, consideramos entre los débilmente sacarolíticos a *Ps. pseudoalcaligenes* y *Ps. vesiculare*, mientras que en los no sacarolíticos y junto con *Ps. alcaligenes*, podemos incluir *Ps. diminuta* y *Ps. testosteroni*, todos ellos, e incluso algunas otras especies no citadas, con significación clínica dudosa.

Prescindiendo del estudio de los flagelos y de la acción sobre la glucosa, ya empleadas a nivel de género, son convenientes otras 13 técnicas

más, aunque, como veremos al final, en la práctica todo puede reducirse considerablemente.

Fijémonos en los recuadros señalados con trazo continuo. En el primero se nos indica cómo la positividad de fluorescencia o de oxidación del gluconato la poseen exclusivamente 3 especies: *aeruginosa*, *fluorescens* y *putida*, las cuales integran el grupo conocido como fluorescente. Sin embargo, ello no quiere decir que siempre hayan de poseer ambas propiedades. Lo que sí es cierto es que toda cepa perteneciente a este grupo es positiva, cuando menos en una de ellas.

Para nosotros, sobre todo a nivel hospitalario, representa el grupo más frecuente, y sobre él volveremos a fin de comentar la manera de separar sus tres especies.

En un segundo grupo, meramente práctico, nos encontramos con los dos únicos *Pseudomonas* LDC-positivos: *maltophilia* y *cepacia*.

De las especies *pseudomallei* y *stutzeri* no puede decirse que posean en exclusiva un carácter. A pesar de ello, su clasificación puede obtenerse indirectamente por tratarse de *Pseudomonas* desnitrificantes que no pertenecen al grupo fluorescente. Señalemos que para excluir de este grupo a un *Pseudomonas* se requiere la negatividad, tanto de la fluorescencia como de la oxidación del gluconato.

*Pseudomonas mallei* es fácil de diferenciar, ya que su falta de flagelos, y en consecuencia su inmovilidad, en un *Pseudomonas* no fluorescente y LDC-negativo hace que aún al margen de su comportamiento variable en la desnitrificación se pueda, en el poco probable caso de encontrarnos frente a él, reconocerle sin dificultad. Otro tanto cabe decir de *Ps. putrefaciens*, cuyo carácter SH<sub>2</sub>-positivo es, en líneas generales, exclusivo de esta especie.

Finalmente, la débil o nula capacidad oxidativa de la glucosa nos llevará a pensar en *Pseudomonas* de grupo *acidovorans* o *alcaligenes*.

Así, pues, identificada una bacteria como perteneciente al género *Pseudomonas* y encuadrada en una primera orientación en el grupo mencionado, podemos, sin grandes dificultades, continuar su estudio hasta una identificación más exacta.

Para ello, en el grupo fluorescente, podremos mediante la comprobación de su capacidad de crecimiento a 42 °C separar *Pseudomonas aeruginosa*; la gelatinasa y el inositol nos servirán para diferenciar *Ps. fluorescens* de *Ps. putida*.

Entre *maltophilia* y *multivorans* pueden resultarnos útiles y de reali-

zación sencilla la acidificación del inositol y del manitol. *Pseudomonas multivorans* es oxidativa de ambos azúcares, mientras que *Ps. maltophilia*, no.

Las dos especies desnitrificantes no fluorescentes pueden distinguirse mediante el estudio del número de flagelos: uno, para *Pseudomonas stutzeri*, y varios, para *Ps. pseudomallei*; sin embargo, la utilización del inositol y de la lactosa, y más aún la argininadehidrolasa (ADH)-positiva de *Ps. pseudomallei*, nos permitirán completar la identificación en un plano más accesible.

La identificación de *Pseudomonas mallei* y *Ps. putrefacins* ya hemos visto cómo presenta caracteres especiales que las hacen fácilmente reconocibles.

Por último, las especies que integran los grupos *acidovorans* y *alcaligenes* resultan más difíciles de matizar. No obstante, creemos que con llegar a saber de una bacteria procedente de clínica humana, que es *Pseudomonas*, que es también débilmente o nada en absoluto sacarolítica, y mediante la prueba de fructosa tratamos de confirmar si estamos ante una perteneciente al grupo *acidovorans* (positivo) o *alcaligenes* (negativo), habremos dado un paso interesante en el aspecto etiológico de las infecciones por *Pseudomonas*.

La producción de pigmentos viene señalada en el *cuadro 3*, y sólo añadiremos que como característica clasificatoria solamente nos ha servido en ocasiones como un dato más. Por otra parte, de sus diferentes tipos, de su estudio e implicaciones teóricas, se trata ampliamente en la ponencia del Dr. Portolés, y a ella nos remitimos. Igualmente, el piocianotipo y su importancia diagnóstica y epidemiológica es tratada en otro lugar por el Prof. Gómez Lus.

Queremos terminar este capítulo diciendo, como ya lo hicimos al principio, y señalan perfectamente Hendrie y Shewan (13), que el procedimiento clasificatorio dicotómico es limitado y que en todas las especies mencionadas es el conjunto de pruebas lo que en realidad ha de servirnos.

Los autores citados señalan cómo, por ejemplo, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* pueden darse, entre otras, cepas con características tales como:

- 1) No móviles.
- 2) Fluorescentes, pero no productoras de piocianina.

- 3) Productoras de pigmento no difusible.
- 4) Formadoras de piorrubina y no de piocianina.
- 5) Inmóviles, fluorescentes y piocianina-negativas.
- 6) No móviles, fluorescentes y capaces de producir un pigmento semejante a la melanina.

#### TECNICAS Y VIAS DE DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO

Nos limitaremos simplemente a enumerar las técnicas que utilizamos, para después mostrar las vías y fases que llevamos en nuestro laboratorio.

Salvo en la prueba de capacidad de crecimiento a 42 °C, todas las demás han sido incubadas a  $36^{\circ} \pm 1$  °C.

*Movilidad.* Examen en gota pendiente e inoculación por picadura de un medio de agar semisólido. Se observa el cultivo a las 6, 24 y 48 h, teniendo en cuenta que la opacidad producida, caso de ser móvil, puede no ser intensa.

*Flagelos.* Tinción por el método de Rhodes (28). En determinadas ocasiones hemos necesitado la colaboración de Centros que disponen de microscopio electrónico.

*Oxidación de la glucosa.* Primero, en medio de King A (KIA), comprobación de los no fermentativos con el medio de Hugh y Leifson, modificado. En casos de duda o estudio creemos recomendable el uso de un medio base mineral tamponado.

*Oxidación de azúcares.* Medio O/F o medio base mineral tamponado con el azúcar en concentración final de un 1-2 %. Incubación, hasta 6 días.

*Oxidasa.* Según Kovacs (16).

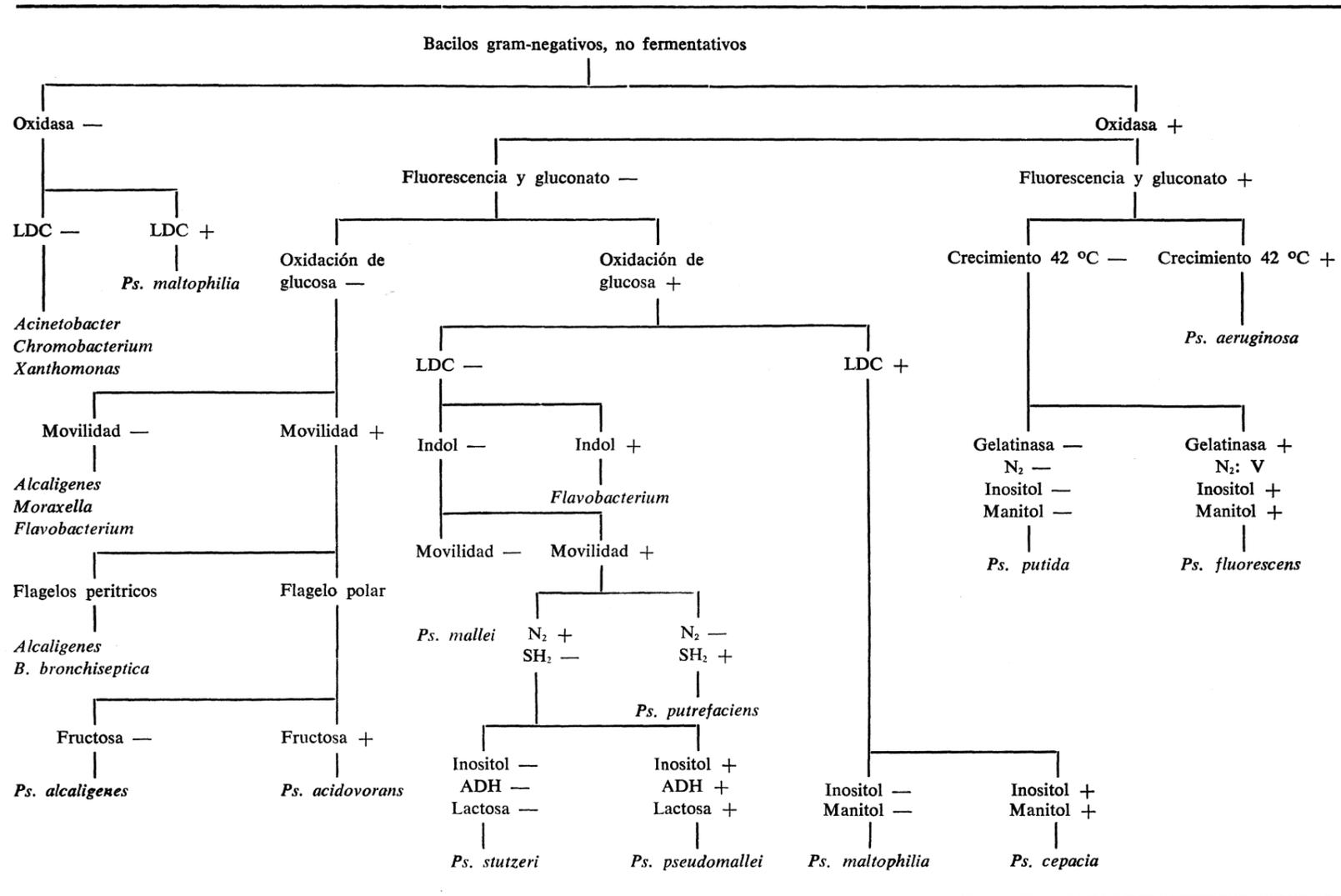
*Fluorescencia.* En medio de King B o en medio de Sellers, tras una incubación de 1-2 días (excepcionalmente pudo ampliarse hasta 4 días). Observación con luz ultravioleta a 366 m $\mu$  o con lámpara de Wood.

*Pigmento.* KIA. Tiempo de incubación, 24-48 h.

*Oxidación de gluconato.* Según Haynes (12). La técnica de Arai y colaboradores (1) puede ser ventajosa.

*Desnitrificación.* Consideramos a una cepa como desnitrificante cuando forma gas en medio de Sellers o en caldo de nitrato. Incubación, 1-4 días.

Cuadro 4. Vía de identificación de las especies de *Pseudomonas* y de géneros afines



*Crecimiento a 42 °C.* En caldo de triptona, incubado en baño termostático durante 48 h.

*LDC.* A partir de KIA, con discos del Instituto Pasteud, siguiendo las instrucciones de los fabricantes y/o según el método de Falkow.

*ADH.* Preferimos el medio de Thomley (33) empleando para cada cepa dos tubos, uno con vaselina estéril y otro sin ella. Incubación y lectura, 2-7 días.

*SH<sub>2</sub>.* Presencia en KIA.

*Gelatinasa.* Inoculación de gelatina nutritiva (12 %) e incubada de 1-14 días, con observación cada 48 h del cultivo, introduciéndolo en frigorífico durante 30 min.

*Indol.* En agua de triptona y reactivo de Kovacs.

## DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO

En el *cuadro 4* veremos mejor algo de lo que podemos hacer para llegar a las especies descritas.

Para ello necesitamos los pasos o fases siguientes: un primer paso en el que simplemente a partir de una colonia pura correspondiente a un bacilo gram-negativo se inocula un KIA, incubándolo a 36 °C durante 24 h. Con las características del crecimiento, la oxidasa y la LDC se puede, al margen de separar otros géneros, llegar ya a *Pseudomonas maltophilia*. Identificación que podemos ratificar con una investigación de requerimiento de metionina.

En el caso de que el KIA revele la presencia de un germen no fermentativo, pero oxidasa-positivo, es necesario pasar a una nueva fase, pudiendo, según parezca, hacer o no en este momento una LDC.

La segunda fase consta de la inoculación de los medios siguientes: King B, gluconato, KIA (facultativo), O/F modificado, triptona (42 °C) y nitratos. Con el resultado de estas pruebas se diferencia *Pseudomonas aeruginosa*, quedándose con cuatro vías, las cuales constituyen la tercera y última fase.

1.<sup>a</sup> Fluorescencia y/o gluconato: +; 42 °C; —; O/F: +/—; N<sub>2</sub>: + ó —: inoculación de inositol, manitol y gelatina. Las tres pruebas positivas corresponden a *Pseudomonas fluorescens*; negativas, a *Ps. putida*.

2.<sup>a</sup> Fluorescencia y gluconato: —; O/F: +/—; LDC: +. Inoculación de inositol y manitol. Cepas positivas a las dos pruebas: *Pseudomonas cepacia*; negativas, *Ps. maltophilia*.

3.<sup>a</sup> Fluorescencia y gluconato: —; O/F: +/—; LDC: —; N<sub>2</sub>: + ó —. Inoculación de agua de triptona (indol), ADH, inositol y lactosa. La positividad del indol excluye *Pseudomonas*. Su negatividad, junto con la falta de movilidad, nos llevan a *Ps. mallei*. Si, por el contrario, la bacteria es móvil, produce SH<sub>2</sub> (KIA) y N<sub>2</sub> es negativa, significa *Ps. putrefaciens*. Finalmente, gérmenes con los caracteres citados en esta tercera vía, cuyo N<sub>2</sub> sea positivo y el inositol, ADH y lactosa negativos, se tratará de *Ps. stutzeri*. La misma vía, pero con las tres últimas pruebas positivas, equivalen a *Ps. pseudomallei*.

4.<sup>a</sup> Fluorescencia y gluconato: —; O/F: débil/— ó —/—; LDC: —; N<sub>2</sub>: —. Inoculación de fructosa y estudio de flagelos. La disposición peritrica de éstos descarta *Pseudomonas*. Su polaridad y fructosa +, indica *Ps. acidovorans*; polaridad y fructosa —, *Ps. alcaligenes*.

## RESUMEN

Basados en una amplia revisión bibliográfica y, en parte, en su propia experiencia, los autores proponen con fines de utilidad en microbiología clínica: a) los caracteres básicos del género *Pseudomonas*; b) el esquema diferencial con los géneros afines; c) el estudio comparativo de 15 propiedades en 11 especies más o menos vinculadas a procesos clínicos, que permiten su pronta clasificación en 4 grupos fundamentales; d) vía de identificación.

Se describen las técnicas y se hace énfasis sobre la necesidad de unificar métodos y de un empleo e interpretación correctos de los mismos.

## SUMMARY

### *Identification of Pseudomonas of clinical importance*

Based on a bibliographic review and on the experience of the authors, they present: a) the basic characters of the genus *Pseudomonas*; b) the differential scheme of the related genera; c) a comparative study of 15

properties in 11 species involved in clinical processes which can be quickly classified in 4 different main groups; d) identification key.

Techniques are described and the authors emphasize the need of unification of methods.

### BIBLIOGRAFIA

1. ARAI, T.; ENOMOTO, S., and KUWAHARA, S. 1970. Determination of *Ps. aeruginosa* by biochemical test. I. An improved method for gluconate test. Jap. J. Microbiol., 14, 49.
2. BREED, R. S.; MURRAY, E. D. G., and SMITH, N. R. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Company, Baltimore.
3. BRISOU, J. 1957. Contribution a l'étude de la systématique des Pseudomonada-ceae. Ann. Inst. Pasteur, 93, 397.
4. COLWELL, R. R., and LISTON, J. 1961. Taxonomic relationships among the pseudomonads. J. Bacteriol., 82, 1.
5. DAILEY, R. H., and BERMER, E. J. 1968. Necrotizing pneumonitis due to the pseudomonad "eugonic oxidizer-group 1" N. Engl. J. Med., 279, 361.
6. DE LEY, J. 1964. *Pseudomonas* and related genera. Annu. Rev. Microbiol., 18, 17.
7. DE LEY, J.; PARK, I. W.; TIJTGAT, R., and Van ERMENGEM, J. 1966. DNA homology and taxonomy of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. J. Gen. Microbiol., 42, 56.
8. GARDNER, P.; GRIFFIN, W. B.; SWARTZ, N. N., et al. 1970. Nonfermentative Gram negative bacilli of nosocomial interest. Amer. J. Med., 48, 735.
9. GILARDI, G. L. 1969. *Pseudomonas maltophilia* infections in man. Amer. J. Clin. Pathol., 51, 58.
10. GILARDI, G. L. 1971. Characterization of *Pseudomonas* species isolated from clinical specimens. Appl. Microbiol., 21, 414.
11. GILARDI, G. L. 1972. Infrequently encountered *Pseudomonas* species causing infection in humans. Ann. Intern. Med., 77, 211.
12. HAYNES, W. C. 1951. *Pseudomonas aeruginosa* its characterization and identification. J. Gen. Microbiol., 5, 939.
13. HENDRIE, M. S., and SHEWAN, J. M. 1968. The identification of certain *Pseudomonas* species. En B. M. GIBBS and F. A. SKINNER. Identification Methods for Microbiologists, part A. Academic Press.
14. HUGH, R., and RYSCHENKOW, E. 1961. *Pseudomonas maltophilia*, and *Alcaligenes* like species. J. Gen. Microbiol., 26, 123.
15. KING, E. O. 1959. Studies on a group of a previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants. Amer. J. Clin. Pathol., 31, 241.
16. KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178, 703.

17. LIU, P. V. 1969. Analytical serology of pseudomonadaceae. En KWAPINSKI. Analytical Serology of Microorganisms, vol. 2. Interscience Publishers.
18. LYSENKO, O. 1961. *Pseudomonas*. An attempt at a general classification. J. Gen. Microbiol., 25, 379.
19. PEDERSEN, M. M.; MARSO, E., and PICKETT, M. J. 1970. Nonfermentative bacilli associated with man. III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. Amer. J. Clin. Pathol., 54, 178.
20. PICKETT, M. J., and MANCLARK, C. R. 1970. Nonfermentative bacilli associated with man. I. Nomenclature. Amer. J. Clin. Pathol., 54, 155.
21. PICKETT, M. J., and PEDERSEN, M. N. 1970. Nonfermentative bacilli associated with man. II. Detection and identification. Amer. J. Clin. Pathol., 54, 164.
22. PICKETT, M. J., and PEDERSEN, M. M. 1970. Characterization of sacharolytic nonfermentative bacteria associated with man. Can. J. Microbiol., 16, 351.
23. PICKETT, M. J., and PEDERSEN, M. M. 1970. Characterization of nonsacharolytic and weakly sacharolytic bacteria associated with man. Can. J. Microbiol., 16, 401.
24. PHILIPS, I.; EYKEN, S., and CURTIS, M. A. 1971. *Pseudomonas cepacia* (multi-vorans) septicaemia in an intensive-care unit. Lancet, 1, 375.
25. PREVOT, A. R. 1961. Traité de Systematique Bactérienne. Paris, Dunod.
26. READFEARN, M. S.; PALLERONI, N. J., and STANIER, R. Y. 1966. A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei*. J. Gen. Microbiol., 43, 293.
27. RHODES, M. E. 1958. The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. J. Gen. Microbiol., 18, 639.
28. RHODES, M. E. 1959. The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. J. Gen. Microbiol., 21, 221.
29. SHEWAN, J. M.; HOBBS, G., and HODGKISS, W. 1960. A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. J. Appl. Bacteriol., 23, 379.
30. STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J., and DOUDOROFF, M. 1966. The aerobic pseudomonads. A taxonomic study. J. Gen. Microbiol., 43, 159.
31. SUTTER, V. L. 1968. Identification of *Pseudomonas* species isolated from hospital environment and human sources. Appl. Microbiol., 16, 1532.
32. THORNLEY, M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bacteriol., 23, 37.
33. VON GRAEVENITZ, A. 1965. *Pseudomonas stutzeri* isolated from clinical specimens. Amer. J. Clin. Pathol., 43, 357.
34. VON GRAEVENITZ, A., and SIMON, G. 1970. Potentially pathogenic, nonfermentative, H<sub>2</sub>S-producing, Gram negative rod (1b). Appl. Microbiol., 19, 176.

FACULTAD DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

## ENUMERACION Y CARACTERIZACION DE LA FLORA DESNITRIFICANTE QUIMIOORGANOTROFA EN UNA PRADERA EXPERIMENTAL

por

J. VIVES y R. PARÉS

### INTRODUCCION

El Departamento de Fisiología Vegetal y Edafología, de la Facultad de Ciencias de Barcelona, controla la producción vegetal, el abonado y el nitrato perdido con las aguas de drenaje (recogidas en cajas lisimétricas) de una pradera experimental de *Lolium perenne*. El contenido inicial de materia orgánica existente en el suelo era del orden del 5 % (C/N = 14). El nitrógeno de la planta, junto con el recogido en forma de nitrato en los lisímetros, representaba una cifra igual a la suministrada con el abonado. Es decir, que el rico substrato orgánico del suelo no parecía haber suministrado nitrógeno, cuando por las condiciones del ensayo se esperaba una cifra semejante a la del abonado. Dicho déficit podía ser debido a pérdidas por desnitrificación, o bien por inmovilización en el suelo, aunque esta última posibilidad fuese menos probable.

Las finalidades iniciales de este trabajo fueron la evaluación a lo largo del tiempo de la flora desnitrificante que fuese responsable de la posible desnitrificación bacteriana en estos suelos y su caracterización.

## MATERIAL Y METODOS

### *1. La pradera experimental*

La pradera objeto de estudio está situada en los campos experimentales de la Facultad de Ciencias. El Departamento de Fisiología Vegetal y Edafología la utiliza para estudios de producción y ritmos. Está sembrada con ballico (*Lolium perenne*) desde 1966. Las características físicas, químicas, geológicas y climáticas de la plantación, abonado y cosecha se han expresado previamente (12).

### *2. Las enumeraciones viables*

Se ha enumerado la flora desnitrificante quimioorganótrofa empleando el método del número más probable (6). El medio de enriquecimiento empleado ha sido el medio DPS (16), entubándose a razón de 2,5 ml/tubo (10 × 120 mm). Se incuban a 30 °C, durante una semana. La anaerobiosis se consigue por medio de un tapón de agar, añadido previa inoculación. La acumulación de gas debajo del tapón se considera como signo positivo para la presencia de bacterias desnitrificantes. La flora aerobia total viable se enumera sobre placas de agar ordinario a 30 °C, durante 4 días.

### *3. Estudios estadísticos*

Se han representado los valores de desnitrificantes quimioorganótrofos a lo largo del tiempo, aplicando el intervalo de confianza correspondiente a las características de la enumeración, 2,32 (10). Los estudios de ritmicidad se han llevado a cabo en términos de autocorrelación serial (2).

### *4. Caracterización sistemática*

Las pruebas sistemáticas empleadas han sido: morfología, gram, esporas oxidásicas, motilidad, acidificación y gas a partir de glucosa y lactosa, O/F, agar cetrimide al 0,03 %, crecimiento a 4 °C y 41 °C, fluorescencia, piocianina, gelatina, lecitinasa. Para los criterios de clasificación empleados véanse citas 7, 11 y 13-14.

## 5. Determinación de la desnitrificación

Se determina la capacidad desnitrificante específica de algunas de las cepas aisladas emplando microrrespirómetros de Warburg (15).

## RESULTADOS

Los valores obtenidos de la flora desnitrificante quimioorganótrofa se expresan en la *figura 1*. Los valores máximos, mínimos y promedios, expresados en número de bacterias/g de suelo, son los siguientes: año 1968: valor máximo,  $10^7$ ; valor mínimo, 23.000; valor promedio, 1.278.000; año 1969: valor máximo,  $10^9$ ; valor mínimo, 13.000; valor promedio, 7.915.200; año 1970: valor máximo, 702.000; valor mínimo, 500; valor promedio, 94.272.

Los valores de autocorrelación serial obtenidos se expresan en el *cuadro 1*. El mayor coeficiente (0,4461) corresponde a un período de 100 días. La oscilación estacional manifiesta un máximo en primavera y otoño de 1968, invierno, verano y otoño de 1969, compatibles con este resultado estadístico.

*Cuadro 1. Coeficientes de autocorrelación ( $C_t$ ) de la evolución temporal de la flora desnitrificante quimioorganótrofa*

$C_t$	k	Período (días)
1,0000	0	0
0,0669	1	20
— 0,0196	2	40
— 0,0202	3	60
— 0,0215	4	80
0,4461	5	100
0,0071	6	120
— 0,0374	7	140
— 0,0904	8	160
— 0,0988	9	180

Período = pk, siendo p, 20 días, y k, 1, 2, 3, ..., n.



Se ha verificado que la positividad en los tupos de DPS es dependiente del inóculo, del desarrollo bacteriano y de la presencia de nitratos. Se ha verificado que la flora aerobia quimioorganótrofa enumerada sobre placas, se mantiene por encima de la flora desnitrificante, representando ésta un 90-99 % de los valores de aquélla.

Se han aislado cepas de bacterias desnitrificantes a partir de los últimos tubos positivos de los recuentos por el número más probable. Se verifica la capacidad desnitrificante de las cepas aisladas en tubos de DPS. Paralelamente se han realizado aislamientos de otros tipos de complejos suelo-vegetación, por el mismo método. La identificación del conjunto de cepas aisladas se expresa en el *cuadro 2*. Destaca el alto porcentaje de *Achromobacter* sp. desnitrificantes, respecto a los miembros del género *Pseudomonas* desnitrificantes encontrados. Asimismo, cabe resaltar la homogeneidad taxonómica del grupo de desnitrificantes aislados de diferentes orígenes y la ausencia de algunos desnitrificantes clásicos, como *Micrococcus desnitrificans*, y de fermentadores (un solo caso entre estos últimos). Ello puede atribuirse a la especificidad del medio empleado para el aislamiento; un suplemento en azúcares posiblemente hubiese favorecido el enriquecimiento de fermentadores.

*Cuadro 2. Identificación y origen de las cepas desnitrificantes aisladas*

Origen	Aislamiento	Sigla	Identificación
Pradera experimental de <i>Lolium perenne</i> (P. E.)	1	D-1	<i>Achromobacter</i>
	2	D-2	<i>Achromobacter</i>
	3	D-3	<i>Achromobacter</i>
	4	D-4	<i>Achromobacter</i>
	5	D-5	<i>Achromobacter</i>
	6	D-6	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	7	D-7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	8	D-8	<i>Achromobacter</i>
	9	D-9	<i>Achromobacter liquefaciens</i>
	10	D-10	<i>Achromobacter</i>
	11	D-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	12	D-12	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	13	D-13	<i>Achromobacter</i>
	14	D-15	<i>Achromobacter</i>
	15	D-16	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Cuadro 2 (continuación)

Origen	Aislamiento	Sigla	Identificación
	16	D-17	<i>Achromobacter</i>
	17	D-18	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	18	D-19	<i>Achromobacter</i>
	19	D-20	(suprimida)
	20	D-22	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	21	D-30	<i>Ps. putida</i>
	22	D-32	<i>Achromobacter</i>
Pradera jardín del Parque de la Ciudadela, de Barcelona	23	D-33	<i>Bacillus licheniformis</i>
	24	D-34	<i>Achromobacter</i>
	25	D-35	<i>Pseudomonas</i>
	26	D-36	<i>Pseudomonas</i>
	27	D-37	<i>Pseudomonas</i>
	28	D-38	<i>Pseudomonas</i>
	29	D-39	<i>Pseudomonas</i>
	30	D-40	<i>Pseudomonas</i>
	Pradera jardín "Eduardo Marquina", de Barcelona (P. E. M.)	31	D-41
32		D-42	<i>Achromobacter</i>
33		D-43	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
34		D-44	<i>Alcaligenes faecalis</i>
35		D-45	<i>A. faecalis</i>
36		D-46	<i>Achromobacter</i>
Parque de la Rosaleda, de Barcelona	37	D-47	<i>Pseudomonas putida</i>
	38	D-48	<i>Ps. putida</i>
	39	D-49	<i>Ps. putida</i>
	40	D-50	<i>Achromobacter</i>
	41	D-51	<i>Achromobacter</i>
	42	D-52	<i>Achromobacter</i>
Viña en el kilómetro 25 de la carretera de Villanueva a Geltrú (Barcelona) (V. 25)	43	D-53	<i>Pseudomonas</i> (oxid.-)
	44	D-54	<i>Achromobacter</i>
	45	D-55	<i>Escherichia coli</i>
	46	D-56	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Cuadro 2 (conclusión)

Origen	Aislamiento	Sigla	Identificación
Viña en San Cugat del Vallés (Barcelona)	47	D-58	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	48	D-59	<i>Ps. fluorescens</i>
	49	D-60	<i>Pseudomonas</i>
Bosque de San Feliu de Codina (Barcelona)	50	D-61	<i>Pseudomonas</i> (oxid.-)
Pradera experimental de <i>Lolium perenne</i> (P. E.)	51	AM-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	52	AM-2	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	53	AM-3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	54	AM-6	<i>Ps. fluorescens</i>
	55	AM-7	<i>Achromobacter</i>
	56	AM-8	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	57	AM-9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Viña en el kilómetro 25 de la carretera de Villanueva a Villanueva y Geltrú (Barcelona) (V. 25)	58	AM-12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	59	AM-13	<i>Achromobacter</i>
	60	AM-14	<i>Achromobacter</i>
Pradera experimental de <i>Lolium perenne</i> (P. E.)	61	AM-1.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	62	AM-5.2	<i>Achromobacter</i>
Hospitalario	63	Ps-192	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Jardín de la Universidad de Barcelona (J. U.)	64		<i>Ps. azotogensis</i> CCB 1568
	65		<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750
	66		<i>Achromobacter liquefaciens</i> ATCC 15716
Viña en el kilómetro 25 de la carretera de Villanueva a Villanueva y Geltrú (Barcelona) (V. 25)	67	AM-15	<i>Pseudomonas</i>
Viña en San Cugat del Vallés (Barcelona)	68	AM-16	<i>Achromobacter</i>

Se valora la potencia desnitrificante *in vitro* de algunas de las cepas aisladas. Los resultados se expresan en los cuadros 3-4. La cepa *Pseudomonas fluorescens* D-42 ha evidenciado una capacidad desnitrificante superior al resto de las ensayadas. Por el contrario, *Pseudomonas aeruginosa* D-11 ha presentado una actividad desnitrificante sensiblemente inferior a las demás cepas estudiadas.

Cuadro 3. Estima cuantitativa de la actividad desnitrificante de distintas cepas bacterianas aisladas del suelo. Experiencias a largo plazo

Cepa	Origen	Peso seco mg	Nitrógeno $\mu$ l	Minutos	$Q_{N_2}$	$D_r$
D-11 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P.E.	1,30	268	510	0,40	20
D-11 <i>Ps. aeruginosa</i>	P.E.	1,60	201	245	0,51	26
CCB 1568 <i>Ps. aeruginosa</i>	J.U.	1,35	214	210	0,76	39
D-42 <i>Achromobacter</i>	P.E.M.	0,50	118	130	1,80	92
D-42 <i>Achromobacter</i>	P.E.M.	0,60	268	230	1,94	100
AM-14 <i>Achromobacter</i>	V. 25	1,60	255	185	0,86	44
D-54 <i>Achromobacter</i>	V. 25	2,10	279	130	1,00	51

$Q_{N_2}$  = microlitros de nitrógeno/minuto y miligramo de peso seco.  $D_r$  = desnitrificación relativa con respecto a la cepa de mayor producción tomada como 100.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

La flora desnitrificante detectada y aislada presenta unos valores notables en la pradera experimental, comparativamente con los resultados obtenidos en otros suelos estudiados. Las oscilaciones estacionales de

Cuadro 4. Estima cuantitativa de la actividad desnitrificante de distinta cepas bacterianas aisladas del suelo. Experiencias a corto plazo

Cepa	Origen	Peso seco mg	Nitrógeno $\mu$ l	Minutos	$Q_{N_2}$	$D_r$
D-42 <i>Achromobacter</i>	P.E.M.	160,00	274	15	0,11	100
D-2 <i>Pseudomonas</i>	P.E.	58,00	35	60	0,09	78
CCB 1568 <i>Ps. azotogensis</i>	J.U.	115,80	193	30	0,05	48
D-56 <i>Ps. fluorescens</i>	V. 25	16,21	35	60	0,03	31

la pradera experimental, especialmente en los años 1968 y 1969, parecen claramente significativos, aunque a la vista de los resultados anteriores y posteriores a estas fechas no es pensable que tengan una precisa repetitividad.

Es creíble que dicha flora juegue un papel no despreciable en las pérdidas de nitrógeno por desnitrificación y en consecuencia en el balance general del mismo, como ya se ha citado por otros autores (4, 5 y 9).

Desde el punto de vista sistemático, la flora aislada queda caracterizada por los *Achromobacter*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes faecalis*, en orden decreciente de importancia numérica. El conjunto de cepas aisladas representa un grupo homogéneo y convergente por lo que a sus características sistemáticas y culturales se refiere. Utilizando la misma pradera experimental a lo largo de los años 1968, 1969 y 1970, Simón (12) ha encontrado que las oscilaciones de la producción vegetal se corresponden inversamente a las concentraciones de nitratos lisimétricos. Las oscilaciones de desnitrificantes encontradas por nosotros, se corresponden directamente a las curvas de producción vegetal e inversamente a las concentraciones de nitratos lisimétricos, a lo largo del período de estudio reseñado. Esta correspondencia es coherente con el hecho de que el desarrollo de la planta es concomitante con una potenciación de la flora del suelo (1). Por otro lado, se ha admitido reiteradamente la posible

influencia de la flora desnitrificante sobre la concentración de nitratos en el suelo, independientemente de la repercusión del desarrollo de la planta sobre los mismos (3, 8 y 9).

### RESUMEN

Se han realizado recuentos de bacterias quimioorganótrofas a lo largo de más de 2 años, en una pradera experimental de *Lolium perenne*. Empleando métodos estadísticos de autocorrelación serial, se han detectado oscilaciones de unos 100 días en la población bacteriana.

La flora desnitrificante aislada se ha identificado como *Achromobacter* y *Pseudomonas* en la mayor parte de los casos. El papel de este tipo de bacterias es objeto de discusión.

### SUMMARY

*Count and identification of chemoorganotrophic denitrifying bacteria in an experimental field*

Counts of chemoorganotrophic denitrifying bacteria in an experimental field (*Lolium perenne*), have been made along 2 years. Oscillations of around 100 days have been detected using autocorrelation statistical methods.

The denitrifying isolated bacteria, has been identified as *Achromobacter* and *Pseudomonas* in most of the cases. The role of these bacteria in the natural denitrification of these soils is discussed.

### BIBLIOGRAFIA

1. BALLONI, W., et MATERASSI, R. 1966. Recherches sur l'influence des engrais chimiques sur la microflore du sol. Ann. Inst. Pasteur, 111, 39-48.
2. BLACKMAN, R. B., and TUKEY, J. W. 1959. The Measurement of Power Spectra. Manual S.S.P. FØRTRAN IBM-360. 360-A-CM-03X. Versión III. Dover Publications Inc., Nueva York.
3. BURFORD, J. R., and STEFANSON, R. C. 1973. Measurements of gaseous losses of nitrogen from soils. Soil Biol. Biochem., 5, 133-41.

4. FIRTH, P.; HANSA, T.; SUMALEE, S.; WETSELAAR, R., and BEECH, D. F. 1973. Nitrogen balance studies in the central plain of Thailand. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 41-46.
5. GESSEL, S. P.; COLE, D. W., and STEINBRENNER, E. C. 1973. Nitrogen balances in forest ecosystems of the Pacific northwest. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 19-34.
6. HALVORSON, H. O., and ZIEGLER, N. R. 1933. Application of statistics to problems in bacteriology. I. A means of determining bacterial population by the dilution method. *J. Bacteriol.*, 25, 101-21.
7. HENDRIE, M. S., and SHEWAN, J. M. 1966. The identification of certain *Pseudomonas* species. En B. M. GIBBS and F. A. SKINNER. *Identification Methods for Microbiologists*, part A. Academic Press, London and New York.
8. MCGARITY, J. W., and MYERS, R. J. K. 1968. Denitrifying activity in solodized solonetz soils of Eastern Australia. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 32, 812-17
9. MCGARITY, J. W., and RAJARATNAM, J. A. 1973. Apparatus for the measurement of losses of nitrogen as gas from the field and simulated field environments. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 121-31.
10. MEYNELL, M. D., y MEYNELL, E. 1969. *Bacteriología Experimental. Teoría y Práctica*. Editorial Omega, Barcelona.
11. MOORE, H. B., and PICKETT, M. J. 1960. The *Pseudomonas-Achromobacter* group. *Can. J. Microbiol.*, 6, 35-42.
12. SIMÓN, E. 1972. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona.
13. SKERMAN, V. B. D. 1967. *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
14. STANIER, R. Y.; PALLERON, N. J., and DOUDOROFF, M. 1966. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43, 159-271.
15. UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H., and STAUFFER, J. F. 1959. *Manometric Techniques*. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
16. VIVES, J., y PARÉS-FARRÁS, R. 1969. Desnitrificació bacteriana en un prat experimental. *Trab. Soc. Cat. Biol.*, 27, 101-7.

FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA (C S I C)

## LOCALIZACION Y LIBERACION DE FOSFATASA ALCALINA DEL *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

por

V. MORALES, P. DÍAZ-RUBIO, C. GARCÍA DEL AMO y A. SANTOS-RUIZ

### INTRODUCCION

La localización y liberación de la fosfatasa alcalina (genuina cinc-enzima) es problema que se nos presentó al estudiar su biosíntesis, en cultivos de *Pseudomonas fluorescens*, que crecían en distintos medios, incluidos aquellos que contenían Zn-65 como marcador (13). Esto nos llevó a revisar la bibliografía sobre los métodos empleados por otros investigadores, pues así como el problema de localización de enzimas en las bacterias gram-positivas parece resuelto, no ocurre lo mismo con las gram-negativas, dentro de cuyo grupo está incluido nuestro microorganismo. Tanto las técnicas empleadas como los resultados obtenidos son dispares. Heppel (7) y sus colaboradores informan haber conseguido obtener mezclas de paredes y membranas que retienen varias enzimas, mientras que otras no parecen estar enlazadas a las mismas, sino, más bien, situadas en un espacio periplasmático comprendido entre la pared y la membrana y son liberadas al transformar las células en esferoplastos.

La mayor parte de los trabajos se han realizado sobre *Escherichia coli*, primero por Malamy y Horecker (11) y posteriormente por Brockman y Heppel (1). Este mismo autor consigue, mediante la formación de esferoplastos, separar a las enzimas de diferentes bacterias gram-negativas en dos grupos: las que se liberan al formarse dichos esferoplas-

tos, al actuar la lisozima y el EDTA sobre ellos; y las no liberables por este método. La fosfatasa alcalina, según él, está incluida en el primer grupo.

Cheng y colaboradores (2) abordan este mismo problema en *Pseudomonas aeruginosa*, pero los esferoplastos los forman sin la intervención del EDTA, empleando lisozima en sacarosa al 20 %, para evitar la ruptura de la membrana citoplasmática (6), y aseguran un rendimiento del 100 % en fosfatasa alcalina liberada, al formarse los esferoplastos. Cheng y colaboradores informan en otro trabajo (3), que en el caso del *Ps. aeruginosa* se puede conseguir una buena liberación de fosfatasa alcalina, mediante simple lavado, del sedimento celular con soluciones salinas que contengan cationes mono y divalentes a concentración variable; el rendimiento depende de la fuerza iónica de estas soluciones de lavado.

Como ambos trabajos de Cheng son los únicos encontrados por nosotros, sobre un microorganismo del género *Pseudomonas*, nos pareció interesante aplicar ambas técnicas al *Ps. fluorescens*, ya que sobre este microorganismo habíamos obtenido resultados negativos al aplicar otras técnicas, tales como el choque osmótico, descrito por Neu y Hepfel (14).

## MATERIAL Y METODOS

### *Material biológico*

Se ha utilizado para todas las experiencias *Pseudomonas fluorescens*, estirpe CECT-378 = ATC 13.525.

### *Medio de cultivo*

El medio de cultivo utilizado ha sido el de Levinthal (11) modificado por nosotros, en el sentido de variar la cantidad de peptona, hasta comprobar un mayor rendimiento (1 % de peptona) y añadir cantidades de  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  o  $\text{Cl}_2\text{Zn-65}$  en proporción suficiente para alcanzar una concentración de  $2 \times 10^{-6}$  M en ion  $\text{Zn}^{++}$  en el medio (13).

### *Valoración de la fosfatasa alcalina*

La reacción utilizada para valorar la fosfatasa alcalina se basa en la medida espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado, al actuar la enzima

la medida espectrofotométric del p-nitrofenol liberdo, al actuar la enzima sobre el p-nitrofenilfosfato que se usa como sustrato según el método de Dorn (5), y que ha sido modificado por nosotros en trabajos anteriores (12). Como *unidad de actividad* enzimática se ha tomado la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol en 1 h.

La actividad enzimática específica se expresa en unidades de actividad enzimática/mg de proteína, determinadas por el método de Lowry y sus colaboradores (9).

#### Liberación de la enzima

El paquete celular, obtenido por centrifugación del cultivo a 8.500 r/m durante 20 min, fue sometido a las diferentes operaciones de extracción y liberación de la enzima como se muestra en la *figura 1*, siguiendo la metódica que a continuación se indica.

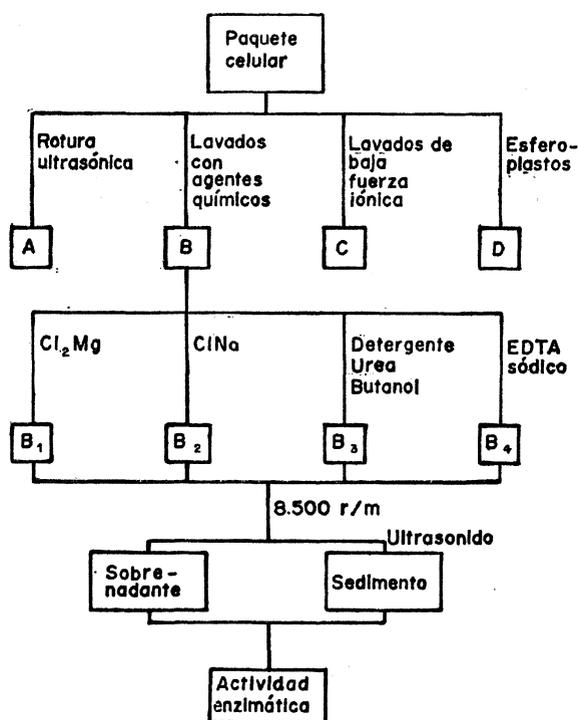


Figura 1. Esquema de la liberación de la fosfatasa alcalina

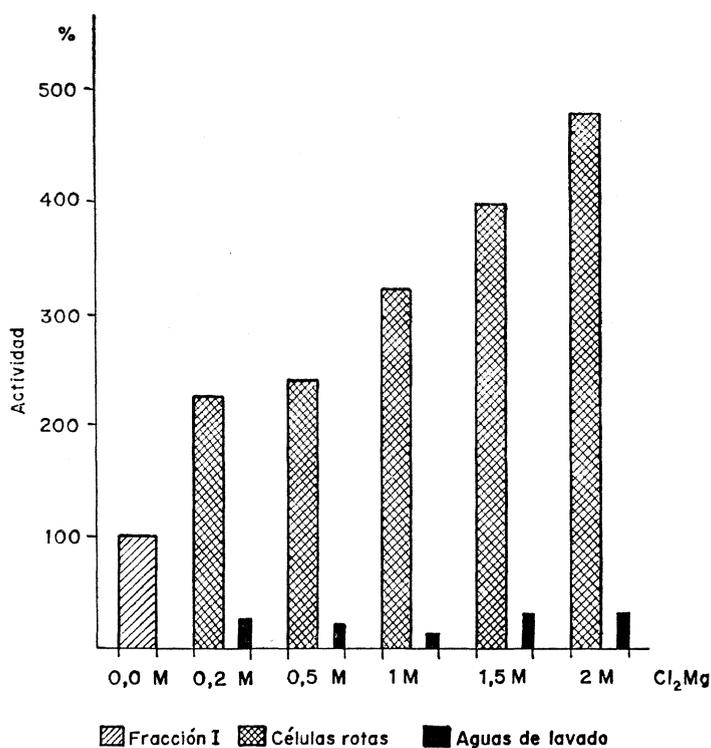
Designamos como fracción I, en dicha figura, al sobrenadante que resulta de separar por centrifugación a 15.000 r/m las paredes celulares de la totalidad de las células del cultivo, rotas por el desintegrador ultrasónico MSE, en las condiciones óptimas de rendimiento (12).

*A) Ruptura por ultrasonido*

Esta técnica se utilizó sistemáticamente para la liberación total de enzimas, y la cifra resultante sirve de base para comparar los valores obtenidos por otros procedimientos. Las condiciones óptimas de rendimiento son 2 min a 1,5 A en un volumen de 5 ml (13).

*B) Lavados con agentes químicos*

*B<sub>1</sub>) Liberación de la enzima por lavados con cloruro magnésico.* Según la técnica de Cheng (3), el paquete celular se sometió a lavados



*Figura 2. Actividad de fosfatasa alcalina de células lavadas con cloruro magnésico respecto al control*

con solución de cloruro magnésico al 0,2 M, los resultados fueron negativos, se aplicaron soluciones de concentración creciente hasta 2 M, sin conseguir la liberación de cantidades significativas de fosfatasa alcalina; como puede verse en la figura 2.

B<sub>2</sub>) *Liberación por lavados con cloruro sódico.* Se repitió la prueba anterior utilizando soluciones de cloruro sódico desde 0,5 M hasta 3 M, sin resultados positivos en cuanto a la liberación de la enzima. Los resultados están recogidos en la figura 3.

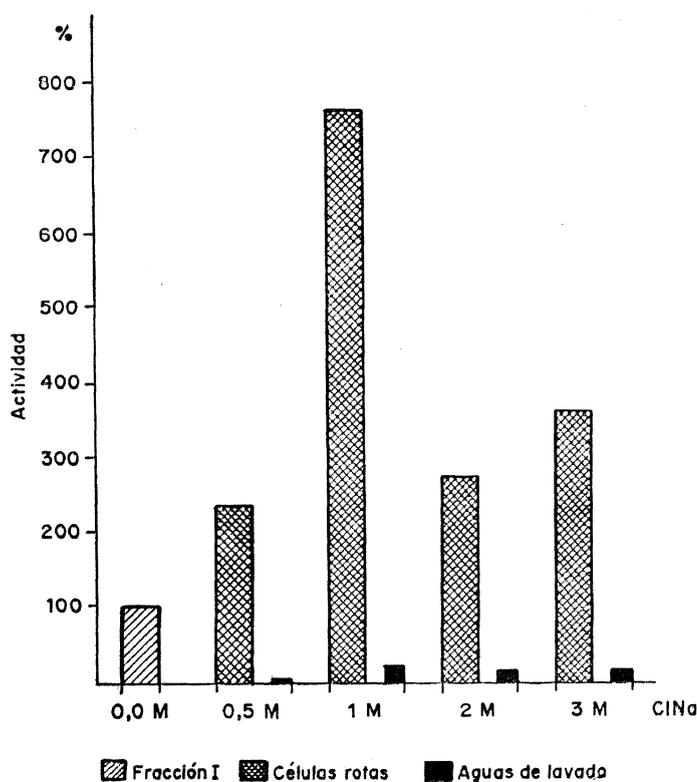


Figura 3. Actividad de fosfatasa alcalina en células lavadas con cloruro sódico respecto al control

B<sub>3</sub>) *Liberación de la enzima por lavados de lauril-sulfato sódico, urea y butanol.* Estas pruebas se realizaron en las mismas condiciones básicas que las correspondientes a los apartados anteriores, utilizando

las concentraciones siguientes: lauril-sulfato sódico, 0,1 %; urea, 8 M, y butanol, hasta igualar el volumen primitivo. Los resultados vienen expresados en la figura 4.

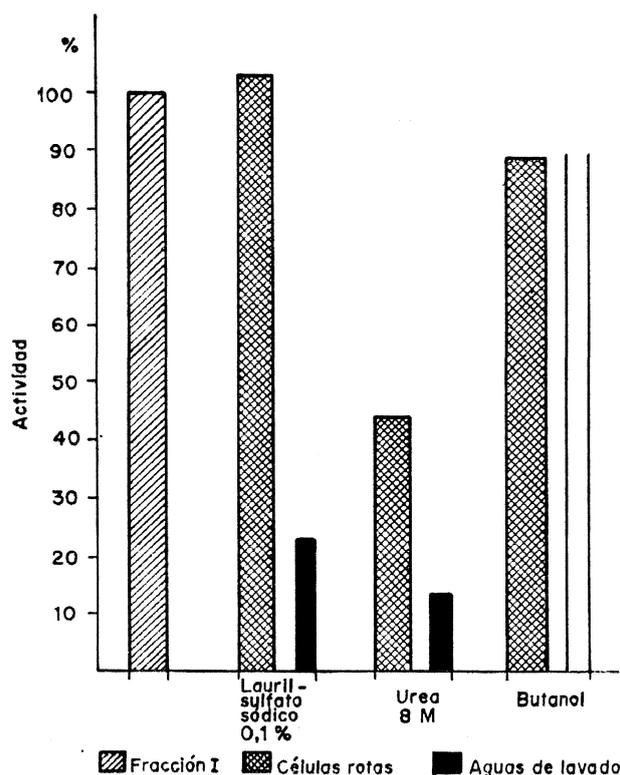


Figura 4. Actividad de fosfatasa alcalina en células lavadas con diversos agentes respecto al control

B<sub>4</sub>) Liberación de la enzima por lavado con EDTA sódico. El paquete celular resuspendido en tampón de veronal 0,01 M, a pH 7,4, se llevó a unas concentraciones finales de  $10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-2}$  y  $10^{-1}$  M con EDTA sódico. Las actividades encontradas en todas las fracciones estudiadas se recogen en la figura 5.

C) Liberación de la enzima por lavados sucesivos de baja fuerza iónica

Se intentó también la liberación de la fosfatasa alcalina tratando el paquete celular con lavados sucesivos con tris clorhídrico 0,033 M, de

pH 7,5, y tris clorhídrico 0,0033 M, al mismo pH. Se realizaron 5 lavados con cada tampón y se determinaron las actividades enzimáticas en los sobrenadantes de cada prueba. La cantidad de fosfatasa alcalina liberada por este procedimiento fue nula.

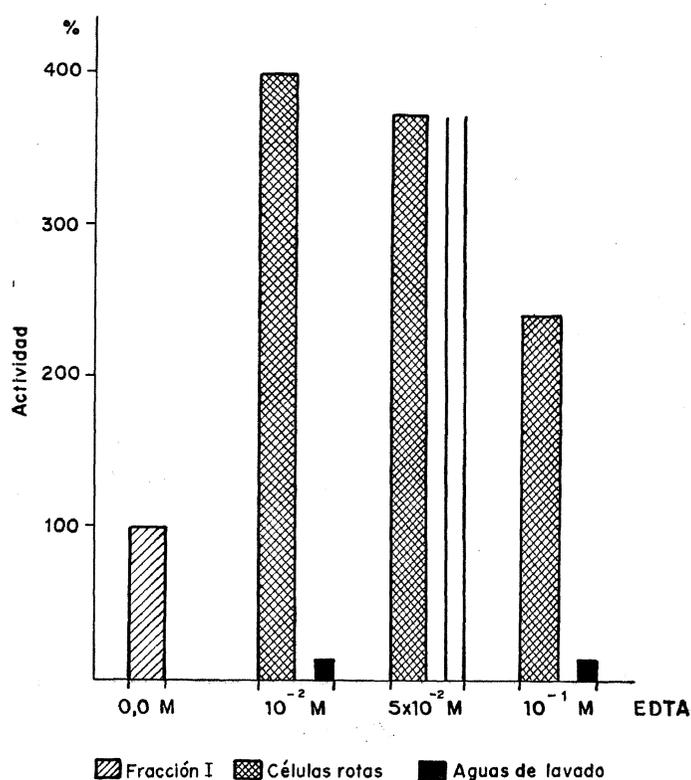
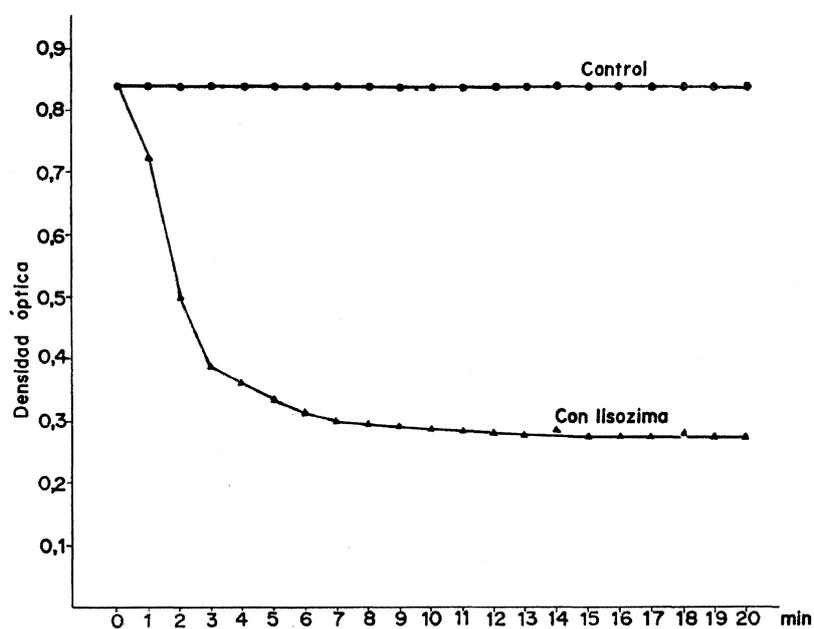


Figura 5. Actividad de fosfatasa alcalina en células lavadas con EDTA respecto al control

#### D) Formación de esferoplastos

Los esferoplastos se obtuvieron siguiendo la técnica de Repaske (15). Las células lavadas con tris clorhídrico y lauril-sulfato sódico, se tratan con lisozima y EDTA sódico en un medio isotónico de sacarosa al 20 %. El proceso de formación de los esferoplastos se sigue por observación del descenso de la densidad óptica a 660 nm frente a un control sin lisozima y EDTA. El tratamiento realizado a la temperatura ambiente se continúa hasta la estabilización de la densidad óptica, lo que se consigue

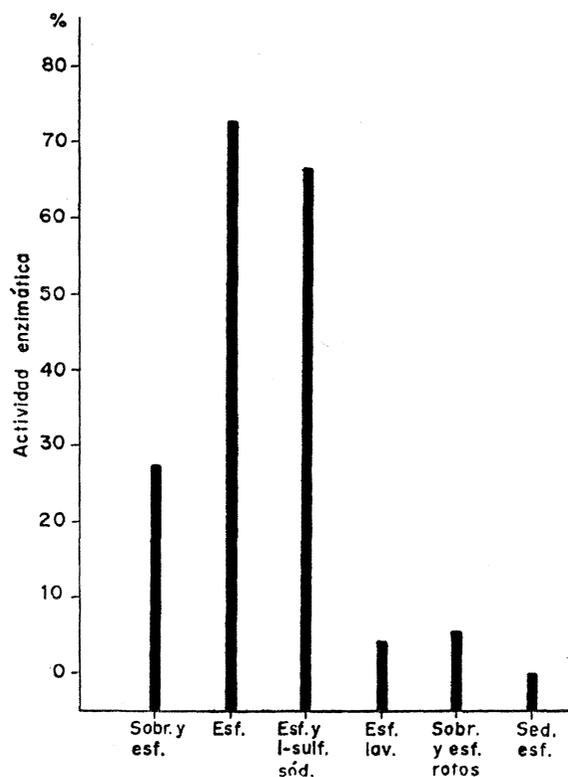
aproximadamente a los 20 min. La *figura 6* nos da idea de la marcha del tratamiento con lisozima y EDTA en función del tiempo, y la formación de los esferoplastos se comprueba por microscopia. En dicha figura, las densidades ópticas se representan en ordenadas, y el tiempo, en minutos, en abscisas.



*Figura 6*

Para separar los esferoplastos, la suspensión se centrifuga a 17.000 r/m durante 30 min. Se determinó la actividad enzimática en el sobrenadante que resultó positiva, pero también lo fue la prueba de los esferoplastos intactos, resuspendidos en sacarosa al 20 % y disueltos en tris clorhídrico, para mantener la isotonía. Al dar positivas ambas pruebas de actividad, lo que parece indicar una retención de la enzima por los esferoplastos, se pensó en realizar un nuevo intento de separación de esta fosfatasa alcalina, lavándolos durante 30 min, a temperatura ambiente, con lauril-sulfato sódico 0,1 % en sacarosa al 20 %, y centrifugando a 17.000 r/m. La actividad enzimática del sobrenadante se midió en idénticas condiciones que en el caso anterior. Los esferoplastos lava-

dos se sometieron a la acción del desintegrador ultrasónico, y se centrifugaron para separar los restos celulares, midiéndose a continuación la actividad del sobrenadante. Los resultados pueden verse en la *figura 7*.



*Figura 7*

## RESULTADOS

En las *figuras 2-7* se dan los resultados obtenidos con los distintos métodos empleados para la liberación de la fosfatasa alcalina.

## DISCUSION

En la *figura 2*, y siguiendo la técnica de Cheng (3), vemos que en el lavado con solución 0,2 M de cloruro magnésico, que él aplica, no conseguimos prácticamente ninguna separación de fosfatasa alcalina de las células.

Utilizamos concentraciones crecientes de la misma solución sin resultados prácticos, puesto que las células retenían más del 90 % de su contenido total en todos los casos. Pero aunque la liberación de la enzima no se ha conseguido, los resultados son interesantes, puesto que las células lavadas y rotas posteriormente al ultrasonido presentan un porcentaje de actividad muy superior a las que no sufrieron dicho tratamiento. Así, para la concentración inicial de 0,2 M, se obtiene una cifra de actividad fosfatásica aproximadamente del doble de la correspondiente a la del control, y para la 2 M, la actividad alcanza un valor 5 veces superior al de dicho control.

En la *figura 3* vemos los resultados obtenidos al lavar el precipitado con soluciones crecientes de ClNa desde la 0,2 M, que utiliza Cheng, hasta la 3 M. Este autor informa haber conseguido por este método la liberación de un 59,2 % del total de la enzima; en nuestro caso, lo único interesante y que queremos resaltar son los incrementos de actividad fosfatásica inducida por los iones  $\text{Na}^+$ , con un máximo para la concentración 1,0 M, que nos da un aumento de unas 7 veces la del control.

En la *figura 4* presentamos los resultados obtenidos al lavar el paquete celular de *Pseudomonas fluorescens* con solución de urea 8 M, con lauril-sulfato sódico y con butanol puro.

En el caso de la urea se consiguió la liberación de un 20 % de actividad enzimática, pero hay una disminución de actividad respecto al control, posiblemente por una acción desnaturalizante de la urea para esta enzima; por lo cual, aunque se mostró como uno de los agentes liberadores más efectivos, su efecto inhibitor nos aconsejó no utilizarlo en lo sucesivo.

El lauril-sulfato sódico, al 0,1 %, actúa de forma análoga, en cuanto a poder liberatorio, como la urea, pero, como puede verse en dicha *figura 4*, su acción inhibitoria es nula.

Estas pruebas, que no hemos visto recopiladas en ninguna otra publicación, nos parecieron interesantes, y pensamos continuar estudiando el efecto del lauril-sulfato sódico que se manifiesta como un prometedor agente liberador para la fosfatasa alcalina.

Como los resultados obtenidos con las técnicas expuestas no eran concluyentes, continuamos estudiando otros agentes que pudieran liberar esta enzima. Fijamos nuestra atención en el EDTA, que por su poder quelante para los cationes divalentes y por su acción sobre los polisacáridos que contienen las paredes de las bacterias gram-negativas (16),

podiera ser efectivo. En la *figura 5* vemos los resultados obtenidos en función de la concentración del EDTA. La liberación no fue significativa para ninguna concentración de las ensayadas; sin embargo, la actividad enzimática aumentó ostensiblemente, sobre todo a concentraciones bajas, y siempre los valores de actividad quedan por encima de los obtenidos al romper el paquete celular sin tratamiento alguno.

Según la literatura revisada, uno de los métodos más utilizados para la liberación y localización de la fosfatasa alcalina es la conversión de las células en esferoplastos. Malamy (10) obtiene buenos resultados en *Escherichia coli*; Hulett-Cowling (8), en *Bacillus licheniformis*, y Cheng, en *Pseudomonas aeruginosa* (2). En la *figura 6* presentamos el proceso de formación de esferoplastos obtenidos por nosotros utilizando el método que Repaske aplicó al *Ps. aeruginosa* (15). Los resultados son claros, pues a los 20 min se estabiliza el descenso de la densidad óptica y, vistas las preparaciones al microscopio, no se observa ninguna célula sin transformar en todas las pruebas realizadas.

En la *figura 7* presentamos las cifras de fosfatasa alcalina, liberada al sobrenadante, una vez formados los esferoplastos por el método descrito, que es del orden de un 30 %.

En un parte alícuota de los esferoplastos separados y suspendidos en sacarosa al 20 %, para su estabilidad, se determina la fosfatasa alcalina y el porcentaje fue de un 70 %, lo que nos hace suponer que las uniones de la fosfatasa alcalina para el *Pseudomonas fluorescens* sean más fuertes que para los otros microorganismos estudiados por otros autores, toda vez que la separación total de la enzima sólo la hemos conseguido por un lavado posterior de los esferoplastos con solución de lauril-sulfato sódico al 0,1 %, en sacarosa al 20 %, para mantener su isotonicidad.

En el sobrenadante obtenido por una nueva centrifugación a 17.000 r/m conseguimos recuperar ese 70 % que había quedado retenido posiblemente en los restos de las paredes que aún conservan los esferoplastos.

Por lo tanto, podemos suponer que, también en nuestro caso, la fosfatasa alcalina del *Pseudomonas fluorescens* está, de acuerdo con otros autores (1 y 4), en el espacio periplasmático, pero las fuerzas de unión y la resistencia de la pared exterior son más fuertes que en los otros microorganismos estudiados.

Resumiendo los resultados obtenidos en las pruebas descritas, podemos informar que aunque no hay conclusiones definitivas, y seguimos

trabajando sobre el tema, sí podemos apuntar que los lavados con soluciones de iones mono y divalentes, principalmente el  $Mg^{++}$ , aumentan la actividad fosfatásica en el interior de las células, respecto al grupo control.

Al aplicar el método de Repaske a la formación de esferoplastos, el rendimiento es total a los 20 min, pero la liberación de la fosfatasa alcalina al medio es parcial, del orden de un 30 %. Al separar los esferoplastos del medio y lavarlos con solución al 0,1 % de lauril-sulfato sódico en sacarosa al 20 %, se consigue recuperar en el sobrenadante un 70 % de la enzima; por tanto, conseguimos la liberación completa de la fosfatasa alcalina entre las dos etapas.

Podemos, pues, admitir una localización periplasmática de dicha enzima, si bien con fuerza de unión más fuerte para las paredes y membranas.

#### RESUMEN

Presentamos los resultados obtenidos en la localización y liberación de la fosfatasa alcalina, eligiendo como agentes formador el *Pseudomonas fluorescens*, estirpe CECT-378 = ATCC-13523, crecido en medio de Levinthal, modificado por nosotros, previo ensayo en otros medios de cultivo.

Utilizamos el ultrasonido para la ruptura de las células, fijando, para 5 ml, las condiciones óptimas de 3 min a 1,5 A.

Para la liberación selectiva se han probado los métodos siguientes: lavados con detergentes y otros agentes químicos, lavados con soluciones de diferente fuerza iónica y formación de esferoplastos.

Los mejores resultados se consiguieron combinando la formación de esferoplastos con lisozima y EDTA, y lavados pre y post-formación de éstos, con soluciones de lauril-sulfato sódico al 0,1 %, durante 30 min. Con este método, la fosfatasa alcalina pasa íntegramente al sobrenadante, en dos fases: un 30 % en la primera, y un 70 % en el post-lavado con lauril-sulfato sódico.

Los lavados con soluciones salines de baja fuerza iónica, preconizados por Cheng como método de liberación de la fosfatasa alcalina en el *Pseudomonas aeruginosa*, no dieron resultados positivos para este microorganismo, pero su acción aumentó notablemente la actividad enzimática en el interior de las células.

## SUMMARY

*Localization and liberation of alkaline phosphatase from Pseudomonas fluorescens*

Results on location and release of alkaline phosphatase from *Pseudomonas fluorescens* are given in this paper. Release of the enzyme was carried out by ultrasonic disruption of the cells.

To study its location, different methods used for Gram negative bacteria were assayed in our organism with negative results. We developed an original method which consists in the obtention of spheroplasts by the method of Repaske, previous washing of the cell with 0.1 % sodium lauryl sulphate. After treatment under isotonic conditions of the spheroplasts with the same reagent the enzyme was completely solubilized.

Selective washings with low ionic strength solutions as reported by Cheng in *Pseudomonas aeruginosa*, failed in our organism, but the treatment increased markedly the phosphatase activity in the cells.

## BIBLIOGRAFIA

1. BROCKMAN, R. W., and HEPPEL, L. A. 1968. On the localization of alkaline phosphatase and cyclic phosphodiesterase in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 7, 2554-62.
2. CHENG, K. L.; INGRAM, J. M., and COSTERTON, J. W. 1970. Alkaline phosphatase localization and spheroplast formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, 16, 1319-24.
3. CHENG, K. L.; INGRAM, J. M., and COSTERTON, J. W. 1970. Release of alkaline phosphatase from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and pH. *J. Bacteriol.*, 104, 748-53.
4. CHENG, K. L.; INGRAM, J. M., and COSTERTON, J. W. 1971. Interactions of alkaline phosphatase and the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 107, 325-40.
5. DORN, G. L. 1968. Purification and characterization of phosphatase I from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.*, 243, 3500-6.
6. EAGON, R. C., and CARSON, K. J. 1967. Lysis of cell walls and intact cells of *Pseudomonas aeruginosa* by ethylenediaminetetraacetic acid and by lysozyme. *Can. J. Microbiol.*, 11, 193-201.
7. HEPPEL, L. A. 1965. Selective release of enzymes from bacteria. *Science*, 156, 1451-55.

8. HULETT-COWLING, F. M., and CAMPBELL, L. L. 1971. Purification and properties of an alkaline phosphatase of *Bacillus licheniformis*. *Biochemistry*, 10, 1364-71.
9. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., and RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-75.
10. MALAMY, M., and HORECKER, B. L. 1961. The localization of alkaline phosphatase in *Escherichia coli* K<sub>12</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 5, 104-10.
11. MALAMY, M. H., and HORECKER, B. L. 1964. Release of alkaline phosphatase from cells of *Escherichia coli* upon lysozyme spheroplast formation. *Biochemistry*, 3, 1889-93.
12. MORALES, V. 1973. Biosíntesis de fosfatasa alcalina en cultivos de *Pseudomonas fluorescens*. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.
13. MORALES, V.; DÍAZ-RUBIO, P.; GARCÍA DEL AMO, C., y SANTOS-RUIZ, A. Estudios metabólicos con Zn-65. X. Biosíntesis de fosfatasa alcalina en cultivos de *Pseudomonas fluorescens*. *Rev. Españ. Fisiol.*, en prensa.
14. NEU, H., and HEPPPEL, L. A. 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.*, 240, 3685-92.
15. REPASKE, R. 1958. Lysis of Gram negative organisms and the role of versene. *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 225-32.
16. SALTON, M. R. J. 1971. *The Bacterial Membrane. I. Biomembranes*. Philadelphia, Pennsylvania.

FACULTAD DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

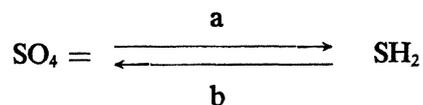
## ENUMERACION DE DESNITRIFICANTES QUIMIOLITOTROFOS Y DE REDUCTORES DE SULFATOS EN UNA PRADERA EXPERIMENTAL

por

J. VIVES y R. PARÉS

### INTRODUCCION

La flora desnitrificante quimiolitótrofa está caracterizada unívocamente por *Thiobacillus denitrificans* (4). La existencia de poblaciones enumerables de este tipo de microorganismos presupone la presencia en el suelo de compuestos reducidos del azufre. Estos no son habituales en los suelos de pradera.. La flora reductora de sulfatos aporta este tipo de productos, al mismo tiempo que utiliza los sulfatos que los tiobacilos han producido.



a = respiración anaerobia a cargo de los reductores de sulfatos.

b = reacción aerobia energética a cargo de los tiobacilos.

## MATERIAL Y METODOS

El criterio de positividad en la enumeración de *Thiobacillus denitrificans* ha sido la producción de gas a partir de nitratos bajo condiciones anaeróbicas. El medio empleado ha sido el medio R de Postgate (6) que contiene 2 g/l de nitratos. Se intuba a razón de 2,5 ml/tubo (10 × 120 mm). El desarrollo anaeróbico se lleva a cabo colocando un tapón de agar, bajo el cual se acumula el gas desprendido por la desnitrificación. La incubación se realiza a 30 °C, durante 2 semanas. El método de enumeración ha sido el del número más probable por diluciones sucesivas, empleando 10 tubos por dilución y factor de dilución 1/10, según el método y las tablas de Halvorson y Ziegler (3). Se ha verificado que la producción de gas es dependiente de la presencia de nitratos, del inóculo y del desarrollo celular. El medio y las condiciones de crecimiento se han comprobado con una cepa de *T. denitrificans* ATCC 23644. Los reductores de sulfatos se han enumerado empleando el mismo método que para los tiobacilos. El medio empleado ha sido el de Baar (2). La serie de tubos correspondientes a la enumeración de mesófilos se ha incubado a 30 °C y la serie correspondiente a los termófilos se ha incubado a 55 °C, en ambos casos por un período de 21 días. La anaerobiosis se consigue mediante un volumen de vaselina líquida estéril (1-2 ml). Las enumeraciones se llevan a cabo a lo largo de 20 meses, sobre una pradera experimental de ballico (*Lolium perenne*) cuyas características edáficas, climáticas y del abonado, plantación y cosecha se han descrito previamente (1 y 8). Las relaciones entre ambos tipos de flora se estudian por correlación serial cruzada con un desfase de un período pk, siendo p = 20 días y k = 1, 2, 3, ... La expresión de la correlación serial empleada es:

$$C_s = \frac{\text{cov.}(U_t, V_{t+k})}{\text{des.}(U_t) \cdot \text{des.}(V_{t+k})}$$

siendo C, correlación serial; cov, covarianza; des, desviación típica;  $U_t$ , valores observados;  $V_{t+k}$ , valores observados en el período pk. Para la aplicación y cálculo de dicha expresión se ha utilizado el programa CROSSCORR escrito en FØRTRAN IV para IBM 360-40 disponible en el Laboratorio de Cálculo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona.

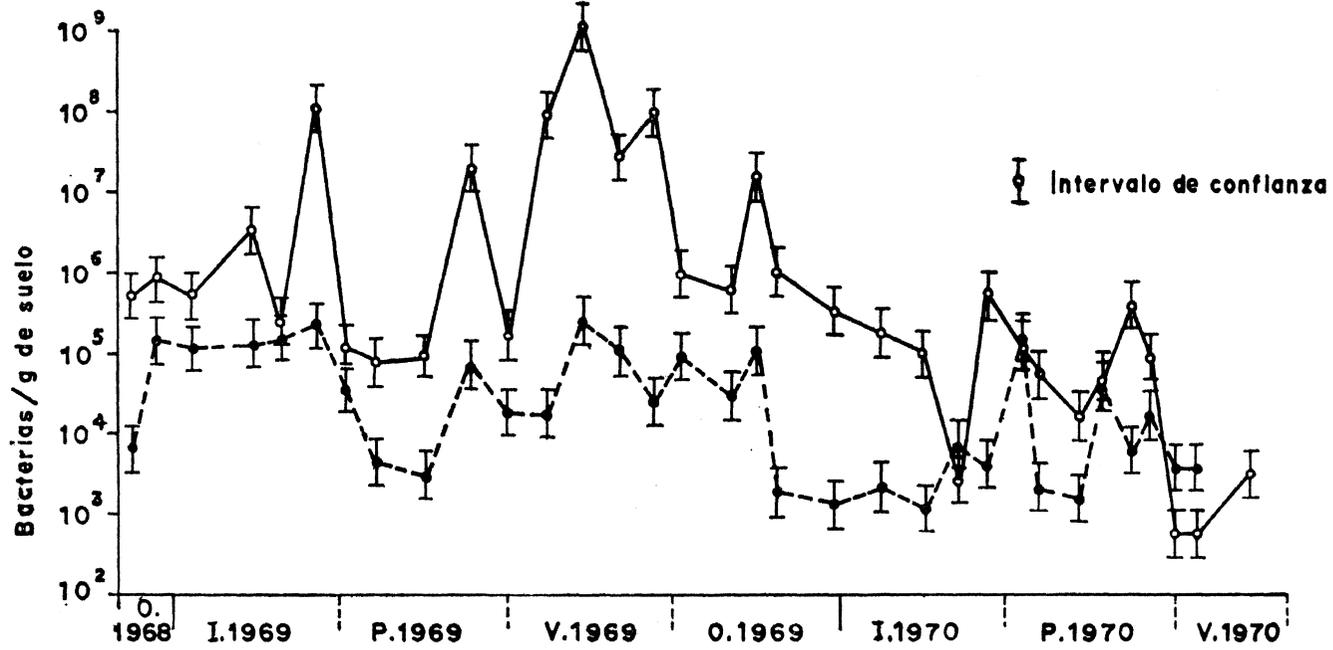


Figura 1. Evolución a lo largo del tiempo de la flora desnitrificante quimiolitótrofa (—○—○—) y de la de reductores de sulfatos (--- ● --- ● ---)

## RESULTADOS

En la *figura 1* se exponen los resultados de las enumeraciones de tiobacilos desnitrificantes y reductores de sulfatos a lo largo del tiempo. Sobre los datos obtenidos se aplica el intervalo de confianza (2,32) para este tipo de prueba (5). Los resultados de reductores de sulfatos representan la suma de los valores parciales obtenidos de mesófilos y termófilos.

Se observa que los máximos más importantes de la flora desnitrificante quimiolitótrofa se dan en primavera, verano, otoño e invierno de 1969. Destaca de manera especial el máximo de  $10^9$  bacterias/g de suelo. Los valores obtenidos en 1970 son sensiblemente inferiores a los de 1969.

La flora reductora de sulfatos presenta máximos en las cuatro estaciones del año, aunque sus oscilaciones presentan valores cuantitativos más uniformes entre sí que los de la flora desnitrificante quimiolitótrofa. Los resultados obtenidos en 1970 son similares a los obtenidos en 1969.

Los resultados del análisis de correlación serial cruzada se expresan en el *cuadro 1*. El mayor coeficiente de correlación es de 0,4553, correspondiente a la población de tiobacilos cuando se adelanta 20 días. La *t* de Student es de 2,7536, equivalente al 99,98 % de los casos. Estos datos sugieren que la población de reductores de sulfatos está ligada a la oscilación de tiobacilos.

## DISCUSION

Se propone un modelo de oscilación en el que el aporte de compuestos oxidados de azufre, a cargo de los tiobacilos desnitrificantes, es reducido por la flora reductora de sulfatos y reutilizado de nuevo por los tiobacilos. Las oxido-reducciones del azufre serían el nexo de conexión entre los dos tipos de poblaciones. En esta interdependencia, la influencia de los tiobacilos sobre los reductores de sulfatos es coherente por varios motivos. La población de tiobacilos desnitrificantes es numéricamente superior (10-100 veces) y facultativamente anaeróbica cuando utiliza nitratos como aceptor final de electrones. Los reductores de sulfatos son, por el contrario, estrictamente anaerobios. La correspondencia encontrada se considera una verificación más del método de enumeración de tiobacilos.

La concentración de materia orgánica existente en las diluciones empleadas ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) no se considera suficientemente elevada como para inhibir el desarrollo de tiobacilos (7).

No se han aislado ni estudiado las bacterias objeto de ambas enumeraciones, aunque dadas las condiciones impuestas en el recuento, las realizadas con el medio R se atribuyen a *Thiobacillus denitrificans*.

Cuadro 1. Coeficientes de correlación serial cruzada entre desnitrificantes quimiolitótrofos (A) y reductores de sulfatos (B)

AA BBB $C_{f_1}$	AAA BB $C_{f_2}$	k	t de Student		Grados de libertad
—0,0744	—0,0744	0	—0,4088	—0,4088	30
0,4553	—0,0356	1	2,7536	—0,1920	29
0,1735	0,0050	2	0,0321	0,0266	28
—0,0806	—0,1564	3	—0,4199	—0,8228	27
0,1170	—0,1735	4	0,6009	—0,8984	26
—0,0290	—0,0175	5	—0,1452	—0,0875	25
0,1553	0,4193	6	0,7702	2,2626	24

$C_{f_1}$  = Coeficiente de correlación cruzada, adelantamiento de la población (A).

$C_{f_2}$  = Coeficiente de correlación cruzada, adelantamiento de la población (B).

## RESUMEN

Se han realizado recuentos simultáneos de bacterias desnitrificantes quimiolitótrofas y de bacterias reductoras de sulfatos, en una pradera experimental de *Lolium perenne*, a lo largo de 20 meses. Los resultados obtenidos se estudian estadísticamente con vistas a verificar las posibles relaciones entre ambas poblaciones.

Se propone un modelo de oscilación conjunto para ambos grupos fisiológicos. En dicho modelo, parece que las bacterias sulfato-reductoras están influidas por los tiobacilos desnitrificantes. Se discuten los argumentos expuestos en favor de esta hipótesis.

## SUMMARY

*Count of chemolithotrophic denitrifying bacteria and sulphate reducing bacteria in an experimental field*

Counts of chemolithotrophic denitrifying bacteria and sulphate reducing bacteria in an experimental field (*Lolium perenne*), have been made after 20 months. The results are studied statistically by cross-correlation.

A model of oscilation for both populations is proposed. In which, the sulphate reducing bacteria seems to be influenced by the denitrifying thiobacilli. Arguments supporting that hypothesis are exposed.

## BIBLIOGRAFIA

1. CABALLERO, A. 1969. Ritmos de período largo en el crecimiento de las plantas. Mem. Real Acad. Cienc. Artes Barcelona, 37, 169-214.
2. COLLINS, C. H. 1967. Microbiological Methods. Laboratory Techniques Series. Ed. Butterworths, Londres.
3. HALVORSON, H. O., and ZIEGLER, N. R. 1933. Application of statistics to problems in bacteriology. I. A. means of determining bacterial population by the dilution method. J. Bacteriol., 25, 101-21.
4. HUTCHINSON, M.; JOHNSTONE, K. I., and WHITE, D. 1967. Taxonomy of anaerobic thiobacilli. J. Gen. Microbiol., 47, 17-23.
5. MEYNELL, M. D., and MEYNELL, E. 1969. Bacteriología Experimental. Teoría y Práctica. Ed. Omega, Barcelona.
6. POSTGATE, J. R. 1966. Media for sulphur bacteria. Lab. Pract., 15, 1239-44.
7. RITTENBERG, S. C. 1969. En A. H. ROSE and J. F. WILKINSON. The Roles of Exogeneous Organic Matter in the Physiology, vol. 3. Academic Press, London and New York.
8. SIMÓN, E. 1972. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona.

## CONGRESO INTERNACIONAL DE VIROLOGIA

El III Congreso Internacional de Virología se celebrará en Madrid, del 10 al 17 de septiembre del año actual. El Comité organizador está formado por los Dres. F. Pérez Gallardo, Presidente; A. Pumarola Busquets, Vicepresidente; R. Nájera Morrondo, Secretario, y L. Valenzuela Clavel, Tesorero.

Las personas interesadas pueden dirigirse al Dr. R. Nájera, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias. Majadahonda (Madrid).

## BIBLIOGRAFIA

*EQUINE HERPESVIRUSINFEKTIONEN*, por K. Petzoldt. 1974.  
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 232 páginas y 32 figuras.

Recientemente se han aislado nuevos herpesvirus, que originan infecciones en los équidos, lo cual resulta digno de mención, puesto que hasta 1963 sólo se citaba un único tipo en el caballo. Naturalmente, tales hallazgos han promovido un notable aumento de la bibliografía correspondiente.

Además de la importancia evidente que suponen los virus herpes para las explotaciones animales, el interés por estos agentes patógenos se ha extendido al dinámico campo de la Microbiología, considerada en su sentido más amplio, desde el momento que el denominado "virus herpes equino 1 (VHE)" se ha utilizado como patrón en el estudio de los virus ADN, a efectos de conocer sus acciones citopáticas.

Las premisas de referencia justificarían propiamente una sinopsis sobre esta materia a la luz de los conocimientos actuales, sobre todo teniendo en cuenta que hasta los últimos tiempos se habían tratado con extensión exclusivamente las afecciones por VHE 1, agente etiológico clásico de los équidos.

La necesidad científica de una actualización del tema aparece cumplimentada con el nuevo volumen de la colección de monografías, editada por Bieling, Kathe, Köhle y Mayr y redactada por K. Petzoldt.

La sistemática que ha presidido la composición de esta monografía resulta análoga a la empleada para describir cualquier entidad patológica. Por ello, las infecciones de los équidos por los herpesvirus se analizan en el texto bajo los títulos de etiología, epidemiología, patogenia, sintomatología, diagnóstico, inmunización y terapéutica, entre otros.

Comprende el estudio, junto a su revisión con referencias bibliográficas hasta 1974, las personales investigaciones del autor relativas al aborto (principal acción patógena del VHE 1), con otras manifestaciones clínicas diferentes del mismo virus, y a los herpesvirus respiratorios. La parte gráfica incluye valiosas fotografías en color del exantema herpético de la yegua.

En vista de que los herpesvirus se presentan en todos los animales superiores y en el hombre, el texto representa una ayuda importante para los dedicados a la Virología y Patología comparadas.

M. RODRIGUEZ-REBOLLO

*VIROLOGISCHE ARBEITSMETHODEN*, I, por *A. Mayr, P. A. Bachmann, B. Bibrack y G. Wittman*. 1974. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 666 páginas y 169 figuras.

Este tomo es el primero de una colección que aparecerá bajo el mismo título arriba indicado de "Métodos de trabajo en Virología", aunque no se dice cuántos van a ser, ni cómo se distribuirá el contenido. En el presente, se trata de los cultivos de células, de los huevos de gallina incubados y de los animales de experimentación.

La intención de la obra no es la de presentar las últimas novedades de los laboratorios de Virología, sino la de facilitar el trabajo del virólogo, tanto del principiante como del veterano. Todos los métodos que han demostrado su utilidad están descritos en forma que pueden repetirse por los que nunca los han practicado. Explicaciones, consejos, recetas, etc., todo está expuesto de un modo completo, con el propósito de que este libro sea el que esté encima de la mesa del principiante, y continúe sobre ella, en sucesivas ediciones, mientras el lector siga trabajando en Virología.

Los grandes capítulos de la obra son éstos:

Cuestiones de interés general. 1, Las infecciones de laboratorio, la dispersión de virus y medidas para evitarlas. 2, Tratamiento de las muestras. 3, Determinación cuantitativa de la infecciosidad de los virus (titulación de virus).

Cultivo de células. 1, Generalidades. 2, Cultivo de tejidos y células de

mamíferos y aves. 3, Cultivo de células de tejidos de animales de sangre fría. 4, Morfología y biología de las células de tejidos *in vitro*. 5, Conservación, identificación, hibridación y clonización de las células *in vitro*. 6, Contaminación de los cultivos de células. 7, Métodos de tinción y autorradiográfico para cultivos de células. 8, Cultivos de virus en cultivos de células. 9, Transformación de células *in vitro*. 10, Producción y comprobación de interferón. 11, Apéndice (este apéndice está formado por 60 páginas de color diferente al del resto del libro y contiene las técnicas para la preparación de medios y disoluciones).

Huevos de gallina incubados. 1, Introducción. 2, Historia del cultivo de virus en embriones de aves. 3, Desarrollo de los anejos embrionarios interesantes para el cultivo de virus. 4, Técnica de la incubación de huevos. 5, Técnica de la inoculación de huevos. 6, Cultivo de virus en embriones de otras aves. 7, Patogénesis de las infecciones de virus en los huevos de gallina incubados. 8, Clínica de las infecciones producidas por virus en huevos de gallina incubados. 9, Histología de las alteraciones de la membrana. 10, Recolección de los virus. 11, Impurificaciones de los virus en los huevos de gallina incubados. 12, Obtención de preparaciones permanentes de membranas de huevos en el laboratorio de virus.

Animales de experimentación. 1, Importancia, objetivos y límites del ensayo con animales en la Virología. 2, El animal de experimentación. 3, Metodica de la experimentación con animales. 4, Datos específicos de los más importantes experimentos con animales en los diferentes virus. 5, Obtención de inmunosueros. 6, Apéndice.

La bibliografía aparece al final de cada uno de los apartados que acabamos de citar, lo que facilita su manejo, y alcanza hasta el año 1971, inclusive.

Los autores del presente tomo son los Dres. Mayr, Bachman y Bibrack, que trabajan en el Instituto de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad "Ludwig Maximilian", de Munich, y el Dr. Witmann, del Instituto Federal para Investigación de las Virosis de los Animales, de Tubinga. Todos ellos han demostrado una erudita competencia en la materia. Esperamos que los autores de los sucesivos tomos conserven el nivel de utilidad del que acabamos de reseñar.

L. VILAS

*LOS METODOS DE TOMA DE MUESTRAS Y DE ANALISIS EN LOS PROGRAMAS DE VIGILANCIA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS.* Informe de un Grupo de Estudio de la OMS. 1974. Organización Mundial de la Salud, Serie de Informes Técnicos, núm. 543, Ginebra, 55 páginas.

El informe recoge el criterio de un grupo internacional de especialistas en relación con el análisis microbiológico de los alimentos, el establecimiento y aplicación de una normativa, la selección de métodos, interpretación y difusión de datos. Los autores expresan su inquietud por el incremento mundial de las enfermedades transmitidas por los alimentos y su repercusión económica; intentan aunar esfuerzos para evitar pérdidas, prevenir las toxiinfecciones y elaborar con más calidad, de acuerdo con las exigencias del mercado internacional.

En el capítulo 1 se plantean los aspectos técnicos y administrativos en la formulación de normas, fines del análisis, criterios microbiológicos de calidad e interés de muestreo con bases estadísticas. Se destaca la importancia de los nuevos métodos inmunológicos para detectar las enterotoxinas en los alimentos, exponiendo la panorámica actual en cuanto a las estirpes enterotóxicas de *Cl. perfringens*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus* y *Ps. fluorescens*.

En los capítulos 3, 4 y 5 se resume la problemática de la contaminación vírica de los alimentos, la investigación de micotoxinas y hongos productores en el producto contaminado, así como el incremento de las zoonosis parasitarias. Los autores insisten en el ensayo de nuevos métodos de análisis de micotoxinas y en la preparación de más antígenos y antisueros para diagnosticar mayor número de parasitosis.

Los dos últimos capítulos se refieren a la recopilación y difusión de datos por los organismos competentes, destacando el papel de la OMS en la elaboración de normas microbiológicas, coordinación de grupos de trabajo, financiación de programas de investigación y de enseñanza.

Resumiendo, una exposición sencilla, clara, escueta y realista del problema actual en esta rama de la Microbiología, insistiendo en la labor conjunta a nivel internacional, en la necesidad de mayores esfuerzos para mejorar la formación en microbiología de los alimentos del personal de

los Organismos oficiales de inspección y atención especial a la programación de cursos de capacitación, para cuantos esperan desempeñar una labor en los laboratorios especializados y de control.

C. GONZALEZ

*THE NORMAL MICROBIAL FLORA OF MAN*. Directores: *F. A. Skinner* y *J. G. Carr*. Society for Applied Bacteriology Symposium Series no. 3. 1974. Academic Press, London and New York. XVI + 264 páginas.

Casi desde el advenimiento de la era antibiótica, existe una progresiva deriva del concepto de la Microbiología Clínica como ciencia que se ocupa de los microorganismos implicados en las enfermedades infecciosas (Microbiología de Patógenos), hacia el concepto actual, más amplio, de ciencia que se ocupa de todos aquellos microorganismos que, primitivamente patógenos o no, entran en interrelación con las especies animales o con el hombre, tanto para constituir parte de su fisiología como para, ocasionalmente, provocar o —lo que es más frecuente— complicar enfermedades. Gran parte de la labor usual de un microbiólogo clínico se basa en determinar alteraciones cuantitativas o cualitativas de la “flora normal” a nivel de un determinado territorio orgánico, porque estas alteraciones son cada vez más frecuente causa de patología. Es por ello por lo que existe un creciente interés por definir las condiciones de la flora normal del hombre. A este tema se dedicó el Simposio de julio de 1973 de la Sociedad de Bacteriología Aplicada Inglesa, que recoge este libro.

La flora normal de la piel, su control ecológico y los efectos de jabones y germicidas en las poblaciones microbianas cutáneas son temas extensivamente tratados, que interesarán a microbiólogos clínicos generales, y, de forma especial, a los conectados con áreas quirúrgicas. También se dedican varios capítulos al estudio de la flora normal de la cavidad oral, así como a su regulación endógena y exógena, deteniéndose especialmente en la microbiología de la placa dentaria, de tan alto interés para el estudio de la periodontitis y la caries. No hay que olvidar que la microbiología de la cavidad oral constituye ya una verdadera supraespecialidad de la microbiología clínica.

Probablemente, la mejor contribución del libro esté constituida por el

capítulo de Hurley y colaboradores acerca de la microflora vaginal en el embarazo, tema de interés excepcional en la comprensión de la patología microbiana del recién nacido.

Se dedica relativamente poca atención a la flora respiratoria normal, aunque un capítulo se ocupa de la dispersión aérea de microorganismos respiratorios humanos.

En el área de la flora intestinal normal, se presentaron al simposio trabajos que aquí se recogen acerca de las variaciones geográficas de la microflora intestinal (B. S. Drasar), de la ecología intestinal de *Clostridium perfringens*, del estado de portador en salmonelosis y del efecto de algunos antibióticos en la flora fecal. Aunque existe un trabajo (Anderson, Challacombe y Richardson) acerca de la flora intestinal del tracto duodeno-yeyunal en el niño, creemos que el tema de la flora intestinal del intestino delgado debía haberse tratado más ampliamente, ya que constituye una de las grandes aportaciones de la microbiología clínica actual a la comprensión de la patogenia de buen número de entidades nosológicas en el hombre.

Los dos trabajos finales, sobre la acción de antibióticos favoreciendo transferencia de resistencia *in vivo* en el intestino humano y el que se ocupa de los virus asociados al individuo sano, son de más limitado interés.

Libro bien editado, con algunas erratas en el índice de conceptos. El precio en librería es de unas 1.000 pesetas.

F. BAQUERO

Depósito legal: M. 702 - 1958.

---

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15. Madrid