

---

VOLUMEN 28. 1975

JULIO - DICIEMBRE. NUMEROS 3-4

# *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 cualquier 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 2,5 cm 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, 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.

Los Resúmenes, de un máximo de doscientas palabras cada uno, deberán contener un esquema del trabajo y, en su caso, las conclusiones, abreviadas; el Resumen en la otra lengua, incluirá, además, el título.

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 quince días para los residentes en España, y en el de treinta, 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
Ultraestructura y composición química del lipopolisacárido de la <i>Erwinia carotovora</i> . II. Influencias del método de extracción, por <i>M. Santaolalla</i> ... ..	83
Evolución cuantitativa y cualitativa de las proteínas en la curva de crecimiento de <i>Sarcina flava</i> , por <i>Marta Calvo, E. Cardell, M. A. Falcón y A. Chordi</i> ... ..	103
<i>Listeria monocytogenes</i> : portadores fecales y mortalidad perinatal, por <i>E. Gómez-Mampaso, L. Michaux, L. de Rafael, P. Peña, A. Carvajal y F. Baquero</i> ... ..	117
La estimulación de la competencia en <i>B. subtilis</i> y su posible inhibición a distintos niveles celulares, por <i>A. Portolés, E. García, M.<sup>a</sup> Teresa Pérez-Ureña y M. Espinosa</i> ... ..	129
Producción de enzimas pécticas por <i>Pseudomonas viridiflava</i> , por <i>Eulalia Cabezas de Herrera y Olga García Jurado</i> ... ..	143
Toxicidad de varias estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> aisladas de larvas muertas de <i>Prays oleae</i> Bernard, por <i>F. Roig, P. Ramos y J. M. Barea</i> ... ..	153
Diagnóstico de meningitis meningocócica por inmunoelectroforesis, por <i>J. Casal, A. Fadón y S. Fernández</i> ... ..	165
Conferencia sobre Colecciones de Cultivos ... ..	171
Simposio de Fermentación ... ..	171
Premio "Alonso de Herrera" ... ..	171
Bibliografía, por <i>L. Vilas, M. Rubio-Huertos y A. Portolés</i> ... ..	173

## CONTENTS

	Page
Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide from <i>Erwinia carotovora</i> . II. Influences of the extraction method, by <i>M. Santaolalla</i> ... ..	83
Quantitative and qualitative evolution of proteins during the growth curve of <i>Sarcina flava</i> , by <i>Marta Calvo, E. Cardell, M. A. Falcón and A. Chordi</i> ... ..	103
<i>Listeria monocytogenes</i> : faecal carriers and perinatal mortality, by <i>E. Gómez-Mampaso, L. Michaux, L. de Rafael, P. Peña, A. Carvajal and F. Baquero</i> ... ..	117
The stimulation of the competence in <i>B. subtilis</i> and its possible inhibition at different cell levels, by <i>A. Portolés, E. García, M.<sup>a</sup> Teresa Pérez-Ureña and M. Espinosa</i> ... ..	129
Production of pectic enzymes by <i>Pseudomonas viridiflava</i> , by <i>Eulalia Cabezas de Herrera and Olga García-Jurado</i> ... ..	143
Toxicity of <i>B. thuringiensis</i> isolated from dead larvae of <i>Prays oleae</i> Bernard, by <i>F. Roig, P. Ramos and J. M. Barea</i> ... ..	153
Diagnostic of meningococcal meningitis by immunoelectrophoresis (IEP), by <i>J. Casal, A. Fadón and S. Fernández</i> ... ..	165
Third International Conference on Culture Collections ... ..	171
Fifth International Fermentation Symposium ... ..	171
"Alonso de Herrera" award ... ..	171
Bibliography, by <i>L. Vilas, M. Rubio-Huertos and A. Portolés</i> ... ..	173

# *Microbiología Española*

*Revista*

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



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

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

Vocales: Dr. Jorge 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

## INDICE

	Página
<i>Baquero, F.</i> : véase <i>Rodríguez-Rebollo, M.</i> ... ..	77
<i>Baquero, F.</i> : véase <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117
<i>Barea, J. M.</i> : véase <i>Roig, F.</i> ... ..	153
<i>Cabezas de Herrera, Eulalia, y García-Jurado, Olga</i> : Producción de enzimas pécticas por <i>Pseudomonas viridiflava</i> ... ..	143
<i>Calvo, Marta; Cardell, E.; Falcón, M. A., y Chordi, A.</i> : Evolución cuantitativa y cualitativa de las proteínas de la curva de crecimiento de <i>Sarcina flava</i> ... ..	103
<i>Cardell, E.</i> : véase <i>Calvo, Marta</i> ... ..	103
<i>Carvajal, A.</i> : véase <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117
<i>Casal, J.; Fadón, A., y Fernández, S.</i> : Diagnóstico de meningitis meningocócica por inmunoelectroforesis ... ..	165
Conferencia sobre Colecciones de Cultivos ... ..	171
Congreso Internacional de Virología ... ..	75
<i>Chordi, A.</i> : véase <i>Calvo, Marta</i> ... ..	103
<i>Díaz-Rubio, P.</i> : véase <i>Morales, V.</i> ... ..	55
<i>Espinosa, M.</i> : véase <i>Portolés, A.</i> ... ..	129
<i>Fadón, A.</i> : véase <i>Casal, J.</i> ... ..	165
<i>Falcón, M. A.</i> : véase <i>Calvo, Marta</i> ... ..	103
<i>Fernández, S.</i> : véase <i>Casal, J.</i> ... ..	165
<i>García, E.</i> : véase <i>Portolés, A.</i> ... ..	129
<i>García del Amo, C.</i> : véase <i>Morales, V.</i> ... ..	55
<i>García-Jurado, Olga</i> ; véase <i>Cabezas de Herrera, Eulalia</i> ... ..	143
<i>Gómez-Mampaso, E.; Michaux, L.; Rafael, L, de; Peña, P.; Carvajal, A., y Baquero, F.</i> : <i>Listeria monocytogenes</i> : portadores fecales y mortalidad perinatal ... ..	117
<i>González, C.</i> : véase <i>Rodríguez-Rebollo, M.</i> ... ..	77
<i>Lanzuela, F.; Pérez-Silva, G.; Ronda, E., y Rodríguez, D.</i> : Efecto de la debariocidina sobre <i>Candida albicans</i> y <i>Debariomyces kloeckeri</i> ... ..	1
<i>Martín, R. M.</i> : Modificaciones en la composición antigénica de <i>Arthrobacter simplex</i> ATCC 6946 en presencia de la sustancia S de Reichstein ... ..	13

	Página
<i>Michaux, L.</i> : véase <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117
<i>Moral, A.</i> del: véase <i>Repáraz, J.</i> ... ..	27
<i>Morales, V.</i> ; <i>Díaz-Rubio, P.</i> ; <i>García del Amo, C.</i> , y <i>Santos-Ruiz, A.</i> : Localización y liberación de fosfatasa alcalina del <i>Pseudomonas fluorescens</i> ... ..	55
<i>Parés, R.</i> : véase <i>Vives, V.</i> ... ..	43
<i>Parés, R.</i> : véase <i>Vives, V.</i> ... ..	69
<i>Peña, P.</i> : véase <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117
<i>Pérez-Silva, G.</i> : véase <i>Lanzuela, F.</i> ... ..	1
<i>Pérez-Ureña, M.<sup>a</sup> Teresa</i> : véase <i>Portolés, A.</i> ... ..	129
<i>Portolés, A.</i> ; <i>García, E.</i> ; <i>Pérez-Ureña, M.<sup>a</sup> Teresa</i> , y <i>Espinosa E.</i> : La estimulación de la competencia en <i>B. subtilis</i> y su posible inhibición a distintos niveles celulares ... ..	129
<i>Portolés, A.</i> : véase <i>Vilas, L.</i> ... ..	173
Premio "Alonso de Herrera" ... ..	171
<i>Rafael, L.</i> de: véase <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117
<i>Ramos, P.</i> : véase <i>Roig, F.</i> ... ..	153
<i>Repáraz, J.</i> , y <i>Moral, A.</i> del: Identificación de <i>Pseudomonas</i> de interés clínico ... ..	27
<i>Rodríguez, D.</i> : véase <i>Lanzuela, F.</i> ... ..	1
<i>Rodríguez-Rebollo, M.</i> ; <i>Vilas, L.</i> ; <i>González, C.</i> , y <i>Baquero, F.</i> : Bibliografía ... ..	77
<i>Roig, F.</i> ; <i>Ramos, P.</i> , y <i>Barea, J. M.</i> : Toxicidad de varias estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> aisladas de larvas muertas de <i>Prays oleae</i> Bernard ... ..	153
<i>Ronda, E.</i> : véase <i>Lanzuela, F.</i> ... ..	1
<i>Rubio-Huertos, M.</i> : véase <i>Vilas, L.</i> ... ..	173
<i>Santaolalla, M.</i> : Ultraestructura y composición química del lipopolisacárido de la <i>Erwinia carotovora</i> . II. Influencias del método de extracción ... ..	83
<i>Santos-Ruiz, A.</i> : véase <i>Morales, V.</i> ... ..	55
Simposio de Fermentación ... ..	171
<i>Vilas, L.</i> : véase <i>Rodríguez-Rebollo, M.</i> ... ..	77
<i>Vilas, L.</i> ; <i>Rubio-Huertos, M.</i> , y <i>Portolés, A.</i> : Bibliografía ... ..	173
<i>Vives, J.</i> , y <i>Parés, R.</i> : Enumeración y caracterización de la flora desnitrificante quimioorganótrofa en una pradera experimental. ... ..	43
<i>Vives, J.</i> , y <i>Parés, R.</i> : Enumeración de desnitrificantes quimiolitótrofos y de reductores de sulfatos en una pradera experimental ... ..	69

## CONTENTS

	Page
"Alonso de Herrera" award ... ..	171
<i>Baquero, F.</i> : see <i>Rodríguez-Rebollo, M.</i> ... ..	77
<i>Baquero, F.</i> : see <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117
<i>Barea, J. M.</i> : see <i>Roig, F.</i> ... ..	153
<i>Cabezas de Herrera, Eulalia, and García-Jurado, Olga</i> : Production of pectic enzymes by <i>Pseudomonas viridiflava</i> ... ..	143
<i>Calvo, Marta; Cardell, E.; Falcón, M. A., and Chordi, A.</i> : Quantitative and qualitative evolution of proteins during the growth curve of <i>Sarcina flava</i> ... ..	103
<i>Cardell, E.</i> : see <i>Calvo, Marta</i> ... ..	103
<i>Carvajal, A.</i> : see <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117
<i>Casal, J.; Fadón, A., and Fernández S.</i> : Diagnostic of meningococcal meningitis by immunoelectrophoresis (IEP) ... ..	165
<i>Chordi, A.</i> : see <i>Calvo, Marta</i> ... ..	109
<i>Díaz-Rubio, P.</i> : see <i>Morales, V.</i> ... ..	55
<i>Espinosa, M.</i> : see <i>Portolés, A.</i> ... ..	129
<i>Fadón, A.</i> : see <i>Casal, J.</i> ... ..	165
<i>Falcón, M. A.</i> : see <i>Calvo, Marta</i> ... ..	103
<i>Fernández, S.</i> : see <i>Casal, J.</i> ... ..	165
Filth International Fermentation Symposium ... ..	171
<i>García, E.</i> : see <i>Portolés, A.</i> ... ..	129
<i>García del Amo, C.</i> : see <i>Morales, V.</i> ... ..	55
<i>García-Jurado, Olga</i> : see <i>Cabezas de Herrera, Eulalia</i> ... ..	143
<i>Gómez-Mampaso, E.; Michaux, L.; Rafael, L. de; Peña, P.; Carvajal, A., and Baquero, F.</i> : <i>Listeria monocytogenes</i> : faecal carriers and perinatal mortality ... ..	117
<i>González, C.</i> : see <i>Rodríguez-Rebollo, M.</i> ... ..	77
International Congress for Virology ... ..	75
<i>Lanzuela, F.; Pérez-Silva, G.; Ronda, E., and Rodríguez, D.</i> : Effect of debariocidine on <i>Candida albicans</i> and <i>Debariomyces klockeri</i> ... ..	1
<i>Martín, R. M.</i> : Modification of the antigenic composition of <i>Arthrobacter simplex</i> ATCC 6946, in presence of Reichstein's substance S ... ..	13
<i>Michaux, L.</i> : see <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117

	Page
<i>Moral, A. del</i> : see <i>Repáraz, J.</i> ... ..	27
<i>Morales, V.</i> ; <i>Díaz-Rubio, P.</i> ; <i>García del Amo, C.</i> , and <i>Santos-Ruiz, A.</i> : Localization and liberation of alkaline phosphatase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> ... ..	55
<i>Parés, R.</i> : see <i>Vives, J.</i> ... ..	43
<i>Parés, R.</i> : see <i>Vives, J.</i> ... ..	69
<i>Peña, P.</i> : see <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117
<i>Pérez-Silva, G.</i> : see <i>Lanzuela, F.</i> ... ..	1
<i>Pérez-Ureña, M.<sup>a</sup> Teresa</i> : see <i>Portolés, A.</i> ... ..	129
<i>Portolés, A.</i> ; <i>García, E.</i> ; <i>Pérez-Ureña, M.<sup>a</sup> Teresa</i> , and <i>Espinosa, M.</i> : The stimulation of the competence in <i>B. subtilis</i> and its possible inhibition at different cell levels ... ..	129
<i>Portolés, A.</i> : see <i>Vilas, L.</i> ... ..	173
<i>Rafael, L. de</i> : see <i>Gómez-Mampaso, E.</i> ... ..	117
<i>Ramos, P.</i> : see <i>Roig, F.</i> ... ..	153
<i>Repáraz, J.</i> , and <i>Moral, A. del</i> : Identification of <i>Pseudomonas</i> of clinical importance ... ..	27
<i>Rodríguez, D.</i> : see <i>Lanzuela, F.</i> ... ..	1
<i>Rodríguez-Rebollo, M.</i> ; <i>Vilas, L.</i> ; <i>González, C.</i> , and <i>Baquero, F.</i> : Bibliography ... ..	77
<i>Roig, F.</i> ; <i>Ramos, P.</i> , and <i>Barea, J. M.</i> : Toxicity of <i>B. thuringiensis</i> isolated from dead larvae of <i>Prays oleae</i> Bernard ... ..	153
<i>Ronda, E.</i> : see <i>Lanzuela, F.</i> ... ..	1
<i>Rubio-Huertos, M.</i> : see <i>Vilas, L.</i> ... ..	173
<i>Santaolalla, M.</i> : Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide from <i>Erwinia carotovora</i> . II. Influence of the extraction method ... ..	83
<i>Santos-Ruiz, A.</i> : see <i>Morales, V.</i> ... ..	55
Third International Conference on Culture Collections ... ..	171
<i>Vilas, L.</i> ; <i>Rubio-Huertos, M.</i> , and <i>Portolés, A.</i> : Bibliography ... ..	173
<i>Vives, J.</i> , and <i>Parés, R.</i> : Count and identification of chemoorganotrophic denitrifying bacteria in an experimental field ... ..	43
<i>Vives, J.</i> , and <i>Parés, R.</i> : Count of chemolithotrophic denitrifying bacteria and sulphate reducing in an experimental field ... ..	69

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

## ULTRAESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DEL LIPOPOLISACARIDO DE LA *ERWINIA CAROTOVORA*

### II. Influencias del método de extracción

por

M. SANTAOLALLA

#### INTRODUCCION

El lipopolisacárido de los microorganismos gram-negativos es una macromolécula compleja cuyo peso molecular oscila entre varios millones, dependiendo principalmente del estado de agregación en que se encuentra. El conocimiento de su estructura química total nos es desconocido en la actualidad, aunque existen grandes conocimientos parciales de su estructura, sobre todo de los lipopolisacáridos de *Salmonella* y *Escherichia coli*.

El tratar de encontrar relaciones entre su toxicidad, pirogenicidad, neutralización de anticuerpos, etc., y estados de agregación, peso molecular, contenido en lípidos, presenta grandes dificultades, debido principalmente a que no se obtienen productos homogéneos cuando se aplican a su análisis las modernas técnicas de inmunodifusión o inmunoelectroforesis, aún empleando para su extracción los métodos más generalizados basados en el empleo del fenol-agua en caliente, y posteriores purificaciones por ultracentrifugación, tratamiento con ribonucleasa, etc.

En el presente trabajo realizamos un estudio comparativo submicroscópico y químico del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, extraído por diferentes métodos, tratando de obtener algunas consecuencias sobre las diferencias encontradas tanto desde el punto de vista morfológico como químico.

## MATERIALES Y METODOS

### *Microorganismo*

La misma estirpe e idénticas condiciones de cultivo que en un trabajo anterior (16).

### *Extracción del lipopolisacárido*

1) Método de Westphal y Jann (20). Después de una purificación parcial por ultracentrifugación, eliminamos las últimas trazas de ácidos nucleicos por tratamiento con ribonucleasa, según indicamos en el trabajo citado (16).

2) Métodos de Leive (6) y Leive y colaboradores (7).

3) Método de Adams (1).

### *Separación de lípidos libres*

La separación de lípidos libres que pueden impurificar el lipopolisacárido, sobre todo cuando se extrae por el método de Leive, la realizamos según el método de Kanfer y Kennedy (5).

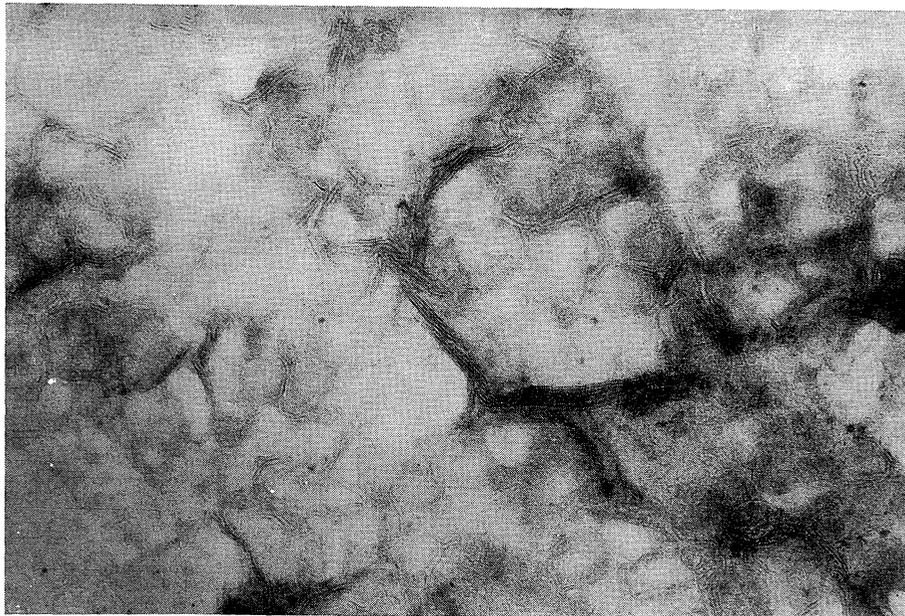
La eliminación de ácidos nucleicos, a medida que avanza el proceso de purificación, la vamos comprobando por curvas de máxima absorción en la zona ultravioleta, empleando el espectrofotómetro Unicam S.P. 500.

### *Determinación de proteínas*

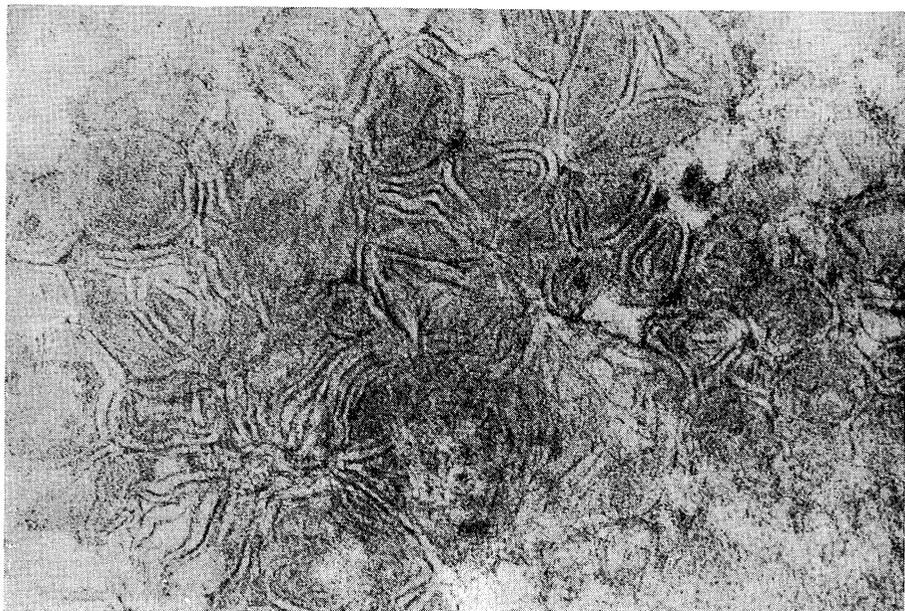
La realizamos según el método de Lowry y colaboradores (10).

### *Microscopia electrónica*

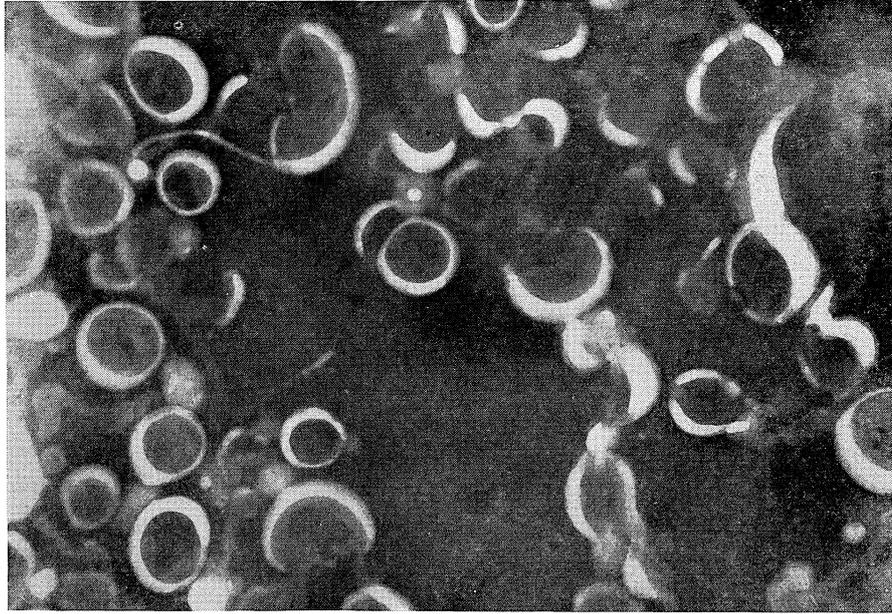
Para la observación del lipopolisacárido usamos las mismas técnicas y tinciones que en nuestro anterior trabajo (16).



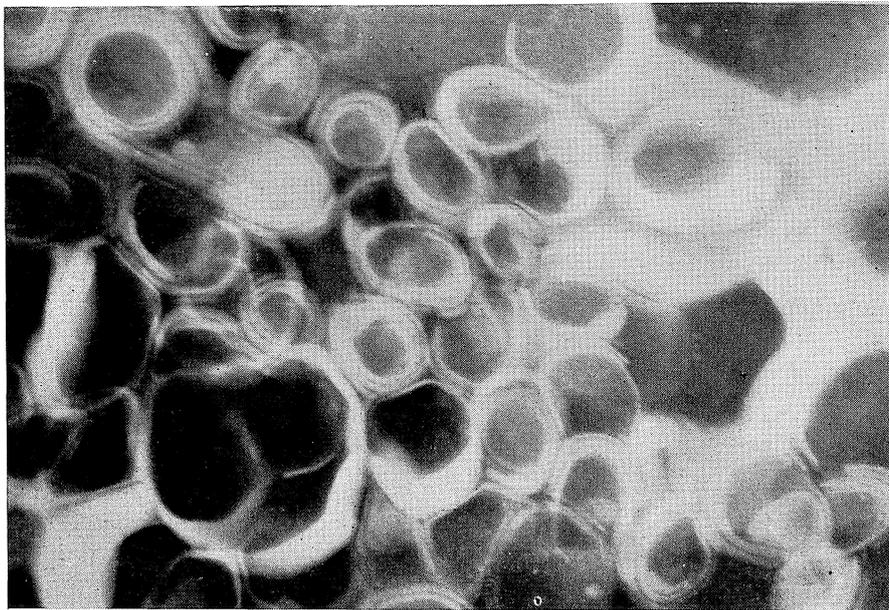
*Figura 1. Lipopolisacárido de la E. carotovora extraído por el método de Westphal y Jann, antes de la purificación. Tinción positiva.  $\times 60.300$*



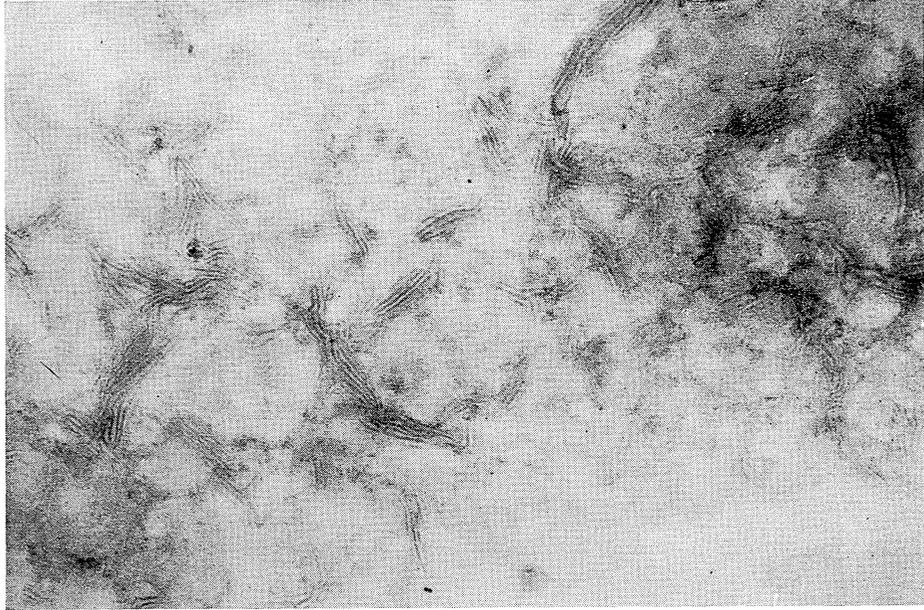
*Figura 2. Lipopolisacárido de la E. carotovora extraído por el método de Westphal y Jann y purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa. Tinción positiva.  $\times 136.000$*



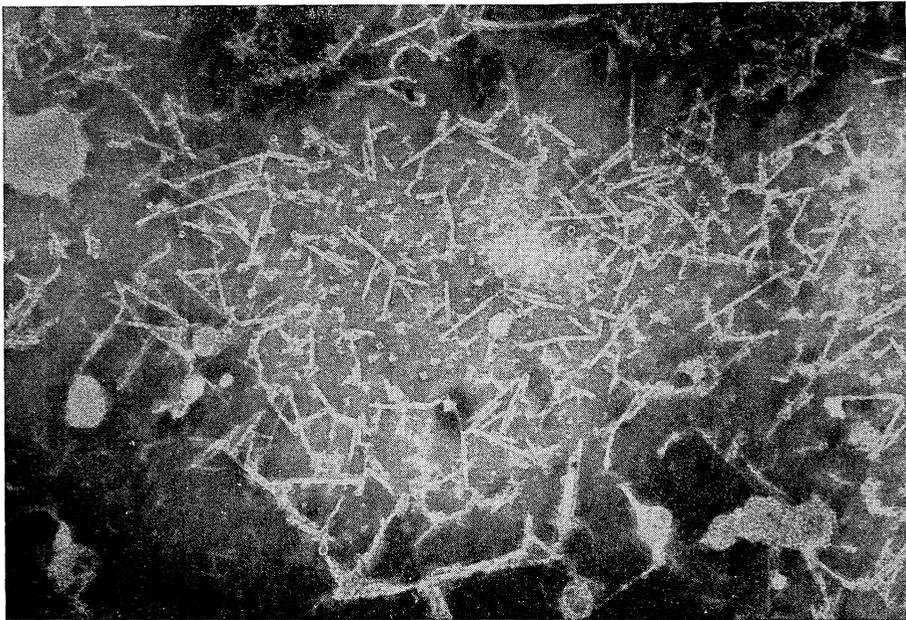
*Figura 3. Lipopolisacárido de la E. carotovora extraído por el método de Westphal y Jann y purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa. Tinción negativa. Aparecen cuerpos ovales.  $\times 94,000$*



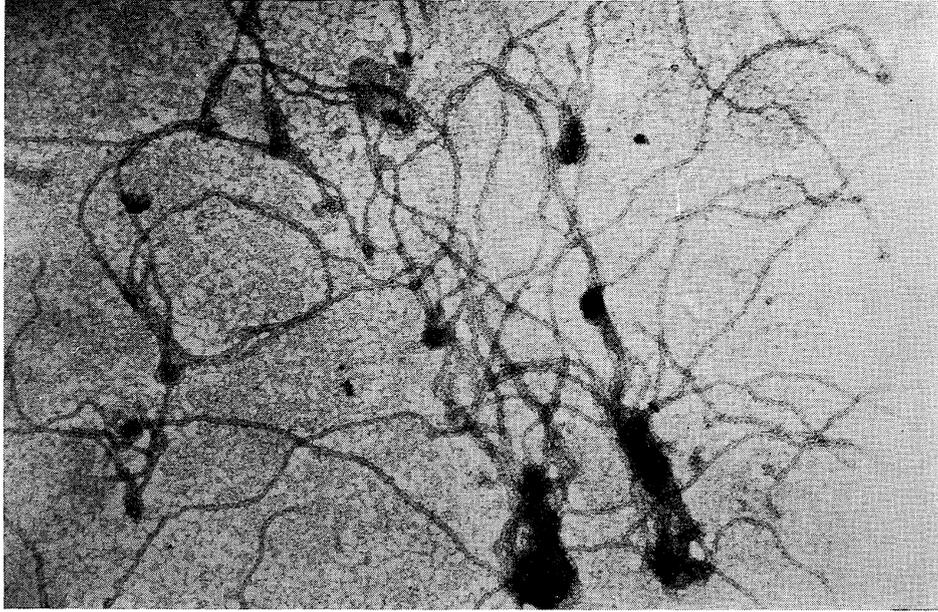
*Figura 4. Lipopolisacárido de la E. carotovora extraído por el método de Westphal y Jann y purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa. Tinción negativa. Estructuras en forma de aillos de elipsoideos concéntricos.  $\times 88,000$*



*Figura 5. Lipopolisacárido de la E. carotovora obtenido por el método de Leive y colaboradores. Tinción positiva.  $\times 60.300$*



*Figura 6. Fracción  $F_1$  del lipopolisacárido de la E. carotovora obtenido por el método de Leive y colaboradores.  $\times 60.300$*



*Figura 7. Lipopolisacárido de la E. carotovora extraído por el método de Westphal y Jann y no eliminado previamente por el método de Leive y colaboradores. Tinción positiva.  $\times 50.000$*



*Figura 8. Lipopolicasárido de la E. carotovora extraído por el método de Adams. Tinción positiva.  $\times 60.300$*

Empleamos el microscopio electrónico Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopia Electrónica, del Centro de Investigaciones Biológicas, de Madrid.

#### *Análisis químico y cromatografía*

Se emplearon los mismos métodos reseñados en el anterior trabajo (16).

### RESULTADOS

#### *a) Ultraestructura*

En el lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, extraído por el método de Westphal y Jann (20), antes de ser purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa, cuando se observa al microscopio electrónico en tinción positiva, vemos que su estructura trilaminar no aparece tan clara como aquella observada en una preparación del mismo, después de purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa (*figuras 1-2*); las cintas trilaminares se aprecian en ambos, pero los anillos imperfectos de distintos tamaños están mucho más delimitados después de la purificación (*figura 2*). Este lipopolisacárido purificado observado al microscopio electrónico en tinción negativa con ácido fosfotúngstico, aparece en forma de cuerpos ovales de diámetro variable y ocasionalmente como esferoides (*figura 3*); también se observan estructuras en forma de cuerda; anillos concéntricos aparecen en la *figura 4*.

Por los métodos de Leive y Leive y colaboradores (6-7) extraemos un complejo EDTA-lipopolisacárido; cuando se observa al microscopio electrónico en forma de tinción positiva, aparece con una estructura trilaminar bien marcada (*figura 5*), que aparenta como si las cintas trilaminares que observamos en el lipopolisacárido obtenido por el método de Westphal y Jann hubiesen sido rotas en pequeños fragmentos.

El lipopolisacárido separado por ultracentrifugación de este complejo EDTA-lipopolisacárido, y que los autores denominan fracción F<sub>1</sub>, observado al microscopio electrónico en tinción negativa, aparece en forma de pequeños túbulos con una orientación rectilínea, como se aprecia en la *figura 6*.

Los microorganismos de los que eliminamos parcialmente el lipopolisacárido (6-7), fueron tratados por fenol-agua en caliente (20), para

extraer el total del lipopolisacárido; la *figura 7* muestra el resto del lipopolisacárido no eliminado por el EDTA y extraído por el método de fenol-agua; observado bajo la forma de tinción positiva se aprecian perfectamente unas cintas largas con estructura trilaminar muy clara.

La *figura 8* muestra el lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora* extraído con dimetil-sulfóxido (1); la observación fue hecha en forma de tinción positiva y se aprecian estructuras en forma de cintas irregulares trilaminares.

#### b) Composición química

Por el método de Westphal y Jann (20) extraemos el lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, que después de purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa resultó estar exento de ácidos nucleicos según nos muestra su curva de máxima absorción en el espectro-

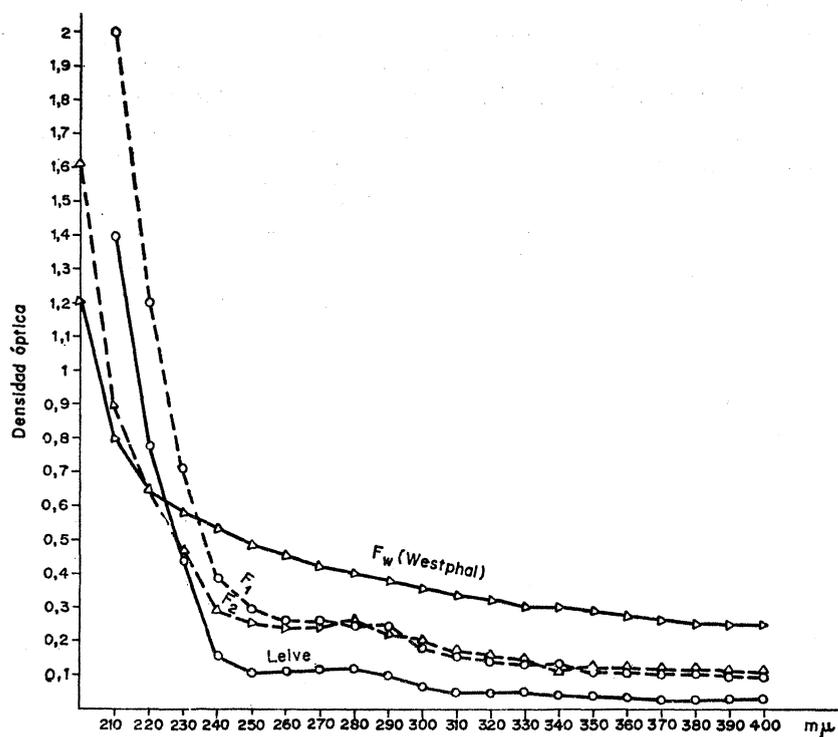


Figura 9

fotómetro (*figura 9*); el porcentaje de lipopolisacárido purificado fue de 0,92, referido a peso seco de microorganismos.

Siguiendo el método de Leive (6-7) obtenemos inicialmente un complejo EDTA-lipopolisacárido que representa el 0,85 %, referido a peso seco de microorganismos de que partimos; pero este lipopolisacárido contiene todavía restos de ácidos nucleicos (véase *figura 9*); sin embargo la fracción  $F_1$  de este complejo EDTA-lipopolisacárido que aislamos por ultracentrifugación, resultó exenta de ácidos nucleicos (*figura 9*); en la fracción  $F_2$  aparecieron indicios; en la fracción que denominamos  $F_w$  y que representó un porcentaje 2,2, referido a peso seco del resto de microorganismos tratados por EDTA, no pudimos identificar ácidos nucleicos (*figura 9*).

El *cuadro 1* indica los resultados obtenidos en cuanto al contenido de nitrógeno y fósforo del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora* extraído según los métodos expuestos.

*Cuadro 1*

Lipopolisacárido	N	P
Westphal y Jahn	0,99	1,1
Leive	9,95	1,1
Leive $F_1$	7,95	0,65
Leive $F_2$	no determinados	
Leive $F_w$	1,25	1,07
Adams	6,24	1,5

La proporción de lípido A en cuanto al polisacárido resultó ser similar en los lipopolisacáridos obtenidos por el método de Westphal y Jann (20), y la fracción que hemos denominado  $F_1$  del lipopolisacárido obtenido por el método de Leive (6-7) correspondió a un 38 %; en la fracción  $F_w$  la proporción de lípido A respecto al polisacárido fue mayor, un 44 %. Sin embargo, el lipopolisacárido que inicialmente era más impuro de estos tres resultó ser el procedente de la fracción  $F_1$ , del que separamos un 8,6 % de lípidos libres, y su contenido en proteínas era un 12,5 %.

La composición química cualitativa (no se ha realizado cuantitativa) del lípido A de estos tres lipopolisacáridos obtenidos de la *Erwinia carotovora* es semejante; el lípido A del lipopolisacárido obtenido directamente por el método de Westphal y Jann (20) dio un contenido en N del 1,61 %, y en P, de 2,09 %; el correspondiente a la fracción F<sub>w</sub>, 1,1 % y 1,85 %, respectivamente. En todos ellos, identificamos cromatográficamente glucosamina, etanolamina, indicios de KDO (ácido-3-desoxi-octulosónico) y ácidos grasos.

Por el método de Adams (1) obtenemos un complejo proteína-lipopolisacárido, para cuyo estudio es imprescindible separar la gran cantidad de proteína que inicialmente extraemos.

En cuanto a la parte polisacárida de estos lipopolisacáridos, hemos realizado un estudio inicial de dos de ellos; el correspondiente al lipopolisacárido obtenido siguiendo directamente el método de Westphal y Jann, y el extraído por el mismo método, pero previo tratamiento de las células por las soluciones de TRIS y EDTA.

Los porcentajes de fósforo de estos dos polisacáridos fueron, respectivamente, de 0,23 y 0,30.

De ambos obtenemos por hidrólisis suave 7 oligosacáridos, cuyos R<sub>f</sub>g sobre papel y placa, composición de los mismos y relaciones molares de los principales, señalamos en el *cuadro 2*.

Los oligosacáridos que se encontraron en mayor proporción fueron, en el correspondiente a microorganismos no tratados, el señalado con el número 4, seguido del 2 y 3; y los predominantes en la fracción F<sub>w</sub>, el señalado con el número 5, seguido del 7 y 4.

## DISCUSION

### a) Ultraestructura

La estructura submicroscópica del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora* extraído por el método de Westphal y Jann (20), aparece cuando se observa en tinción positiva en forma de cinta plana con una estructura trilaminar (*figuras 1-2*). El grosor de esta cinta trilaminar está comprendido entre 80 y 100 Å.

El mismo lipopolisacárido, observado en tinción negativa con ácido fosfotúngstico, aparece en forma de cuerpos ovales de diámetro variable y ocasionalmente como esferoides, pudiéndose apreciar a menudo es-

Cuadro 2

Oligosacáridos	Lipopolisacárido obtenido directamente por el método de Westphal y Jann (20)			Lipopolisacárido obtenido previo tratamiento del microorganismo con TRIS y EDTA y a continuación por el método de Westphal y Jann, fracción F <sub>w</sub>				
	Rfg		Monosacáridos (relación molar)	Rfg		Monosacáridos (relación molar)		
	Papel	Placas		Papel	Placas			
1	0,33	0,26	Glucosamina Galactosamina (indicios) KDO Glucosa 2 Xilosa 1	0,34	0,26	Glucosamina Glucosa 2 Xilosa 1 Sin identificar Sin identificar		
2	0,56	0,38	Glucosamina KDO Glucosa 2 Xilosa 3	0,43	0,38	Glucosamina Glucosa 3 Xilosa 2 Sin identificar		
3	0,75	0,60	Galactosamina Glucosa 3 Xilosa 1 Galactosa 3	0,54	0,60	Galactosamina Glucosa 2 Xilosa 1 Galactosa 3 Sin identificar		
4	1,05	0,79	Galactosamina Glucosa 4 Xilosa 1 Galactosa 3 Ramnosa	0,92	0,79	Galactosamina Glucosa 4 Xilosa 1 Galactosa 3 Ramnosa (indicios)		
5	1,23	1	Glucosa Xilosa Galactosa Ramnosa	1	1	Galactosamina (indicios) Glucosa 3 Xilosa 1 Galactosa 1 Ramnosa		
6	1,38	1,4	Glucosa 9 Xilosa 3 Ramnosa 2 Glucosamina	1,2	1,4	Glucosa 2 Xilosa 6 Ramnosa 9		
7	2,36	1,7	Glucosa Xilosa Galactosa Ramnosa	2	1,7	Glucosa 1 Xilosa 1 Galactosa 2 Ramnosa 3		

estructuras en forma de cuerdas; bajo esta forma de tinción, la estructura trilaminar no es fácilmente observable (*figura 3*). También estructuras elipsoideas concéntricas (*figura 4*) son corrientes y semejantes a las encontradas por Pollock y colaboradores (12) en el lipopolisacárido de un mutante de *Erwinia coli* K 12. Santaolalla (14-15), estudiando la ultraestructura del lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*, formas normal y L estable, extraído por el método de Westphal y Jann (20), encuentra unas estructuras semejantes a las del lipopolisacárido ahora estudiado.

El método de Leive y colaboradores (7) para la extracción del lipopolisacárido de los microorganismos gram-negativos, basado en el empleo del EDTA, no logra extraer más que una parte del total del lipopolisacárido, que, según los autores, está comprendida entre el 30 y el 50 %. Esta parte, purificada por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa, observada al microscopio electrónico en tinción positiva, presenta una estructura trilaminar perfectamente marcada, y su apariencia es como si los cuerpos ovales, que observábamos en el mismo lipopolisacárido cuando se extrae por el método de Westphal y Jann (20), hubiesen sido fragmentados (*figura 5*).

La *figura 6* representa una tinción negativa con ácido fosfotúngstico de la fracción denominada F<sub>1</sub> del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora* extraído por el método de Leive (6-7); en ella se aprecian estructuras tubulares.

Cuando sometemos estos microorganismos, de los que hemos eliminado parte del lipopolisacárido por tratamiento con EDTA, a la acción del fenol-agua, según el método indicado de Westphal y Jann, para tratar de extraer el resto del lipopolisacárido no eliminado por el EDTA, extraemos un lipopolisacárido, que después de purificado por ultracentrifugación y tratamiento con ribonucleasa, al ser observado al microscopio electrónico en tinción positiva, aparece en forma de cinta ramificada (*figura 7*), y su estructura trilaminar se aprecia perfectamente, sobre todo en ciertas zonas.

El lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, extraído por el método de Adams (1), después de purificado, cuando se observa al microscopio electrónico en forma de tinción positiva, aparece también con una estructura trilaminar (*figura 8*), aunque no tan perfectamente delimitada como la que se observa cuando la extracción se hizo por los métodos basados en el empleo del fenol-agua.

De lo anteriormente expuesto y de la atenta observación de las adjuntas microfotografías electrónicas, se deduce que la estructura submicroscópica del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora* está, por lo menos en parte, ligada al método de extracción empleado para su obtención, y a las posteriores purificaciones a que sea sometido.

Shands y colaboradores (17), estudiando la estructura morfológica del lipopolisacárido de distintas especies de *Salmonella typhimurium* extraído por el método del fenol-agua, observan una estructura en forma de cinta ramificada trilaminar, la cual puede romperse por agitación ultrasónica y aparece, entonces, en forma de discos, en cuyos bordes se puede apreciar la misma estructura trilaminar; también indican que el lipopolisacárido de un mutante desprovisto de cadena lateral de polisacárido O, posee una estructura similar e idénticas dimensiones, mientras que el lipopolisacárido de otro mutante sin heptosas tiene una más fina y delicada estructura, lo que sugiere que el corazón del lipopolisacárido contribuiría a su estructura trilaminar, pero no sus cadenas laterales, que, como hemos indicado, constituyen el polisacárido antigénico O.

El comportamiento del lipopolisacárido en los disolventes lipídicos, y la parecida estructura que presenta cuando se emplean los mismos métodos de extracción y purificación, aunque se encuentre, por lo menos en parte, desprovisto de su contenido en polisacárido, parece indicar que el principal componente que determina su estructura morfológica es la mitad lipídica. No obstante, existe una sugestiva evidencia de que la región denominada corazón, que lleva una parte polisacárida, contribuye a la estructura trilaminar.

Lopes e Inniss (8-9) estudian la morfológica del lipopolisacárido de una estirpe aviar del *Escherichia coli* extraído por el método de Westphal y Jann, pero previa precipitación del material con 4 volúmenes de metanol frío; cuando observan al microscopio al lipopolisacárido así obtenido, aparece en forma de cinta, frecuentemente ramificada, en la que se aprecian dos capas externas opacas a los electrones y una interna, menos, indicando la similitud estructural del lipopolisacárido de *E. coli* con aquélla encontrada por Shands y colaboradores (17) para el lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium*. Creemos muy interesante señalar que Lopes e Inniss, en vez de suspender el lipopolisacárido en agua como realizamos nosotros, lo suspenden en TRIS 0,1 M, dejándole a un pH 8; y también, que cuando observan el lipopolisacárido en tinción negativa aparece como una cinta ramificada en la que se aprecia una zona central

y dos laterales; los autores sugieren que las zonas laterales corresponden al polisacárido antigénico O del lipopolisacárido.

Son muy interesantes, a este respecto, los trabajos de Hannecart-Pokorni y colaboradores (3-4) sobre el lipopolisacárido antigénico de *Shigella flexneri*. Los autores extraen inicialmente la endotoxina de Boivin (complejo proteína-lípido-lipopolisacárido) con ácido tricloroacético, siguiendo el método de Boivin y colaboradores (2); tras sucesivas reacciones de desnaturalización, degradación y purificación, señalan que la estructura morfológica observada al microscopio electrónico aparece como largos filamentos de longitud y grosor variables, con un peso molecular comprendido entre  $10 \cdot 10^6$  y  $45 \cdot 10^6$ ; estas dos estructuras en forma de filamentos longitudinales, no son observadas hasta después de la purificación del lipopolisacárido, indicando que tal vez se originen durante ella a partir de ciertas estructuras esféricas que se aprecian en la morfología del lipopolisacárido crudo. Esta estructura macromolecular la consideran formada por la repetición de unidades menores con un peso molecular de 25.000, y una constante de sedimentación  $S_{20w}$  de 10,2 S, unidas por interacción hidrofóbica debida a la parte lipídica de la molécula, por cationes bivalentes y por grupos carboxílicos. Así, estos filamentos observados son definidos por los autores como polimerizaciones artificiales de las unidades moleculares más pequeñas, que serían las entidades biológicas normales, presentes *in situ*. La unidad 10,2 S, que obtienen por degradación del lipopolisacárido, observada al microscopio electrónico aparece como una partícula globular, semejante a la albúmina del suero. También por degradación del lipopolisacárido con dodecil-sulfato sódico al 0,4 %, obtienen unidades 10,2 S, las cuales observadas al microscopio aparecen como filamentos largos, muy finos, con un grosor de 40 Å, junto a partículas globulares de diferentes formas.

Rothfield y Horne (13) estudian al microscopio electrónico el lipopolisacárido de la pared celular de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, extraído por el método del fenol-agua y purificado por diálisis contra un tampón de TRIS-EDTA, pH 8,3. Las preparaciones en solución acuosa y tinción negativa con molibdato amónico, aparecen observadas al microscopio electrónico con una estructura en forma de esferas huecas, donde ocasionalmente aparecen esferoides achatados o dentados. Estas estructuras son parecidas a las encontradas por nosotros cuando observamos al microscopio electrónico el lipopolisacárido de la *Erwinia caro-*

*torova* en forma de tinción negativa, y en ellas, como hemos señalado anteriormente, la estructura trilaminar es difícilmente observable.

Work y colaboradores (21) también encuentran una estructura globular cuando examinan el lipopolisacárido extracelular de *Escherichia coli* bajo la forma de tinción negativa, pero en sus microfotografías la estructura trilaminar aparece algo más marcada.

Por lo que respecta al lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, nuestros resultados parecen indicar que cuando el lipopolisacárido se encuentra más purificado, su ultraestructura aparece, al ser observado al microscopio electrónico en tinción positiva, en forma de cinta ramificada trilaminar (*figura 7*).

#### b) Composición química

En cuanto a composición química, el lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora* extraído por los distintos métodos indicados anteriormente, vemos que presenta diferencias significativas.

Concretándonos al método de Westphal y Jann (20), que empleamos para obtener después de las diversas purificaciones un lipopolisacárido que consideramos más puro (es también el más empleado por distintos investigadores), si nos fijamos en el *cuadro 2*, podemos observar ciertas diferencias consecutivas al previo tratamiento de los microorganismos por la solución tampón TRIS-EDTA, que indicamos a continuación.

El porcentaje de lípido A del lipopolisacárido es mayor, 44 %, cuando los microorganismos son previamente tratados por el tampón TRIS-EDTA, lo mismo sucede con el contenido en nitrógeno total del lipopolisacárido; en cuanto a fósforo, las diferencias son menos significativas.

Por hidrólisis suave del polisacárido separado de ambos lipopolisacáridos obtenemos 7 oligosacáridos (véase *cuadro 2*), que aunque parecidos en cuanto a R<sub>f</sub> sobre papel o placa, no son idénticos; lo mismo sucede en cuanto a la relación molar de los monosacáridos que los componen. Tampoco existe identidad en el predominio cuantitativo de estos oligosacáridos, pues mientras en el lipopolisacárido obtenido directamente por el método de Westphal y Jann predomina el que hemos señalado con el número 4, el predominante después de tratar las células con TRIS-EDTA es el número 5.

Leive y colaboradores (7) también señalan diferencias químicas en el lipopolisacárido de *Escherichia coli*, según el microorganismo sea o

no previamente sometido al incremento de la permeabilidad producido por el EDTA.

En el año 1966, Nowotny y colaboradores (11), estudiando la relación entre estructura y función en los antígenos O de los microorganismos gram-negativos, hacen una interesante observación sobre la necesidad de homogeneidad de los productos ensayados.

Según estos investigadores, es necesario el uso de un producto puro y homogéneo para poder estudiar comparativamente el modo de acción, a través del cual las endotoxinas y, por tanto, el lipopolisacárido producen las distintas reacciones biológicas; puesto que algunos contaminantes de preparaciones purificadas incompletamente pueden influir en los efectos biológicos. También pueden observarse resultados equívocos empleando fracciones no totalmente homogéneas.

Las pruebas convencionales de homogeneidad, tales como la aparición de una sola banda fina en la electroforesis, o en sedimentación por ultracentrifugación, resultan a menudo inconclusas, cuando se aplican mejores procesos resolutivos; como, por ejemplo, la inmunodifusión o inmunolectroforesis; usando estos últimos métodos, aquellos componentes presentes en una preparación antigénica, que no son verdaderos antígenos o no formarían precipitado con el correspondiente anticuerpo, no serían detectados. Los autores también observaron que el sistema antígeno-anticuerpo, que solamente presenta inicialmente una banda de precipitación, después de algunos días de incubación da lugar a dos o más bandas.

Por ninguno de los dos procedimientos más usados para la extracción de los antígenos O endotóxicos, como son los que emplean principalmente el ácido tricloroacético o el fenol-agua, aún con las posteriores purificaciones correspondientes, se logra obtener un producto final totalmente homogéneo.

Los investigadores del grupo de Nowotny (11) observaron que el sobrenadante obtenido después de la precipitación de la endotoxina con antisuero O de conejo en ligero exceso de anticuerpo, contenía polisacáridos que no fueron precipitados con el antisuero; una extracción con fenol-agua de este sobrenadante puso de manifiesto un compuesto conteniendo carbohidratos que no fueron detectados en el extracto obtenido con fenol-agua del antisuero O de conejo solo. Esta observación experimental indica claramente que la endotoxina usada en este proceso era un producto heterogéneo.

Los autores de dicho grupo proponen una serie de procesos que tienen por objeto el descubrimiento de diferentes impurezas de los antígenos O endotóxicos; tienden así a la obtención de fracciones homogéneas, realizando los ensayos biológicos con las fracciones aisladas, al mismo tiempo que su análisis químico. Los métodos empleados para la extracción son los ya referidos del ácido tricloroacético y fenol-agua; purifican el producto por precipitación con metanol y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , fraccionamiento por centrifugación en gradiente de sacarosa y cromatografía en columna de resinas cambiadoras de iones.

Ensayan las distintas fracciones con respecto a la letalidad para el embrión de pollo siguiendo la técnica de Smith y Thomas (18), y la típica reacción de Shwartzman sobre la piel. La actividad serológica de las fracciones la investigan con antisuero O de conejo hiperinmune en sistemas de difusión sobre gel. En las distintas fracciones determinan carbohidratos, hexosaminas y aminoácidos. En el caso de las endotoxinas extraídas con ácido tricloroacético de *Serratia marcescens*, estudian su estabilidad en solventes ácidos y alcalinos; esto es esencial.

A pesar del empleo de todos los procesos combinados de purificación anteriormente indicados no llegaron a la preparación de un producto totalmente homogéneo.

En algunos ensayos biológicos realizados con dichas fracciones todavía no homogéneas, pudieron demostrar que mientras los principales componentes mostraban actividad serológica, no todos fueron tóxicos para el embrión de pollo, o positivos en el ensayo de Shwartzman sobre la piel. Con la excepción de tres fracciones, todas mostraban diferente grado de actividad en el acrecentamiento de las reacciones no específicas; algunas fracciones resultaron inertes en todos los ensayos biológicos.

El indudable valor de estos experimentos fue el poner de manifiesto la necesidad de revisar muchos resultados obtenidos anteriormente sobre la estructura y efectos biológicos de diferentes extractos endotóxicos.

También es muy interesante mencionar aquí el efecto degradativo del fenol sobre la endotoxina y el lipopolisacárido de *Serratia marcescens*, que han demostrado este mismo año Tsang y colaboradores (19); la causa de esta degradación es la rotura de un enlace sensible al fenol dentro de la parte lipídica de la macromolécula. Como consecuencia de esta degradación, el lipopolisacárido y los fragmentos de proteína simple retienen *solamente una parte* de la mitad lipídica. Aunque actuando de otra forma, también parece ser que la extracción del lipopolisacá-

rido por los métodos del fenol-agua produce la hidrólisis de parte de las cadenas específicas O y uniones ésteres de los ácidos grasos. Los autores sugieren, o más bien confirman, que esta parcial degradación es una de las principales causas de la heterogeneidad de las preparaciones de endotoxinas y lipopolisacáridos de los microorganismos gram-negativos.

Con lo anteriormente expuesto creemos poder explicar las diferencias, tanto estructurales como químicas, que encontramos en el lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, según los métodos de extracción y purificación empleados para su aislamiento. Si, como indicábamos, la mitad lipídica parece ser el principal determinante de su estructura morfológica, la mayor o menor acción hidrolítica del fenol puede ser causa de su modificación estructural.

De todo esto se concluye que los lipopolisacáridos obtenidos por distintos métodos no son homogéneos y difieren química y estructuralmente; por lo que, lógicamente, sus propiedades biológicas no serán iguales.

Nuestro trabajo se ha limitado a demostrar las diferencias químicas y estructurales del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*, obtenido y purificado por diferentes métodos.

## RESUMEN

Se han empleado distintos métodos de extracción y purificación para la obtención del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*.

Hemos comparado los resultados, tanto desde el punto de vista ultraestructural como de composición química; pequeñas diferencias se han encontrado en lo referente a su composición química, y más significativas en cuanto a su estructura morfológica al ser observadas en forma de tinción negativa al microscopio electrónico, lo que hace pensar que la composición y ultraestructura del lipopolisacárido varía según los diferentes métodos de extracción y purificación que se empleen.

## SUMMARY

*Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide from Erwinia carotovora. II. Influence of the extraction method*

Different methods of extraction and further purification have been used for the obtention of the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora*. The purificates have been compared chemically and ultrastructurally. Small differences have been found in their chemical composition and rather pronounced ones in the ultrastructure by negative staining at the electron microscope. This seems to indicate that lipopolysaccharide composition and ultrastructure varies depending on the different methods of purification and extraction.

## BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, G. A. 1967. Extraction of lipopolysaccharides from Gram negative bacteria with dimetil-sulfoxide. *Can. J. Biochem.*, 42, 422-26.
2. BOIVIN, A.; MESROBEANU, I., et MESROBEANU, L. 1933. Technique pour la preparation des polysaccharides microbiens spécifiques. *C. R. Soc. Biol.*, 133, 490-92.
3. HANNECART-POKORNI, E.; DEKEGEL, D.; DEPUYDT, F., and DIRK, J. 1970. Study of the structure of *Shigella flexneri* 0 antigen. I. Chemical degradation. *Biochim. Biophys. Acta*, 201, 155-66.
4. HANNECART-POKORNI, E.; DEKEGEL, D.; DEPUYDT, F., and DIRK, J. 1970. Study of the structure of *Shigella flexneri* 0 antigen. II. Physicochemical aspect. *Biochim. Biophys. Acta*, 201, 167-78.
5. KANFER, J., and KENNEDY, E. P. 1963. Metabolism and function of bacterial lipids. I. Metabolism of phospholipids in *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, 238, 2919-22.
6. LEIVE, L. 1965. Release of lipopolysaccharides by EDTA treatment of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 21, 290-96.
7. LEIVE, M. L.; SHOVLIN, V. K., and MERGENHAGEN, L. E. 1968. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharides released from *E. coli* by ethylenediaminetetracetate. *J. Biol. Chem.*, 248, 6384-91.
8. LOPES, J., and INNISS, W. E. 1969. Electron microscopy of effect of polymixin on *E. coli* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 100, 1128-30.
9. LOPES, J., and INNISS, W. E. 1970. Electron microscopy study of lipopolysaccharides from an aviar strain of *E. coli* 018. *J. Bacteriol.*, 103, 238-43.

10. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., and RANDAEL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
11. NOWOTNY, A.; CUNDY, K. R.; NEALE, N. L.; NOWOTNY, A. M.; RADVANY, R.; THOMAS, S. P., and TRIPODY, D. J. 1966. Relation of structure to function in bacterial O-antigen. IV. Fractionation of the components. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 133, 586-603.
12. POLLOCK, J. J.; NGUYEN-DISTECHE, M.; CHUYSEN, G. M.; COYETE, J.; LINDER, R.; SALTON, M. R. J.; KIN, K. S.; PERKINS, H. R., and REYNOLDS, P. 1974. Fractionation of the DD-carboxipeptidase-transpeptidase activities solubilized from membranes of *Escherichia coli* K 12, strain 44. *Eur. J. Biochem.*, 41, 439-46.
13. ROTHFIELD, L., and HORNE, R. W. 1967. Reassociation of purified lipopolysaccharide and phospholipid of the bacterial cell envelope: electron microscopic and monolayer studies. *J. Bacteriol.*, 93, 1705-21.
14. SANTAOLALLA, M. 1971. Estructura y composición química del lipopolisacárido del *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, 24, 243-56.
15. SANTAOLALLA, M. 1972. Estructura y composición química del lipopolisacárido de la forma L fija del *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiol. Españ.*, 25, 179-94.
16. SANTAOLALLA, M., y ESPLÁ, M. D. 1974. Ultraestructura y composición química del lipopolisacárido de la *Erwinia carotovora*. *Microbiol. Españ.*, 27, 257-82.
17. SHANDS (Jr.), J. W.; GRAHAM, J. A., and NATHK, K. 1967. The morphologic structure of isolated bacterial lipopolysaccharide. *J. Mol. Biol.*, 25, 15-21.
18. SMITH, R. T., and THOMAS, L. 1956. The letal effect of endotoxins on the chick embryo. *J. Exp. Med.*, 104, 217-31.
19. TSANG, J. C.; WANG, C. S., and ALAVPOVIC, P. 1974. Degradative effect of phenol on endotoxin and lipopolysaccharide preparative from *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 117, 786-95.
20. WESTPHAL, O., and JANN, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharide, extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohyd. Chem.*, 5, 83-91.
21. WORK, E.; KNOX, K. W., and VESK, M. 1966. The chemistry and electron microscopy of an extracellular lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 133, 438-49.

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

## EVOLUCION CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DE LAS PROTEINAS EN LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *SARCINA FLAVA*

por

MARTA CALVO, E. CARDELL, M. A. FALCÓN y A. CHORDI

### INTRODUCCION

Son varios los autores (2 y 22) que han estudiado cómo el contenido proteico de los microorganismos depende en gran parte de las condiciones de cultivo y de la fuente nutricional de los mismos.

Zaitseva y colaboradores (23) comprobaron variaciones cuantitativas y cualitativas en *Bacillus coagulans* al cambiar la temperatura de crecimiento. Herring (13) también estudió variaciones de este tipo en bacterias halófilas obligadas. Nosotros hemos tenido ocasión de comprobar modificaciones cualitativas de las proteínas de *Sarcina littoralis* sometida a cambios bruscos de temperatura.

La influencia de la concentración salina del medio de cultivo en bacterias halófilas ha sido seguida por Gochnauer y colaboradores (10), Stoeckenius y Rowen (19) y otros. Experimentos realizados en nuestro laboratorio muestran cómo *Sarcina flava* (halófila facultativa), cultivada en el medio recomendado por Gibbons y colaboradores (8) (25 % de ClNa), presentaba un total de 11 proteínas, y disminuía una de las detectadas al principio.

De forma semejante, existen variaciones proteicas cuando se limita

la fuente de carbono en cultivos bacterianos, ya que, según ciertos autores (9 y 14), existe un cambio en la eficiencia de la síntesis proteica por unidad de ARN, por estar el medio de cultivo formado principalmente por aminoácidos y proteínas. Por esto, es fundamental establecer unas condiciones de cultivo, las cuales deben mantenerse a lo largo de los experimentos a realizar.

El objeto de este trabajo es estudiar de forma cuantitativa y cualitativa el contenido proteico de *Sarcina flava* a lo largo de su cultivo, manteniendo constantes tanto las condiciones ambientales como los elementos nutricionales, para comprobar que si existen estas variaciones serán debidas únicamente a la distinta síntesis enzimática necesaria para los procesos metabólicos sufridos durante el crecimiento. Estos experimentos se han realizado en un fermentador, en el cual se puede controlar exactamente la temperatura, aireación y agitación del medio de cultivo.

## MATERIAL Y METODOS

La cepa bacteriana objeto de este estudio fue la *Sarcina flava* de la A.T.C.C. núm. 147. Como medio base hemos empleado el recomendado por Gibbons y colaboradores (8). Las condiciones seguidas para el cultivo de esta bacteria fueron: 300 r/min de agitación, 37 °C de temperatura y 2 l/min de aireación.

Se efectuaron ensayos previos de crecimiento en matraces de 250 ml, con un volumen de 100 ml del medio, inoculados con 5 ml de la suspensión bacteriana de *Sarcina flava* de 24 h, incubada a 37 °C, en agitación.

La determinación de la curva de crecimiento se realizó mediante lectura de la densidad óptica del cultivo a 555 nm, en un espectrofotocolorímetro modelo spectronic 20. Se realizaron recuentos de microorganismos vivos. Se tomó como óptimo el obtenido al final de la fase logarítmica para evitar errores por defecto.

La determinación cuantitativa de proteínas se efectuó en las muestras recogidas cada hora mediante el método ideado por Herbert y colaboradores (12). Se hizo un primer calentamiento con álcali para romper la pared celular, y así poder determinar las proteínas intra y extracelulares colorimétricamente por biuret.

Se estudió cada hora la velocidad de crecimiento de los microorganismos, como un control más en la curva de crecimiento.

Para estudiar la variación cualitativa de las proteínas, se tomó suspensión bacteriana en tres momentos del crecimiento. La primera muestra fue recogida a las 12 h de inoculado el tanque de cultivo, otra a las 24 h de crecimiento y finalmente a las 36 h del mismo. Con el sedimento recogido de cada muestra, centrifugado a 3.000 r/min, se prepararon las muestras antigénicas. Las condiciones establecidas como óptimas en la preparación de antígenos han sido fruto de varios años de trabajo en la preparación de los mismos, según técnicas de Chordi y colaboradores (3-4). Para ello dicho sedimento se recogía en acetona, con una proporción de 3 volúmenes de acetona/1 de medio centrifugado. Se mantiene 24 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pasado este tiempo, se centrifugaba y se recogía el sedimento, para secar a vacío. Se trituraba hasta obtener un finísimo polvo, a partir del cual se preparaban las muestras para el análisis cualitativo. Para ello se tomó 1 g de polvo de cada fracción y se disolvió en 20 ml de suero fisiológico, respectivamente. Se sometía a la acción de ultrasonido durante 30 min, poniendo baño de hielo para evitar subidas de temperatura, que produjeran una desnaturalización de las proteínas. Posteriormente, se centrifugaba la mezcla, recogiendo el sobrenadante y se desechaba el sedimento, que contenía las paredes rotas de las células. Donahue (6) aconseja conservar en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar la desnaturalización de las proteínas.

En las muestras antigénicas, así preparadas, se hizo una determinación cuantitativa de proteínas por ultravioleta, para calcular el tanto por ciento de contenido proteico en la muestra. Para el análisis en gel de poliacrilamida se utilizaron 75  $\mu\text{l}$  de las muestras antigénicas. Se empleó un gel de poro 7,5, a un pH de 8,5, preparado según recomienda Davis (5). Para la coloración de los mismos se utilizó Coman-Seaubleu.

Para el análisis inmunolectroforético fue necesario obtener inmunoseros. Para ello se inmunizaron conejos de la especie *Oryctogalus cuniculus* con antígenos procedentes de *Sarcina flava*, de 48 h de crecimiento. Estos antígenos se prepararon a partir de cultivos de esta edad. Una vez conseguido el polvo antigénico, según se dijo anteriormente, se preparó el antígeno para inmunizar, disolviendo 1 g de polvo en 16 ml de suero fisiológico y 16 ml de coadyuvante de Freund (1 parte de aceite mineral y 3 partes de lanolina anhidra). La pauta de inmunización se realizó teniendo en cuenta las técnicas de Russell y colaboradores (16)

y Tormo (21), en dos etapas. En la primera se inyectó 1 ml de antígeno, en días alternos, durante 4 semanas. Después de 1 semana de descanso, se comenzó la segunda etapa con inyecciones de 2 ml, también en días alternos, durante 2 semanas, o más tiempo si era necesario. Según los mismos autores (16 y 21), cuando el suero del animal alcanza un título de 1/32 se puede considerar en condiciones de ser usado. El análisis se realizó en portaobjetos con gel de agar y se ensayaron distintos sistemas, enfrentando anti-suero *S. flava*, de 48 h, con las muestras antigénicas recogidas a las 12, 24 y 36 h, es decir, en la fase exponencial, fase estacionaria y fase inicial de declinación del crecimiento. En algunos casos fue necesario emplear sueros absorbidos para facilitar la identificación de los complejos patrones inmunoelectroforéticos.

## RESULTADOS

La curva de crecimiento bacteriano es la representada con trazo continuo en la figura 1. Esta nos muestra cómo la fase logarítmica o exponencial comenzaba a las 9 h del crecimiento y duraba hasta las 16 h del mismo.

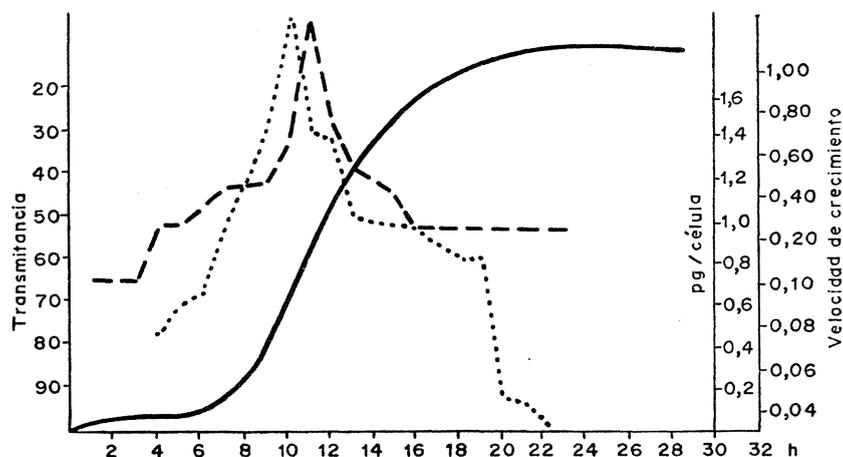
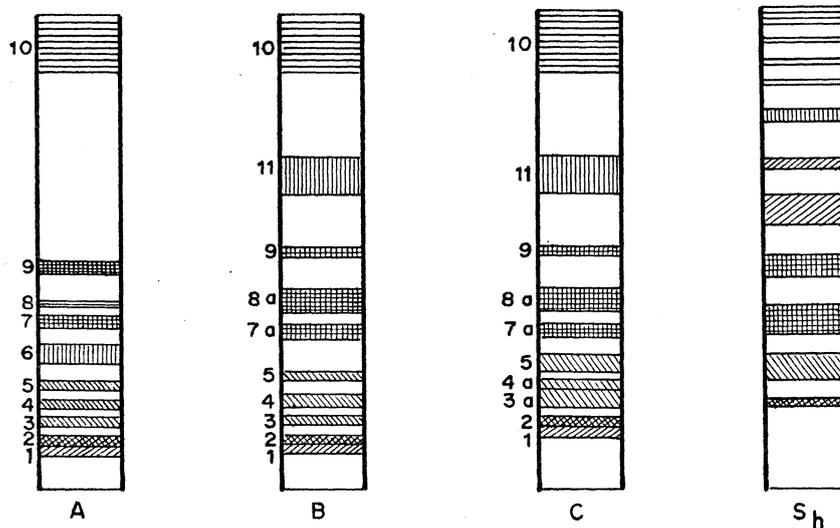


Figura 1. La curva de trazado continuo muestra el crecimiento de *S. flava*. A la curva de trazado discontinuo correspondió la evolución del contenido proteico celular durante el crecimiento de dicha bacteria. La curva de puntos señala la velocidad del crecimiento bacteriano. Obsérvese la relación que existe entre el contenido proteico y la velocidad del crecimiento en un cultivo estático de *S. flava*

Con los resultados obtenidos en la determinación cuantitativa de proteínas se construyó la gráfica de trazo discontinuo de la *figura 1*, que nos manifiesta un máximo contenido proteico de 1,973 pg/célula a las 11 h del crecimiento, aproximadamente a mitad de la fase logarítmica y un mínimo de 0,9 pg/célula a las 16 h del crecimiento, el cual se mantiene constante a lo largo de la fase estacionaria máxima.

La velocidad de crecimiento de *Sarcina flava* está representada con trazado de puntos en la *figura 1*, donde se evidencia claramente que existe una gran similitud o paralelismo entre el contenido proteico/célula y la velocidad de crecimiento de esta bacteria. Por tanto, la máxima multiplicación celular implica una máxima síntesis proteica, puesta de manifiesto a la hora siguiente.

El análisis cualitativo de las proteínas en gel de poliacrilamida nos señaló en cada uno de los distintos momentos de este crecimiento, es decir, a las 12, 24 y 36 h, la existencia de bandas con diferente movilidad electroforética. En la *figura 2* se muestra un esquema de las bandas obtenidas en los geles. Se observa en ella que las bandas 3, 4 y 5 difie-



*Figura 2.* Esquema de las bandas diferenciadas en la electroforesis en gel de poliacrilamida. A, muestra recogida a las 12 h del crecimiento de *S. flava*, correspondiente a la fase exponencial o logarítmica. B, muestra recogida a las 24 h del crecimiento, correspondiente a la fase estacionaria. C, muestra recogida a las 36 h, es decir, al comienzo de la fase inicial de decadencia del crecimiento. S<sub>h</sub>, muestra de suero humano utilizado como control

ren en movilidad e intensidad en las tres fases. La banda número 6 sólo apareció cuando la bacteria crecía en fase exponencial; la número 8 presentó muy poca intensidad en comparación con la adquirida a partir de la fase estacionaria. La banda número 9 de la fase exponencial tenía distinta movilidad electroforética respecto de las demás fases. Finalmente, la número 11 apareció en las fases estacionaria e inicial de decadencia, pero no en la fase exponencial.

Estas diferencias cualitativas de las proteínas han sido confirmadas mediante análisis inmunolectroforético. Para ello, las muestras antigénicas de las tres fases (obtenidas de los cultivos de 12, 24 y 36 h), se ajustaron a una concentración similar de proteínas.

Nosotros enfrentamos cada una de las muestras antigénicas con anti-suero *Sarcina flava* de 48 h de crecimiento. Con los resultados obtenidos se construyó el esquema de la figura 3. La muestra antigénica de la fase exponencial dio un total de 15 componentes. La fase estacionaria dio 17 componentes, y la fase inicial de decadencia del crecimiento dio 23 componentes distintos.

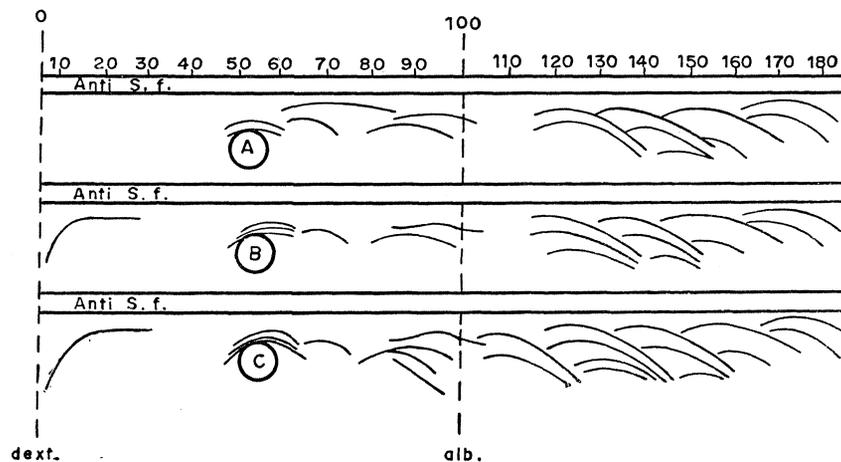
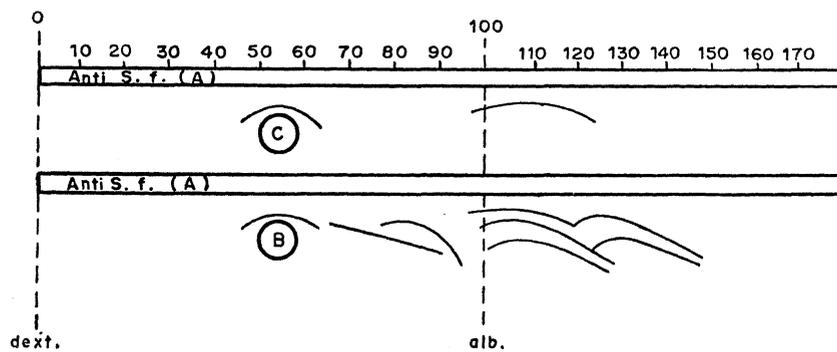


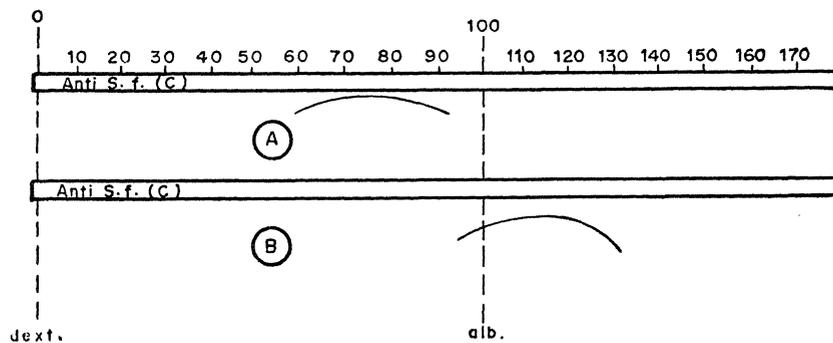
Figura 3. Esquema de los patrones inmunolectroforéticos de las bandas o proteínas comunes de las fases exponencial (A), estacionaria (B) e inicial de decadencia (C) de *S. flava*

Los componentes antigénicos presentes en la fase estacionaria e inicial de decadencia, pero ausentes en la fase exponencial, se determinaron enfrentando anti-suero *Sarcina flava* de 48 h absorbido con antígeno de

esta fase, con muestras antigénicas de las fases estacionaria e inicial de decadencia. Los resultados obtenidos se representan en la *figura 4*, y muestran la presencia de dos bandas de movilidad electroforética, 54b y 119, en la muestra de 24 h de crecimiento, y 8 componentes en la muestra recogida a las 36 h, cuyas movilidades fueron 54b, 84a, 106, 119, 124 y 130.



*Figura 4. Esquema de los patrones inmunolectroforéticos de las bandas ausentes de la fase exponencial (mayor velocidad del crecimiento), y presentes en las fases estacionaria e inicial de decadencia (menor velocidad del crecimiento). El inmunosuero anti-S. flava había sido absorbido con el antígeno de la muestra recogida a las 12 h del crecimiento, para quitar los anticuerpos del inmunosuero correspondiente a los antígenos, a dicha fase*



*Figura 5. Esquema de los patrones inmunolectroforéticos de las bandas existentes en las fases exponencial y estacionaria, que no estaban en la fase inicial de decadencia. El inmunosuero anti-S. flava había sido absorbido con el antígeno de la muestra recogida a las 36 h del crecimiento, para quitar los anticuerpos del inmunosuero correspondientes a los antígenos presentes en dicha muestra*

Cuadro 1

Movilidad electroforética relativa a la albúmina	Muestra		
	12 h	24 h	36 h
25	—	x	x
54a	x	x	x
54b	—	x	x
54c	x	x	x
66	x	x	x
71	x	—	—
84a	—	—	x
84b	—	—	x
87	x	x	x
93	x	x	x
106	—	—	x
109	—	—	x
119	—	x	x
122	x	x	x
124	—	—	x
129	x	x	x
130	—	—	x
135	x	x	x
141	x	x	x
148	x	x	x
151	x	x	x
154	x	x	x
167	x	x	x
174	x	x	x

Finalmente, se determinaron los componentes antigénicos de la fase exponencial y estacionaria diferentes de los detectados en la fase inicial de decadencia. Para ello se enfrentó anti-suero *Sarcina flava* de 48 h, absorbido con antígeno de esta última fase, con los antígenos de las dos primeras. Efectivamente, la *figura 5* muestra la única banda detectada,

con movilidad electroforética 71, que no fuimos capaces de determinar en las demás fases del crecimiento.

Comparando los resultados obtenidos en el análisis de las tres fases (12, 24 y 36 h de crecimiento), se observa que el mayor número de proteínas antigénicas aparece a las 36 h de crecimiento. En el *cuadro 1* se exponen las movilidades electroforéticas de todas las proteínas antigénicas detectadas, dadas con respecto a la albúmina del suero humano, a la cual se atribuye una movilidad del 100 %. En realidad, los resultados obtenidos en la fase inicial de decadencia son más semejantes a los encontrados en la fase estacionaria que en la exponencial, ya que ambas son similares en cuanto al crecimiento. Por tanto, se manifestó un aumento paulatino de proteínas antigénicas a medida que el tiempo de duplicación era mayor.

#### DISCUSION

Los experimentos llevados a cabo a lo largo de este trabajo se han realizado bajo unas condiciones de cultivo que se mantuvieron constantes durante todo el proceso. Es sobradamente conocida (2, 13 y 22-23) la influencia que puede tener una variación de temperatura, aireación y agitación en la síntesis de proteínas de cualquier microorganismo.

De igual modo, en el medio de cultivo se controló exactamente la concentración de nutrientes, para evitar así ciertas modificaciones del contenido proteico observadas (9 y 14).

La curva de crecimiento fue construida con las muestras del cultivo tomadas periódicamente. Como recomienda Goussard (11), estas muestras se diluían en la proporción 2:5 y se leían por turbidimetría; de esta forma se evitan errores, ya que, indiscutiblemente, podrían producirse, en parte, por el color que presentaba el medio de cultivo.

Por otra parte, los valores del contenido proteico determinado por nosotros, son del orden de  $10 \cdot 10^{-4}$  mg/célula, semejantes a los hallados por Thomas y Sumas (20), en sus estudios realizados en *Dunaliella salina*, con un contenido proteico de  $10 \cdot 10^{-5}$  mg/célula. Este estudio de las proteínas mostró ser diferente en la fase exponencial y en la fase estacionaria. La mayor cantidad de proteínas/célula la detectamos en la fase exponencial, coincidiendo con la máxima velocidad de crecimiento.

Zusman y colaboradores (24) afirman haber encontrado en *Mixo-*

*bacterium zanthus* una mayor síntesis de proteínas cuando la división celular era máxima. También Brown y Stevenson (1) obtuvieron en *Halo-bacterium salinarium* una variación cuantitativa de proteínas semejante a la determinada por nosotros en *Sarcina flava*, encontrando un máximo contenido, aproximadamente, en la mitad de la fase exponencial o logarítmica, es decir, cuando el crecimiento entraba en fase estacionaria disminuía el contenido proteico, manteniéndose constante a lo largo de la fase inicial de decadencia del crecimiento. Son diversos los autores (7, 15 y 18) que han realizado trabajos sobre este respecto, hallando resultados semejantes. Por lo que deducimos que este máximo contenido proteico aparece en la fase exponencial.

El estudio cualitativo de la composición proteica en las tres fases del desarrollo ha evidenciado que existen diferentes patrones proteicos en cada una de estas fases. Por un lado encontramos un grupo de proteínas comunes a las tres fases del crecimiento, y por otro, proteínas que estaban presentes solamente en alguna de las fases. En la fase exponencial encontramos una proteína que no estaba en las otras fases. La existencia de esas proteínas transitorias también ha sido descrita por Starka (17), detectada mediante métodos inmunológicos en la fase logarítmica de *Escherichia coli*.

Lo más destacado de nuestros resultados es la aparición de 10 proteínas durante el envejecimiento del cultivo, que no estaban presentes en la fase exponencial. Esto parece indicar que la edad del cultivo, o el agotamiento de los metabolitos en el medio, influyen, no solamente en la velocidad de crecimiento, sino también en la composición de los patrones proteicos. Por otro lado, la aparición de proteínas o enzimas en la fase estacionaria, cuando ocurre el agotamiento de algunos de los metabolitos del medio, parece indicar una cierta especialización de las bacterias en esa fase, para hacer frente a las nuevas condiciones del medio donde crecen.

## RESUMEN

Se determinó que el número de proteínas/célula variaba cuantitativamente a lo largo del crecimiento de *Sarcina flava*. El contenido proteico alcanzó un máximo de 1,973 pg/célula a las 11 h de la inoculación. Se observó cómo la cantidad de proteínas/célula mostraba una correlación directa con el tiempo de duplicación.

El análisis por inmunoelectroforesis presentó un complejo patrón proteico compuesto de 23 antígenos inmunológicamente diferentes. Este mismo análisis manifestó diferencias en la curva de crecimiento, según los tiempos de duplicación. Los antígenos de movilidad electroforética 71, se detectaron en los tiempos de duplicación coincidentes con la fase exponencial y no con la estacionaria. Por el contrario, el antígeno de movilidad electroforética 25 se encontraba en la fase estacionaria e inicial de decadencia con el tiempo de duplicación elevado, y no en la fase exponencial con tiempo de duplicación bajo.

#### SUMMARY

*Quantitative and qualitative evolution of proteins during the growth curve of Sarcina flava*

It was established that the number of proteins per cell varied quantitatively during the growth of *Sarcina flava*. The proteic content reached a maximum of 1.973 pg/cell after 11 hours of inoculation. It was noticed that the amount of proteins per cell showed a direct relationship with the doubling time.

The immunoelectrophoresis analysis gave a complex protein pattern consisting of 23 immunologically different antigens. This same analysis presented differences in the composition of the antigenic proteins during the growth, according to the doubling times. The antigens of electrophoretic mobility 71 were detected in the doubling times corresponding with the logarithmic phase. On the contrary the antigen with electrophoretic mobility 25 was observed in the stationary phase with the longer doubling times and not in the logarithmic phase.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BROWN, R. H., and STEVENSON, J. 1971. Variation in the composition of a purified membrane fraction from *Halobacterium salinarium* with the phase of growth. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 37, 89-99.
2. BUSTA, F. F., and SCHRODER, D. J. 1971. Effect of soy proteins on the growth of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 22, 177-83.

3. CHORDI, A., and KAGAN, I. G. 1965. Identification and characterization of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis. *J. Parasitol.*, 51, 69-71.
4. CHORDI, A.; WALLS, K. W., and KAGAN, I. G. 1964. Studies on the specificity of the indirect hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Immunol.*, 93, 1024-33.
5. DAVIS, B. J. 1964. Disc electrophoresis, method and application to serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404.
6. DONAHUE, J. D., and ONDORF, W. R. 1970. Postmortem changes in liver microsomal protein synthesizing activity. *Biochem. J.*, 119, 50-51.
7. FORCHHAMMER, J., and LINDAHL, L. 1971. Growth rate of polypeptide chains as a function of the cell growth rate in a mutant of *Escherichia coli* 15. *J. Mol. Biol.*, 55, 563-68.
8. GIBBONS, N. E.; SEHGAL, S. N., and PAYNE, I. J. 1960. Immersion refractometry of some halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 6, 9-15.
9. GLEW, R. H., and HEATH, E. C. 1971. Extracellular alkaline phosphatase of *Micrococcus sodonensis*. II. Factors affecting secretion. *J. Biol.*, 246, 1566-74.
10. GOCHNAUEP, M. B.; KUSHWAHA, S. C.; KUSHNER, D. J., and KATES, M. 1972. Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria. *Arch. Mikrobiol.*, 84, 339-49.
11. GOUSSARD, J. 1970. Signification des phases de croissance d'une population cellulaire obtenues par turbidimétrie. *C. R. Soc. Biol.*, 164, 760.
12. HERBERT, D.; PHIPPS, P. J., and STRANGE, R. E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiol.*, 5B, 209-336.
13. HERRING, P. J. 1971. Stability of the blue pigment of *Veillela* and *Porpita*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 39, 1039-43.
14. KOCH, A. L., and DEPPE, C. S. 1971. *In vivo* assay of protein synthesizing capacity of *Escherichia coli* from slowly growing chemostat cultures. *J. Mol. Biol.*, 55, 549-62.
15. MEL'NIKOVA, V. A., and BASNAK'YAN, I. A. 1971. Levels of macromolecular compounds during continuous cultivation of typhoid bacilli. I. Interrelation between the rate of cell division and the levels of DNA, RNA, and protein in the cells. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 48, 62-66.
16. RUSSELL, P. S.; WIENER, J., and SPIRO, D. 1964. Lymphocytes and transplantation immunity. *Advan. Immunol.*, 7, 189-273.
17. STARKA, J. 1971. Cell envelope proteins of dividing and non-dividing cells of *Escherichia coli*. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, 16, 223-25.
18. STAVY, R.; STAVY, L., and GALUM, E. 1970. Protein synthesis in aged and young zones of *Trichoderma* colonies. *Biochim. Biophys. Acta*, 217, 468.
19. STOECKENIUS, W., and ROWEN, R. 1971. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. *J. Cell. Biol.*, 34, 365-93.
20. THOMAS, P., and SUMAS, R. 1971. *Dunaliella salina* studied in bacterial cultures nutrition and composition. *Tethys*, 2, 19-28 (Chem-Abstr., 74, 108631y).

21. TORMO, J. 1963. Análisis antigénico del *Ascaris*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, Universidad de Pamplona.
22. TRUBACHEAU, I. N.; KALACHEVA, G. S.; ANDREEVA, R. I., and VOITOVICH, Y. V. 1971. Effect of growth conditions on the biochemical composition of hydrogen bacteria. *Mikrobiologiya*, 40, 424.
23. ZAITSEVA, G. N.; KALYUZHAYAYA, A. P., and GOLOVACHEVA, R. S. 1970. Biosynthesis of protein in subcellular structures of the thermophilic microorganism *Bacillus coagulans*. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.*, 195, 1226-29.
24. ZUSMAN, D.; GOTTLIEB, P., and ROSENBERG, E. 1971. Division cycle of *Myxococcus xanthus*. III. Kinetics of cell growth and proteins. *J. Bacteriol.*, 105, 811.

CIUDAD SANITARIA DE LA SEGURIDAD SOCIAL «LA PAZ». MADRID  
SERVICIO DE BACTERIOLOGIA

## LISTERIA MONOCYTOGENES: FAECAL CARRIERS AND PERINATAL MORTALITY

by

E. GÓMEZ-MAMPASO, L. MICHAUX, L. DE RAFAEL, P. PEÑA, A. CARVAJAL  
and F. BAQUERO

### INTRODUCTION

The investigations in the field of the epidemiology of listeriosis carried out so far support the idea that *Listeria monocytogenes* is a micro-organism of widespread distribution. The use of special enrichment and culture media have shown that *L. monocytogenes* can usually be isolated from human intestine. If 30 faecal samples were examined in each normal individual it appears likely to obtain practically a 100 % of carriers (91.5 % in Ortel's series) (7). Such a fact would be of utmost importance in the explanation of the pathogenesis of neonatal listeriosis. In this special case it is important to make clear the conditions that allow *L. monocytogenes* to move from the intestine into the vagina and its subsequent colonization.

The present investigation has been led fundamentally to the elucidation of the following points:

A) Incidence of faecal *L. monocytogenes* carriers in healthy primigravidae and their husbands.

B) Incidence of faecal *L. monocytogenes* carriers in women during puerperium with antecedents of previous deliveries of newborns who died perinatally. Mechanical causes have been excluded.

- C) Incidence of vaginal *L. monocytogenes* isolation in the two previous groups.
- D) Correlation between vaginal colonization and faecal carriership status.  
Secondarily some observations have been collected about:
- F) Faecal and vaginal carriership status in mothers with proved listeriosis in their children.
- F) Relationship between cold enrichment period and isolation of *L. monocytogenes*.
- G) Correlations between isolation and serology.
- H) Proportion of isolated serotypes.
- I) Some observations concerning the regularity of *L. monocytogenes* eliminations through the faeces.
- J) Relationship between haemolytic versus non-haemolytic strains.

#### MATERIAL AND METHODS

During 6 weeks faecal samples were taken weekly in 44 healthy primigravidae (between the 5th and 7th month of pregnancy) and their husbands. Likewise, a parallel study was made in 91 puerperal women who had given birth to newborns that died perinatally. Blood samples for serological examination and vaginal smears were taken at the same time as the first and last faecal samples in all women of both previous groups. Moreover we studied 12 faecal samples from three women who had given birth to newborns afflicted with listeriosis of favourable evolution. Six faecal samples were examined in one of these women, five in other and one in the other. Vaginal smears were taken in these three women as well but only one vaginal smear could be taken in one of them.

All samples taken from all individuals comprised in the above mentioned groups were processed following the Ralovich-Kampelmacher technique (4-5, 8-9) slightly modified. 2-3 g of faeces were suspended in tryptose-phosphate-broth (TPB) (Difco) and immediately afterwards a swab of the suspension was introduced into a Stuart medium (Difco). The tubes containing TPB were stored at 4 °C for three months and

were monthly subcultured on to nalidixic-tripaflavin-blood (NTBA) plates without previous passage into Stuart medium. The Stuart tubes were, in their turn, stored at room temperature for ten days and then a subculture on NTBA plates was made. The final concentrations of nalidixic acid (Winthrop) and tripaflavin (Bayer) were 50 µg/ml and 10 µg/ml respectively. The inoculum size was 50µl approximately. Both plates NTBA from TPB and NTBA from Stuart tubes were incubated at 37 °C for 24 hours and then were examined by using a stereoscopic lens (Wild) under oblique transmitted illumination. The magnification power used was 60 × and 120 ×. The suspected colonies were morphologically and biochemically identified. Antisera 1 and 4b were used for serotyping. Serology was performed following the technique described by Despierres (1). Serotypes 1 and 4b (Institute Pasteur, Paris) were used as antigens.

### RESULTS

#### *A) Incidence of faecal Listeria monocytogenes carriers in healthy primagravidae and their husbands*

The results of this group are mentioned as follows (*table 1*):

*Table 1*

	Number of samples	Positive samples	%	Number of carriers	%
44 women	264	16	6	14	31.8
44 men	264	14	5.3	8	18.1

The relationship between the positivities in the women studied and their husbands is expressed as follows (*table 2*).

There seems to be a higher proportion of faecal *Listeria monocytogenes* carriers in the group of husbands of women carriers though the statistic signification is irrelevant:

$$0.3 > P > 0.2$$

*Table 2*

	Husband carriers	Percentage of women with husband carrier
Pregnant carriers (14 cases)	(4)	28.5
Pregnant non-carriers (30 cases)	(4)	13.3

*B) Incidence of faecal Listeria monocytogenes carriers in puerperal women with antecedents*

The results obtained are expressed as follows (*table 3*):

*Table 3*

Number of cases	Number of samples	Positive samples	%	Number of carriers	%
91	546	38	6.9	24	26.3

*C) Incidence of vaginal Listeria monocytogenes isolation*

The results are expressed as follows (*table 4*):

*Table 4*

Group	Number of cases	Number of samples	Positive samples	%	Percentage of vaginal carriers
Primigravides	44	88	0	0	0
Women with antecedents	91	182	4 (a)	2.15	4.3

(a) The four positive samples occurred in the first vaginal smear (during puerperium). Such positive findings did not occur in the vaginal smear performed six weeks later.

*D) Correlation between vaginal colonization and faecal carriership status*

There were 4 vaginal positive results in women of group B and no one in women of group A (*table 5*):

*Table 5*

	Number of faecal samples	Positive samples
Case 1	6	1
Case 2	6	0
Case 3	6	1
Case 4 (a)	6	2
	24	4

(a) Proved listeriosis.

Percentage of faecal carriers: 75 approximately.

*E) Faecal and vaginal carriership status in mothers with proved listeriosis in their children*

The results obtained are expressed as follows (*table 6*):

*Table 6*

Cases	Number of faecal samples	Positive samples	Faecal carrier	Vaginal carrier
Case 4 (a)	6	2	yes	yes
Case B	6	2	yes	no
Case C	5	2	yes	no
Case D	1	0	no	yes
	18	6 (33 %)	75 % ap	50 % ap

(a) Case A is the same that Case 4 in section D).

*F) Relationship between cold enrichment incubation period and number of positive faecal samples*

A comparison between Kampelmacher series and our different groups is expressed as follows (table 7).

*Table 7*

	Number of samples	Initial sample	Months			Total	%
			1	2	3		
Kampelmacher (healthy primigravidae)	1,114	6	20	7	10	43	3.8
Primigravidae	264	1	10	3	2	16	6
Husbands of primigravidae	264	2	10	1	1	14	5.3
Women with antecedents	546	4	23	7	4	38	6.9
Mothers of newborns with proved listeriosis	12	0	4	0	0	4	33

*C) Correlations between isolation and serology*

A positive case was considered when both one or two serum samples were positive (table 8).

Among a total of 36 proved carriers only 10 cases (27.7 %) had a positive serology corresponding to the isolated type. In 4 cases serology was positive but to the different type from the isolated one.

With regard to serotype 4b, 10 cases out of 21 carriers had a coincident serology and there were no positive results to type 1 among carriers of serotype 4b.

With regard to serotype 1 serology was always negative among 15 carriers but in 4 cases (26.6 %) an atypic serology for serotype 4b was observed.

Table 8

Faecal samples					
	Serotype of isolated strains (number of carriers)		Positive serology type 4b (number of cases)	Positive serology type 1 (number of cases)	Coincidence: serology-isolated type
Group A (only women) (i)	Type 1	7	1	0	0
	Type 4b	7	3	0	3
	Us (a)	2	1	0	
Group B (ii)	Type 1	8	3	0	0
	Type 4b	14	7	0	7
	Us	3	1	1	
Total	Type 1	15	4	0	0
	Type 4b	21	10	0	10
	Us	5	2	1	
			14		10
Summary Type 1 + Type 4b =					
= 36					

(a) Unserotypifiable. (i) Two carriers with two different serotypes. (ii) One carrier with two different serotypes.

Among a total of 5 proved carriers of Us strains 2 had a positive serology for serotype 4b and 1 for serotype 1.

Among a total of 97 non-carriers 35 (36 %) has a positive serology for serotype 4b and only 1 (1.03 %) for serotype 1.

Among the 3 vaginal smears serotype 4b there was 1 case (the case with proved listeriosis in newborn corresponding to group B in women) with positive serology for serotype 4b and the other 2 were negative.

The one case in which serotype 1 was recovered in vagina serology was atypic for serotype 4b.

In the 3 mothers corresponding to group E) there was 1 case with

serological coincidence. Another case was atypic. The third was negative.

*H) Proportion of isolated serotypes*

The results obtained are expressed as follows (*table 9*):

*Table 9*

		Number of samples	%	Number of carriers	%
Faeces	Type 1	25	35	18	35
	Type 4b	40	55	27	53
	Us (a)	7	10	6	12
		72		51 (in three cases two different serotypes)	
Vagina	Type 1	2			
	Type 4b	3			
	Us 0	0			
		5			

(a) Unserotypifiable.

*I) Some observations concerning the regularity of Listeria monocytogenes elimination through the faeces*

In 3 cases out of 48 positive carriers two different serotypes could be isolated during our study. In one of the three serotype 1 and an unserotypifiable strains were isolated. In another case so were serotype 1 and 4b. In the third case twice serotype 4b and once serotype 1.

Among 48 positive individuals there were 35 in whom the germ was isolated from only 1 sample of the 6 taken, versus 8 with 2 positive samples, 2 with 3, and 1 with 4, 5 and 6 samples. The one case in which every sample was positive was from a woman with antecedents (group B) and *Listeria monocytogenes* of the same serotype was isolated from the faeces of her own dog through cold enrichment.

## J) Relationship between haemolytic versus non-haemolytic strains

The results obtained are expressed as follows (table 10):

Table 10

	Haemolytic	%	Non-haemolytic	%
A) Primigravidae (faeces)	10		6	
B) Husbands of primigravidae (faeces)	7		7	
C) Women with antecedents (faeces)	19		19	
D) Women with antecedents (vagina)	4		0	
E) Mothers of newborns with proved listeriosis (faeces)	2		2	
F) Mothers of newborns with proved listeriosis (vagina)	1		0	
Total faecal positivities (72)	38	52.7	34	47.3
Total vaginal positivities (5)	5		0	

## DISCUSSION

After a three-month-cold-enrichment period a percentage of 7 of positive results was obtained in a total of 822 faecal samples from 138 women. Our figure is in contrast with that obtained by Kampelmacher (6) which is 3.85 in his series of 1,114 faecal samples from 137 women for the same period of time. This difference may be due to the suppression of the Stuart medium in the subcultures though we rather believe that it is because of the use of tripaflavin as selective agent.

We have not obtained any significant difference in the number of faecal carriers between the group of primigravidae (31.8 %) compared with the group of women with antecedents. Nevertheless, isolation of *Listeria monocytogenes* in vagina was negative in the primigravidae group

whereas it was as high as 4.3 % in the group of women with antecedents. In the latter group 1 case of neonatal listeriosis was shown in the post-mortem examination. Therefore, it seems that the mere condition of faecal carriage does not imply in itself the vaginal colonization by *L. monocytogenes* although in most cases with vaginal colonization there coexists the presence of *L. monocytogenes* in the faeces. Indeed, in a total of 7 women with vaginal colonization and/or who had given birth to newborns afflicted with proved neonatal listeriosis, the status of faecal carriage was proved in five cases. Furthermore, the percentage of positive faecal samples for *L. monocytogenes* was 22.2 in this group instead of 6-7 in the group without vaginal colonization or listeriosis which indicates that the elimination through the faeces was either more abundant or more continuous in the women with vaginal colonization or with proved neonatal listeriosis.

Though our research does not allow to exclude the possibility of vaginal contamination by *Listeria monocytogenes* from the foetus, amnion or placenta, it could be suggested that an unusually high intestinal colonization would lead to a vaginal colonization and the latter to a foetus or neonate involvement. Thus, a very high percentage of positive faecal samples in a pregnant woman and/or the proved presence of *L. monocytogenes* in vagina would entail a high infective risk for the neonate and would indicate the possibility of specific prophylactic treatment. This conclusion is supported by the data recently provided by Emody and Ralovich on experimental studies on mice (3). These data indicate that there is a relation between the length of time during which *Listeria* is eliminated through the faeces and the degree of virulence. Similarly to experimental salmonellosis, the persistent faecal excretion would be related with the capacity of the invasive strain to multiply or persist in the host. Thus, treatment would be indicated on the basis of positive cultural criteria only, not serological ones since serology (Despierre's technique) did not allow to distinguish, as we have seen before, faecal carriers from faecal non-carriers. Besides, serology did not even detect vaginal carriers with certainty.

From the epidemiological standpoint it can be stressed that the percentage of faecal carriers among men was 18, i.e., half of women's percentage approximately. On the other hand, the husbands of women with *Listeria monocytogenes* in faeces were carriers of *L. monocytogenes* with a double frequency than that of the husbands of women without

*L. monocytogenes* in faeces which suggest the influence of the same feeding habits.

From the bacteriological viewpoint most strains of *Listeria monocytogenes* corresponded to serotype 4b (55 %), serotype 1 being next (35 %) and the remainder were unserotypifiable. These findings constitute one of the first positive results of serotype 1 in Spain and differ greatly from those obtained in Centre and Eastern Europe where there appears to be a higher proportion of serotype 1: Elischerová and Stupalová (2), Kampelmacher et al. (6), Szigetvári et al. (10).

A clear predominance of haemolytic versus non-haemolytic strains of *Listeria monocytogenes* was not observed since 52 % of isolated strains corresponded to the haemolytic type. Nevertheless we must emphasize that all strains isolated in vagina were haemolytic.

#### SUMMARY

In a research for *Listeria monocytogenes* following the Ralovich-Kampelmacher technique slightly modified and after a three-month-cold-enrichment period a total of 1,086 faecal samples and 275 vaginal smears were studied in different population groups. A percentage of 25-30 faecal carriers was obtained in pregnant women and women during puerperium. The corresponding figure for men was 18.

The percentage of vaginal carriers was only 3.6 but the positivities in this group were indeed very closely to perinatal pathology having *Listeria monocytogenes* as its causative agent.

The positive results in vagina corresponded to a significant higher proportion of positive faecal samples.

Serology in solid medium (Despieres technique) proved useless for the detection of faecal and vaginal carriers.

The majority of isolated strains corresponded to serotype 4b and all positive vaginal results corresponded to haemolytic strains.

#### RESUMEN

*Listeria monocytogenes: portadores fecales y mortalidad perinatal*

Se ha investigado la presencia de *Listeria monocytogenes* en un total de 1.086 muestras fecales y 275 muestras vaginales en diferentes grupos

de población mediante la técnica de Ralovich-Kampelmacher ligeramente modificada, utilizando un período de tres meses de enriquecimiento. En mujeres gestantes y puérperas se ha detectado un 25-30 % de portadores fecales de *L. monocytogenes*. En la población correspondiente a los maridos de las gestantes se detectó un 18 % de portadores fecales.

El porcentaje de portadores vaginales fue sólo del 3,6 %, pero el carácter de portador vaginal se relaciona con la patología perinatal por *Listeria monocytogenes*. Las positividades vaginales se corresponden con una mayor constancia en la eliminación fecal de *Listeria*. La serología en medio sólido (técnica de Despierrez) no fue útil para detectar los portadores fecales ni vaginales. La mayor parte de las cepas aisladas de *Listeria* corresponden al serotipo 4b, y todos los hallazgos vaginales corresponden a cepas hemolíticas.

#### REFERENCES

1. DESPIERRES, M. 1971. Diagnostique serologique des listeriosis à l'aide d'une reaction d'aglutination sur gelose. Ann. Inst. Pasteur, 121, 503-23.
2. ELISCHEROVÁ, K., and STUPALOVÁ, S. 1972. Listeriosis in professionally exposed persons. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 19, 379-84.
3. EMODY, L., and RALOVICH, B. 1974. Data to the listeric infection in mice. Int. Symp. Probl. Listeriosis 6th Nottingham.
4. KAMPELMACHER, E. H., und NOORLE JANSEN, L. 1972. Isolierung von *L. monocytogenes* mittels Nalidixicaüre trypaflavin. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. A, 221, 139-40.
5. KAMPELMACHER, E. H., and NOORLE JANSEN, L. 1972. Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. A, 221, 70-77.
6. KAMPELMACHER, E. H.; NOORLE JANSEN, L., and HUYSINGA, W. 1972. The presence of *L. monocytogenes* in pregnant women and neonates. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. A, 222, 258-62.
7. ORTEL, S. 1974. Listeriosis in pregnancy and *Listeria monocytogenes*-excretors in laboratory workers. Int. Symp. Probl. Listeriosis 6th Nottingham.
8. RALOVICH, B.; FORRAY, A.; MERO, E., and MALOVICS, I. 1970. Additional data on diagnosis and epidemiology of *Listeria* infections. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig., 214, 231-35.
9. RALOVICH, B.; FORRAY, A.; MERO, E.; MALOVICS, I., and SZAZADOS, I. 1971. New selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes*. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig., 216, 88-91.
10. SZIGETEVÁRI, I.; GATI, I.; DOSZPOD, S.; RALOVICH, B., and MALOVICS, I. 1972. Listeriosis in puerperal women and their infants. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 19, 395-98.

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

## LA ESTIMULACION DE LA COMPETENCIA EN *B. SUBTILIS* Y SU POSIBLE INHIBICION A DISTINTOS NIVELES CELULARES

por

A. PORTOLÉS, E. GARCÍA, M.<sup>a</sup> TERESA PÉREZ-UREÑA y M. ESPINOSA

### INTRODUCCION

Después de los trabajos de Nester (11) y Dooley y colaboradores (5) se conocen bastantes particularidades fisiológicas diferenciales en las células competentes de *Bacillus subtilis*. Sin embargo, pese a los resultados de Akrigg y colaboradores (1) y de Charpak y Dedonder (4), el factor de competencia (FC) todavía no ha podido ser aislado en este sistema transformante. Esto, junto con el hecho de que la adquisición del estado competente tenga una duración de muchas horas, nos lleva a utilizar procesos biológicos en los que puedan ser obviadas estas dificultades.

Así, con el fin de estudiar las posibles modificaciones de la competencia a distintos niveles del metabolismo celular, hemos empleado un sistema de estimulación semejante al descrito por Joenje y colaboradores (7), mediante el cual las células adquieran el estado competente en un breve período de tiempo. En estas condiciones, alteraciones a nivel de pared, de membrana y de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos han sido estudiadas.

## MATERIAL Y METODOS

### *Microorganismos*

Como cepa receptora se utilizó *Bacillus subtilis* AR1T; una estirpe protótrofa obtenida en nuestro laboratorio por transformación de *B. subtilis* SB25 (his B2 trp C2). *B. subtilis* MC1 (rec 1<sup>+</sup> rec 2<sup>-</sup> her<sup>+</sup>) fue la bacteria indicadora. El ADN donador fue obtenido mediante extracción fenólica (15) del bacteriófago SPP1 (14), cedido amablemente por el Dr. T. A. Trautner.

### *Antibióticos*

Los antibióticos utilizados fueron cefalosporina (CEF), colistina (CLST), lincomicina (LINC), rifamicina (RFM), tetraciclina (TTC), doxiciclina (DXC) y ácido nalidíxico (ANDX). También se ensayó un compuesto de amonio cuaternario, el bromuro de cetil-trimetil-amonio (BCTA).

### *Procedimiento de transfección*

A 0,9 ml de cultivo se adicionaron 0,1 ml de una disolución de ADN fágico de 100  $\mu\text{g/ml}$  y se incubaron a 37 °C con agitación durante 30 min; al final de los cuales, la reacción fue detenida por la adición de 100  $\mu\text{g}$  de ADN-asa. El número de células viables y transfectantes fue determinado mediante diluciones apropiadas y siembra en placas de medio LTT (2).

### *Procedimiento de estimulación de la competencia*

El método de estimulación de la competencia fue similar al descrito por Joenje y colaboradores (7), empleando para ello líquidos metabólicos (S), obtenidos por centrifugación de cultivos altamente competentes, conseguidos según el procedimiento de Bott y Wilson (3), y células de baja competencia fisiológica (B) que se mantuvieron congeladas a -70 °C. Estas células fueron rápidamente descongeladas y resuspendidas en líquidos S o en el medio mínimo de Bott y Wilson (3) (BW) a una densidad óptica ( $\text{DO}_{500}$ ) de 0,08.

Los niveles de la competencia en cada momento fueron determinados mediante el estudio de la transfectabilidad del cultivo, según la técnica antes descrita.

### Tratamientos con antibióticos

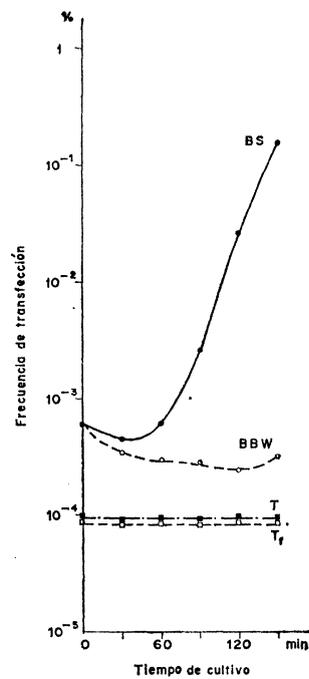
La sensibilidad de la cepa receptora a los distintos antibióticos utilizados fue determinada mediante una técnica de dilución en tubo, en presencia de resazurina como indicador (12).

Los tratamientos con estas moléculas quedaron restringidos a los períodos de estimulación indicados en cada caso; al final de ellos, los fármacos fueron eliminados por filtración a través de filtros millipore de  $0,22 \mu$ . Después se lavaron las células y se resuspendieron en medio fresco BW o en S, según su caso, antes de añadir el ADN.

### RESULTADOS

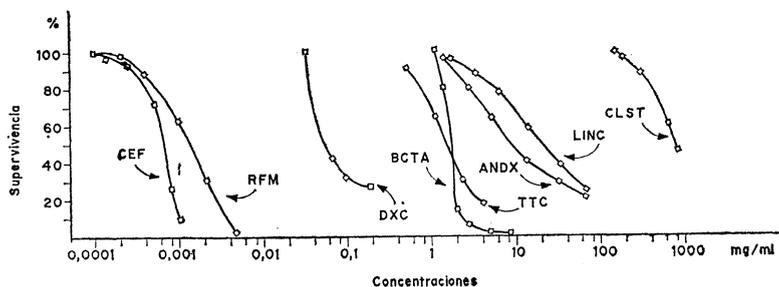
La *figura 1* muestra las condiciones normales de funcionamiento del sistema de estimulación de la competencia. La línea BBW representa las variaciones en las frecuencias de transfección de las células de baja competencia (B) resuspendidas en medio BW e incubadas durante diferentes períodos de tiempo. La línea BS corresponde al mismo tipo de células (B) resuspendidas en líquidos metabólicos S. Cuando las células B se incubaron en sobrenadantes de cultivos no competentes (T) o en sobrenadantes de cultivos competentes previamente filtrados por millipore (Tf) no pudo observarse estimulación en el desarrollo de la competencia.

Una vez establecidas las condiciones idóneas de funcionamiento del sistema y determinadas las concentraciones mínimas inhibitorias, se estudiaron las curvas de muerte de la cepa receptora AR1T en medio BW para distintas concentraciones antibióticas y para un tiempo de contacto célula-antibiótico de 2,5 h, que resultó ser el período óptimo de tiempo para la estimulación de la competencia. Los resultados, expresados en porcentajes de célu-



*Figura 1. Variaciones en la estimulación de la competencia de células (B) según que se resuspendan en sobrenadantes de cultivos altamente competentes normales (BS) o filtrados (Tf), en medio BW (BBW), o en sobrenadantes de cultivos no competentes (T)*

las supervivientes, se indican en la *figura 2*. Estos resultados fueron utilizados para elegir las dosis de droga para las cuales la viabilidad fue



*Figura 2. Curvas de supervivencia, al cabo de 150 min de contacto, de las células (B) en distintas concentraciones de cefalosporina (CEF), rifamicina (RFM), doxiciclina (DXC), bromuro de cetil-trimetil-amonio (BCTA), tetraciclina (TTC), ácido nalidixico (ANDX), lincomicina (LINC) o colistina (CLST)*

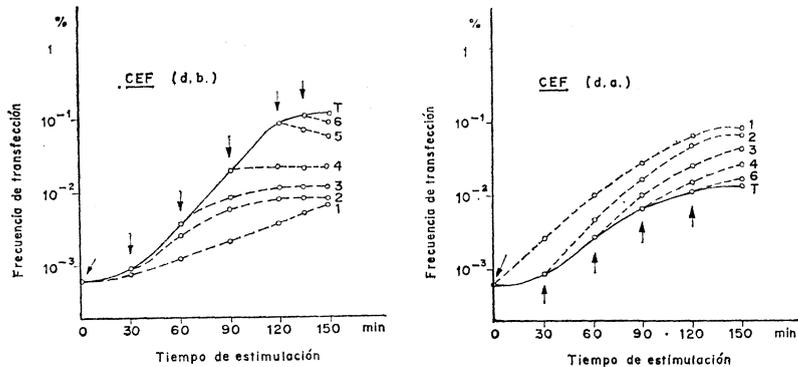
superior al 70 %. Estas concentraciones se indican numéricamente en el *cuadro 1*.

*Cuadro 1. Concentraciones de las distintas moléculas que permiten un 70 % de supervivencia de 2,5 h de incubación a 37 °C con Bacillus subtilis AR1T en medio BW*

Moléculas	Concentración (mg/ml)
CEF	$2 \times 10^{-4}$
RFM	$5 \times 10^{-4}$
DXC	$4,5 \times 10^{-2}$
BCTA	1,20
TTC	0,5
ANDX	5
LINC	8
CLST	250

A continuación procedimos a estudiar el efecto de las diferentes

substancias cuando éstas se adicionaban a distintos tiempos durante el período de estimulación de la competencia. La *figura 3* muestra el efecto de la primera de ellas, la cefalosporina, que actúa a nivel de pared; en dicha figura la línea T representa los valores normales del proceso de

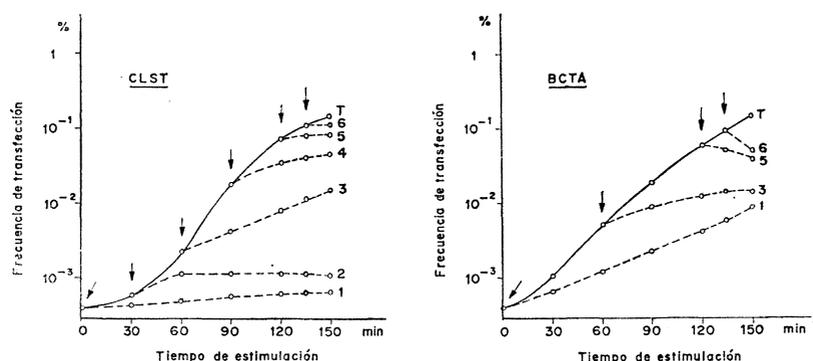


*Figuras 3-4. Variaciones en la estimulación de la competencia de células (B) en presencia del antibiótico (CEF) añadido en distintos momentos de la estimulación (indicados con flechas) a concentraciones de  $2 \times 10^{-4}$  mg/ml (figura 3) y a una dosis diez veces mayor (figura 4). Las líneas numeradas representan la inhibición o estimulación cuando el antibiótico se añade inicialmente (núm. 1) o a los tiempos de 30, 60, 90, 120, 135 y 160 min (núms. 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente)*

estimulación en ausencia del fármaco. Cuando el antibiótico se añade a diferentes tiempos pueden observarse claros efectos inhibidores, dependiendo de la duración del tratamiento. Dado que estos resultados se encontraban en contradicción con los obtenidos previamente con penicilina en cultivos ordinarios [Nester (11)] y en quimostato [López y colaboradores (10)], llevamos a cabo una nueva serie de experimentos en los que se utilizaron dosis más elevadas de antibiótico, pero reduciendo el tiempo de acción del mismo a un máximo de 120 min. Así, en la *figura 4* se observa el efecto de una dosis de  $2 \times 10^{-3}$  mg/ml, que produce una viabilidad del 60 % al cabo de 2 h de actuación. Pueden observarse efectos estimulantes sobre la competencia del cultivo en estas condiciones. Las líneas T representan los controles en fluidos metabólicos de cultivos competentes, y como puede verse, los niveles de transfectabilidad, en presencia de las dosis indicadas de cefalosporina, se incrementan de acuerdo con los tiempos de adición de la droga.

Del mismo modo, se ensayaron moléculas cuya acción se ejerce a

nivel de la membrana celular. La figura 5 muestra los resultados utilizando dosis de 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de colistina, y la figura 6, cuando se empleó 1,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de BCTA. En ambos casos, los niveles normales de fre-



Figuras 5-6. Variaciones en la estimulación de la competencia de células (B) en presencia de antibióticos que actúan a nivel de membrana, a concentraciones de 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (CLST) (figura 5) y 1,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (BCTA) (figura 6)

cuencias de transfección (T) decrecen en presencia de cualquiera de las dos sustancias, produciéndose un grado variable de inhibición inmediatamente después de su adición.

En cuanto a la síntesis proteica en las células competentes, según Tomasz (17) en pneumococo y Tichy (16) y nosotros mismos en *Bacillus subtilis* (13) durante las fases que conducen a la adquisición del estado de competencia, se induce una síntesis *de novo*, de proteínas. Estudiando más detenidamente el fenómeno, en presencia de lincomicina a diferentes tiempos durante el proceso de estimulación (figura 7), pudimos observar cómo dosis de 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de este antibiótico producen las inhibiciones más drásticas de la competencia, incluso aunque la droga se añadiese 5 min antes del final del proceso de estimulación.

Cuando con este mismo propósito se ensayaron moléculas tetracíclicas, inhibiciones de transfección del 93 % (doxiciclina) y del 91,5 % (tetraciclina) fueron obtenidas con un comportamiento semejante al observado con lincomicina.

Por otra parte, también fueron utilizados antibióticos capaces de actuar a nivel de los ácidos nucleicos. Así, con rifamicina y ácido nalidíxico, pudo apreciarse que la inhibición en la síntesis de m-ARN causada

por el primer antibiótico ocasionaba una pérdida paralela en los niveles de competencia (*figura 8*), mientras que no se observó efecto alguno apreciable cuando se utilizó ácido nalidíxico. No obstante, en algunas

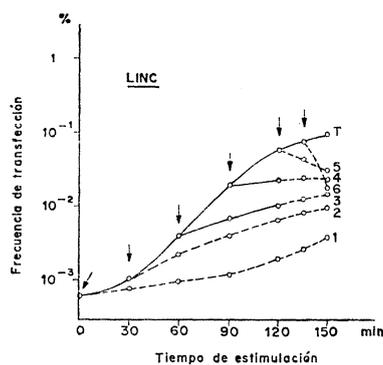


Figura 7. Variaciones en la estimulación de la competencia en presencia de  $8 \mu\text{g/ml}$  de lincomicina

experiencias pareció observarse un ligero efecto estimulante cuando se utilizaba este último fármaco, pero no fueron especialmente significativas.

A la vista de los resultados expuestos, y dado que los efectos más

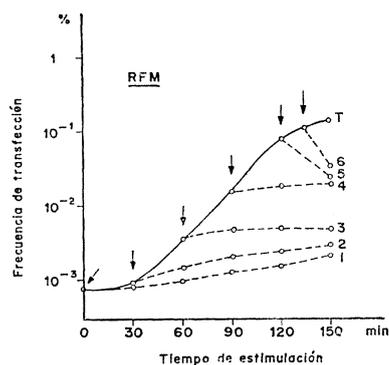


Figura 8. Modificaciones en el desarrollo de la competencia inducidas por rifamicina ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ )

acusados fueron observados al utilizar drogas que actuaban a diversos niveles en la biosíntesis proteica, creímos de importancia estudiar este problema de una manera más específica, utilizando para ello fenilalanina  $^{14}\text{C}$  ( $^{14}\text{C}$ -Phe) y determinando su incorporación en la célula durante la estimulación de la competencia (figura 9). En principio se estudia la respuesta de las células en las condiciones normales comparando las

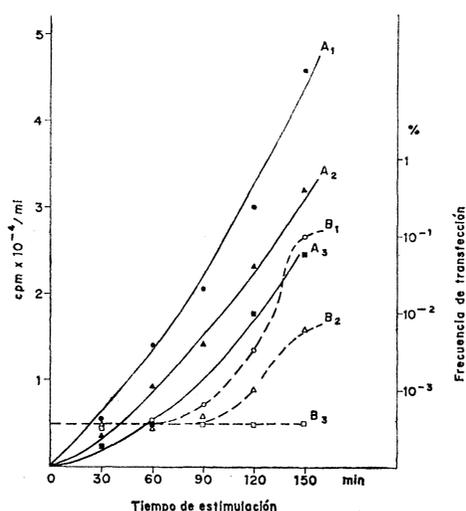
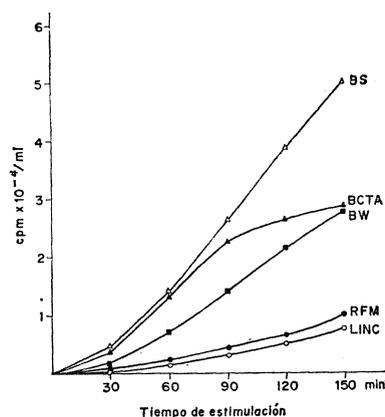


Figura 9. Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Phe y frecuencia de transfección durante el desarrollo de la competencia inducido por sobrenadantes obtenidos de cultivos competentes ( $A_1$  y  $B_1$ , respectivamente), en presencia de estos mismos sobrenadantes filtrados ( $A_2$  y  $B_2$ ) y con medio BW ( $A_3$  y  $B_3$ )

diferencias entre los niveles de transfección de los cultivos incubados en fluidos S ( $B_1$ ) o en medio BW ( $B_3$ ) con la tasa de incorporación de aminoácidos expresada en cuentas/minuto (cpm), en las mismas condiciones experimentales ( $A_3$  y  $A_1$ , respectivamente). Esta actividad biosintética parece inducida por el factor de competencia, ya que cuando éste se inactiva parcialmente, por filtración de los líquidos metabólicos procedentes de cultivos competentes a través de un filtro millipore de  $0,22\ \mu$ , se observa una disminución, tanto en la frecuencia de transfección ( $B_2$ ) como en la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Phe ( $A_2$ ).

Una vez obtenidos estos resultados se procedió a estudiar la tasa de

incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Phe en presencia de cada una de las moléculas ensayadas. Tal y como era de suponer no se observó ningún efecto cuando se usa cefalosporina, colistina o ácido nalidíxico. Sin embargo, en la *figura 10* se aprecia que cuando se utilizaron lincomicina, rifamicina o bromuro de cetiltrimetilamonio se obtuvieron diversos grados de inhibición en la incorporación del aminoácido marcado.



*Figura 10. Variaciones en la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Phe durante la estimulación por sobrenadantes (BS) e inhibiciones en presencia de BCTA, RFM y LINC; como control se utilizó el medio BW*

## DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo aportan mayor número de datos para el conocimiento de las características fisiológicas del estado de competencia del *Bacillus subtilis*.

Como ya se dijo, los primeros resultados obtenidos utilizando un inhibidor de la síntesis de la pared celular se encontraban en desacuerdo con los datos aportados por otros autores; en ellos se sugería que la penicilina aumentaba la frecuencia de transformación cuando se añadía a un cultivo competente. No obstante, en estos trabajos se empleaban dosis bastante elevadas de antibiótico, obteniendo con ello una supervivencia igual o menor al 10 % en todos los casos. En estas condiciones

es lógica la explicación de Nester (11) según la cual las células competentes se dividen más lentamente que las no competentes [luego demostrado más directamente por Dooley y colaboradores (5)], y por tanto la penicilina destruiría selectivamente a la fracción no competente, con lo que se explicaría el incremento en la frecuencia de transformación; sin embargo, en nuestro caso, la supervivencia ha sido siempre superior al 60 %, cualquiera que sea la dosis antibiótica empleada. También se ha aducido que al poseer una composición diferente en su pared (6) las células competentes serían menos sensibles a la acción antibiótica (10).

La importancia que poseen las estructuras membranosas en la adquisición del estado competente (18-20) resulta confirmada en las figuras 5-6. Así se observa que ligeras alteraciones a nivel de membrana —que de por sí son incapaces de destruir la célula— inhiben drásticamente la competencia. Este efecto es más acusado utilizando BCTA, pero hay que tener en cuenta que esta sustancia produce al mismo tiempo inhibición de la síntesis proteica que caracteriza al proceso de estimulación de la competencia. Esta biosíntesis proteica *de novo* debe de ser continuada a lo largo de todo el proceso de estimulación de la competencia, como lo demuestra el hecho de que la adición de lincomicina 5 min antes del pico máximo de competencia produce una drástica inhibición de la transfectabilidad. Nuestros datos parecen estar en contradicción con los de Tichy (16), quien afirma que esta síntesis de proteínas no es continua a lo largo de todo el proceso, pero coinciden con los de Tomasz (17), quien, utilizando un sistema análogo, obtuvo resultados similares en el sistema de transformación de pneumococo.

Por otra parte, estos resultados se ven también confirmados al estudiar la incorporación de fenilalanina en el interior de las células (figura 10). Así, se puede observar una correlación directa entre inhibición de la síntesis proteica e inhibición de la competencia; e incluso la inhibición en la síntesis de ARN-polimerasa, al producir una disminución acusada en la competencia, confirma los resultados de Kammen y colaboradores (8), que indican que para la adquisición del estado competente es necesaria una síntesis de proteínas dirigida por el m-ARN al revés de lo que sucede para la supervivencia de las células recién transformadas (9). No obstante, no parecen ejercer efecto alguno apreciable las acciones antibióticas a nivel del ADN, seguramente como consecuencia de la latencia divisional que caracteriza a las células competentes (5 y 11).

RECONOCIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento a Pfizer, S. A., por la ayuda económica prestada para la realización parcial de este trabajo.

RESUMEN

En el presente trabajo se analiza un sistema estimulante de la competencia en *Bacillus subtilis* mediante transfección con ADN del fago SPP1. Asimismo, sobre este sistema, se estudian posibles modificaciones a distinto nivel celular, empleando diversas sustancias antimicrobianas.

Se comprueba que inhibiciones en distintas fases de la síntesis proteica, así como ligeras alteraciones a nivel de membrana, son capaces de disminuir el desarrollo de la estimulación de la competencia. Las actividades a nivel de la pared celular pueden tener distinto significado, dependiendo de la concentración del antibiótico utilizado.

SUMMARY

*The stimulation of the competence in B. subtilis and its possible inhibition at different cell levels*

In this paper we study a stimulative competence system in *Bacillus subtilis* transfection with SPP1 DNA phage. Possible modifications of this process, at different cell levels were investigated by using several antimicrobial substances.

The results indicate that inhibitions on protein synthesis as well as small alterations at a membrane level were able to decrease the stimulating competence development. Drugs acting on the cell wall show a differential behaviour depending on the concentration used.

BIBLIOGRAFIA

1. AKKRIGG, A.; AYAD, S. R., and BARKER, G. R. 1967. The nature of a competence inducing factor in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 1062-67.

2. BISWAL, N.; KLEINSCHMIDT, A. K.; SPATZ, H. Ch., and TRAUTNER, T. A. 1967. Physical properties of the DNA of bacteriophage SP50. *Mol. Gen. Genet.*, 100, 39-55.
3. BOTT, K. F., and WILSON, G. A. 1968. Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. Rev.*, 32, 370-78.
4. CHARPAK, M., et DEDONDER, R. M. 1965. Production d'un facteur de competence soluble par *Bacillus subtilis* ind<sup>-</sup> 168. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 260, 5638-41.
5. DOOLEY, D. C.; HADDEN, C. T., and NESTER, E. W. 1971. Macromolecular synthesis in *Bacillus subtilis* during development of the competence state. *J. Bacteriol.*, 108, 668-79.
6. ELLWOOD, D. C. 1970. The wall content and composition of *Bacillus subtilis* var. *niger* grown in a chemostat. *Biochem. J.*, 118, 367-73.
7. JOENJE, H.; GRUBER, M., y VENEMA, G. 1972. Stimulation of the development of competence by culture fluids in *Bacillus subtilis* transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 262, 189-99.
8. KAMMEN, H. O.; BELOFF, R. H., and CANELLAKIS, E. S. 1966. Transformation in *Bacillus subtilis*. I. Role of amino acids in stabilization of transformants. *Biochim. Biophys. Acta*, 123, 39-55.
9. KAMMEN, H. O.; WOKNAR, R. J., and CANALLAKIS, E. S. 1966. Transformation in *Bacillus subtilis*. II. The development. *Biochim. Biophys. Acta.*, 123, 56-65.
10. LÓPEZ, R.; PÉREZ-UREÑA, M. T.; ESPINOSA, M., and PORTOLÉS, A. 1972. The effect of penicillin on competence in *Bacillus subtilis* cultures growing in chemostat at different doubling times. *Arch. Mikrobiol.*, 82, 206-12.
11. NESTER, E. W. 1964. Penicillin resistance of competent cells in DNA transformation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 87, 867-75.
12. PORTOLÉS, A. 1960. La terapia antibiótica desde el laboratorio clínico. I. Determinación de niveles antibióticos en líquidos orgánicos y valoración de su poder antimicrobiano efectivo. *Laboratorio*, 29, 21-30.
13. PORTOLÉS, A.; PÉREZ-UREÑA, M. T.; ESPINOSA, M.; GARCÍA, E., and LÓPEZ, R. 1974. Influence of some antibiotics inhibitors for protein synthesis on *Bacillus subtilis* transformation and transfection. *Progr. Chemother. Proc. Int. Congr. Chemother*, 8th, 1, 140-43.
14. RIVA, S.; POLSINELLI, M., and FALASCHI, A. 1968. A new phage of *Bacillus subtilis* with infectious DNA having separable strands. *J. Mol. Biol.*, 35, 347-56.
15. ROTTLANDER, E., and TRAUTNER, T. A. 1970. Genetic and transfection studies with *Bacillus subtilis* phage SP50. I. Phage mutant with restricted growth on *B. subtilis* strains 168. *Mol. Gen. Genet.*, 108, 47-60.
16. TICHY, P. 1972. De novo protein synthesis during the development of competence in *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.*, 17, 213-20.
17. TOMASZ, A. 1970. Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci

- requeriment for protein synthesis during induction of competence. *J. Bacteriol.*, 101, 860-71.
18. VERMEULEN, C. A., and VENEMA, G. 1974. Electron microscope and autoradiographic study of ultrastructural aspects of competence and deoxyribonucleic acid absorption in *Bacillus subtilis*: ultrastructure of competent and non-competent cells and cellular changes during development of competence. *J. Bacteriol.*, 118, 334-42.
  19. VERMEULEN, C. A., and VENEMA, G. 1974. Electron microscope and autoradiographic study of ultrastructural aspects of competence and deoxyribonucleic acid absorption in *Bacillus subtilis*. Localization of uptake and of transforming deoxyribonucleic acid in competent cells. *J. Bacteriol.*, 118, 342-50.
  20. WOLSTENHOLME, D. R.; VERMEULEN, C. A., and VENEMA, G. 1966. Evidence for the involvement of membranous bodies in the processes leading to genetic transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 92, 1111-21.

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

## PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS POR *PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA*

por

EULALIA CABEZAS DE HERRERA y OLGA GARCÍA-JURADO

### INTRODUCCION

El papel que juegan las enzimas pécticas en la patología vegetal fue puesto de manifiesto por De Bary (6) y posteriormente estudiado por Jones (10) y Brown (4).

Hoy se las considera responsables de muy diversos tipos de enfermedades, por su participación en la degradación de los constituyentes pécticos de las paredes celulares y lámina media de los tejidos vegetales (1 y 16).

La importancia de las enzimas pécticas sintetizadas por microorganismos fitopatógenos han sido ampliamente demostrada por Albersheim (1) y Bateman y Millar (3).

Hildebrand (8) hizo una revisión de todas las cepas de *Pseudomonas* fitopatógenas conocidas y encontró que la mayoría producían enzimas pécticas en mayor o menor proporción.

En el presente trabajo estudiamos la producción de enzimas pécticas por *Pseudomonas viridiflava*, así como las condiciones óptimas de producción de las mismas, por selección de substratos inductores.

Se conocen varios tipos de enzimas pécticas bacterianas. Las estudiadas por nosotros en el *Pseudomonas viridiflava* están encuadradas en

el grupo de "enzimas que rompen cadenas", según la clasificación de Bateman y Millar (3); poligalacturonasa, que por un mecanismo de hidrólisis rompe los enlaces glicosídicos 1-4 entre monómeros adyacentes de ácido urónico; pectintranseliminasa, degrada la pectina por un mecanismo de transeliminación, apareciendo dobles enlaces con un máximo de absorción de 235 m $\mu$ ; ácido pécico transeliminasa, degrada el ácido pécico también por transeliminación y los productos de reacción que se obtienen muestran un máximo de absorción a 230 m $\mu$ .

## MATERIAL Y METODOS

### *Estirpe*

*Pseudomonas viridiflava*, estirpe 2012, procedente de la National Collection of Phytopathogenic Bacteria, de Harpenden (Inglaterra).

### *Medios de cultivo*

Utilizamos caldo común, caldo glucosado, medio específico de *Pseudomonas* propuesto por Kado y Heskett (11); este mismo medio suplementado con pectina al 0,25 %, o con caseína en la misma proporción; medio de Smith (18) y caldo común suplementado con extracto de judía al 20 % (500 g de extracto de judía/1 de agua). Medio de azúcares, compuesto por una solución salina como base, compuesta de: fosfato amónico (1 g), sulfato magnésico (0,2 g), cloruro potásico (0,2 g) y agua destilada (1.000 ml), ajustando a pH 7. A esta solución se le añade 1 % del azúcar correspondiente y 0,002 % de rojo de fenol, como indicador. En el interior de los tubos, con el medio, se colocan campanas de Dürham, para probar la producción de gas.

### *Crecimiento bacteriano*

Obtenemos las curvas de crecimiento de la bacteria, cultivándola en medio líquido a 25 °C, en agitación, en matraces de Monod y realizando lecturas periódicas en un espectrocolorímetro de Baush y Lomb, spectronic 20.

Periódicamente, a las 12, 24 y 48 h de cultivo, se toman muestras para determinar la actividad enzimática en los sobrenadantes libres de células.

### Valoración de enzimas pectolíticas

Poligalacturonasa, según la técnica propuesta por Jansen y McDonnell (9).

Pectintranseliminasa y ácido péctico transeliminasa, siguiendo el procedimiento de Nasuno y Starr (13).

### RESULTADOS

Las curvas de crecimiento de la *figura 1* reflejan las exigencias nutricionales de la bacteria. Se observa buen crecimiento en caldo común, caldo glucosado, medio específico de *Pseudomonas* suplementado con caseína, medio de Smith y caldo con extracto de judía. En el medio específico de *Pseudomonas* suplementado con pectina, el crecimiento es más lento, pero a las 14 h de cultivo se alcanza la misma población bacteriana que la obtenida en los demás medios de cultivo.

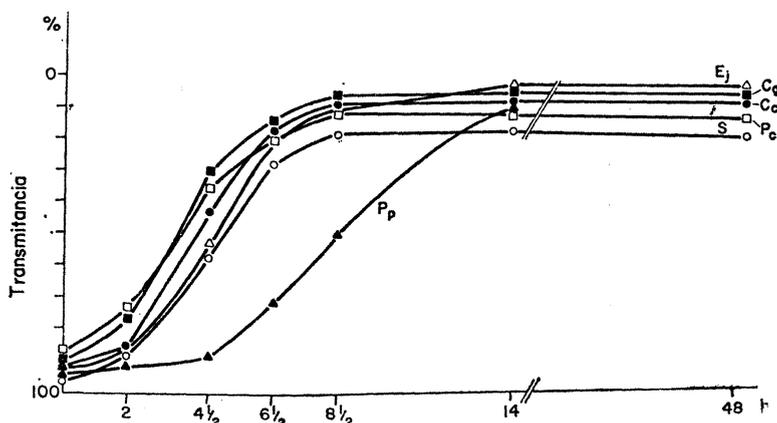


Figura 1. *Ps. viridiflava*. Curvas de crecimiento en seis medios de cultivo diferenciales

Metaboliza los azúcares arabinosa, celobiosa, dextrina, fructosa, galactosa, melibiosa, sorbitol y xilosa y licúa la gelatina.

No crece sobre adonita, dulcitol, eritrita, esculina, glucógeno, inulina, lactosa, maltosa, melicitosa, rafinosa, ramnosa, sacarosa, salicina y trealosa, cuando se encuentran en el medio como única fuente de carbono.

### Enzimas

Ensayada la actividad enzimática en los líquidos metabólicos, libres de células, procedentes de cultivar la bacteria en cada uno de los medios de cultivo ya indicados, en los que obtuvimos un crecimiento bacteriano abundante, sólo encontramos actividad de enzimas pectolíticas en los sobrenadantes procedentes de cultivar la bacteria en medios de cultivo que contienen pectina como fuente de carbono y en los que proceden del cultivo en caldo con extracto de judía.

La máxima actividad enzimática se encuentra en los sobrenadantes de cultivos de 48 h, en las condiciones de temperatura y aireación indicadas.

### Poligalacturonasa

La figura 2 refleja la cantidad de poligalacturonasa expresada en miligramos de ácido galacturónico/ml de sobrenadante.

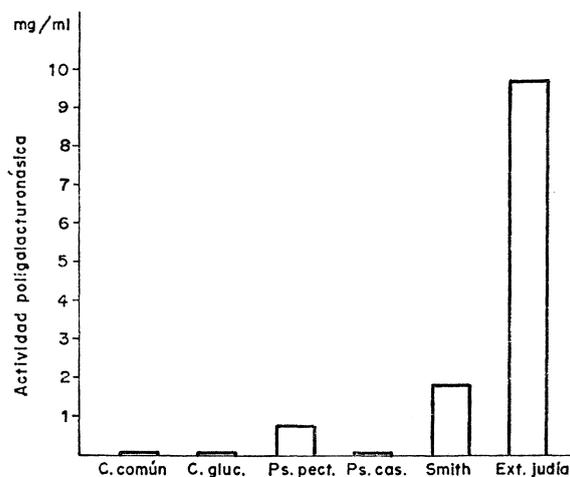
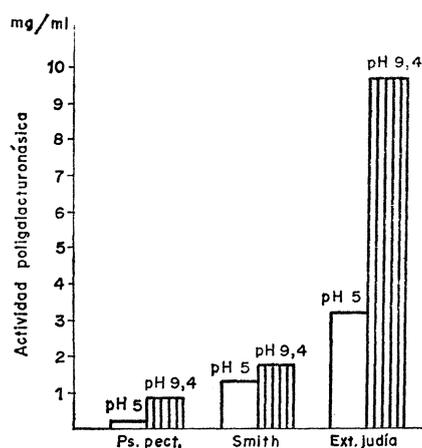


Figura 2. *Ps. viridiflava*. Diferencias en el contenido de poligalacturonasa en los líquidos metabólicos procedentes del cultivo de la bacteria en medios con distintos substratos inductores

Los sobrenadantes proceden del cultivo de la bacteria durante 48 h en 6 medios de cultivo, con diferentes substratos inductores.

Ensayamos la influencia del pH en la mezcla de reacción para la valoración de estas enzimas. En la *figura 3* se observa que la actividad de esta enzima medida a pH 9,4 es tres veces superior a la medida a pH 5.



*Figura 3.* *Ps. viridiflava.* Influencia del pH en la valoración de poligalacturonasa

#### *Pectintranseliminasa*

La actividad de la pectintranseliminasa se expresa en incremento de la densidad óptica a 235  $m\mu$  multiplicado por 100.

En la *figura 4* reflejamos la actividad encontrada en los líquidos metabólicos procedentes de cultivar la bacteria durante 48 h, en los 6 medios de cultivo antes indicados.

Como en el caso de la poligalacturonasa, sólo aparece actividad de esta enzima en los líquidos metabólicos procedentes de los medios de cultivo que contienen pectina como fuente de carbono y en el que procede de caldo con extracto de judía.

El pH de valoración de esta enzima es muy específico, pH 8,6. A valores más ácidos o más alcalinos, no se detecta actividad.

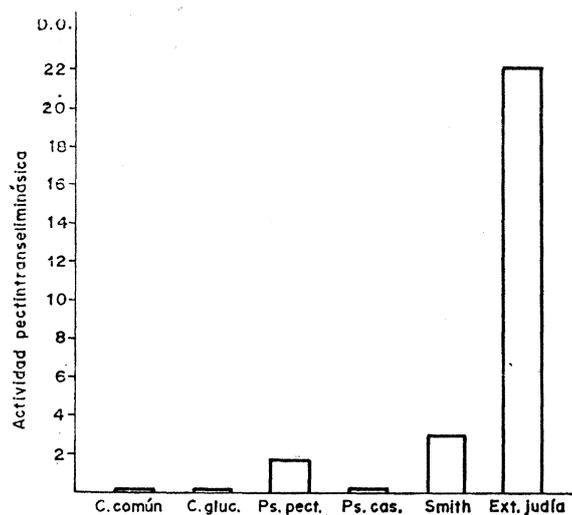


Figura 4. *Ps. viridiflava*. Diferencias en el contenido de pectintranseliminasa en los líquidos metabólicos procedentes del cultivo de la bacteria en medios con distintos substratos inductores

#### Acido péctico transeliminasa

Se comprueba, una vez más, que las enzimas pectolíticas sólo se producen sobre medios de cultivo que contienen pectina como fuente de carbono (figura 5).

Como en el caso de la pectinmetilesterasa, sólo se detecta actividad a pH 8,6.

#### DISCUSION

Severini (17) fue el primero que describió dos bacterias que causaban podredumbre en los gladiolos. Una de ellas era un *Pseudomonas*. Pero durante 30 años no se volvió a tener en consideración este género bacteriano como patógeno de plantas, hasta que, en 1944, Oxford (14) hizo una revisión sobre los *Pseudomonas* que formaban enzimas pécticas.

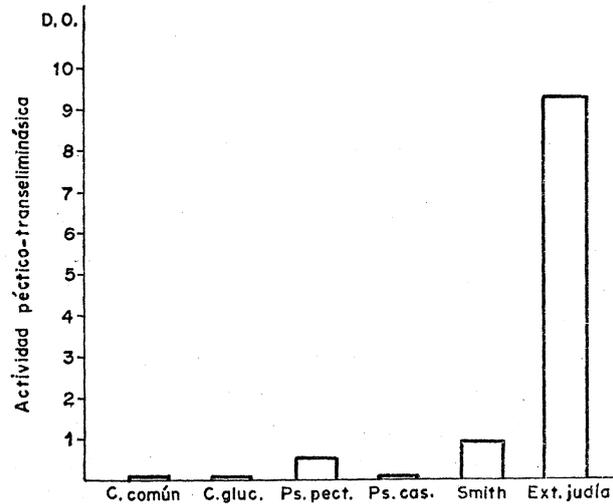


Figura 5. *Ps. viridiflava*. Diferencias en el contenido de ácido pécico transeliminasa en los líquidos metabólicos procedentes del cultivo de la bacteria en medios con distintos sustratos inductores

No todos los autores están de acuerdo en que produzca este tipo de enzimas. Burkholder y Starr (5), por ejemplo, revisaron 80 estirpes de este género, y ninguna licuaba el gel de pectato. Sin embargo, Sabet y Dowson (15) encontraron que todas las estirpes patógenas de plantas licuaban el gel de pectato con mayor o menor intensidad.

Tanta diversidad de opiniones, le indujo a Hildebrand (8) a hacer una revisión de todas las cepas estudiadas hasta el momento. Dividió los *Pseudomonas* en 4 grupos, dependiendo de su acción sobre los geles de polipectato en relación con el pH, la fluorescencia de sus cultivos o los distintos síntomas que producían en las plantas que atacaban.

Según Bateman y Millar (3), los microorganismos pueden poseer enzimas constitutivas o sintetizarlas por inducción. La estirpe de *Pseudomonas viridiflava* que estudiamos, sintetiza las enzimas por inducción, y muy específicamente, como hemos podido comprobar en los resultados obtenidos al realizar el análisis enzimático en los líquidos metabólicos de la bacteria en medios con diferentes sustratos (figuras 2 y 4-5).

Con independencia de los sustratos inductores específicos, existen determinadas sustancias que estimulan o inhiben la producción enzimática de las bacterias. Estudiando la producción enzimática de *Erwinia carotovora* en cultivo continuo (19), comprobamos que la glucosa era necesaria para que se produjera un crecimiento abundante, pero hasta que la glucosa no era eliminada del medio, la bacteria no sintetizaba ninguna enzima péctica.

En general, todos los azúcares metabolizables inhiben o retardan la síntesis enzimática, ya que si la bacteria tiene a su alcance fuentes de carbono fáciles de metabolizar no se "molesta" en degradar sustancias más complicadas, como las pécticas.

En el presente trabajo demostramos que la bacteria sintetiza enzimas pécticas sobre un sustrato de pectina, medio de Smith, medio específico de *Pseudomonas* suplementado con pectina. Pero los factores que le proporciona el extracto de judía exaltan la producción enzimática de tal manera que llega a ser diez veces superior en este medio que en los anteriormente citados (figuras 2 y 4-5).

Hancock (7), trabajando con *Colletotrichum trifolii*, demostró que el pH del medio puede determinar el tipo de actividad enzimática. Lange y Knösel (12) observaron variaciones en la producción de enzimas por diversos *Pseudomonas*, dependiendo del pH.

Finalmente, Hildebrand (8) realiza un estudio sobre el efecto que los diferentes niveles de pH producen en las enzimas pécticas del género *Pseudomonas*, y llegó a la conclusión de que existen 4 grupos de *Pseudomonas* en relación con el pH a que actúan sobre los geles de polipectato, señalando el pH 5 como óptimo para manifestar la actividad de poligalacturonasa, y el pH 8, óptimo para las liasas.

En la estirpe 2012 del *Pseudomonas viridiflava*, el pH influye de una manera decisiva en la actividad de estas enzimas. En la figura 3 podemos ver la enorme diferencia de la enzima poligalacturonasa a diferentes pH (pH 5 y pH 9,4), diferencia que se hace más patente cuando las condiciones de producción son óptimas.

En las enzimas pectintranseliminasa y ácido péctico transeliminasa, el pH es tan específico que sólo se puede valorar su actividad a pH 8,6.

## RESUMEN

En el presente trabajo fijamos las condiciones fisiológicas óptimas del *Pseudomonas viridiflava* en cuanto a factores de crecimiento y substratos inductores de síntesis de enzimas pectolíticas.

La síntesis de estas enzimas es diez veces mayor cuando se cultiva la bacteria en caldo con extracto de judía que cuando crece sobre medios sintéticos suplementados con pectina.

El pH influye significativamente en la determinación de la actividad de estas enzimas. A pH 9,4, la actividad de la poligalacturonasa es tres veces superior que a pH 5. En las enzimas pectintranseliminasa y ácido pectico transeliminasa, el pH es tan específico que sólo se puede valorar a pH 8,6.

## SUMMARY

*Production of pectic enzymes by Pseudomonas viridiflava*

The growth of *Pseudomonas viridiflava* was carried out in different conditions and selected the medium in which the production of pectic enzymes was greater.

The synthesis of these enzymes is ten times bigger when the bacteria is cultivated in bean extract broth, that when it is grown in synthetic media supplemented with pectin.

The pH is very important in the determination of the enzymatic activity. At the pH 9.4 the polygalacturonase activity is three times bigger than at pH 5. The pH for pectintranseliminase and pectic acid transeliminase enzymes is critical, and only they can be estimated at pH 8.6.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALBERSHEIM, P.; JONES, T. M., and ENGLISH, P. D. 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 7, 171-94.
2. ALBERSHEIM, P.; NEUKOM, H., und DEUEL, H. 1960. Über die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten durch ein pektinabbaudnes Enzym. *Helv. Chim. Acta*, 43, 1422-26.

3. BATEMAN, D. F., and MILLAR, R. L. 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 4, 119-46.
4. BROWN, W. 1915. Studies in the physiology of parasitism. I. The action of *Botrytis cinerea*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 3, 1-19.
5. BURKHOLDER, W. H., and STARR, M. P. 1948. The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 38, 494-502.
6. DE BARY, A. 1886. Über einige Sclerotien und Sclerotinienkrankheiten. *Bot. Zh.*, 44, 377-474.
7. HANCOCK, J. G. 1965. Relationship between induced changes in pH and production of polygalacturonate transeliminase by *Colletotrichum trifolii*. *Phytopathology*, 55, 1061-67.
8. HILDEBRAND, D. C. 1971. Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacteria plant pathogens. *Phytopathology*, 61, 1430-35.
9. JANSEN, E. F., and McDONELL, L. R. 1945. Influence of methoxyl content of pectic acid substance on the action of polygalacturonase. *Arch. Biochem.*, 8, 97-112.
10. JONES, L. R. 1909. The bacterial soft-rots of certain vegetables. II. Pectinase, the cytolic enzyme produced by *Bacillus carotovorus* and certain other soft-rot organisms. *Verm. Univ. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.*, 147, 281-360.
11. KADO, C. I., and HESKETT, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60, 969-76.
12. LANGE, E., und KNÖSEL, D. 1970. Zur Bedeutung pektolytischen, cellulolytischen und proteolytischen Enzyme für die Virulenz phytopathogener Bakterien. *Phytopathol. Z.*, 69, 315-29.
13. NASUNO, S., and STARR, M. P. 1967. Polygalacturonic acid transeliminase of *Xanthomonas campestris*. *Biochem. J.*, 104, 178-83.
14. OXFORD, A. E. 1944. Production of a soluble pectinase in a simple medium by certain plant pathogenic bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*. *Nature London*, 154, 271-72.
15. SABET, K. A., and DOWSON, W. J. 1951. Action of phytopathogenic bacteria on pectate gel. *Nature London*, 168, 605.
16. SATO, S. 1968. Enzymatic maceration of plant tissue. *Physiol. Plant.*, 21, 1067-75.
17. SEVERINI, G. 1913. Intorno alle attività enzimatiche di due bacteri patogeni per la pianta. *Ann. Bot. Roma*, 11, 441-52.
18. SMIT, W. K. 1958. A survey of the production of pectic enzymes by plant pathogenic and other bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 33-41.
19. TEJERINA, G.; PORTOLÉS, A., y CABEZAS DE HERRERA, E. 1967. Producción de enzimas pectolíticas en cultivo continuo. *Microbiol. Españ.*, 20, 233-44.

ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN (C S I C). GRANADA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

## TOXICIDAD DE VARIAS ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* AISLADAS DE LARVAS MUERTAS DE *PRAYS OLEAE* BERNARD

por

F. ROIG, P. RAMOS y J. M. BAREA

### INTRODUCCION

A principios del presente siglo, Berliner (2) dio el nombre de *Bacillus thuringiensis* a un bacilo esporulado, tóxico para insectos. Desde entonces, las estirpes de dicha bacteria han sido muy estudiadas y utilizadas para el control de plagas (1, 3-4, 9 y 11). Recientemente, Roig (12) ha revisado la literatura científica relacionada con este tema.

*Bacillus thuringiensis* ha sido aislado en larvas muertas de numerosos lepidópteros (1, 3 y 15). Sin embargo, no ha sido descrito el aislamiento de dichas bacterias en larvas de *Prays oleae* Bernard (Lep. Hyponomeutidae), importante plaga del olivar. No obstante, Yambrias (19-20) ha realizado tratamientos de dicha plaga con preparados comerciales a base de *B. thuringiensis*.

Teniendo en cuenta el interés ecológico que representaría el hecho de emplear estirpes de *Bacillus thuringiensis* aisladas en el mismo biotopo donde serían utilizadas como insecticidas, se procedió a la búsqueda de dichas bacterias en larvas muertas de las tres generaciones anuales de *Prays oleae*, filófaga, antófaga y carpófaga.

En un trabajo anterior, en este laboratorio, se demostró la presencia de *Bacillus thuringiensis* en larvas muertas de las tres generaciones (13).

En el presente estudio se describen las técnicas de aislamiento, se clasifican las estirpes aisladas y se investiga la toxicidad de cultivos de las mismas frente a larvas de *Prays oleae*.

## MATERIAL Y METODOS

### *Aislamiento*

El material de partida consistió en larvas muertas de las distintas edades de las tres generaciones de *Prays oleae*, realizándose la toma de muestras de material vegetal (hoja, flor o fruto) en diversas zonas olivares de Andalucía.

Se partió en total de 1.728 larvas muertas, de las cuales 1.087 pertenecían a la generación filófaga, 540 a la antófaga y 106 a la carpófaga. Las larvas muertas se trituraron en un mortero estéril con 5 ml de caldo común y una pequeña cantidad de arena de cuarzo estéril. El homogeneizado de larvas muertas se calentó a 75 °C durante 30 min con objeto de seleccionar bacterias esporuladas del género *Bacillus*. Esta suspensión se sembró en agar común, cultivándose durante 48 h a 28 °C, y de las colonias con diferencias morfológicas distinguibles, se realizó una tinción de esporas (16), seleccionándose los *Bacillus* sp.

### *Identificación*

Se siguió el método de Wolf y Barker (18) que clasifica a los *Bacillus* en tres grupos según el tipo de spora, oval o esférica, y según el esporangio aparezca, o no, hinchado. En el grupo I se encuadra *Bacillus cereus* y variedades en las que se incluyen los bacilos cristalíferos del grupo *B. thuringiensis*. Se siguieron las técnicas que utilizan los citados autores, completadas con el manual de Harrigan y McCance (8).

Por el hecho de haber sido descritos tipos de *Bacillus thuringiensis* no productores de lecitinasa (*B. cereus* es lecitinasa +), con todos los bacilos esporulados en identificación (productores, o no, de lecitinasa), se realizó una tinción específica para poner de manifiesto la presencia de cuerpos paraesporales, utilizando el método de Smirnoff (17).

### Clasificación de *B. thuringiensis*

Se siguió el criterio taxonómico de De Barjac y Bonnefoi (6), que permite la diferenciación de 6 tipos de bacilos cristalíferos.

### Pruebas de toxicidad

#### a) Producción de $\beta$ -exotoxina

Se siguió el método descrito por Rosemberg y colaboradores (14), usando *Sarcina flava* como microorganismo susceptible a la  $\beta$ -exotoxina de *Bacillus thuringiensis*. Asimismo, se investigó la posible susceptibilidad de *Pseudomonas reptilivora*, *Staphylococcus aureus* y un *Bacillus* sp. a la mencionada toxina.

Como condiciones óptimas para esta técnica se eligieron las siguientes: 24 h en incubación a 28 °C para la producción de  $\beta$ -exotoxina por las estirpes de *Bacillus thuringiensis* en el medio de Conner y Hansen (5) y 24 h para el crecimiento de *Sarcina flava* y las demás bacterias cuya susceptibilidad a la  $\beta$ -exotoxina se investiga, en el medio descrito por Rosemberg y colaboradores (14).

#### b) Pruebas de toxicidad sobre larvas

Para la preparación de cultivos de *Bacillus thuringiensis* se siguió el método descrito por Dubois (7), en el que se sustituyó "phytone" por extracto de levadura. Para el ensayo de toxicidad se emplearon larvas de la generación antófaga (20) de *Prays oleae* de segunda a quinta edad, y en lotes de 5 larvas de la misma edad se colocaron en frascos de vidrio con inflorescencias como alimento. Posteriormente, se pulverizó con la suspensión del cultivo de *B. thuringiensis* a dos concentraciones distintas ( $10^7$  y  $10^8$  esporas viables/ml), realizándose todos los ensayos por duplicado. Estos frascos se taparon con una gasa de malla fina que se sujetó con goma elástica a la boca del frasco, y se mantuvieron en insectario procurando que las condiciones fueran semejantes a las del habitat natural. Las lecturas parciales se realizaron a las 48 h después del tratamiento y periódicamente cada 48 h; la lectura final, cuando ya habían emergido los adultos, contando el número de ellos.

Los resultados se expresan en porcentaje de eficacia de los tratamientos, de acuerdo con la fórmula de Abbot modificada (4).

En todos los casos, a partir de larvas muertas por el tratamiento se hicieron aislamientos para investigar la presencia de bacilos cristalíferos.

## RESULTADOS

*Aislamiento*

Se aislaron 680 *Bacillus* sp., que, agrupados según el esquema de Wolf y Barker (18), se exponen en el *cuadro 1*, de acuerdo con la generación de procedencia.

*Cuadro 1. Clasificación de Bacillus sp. aislados*

Grupo	Número de <i>Bacillus</i> según generación de procedencia			
	Filófaga	Anfófaga	Carpófaga	Total
I	289	123	56	468
II	112	65	19	196
III	10	6		16
Total	411	194	75	680

*Identificación de Bacillus sp. del grupo I y selección de estirpes cristalíferas*

En el *cuadro 2* se indica la generación de *Prays oleae* de cuyas larvas muertas fueron aislados los 51 bacilos identificados como *Bacillus cereus* y variedades, y los 25 de ellos que fueron caracterizados como *B. thuringiensis*.

*Cuadro 2. Generación de P. oleae de la que se aislaron las estirpes de B. cereus y variedades*

Microorganismos	Número de <i>Bacillus</i> según generación de procedencia		
	Filófaga	Antófaga	Carpófaga
<i>B. cereus</i> y variedades	26	18	7
<i>B. thuringiensis</i>	12	11	2

Cuadro 3. Identificación de los distintos tipos de *B. thuringiensis*

Estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	Pruebas bioquímicas (*)										Tipo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Thuricide (**)	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	Berliner
T <sub>1</sub> (***)	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	Sotto
T <sub>2</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>3</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>4</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>5</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>6</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>7</sub>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	Berliner
T <sub>8</sub>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	"
T <sub>9</sub>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	"
T <sub>10</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	Sotto
T <sub>11</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	Dendrolimus
T <sub>12</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	Sotto
T <sub>13</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>14</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>15</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>16</sub>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	Berliner
T <sub>17</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	Sotto
T <sub>18</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>19</sub>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	Berliner
T <sub>20</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	Dendrolimus
T <sub>21</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	Sotto
T <sub>22</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	Dendrolimus
T <sub>23</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	Sotto
T <sub>24</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	"
T <sub>25</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	Dendrolimus

(\*) 1, reacción del rojo de metilo; 2, crecimiento en Koser; 3, producción de indol; 4, producción de ureasa; 5, reacción de Voges-Proskauer; 6, producción de lecitinasa; 7, fermentación de salicina; 8, producción de pigmento; 9, hidrólisis de almidón; 10, fermentación de sacarosa.

(\*\*) *Bacillus thuringiensis* aislado de un preparado comercial.

(\*\*\*) Con la sigla T y subíndices 1 al 25 se designan las 25 estirpes de *B. thuringiensis* aisladas de larvas de *P. oleae*.

*Clasificación de estirpes cristalíferas de Bacillus sp.*

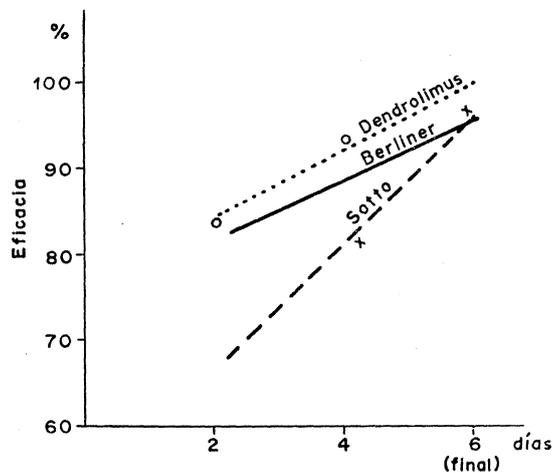
El *cuadro 3* recoge los resultados de las pruebas de identificación de las 25 estirpes cristalíferas aisladas de larvas, así como de una estirpe obtenida a partir del preparado comercial "thuricide".

*Producción de  $\beta$ -exotoxina por las estirpes de Bacillus thuringiensis aisladas*

En el *cuadro 4* se exponen los resultados obtenidos en esta prueba. Como puede apreciarse, *Sarcina flava* y *Pseudomonas reptilivora* resultaron ser sensibles a la  $\beta$ -exotoxina, con parecida intensidad.

*Pruebas de toxicidad frente a larvas*

Los resultados se resumen en la *figura 1*, expresados en porcentaje de eficacia de los tratamientos. Estos datos se calcularon utilizando la media de los valores de "porcentaje de mortalidad" obtenidos por el tratamiento con cultivos individuales de todos los *Bacillus* pertenecientes a cada uno de los tres tipos: Berliner, Dendrolimus y Sotto.



*Figura 1. Porcentaje de eficacia del tratamiento de larvas de la generación antófaga de P. oleae con cultivos de distintos tipos de B. thuringiensis*

En dicha *figura 1* se muestra la variación de la eficacia según el tiempo después del tratamiento con cultivos que poseían una "riqueza

relativa" de  $10^7$  esporas viables/ml. Cuando se empleó la concentración  $10^8$  esporas viables/ml, el porcentaje de eficacia, a sólo 2 días del tratamiento, alcanzó valores comprendidos entre 95,5 y 96,6.

De las larvas muertas por los tratamientos se reaislaron *Bacillus* cristalíferos.

## DISCUSION

De la distribución de *Bacillus* según generación de *Prays oleae*, de donde fueron aislados, se deduce que el porcentaje de *Bacillus thuringiensis* con respecto al de *Bacillus* sp. totales (*cuadro 1*) es el doble en generación antófaga (5,2 %) que en cualquiera de las otras dos. Asimismo, si se calcula por generación el porcentaje de *B. thuringiensis* (*cuadro 2*) con respecto al de larvas muertas investigadas, se observa que en generación antófaga, dicho tanto por ciento es el doble que en filófaga y superior que en carpófaga.

De estas consideraciones se deduce:

1. Las larvas de generación antófaga parecen tener más fácil acceso a la ingestión de *Bacillus thuringiensis*. Ello está de acuerdo con el sistema de alimentación utilizado por las larvas en cada una de las tres generaciones anuales y con el trabajo de Yambrias (19-20).

2. Si se tiene en cuenta que se partió de 1.728 larvas, el haber aislado solamente 25 *Bacillus thuringiensis* indica que puede ser aconsejable el empleo de esta bacteria como "insecticida microbiano", en una zona en la que está poco introducido.

Los resultados que se exponen en el *cuadro 4* están, en parte, de acuerdo con los de Carlberg (4). Los *Bacillus thuringiensis* tipo Berliner aislados de *Prays oleae* son productores de  $\beta$ -exotoxina, tal como describe Carlberg. Igualmente, hay correspondencia en que los tipo Sotto son malos productores de toxina termostable. Sin embargo, los tipo Dendrolimus, considerados como malos productores (4), sí han resultado ser buenos productores de dicha toxina en el presente estudio. Este hecho hace pensar en la posibilidad de que se trate de un nuevo serotipo de *B. thuringiensis*, o bien que los tipo Dendrolimus identificados en el presente estudio, de acuerdo con criterios bioquímicos de De Barjac y Bon-

Cuadro 4. Producción de  $\beta$ -exotoxina por los distintos tipos de *B. thuringiensis*

Tipo	Estirpe de <i>B. thuringiensis</i>	Producción de $\beta$ -exotoxina Milímetros del halo de inhibición del crecimiento de			
		<i>S. flava</i>	<i>Ps. reptilivora</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
Berliner	Thuricide (*)	23	22	—	— (**)
	T <sub>7</sub>	22	22	11	—
	T <sub>8</sub>	23	20	—	—
	T <sub>9</sub>	24	25	11	11
	T <sub>16</sub>	26	24	10	10
	T <sub>19</sub>	22	22	—	—
Dendrolimus	T <sub>11</sub>	22	22	—	—
	T <sub>20</sub>	24	24	—	—
	T <sub>22</sub>	22	22	10	—
	T <sub>25</sub>	23	23	10	10
Sotto	T <sub>1</sub>	16	12	10	—
	T <sub>2</sub>	18	12	—	11
	T <sub>3</sub>	14	—	—	—
	T <sub>4</sub>	—	11	10	10
	T <sub>5</sub>	17	11	—	—
	T <sub>6</sub>	—	—	—	10
	T <sub>10</sub>	—	11	—	—
	T <sub>12</sub>	14	11	—	—
	T <sub>13</sub>	16	15	11	11
	T <sub>14</sub>	—	—	—	—
	T <sub>15</sub>	—	—	—	—
	T <sub>17</sub>	18	11	12	10
	T <sub>18</sub>	14	13	10	11
	T <sub>21</sub>	—	—	—	—
T <sub>23</sub>	—	—	—	—	
T <sub>24</sub>	17	11	12	11	

(\*) *Bacillus thuringiensis* aislado de un preparado comercial.(\*\*) El signo — indica que el halo de inhibición, si lo hubo, no superó el  $\varnothing$  del pocillo (9 mm).

nefoi (6), no deban ser incluidos en el serotipo Dendrolimus, de Carlberg (4).

Para la realización de las pruebas de toxicidad en insectario se eligieron larvas de la generación antófaga, siguiendo la recomendación preconizada por Yambrias (19-20), que utiliza como base científica el sistema de alimentación de las larvas en cada generación. De acuerdo con los datos obtenidos en esta investigación, si la incidencia de *Bacillus thuringiensis* ha resultado ser mayor en generación antófaga, cabe pensar en que en esta generación es donde existen más posibilidades de que las larvas ingieran los productos tóxicos de estos *Bacillus*, confirmándose así que éste sería el período aconsejable para realizar el tratamiento.

Como se aprecia en la *figura 1*, los *Bacillus* tipo Sotto, que resultaron ser malos productores de  $\beta$ -exotoxina, poseen una actividad letal bastante inferior a la de los tipo Berliner y Dendrolimus, en los primeros días después del tratamiento. Ello sugiere la posibilidad de que la  $\beta$ -exotoxina tenga gran influencia en el efecto letal de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Prays oleae* en las primeras 48 h después de su aplicación.

En resumen, se puede decir que, teniendo en cuenta que se aisló *Bacillus thuringiensis* de larvas muertas de *Prays oleae*; que dichos *Bacillus* tienen características tóxicas para larvas vivas del mencionado lepidóptero, y que, de larvas muertas por el tratamiento con los *Bacillus* previamente aislados, se reaislaron dichos microorganismos, se deduce como conclusión final que en las relaciones patógenas entre *B. thuringiensis* y *Prays oleae*, se cumplen los clásicos cuatro postulados de Koch.

#### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Dr. G. Carlberg, del Departamento de Microbiología de la Universidad de Helsinki, el envío de la estirpe de *Sarcina flava* utilizada en el ensayo de producción de  $\beta$ -exotoxina.

#### NOTA

De acuerdo con Ramos-Cormenzana (comunicación personal y Apuntes de Taxonomía Microbiana, Universidad de Granada), la mencionada estirpe, aerobia, de *Sarcina flava* debería ser considerada como *Micrococcus*. No obstante, por ser estirpe enviada, y para evitar confusiones

en la bibliografía, se le ha seguido denominando *Sarcina* en el presente trabajo.

### RESUMEN

25 estirpes de bacterias formadoras de cristales fueron aisladas de larvas muertas de *Prays oleae* Bernard, pertenecientes a las tres generaciones anuales: filófaga, antófaga y carpófaga de dicho lepidóptero. Las estirpes fueron identificadas y clasificadas dentro de los tipos bioquímicos Berliner, Sotto y Dendrolimus de *Bacillus thuringiensis*. Los tipos Berliner y Dendrolimus resultaron ser productores de  $\beta$ -exotoxina termostable, mientras que los tipo Sotto no poseían de forma acusada dicha actividad tóxica.

Con las estirpes identificadas se llevó a cabo un tratamiento de larvas vivas de la generación antófaga de *Prays oleae*, en insectario. Los cultivos líquidos de los *Bacillus* contenían esporas y cristales (y en algunos casos  $\beta$ -exotoxina). A los dos días del tratamiento por pulverización, los resultados obtenidos con la concentración más débil de las dos estudiadas,  $10^7$  esporas viables/ml, mostraron que la mortalidad de las larvas, expresada como porcentaje de eficacia del tratamiento, fue 68 para los tipo Sotto y 81 para los productores de  $\beta$ -exotoxina. Al final del ensayo, el porcentaje de eficacia de todos los tratamiento fue aproximadamente de 100.

Se demuestran los cuatro postulados de Koch en las relaciones patógenas: *Bacillus thuringiensis-Prays oleae*.

### SUMMARY

*Toxicity of B. thuringiensis isolated from dead larvae of Prays oleae Bernard*

25 strains of crystal-forming bacteria were isolated from dead larvae of the olive moth, *Prays oleae* Bernard, belonging to the leaf, flower and fruit generations. The strains were identified as Berliner, Dendrolimus and Sotto biotypes of *Bacillus thuringiensis*.

Berliner and Dendrolimus types produced thermostable  $\beta$ -exotoxin, but Sotto types were poor producers of such substance.

The isolated strains were tested in an insect-evolutionary against the flower generation of the olive moth. Larvae were reared and fed with inflorescences, and liquid cultures of the *Bacillus* containing spores and crystals (and  $\beta$ -exotoxin in some cases) at  $10^7$  and  $10^8$  viable spores/ml were applied. Two days after spraying with the former concentration, larval mortality, as expressed in percentage of efficacy, was 68 for Sotto and 81 for the  $\beta$ -exotoxin-producers types. At the end of the assay the percentage of treatments efficacy was nearly 100 in all cases.

Koch's postulated are demonstrated in the *Bacillus thuringiensis-Prays oleae* pathogenic relationship.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ANGUS, T. A. 1965. Symposium of microbial insecticides. I. Bacterial pathogens of insects as microbial insecticides. *Bacteriol. Rev.*, 29, 364-72.
2. BERLINER, E. 1915. Uber die Schlaffsucht der Mehlmotenraupe (*Ephesia kuhniella* Zell.) und ihre Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Z. Angew. Entomol.*, 2, 29-56.
3. BURGESS, H. D., and HUSSEY, N. W. 1971. *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, London and New York.
4. CARLBERG, G. 1973. Biological effects of the thermostable  $\beta$ -exotoxin produced by different serotypes of *B. thuringiensis*. Tesis doctoral, Universidad de Helsinki.
5. CONNER, R. M., and HANSEN, P. A. 1967. Effects of valine, leucine and isoleucine on the growth of *B. thuringiensis* and related bacteria. *J. Invertebr. Pathol.*, 9, 12-18.
6. DE BARJAC, H., et BONEFOI, A. 1962. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. *Entomophaga*, 7, 5-31.
7. DUBOIS, N. R. 1968. Laboratory batch production of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Appl. Microbiol.*, 16, 1098-99.
8. HARRIGAN, W. F., and MCCANCE, N. E. 1966. *Laboratory Methods in Microbiology*, 56-64. Academic Press, New York.
9. HEIMPEL, A. M. 1967. A critical review of *B. thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annu. Rev. Entomol.*, 12, 287-322.
10. HEIMPEL, A. M., and ANGUS, T. A. 1960. Bacterial insecticides. *Bacteriol. Rev.*, 24, 266-88.
11. ROGOFF, M. H. 1966. Crystal-forming bacteria as insect pathogens. *Advan. Appl. Microbiol.*, 8, 291-313.
12. ROIG, F. 1974. Estudios sobre *B. thuringiensis* presentes en larvas muertas de *Prays oleae* Bernard. Aislamiento, pruebas de toxicidad y posibilidades

- del control microbiano de la plaga. Tesis doctoral, Universidad de Granada.
13. ROIG, F.; BAREA, J. M., y CALLAO, V. 1973. Investigación de la presencia de *B. thuringiensis* en larvas muertas de *Prays oleae*. Comunicación al IV Congreso Nacional de Microbiología, Granada.
  14. ROSEMBERG, G.; CARLBERG, G., and GYLLEMBERG, H. G. 1971. Microbiological assay of the  $\beta$ -exotoxin of *B. thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 417-23.
  15. SANTIAGO-ALVAREZ, C.; ARROYO-VALERA, M., and ALFARO-GARCÍA, A. 1947. Aislamiento de *B. thuringiensis* de lepidópteros españoles. *Rev. Soc. Hisp. Luso Amer. Lepidopterol.*, 5, 74-82.
  16. SHAEFEER, A. B., and FULTON, M. 1933. A simplified method of staining endospores. *Science*, 77, 194.
  17. SMIRNOFF, W. A. 1962. A staining method for differentiating spores, crystals, cells of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect. Pathol.*, 4, 384-86.
  18. WOLF, J., and BARKER, A. N. 1968. The genus *Bacillus*: aids to the identification of its species. En B. GIBBS and D. A. SHAPTON (eds.). *Identification Methods for Microbiologists*, part B, 93-109. Academic Press, London and New York.
  19. YAMBRIAS, Chr. 1964. Essais préliminaires d'une préparation bactérienne a *B. thuringiensis*, sur la lutte contre les larves de la generation anthophage de la teigne de l'olivier (*P. oleae*). *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki*, 6, 37-43.
  20. YAMBRIAS, Chr. 1972. Efficacité des préparations bactériennes dans un assai de lutte contre les larves de la generation anthophage de *P. oleae*. *Communication au Groupe de travail "Ravageurs de l'olivier"*, Portici (Italia).

CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA,  
VIROLOGIA E INMUNOLOGIA SANITARIAS. MAJADAHONDA (MADRID)  
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA  
HOSPITAL DE REY. MADRID  
LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA

## DIAGNOSTICO DE MENINGITIS MENINGOCOCICA POR INMUNOELECTROFORESIS

por

J. CASAL (\*), A. FADÓN (\*\*) y S. FERNÁNDEZ (\*\*)

### INTRODUCCION

Para hacer un diagnóstico correcto y un tratamiento adecuado de la meningitis meningocócica es importante que el laboratorio confirme la presencia de meningococos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) del enfermo lo antes posible.

Los meningococos se identifican en los LCR por tinciones directas y cultivos bacterianos, pero estas técnicas clásicas no siempre dan resultados óptimos. Las tinciones pueden parecer negativas al haber pocos gérmenes, y en los cultivos se pueden obtener falsos resultados debido a la fragilidad de los meningococos, al tratamiento previo del enfermo por antibióticos, o a una contaminación secundaria de los LCR.

Los meningococos poseen un polisacárido capsular que se expresa como antígeno precipitante (1 y 4). La detección de este antígeno en LCR

---

(\*) Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias.

(\*\*) Hospital del Rey.

demuestra que esos líquidos están o han sido infectados por meningococos.

Varios autores (2-3 y 5) han utilizado previamente la inmunoelectroforesis (IEF) como técnica diagnóstica en casos de meningitis meningocócica. En este trabajo nosotros hemos aplicado esta técnica en 45 LCR procedentes del Hospital del Rey, de Madrid, y a la vez que se comparan los resultados con los conseguidos por los métodos habituales de diagnóstico bacteriológico de los mismos, se estudian las variaciones condicionadas por la naturaleza del polisacárido específico.

## MATERIAL Y METODOS

### *Líquidos cefalorraquídeos*

Se estudiaron 45 LCR pertenecientes a casos sospechosos de meningitis meningocócica desde el punto de vista clínico, ingresados en el Hospital del Rey.

El estudio por inmunoelectroforesis de los mismos se llevó a cabo, en su mayoría, en el momento de su llegada al laboratorio; algunos LCR, sin embargo, no se estudiaron hasta 2 días más tarde, manteniéndolos durante ese mismo tiempo a 4 °C. Los LCR positivos fueron conservados a -20 °C, para repetir con ellos nuevamente la IEF al mes y a los 2 meses siguientes.

### *Sueros antimeningocócicos*

Utilizamos sueros obtenidos en nuestro laboratorio por inoculación de conejos con las cepas A-1a y C-11 (enviados por el Dr. Artenstein, del Departamento de Bacteriología, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D. C.), y también la B-HR1, aislada del LCR de un paciente con meningitis en el Hospital del Rey (Madrid). Como controles usamos sueros procedentes de los laboratorios Difco. Para la obtención de sueros se inocularon conejos por vía intravenosa con una suspensión de meningococos en solución salina ( $3.000 \times 10^6$  organismos) previamente inactivados en un baño a 60 °C durante 60 min. Cada conejo recibió 6 inoculaciones, separadas 2 ó 3 días, con dosis creciente de dicha suspensión: 0,2, 0,2, 0,3, 0,3, 0,4 y 0,5 ml. A los 5 días de la sexta inyección se determinó la actividad aglutinante del suero del animal, sangrándole si el título era bueno.

*Estudio bacteriológico*

Los LCR fueron estudiados por tinción directa de Gram y por cultivo en placas de Mueller Hinton (Difco), en una atmósfera húmeda de aire conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez crecidos los meningococos, se identificaron por tinción de Gram, prueba de la oxidasa y aglutinaciones en portaobjeto frente a sueros específicos.

*Inmunoelectroforesis*

La IEF se llevó a cabo en portaobjetos de 30 × 90 mm, cubiertos con una capa de 3,6 ml de agarosa al 1 % en una solución de tampón de acetato de dietilbarbiturato, pH 8,2. Se hicieron 2 filas de pocillos separadas por 7 mm una de otra. Los diámetros de los pocillos medían 3 mm.

Los sueros se colocaron en los pocillos más cercanos al ánodo, y los LCR, en los pocillos opuestos. Se utilizó un aparato Shandon SAE 3225, en el cual la electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 45 min, haciendo pasar una corriente constante de 15 mA por portaobjeto. Cada LCR fue enfrentado con sueros de los grupos A, B y C simultáneamente.

Con objeto de controlar los antisueros utilizados, éstos se enfrentaban a suspensiones de meningococos A-1a, C-11 y B-HR rotos por congelación en nieve carbónica y descongelación rápida en agua caliente, repitiendo el tratamiento 5 veces.

## RESULTADOS

De los 45 LCR estudiados por IEF frente a sueros antimeningocócicos A, B y C, 8 fueron positivos frente al serogrupo A, no encontrándose ninguno positivo frente a los otros serogrupos (*cuadro 1*).

En el estudio hecho por tinción de Gram y aislamiento de los mismos LCR, se encontraron 5 meningococos pertenecientes al serogrupo A, 18 al B y ninguno al C. Los 5 LCR con aislamiento positivo de meningococo A, fueron también positivos por IEF.

Las líneas observadas al terminar la IEF eran claras y específicas, comprobando que los LCR positivos a un serogrupo no daban líneas de precipitación con sueros pertenecientes a otros grupos. En los con-

*Cuadro 1. Resultados comparativos del estudio diagnóstico de 45 LCR con probable infección meningea, por tinción y/o aislamiento y por IEF*

Métodos de diagnóstico	LCR positivos			LCR negativos	Total
	Serotipo A	Serotipo B	Serotipo C		
Tinción y/o aislamiento	5	18		22	45
IEF	8			37	45

troles, las suspensiones de meningococos A y C dieron líneas de precipitación con sus sueros homólogos, siendo en cambio negativa la reacción del meningococo B con el suero anti-B.

Con objeto de saber si el diagnóstico podía realizarse con LCR extraídos hacía ya tiempo, se repitió la IEF al mes y 2 meses de la extracción con aquellos líquidos encontrados previamente positivos, sin que el resultado presentara ninguna variación.

#### DISCUSION

La IEF aparece como un método más seguro y rápido para el diagnóstico de la meningitis producida por meningococo A que los clásicos de tinción directa y cultivo. Sin embargo, un inconveniente importante es que el meningococo B, ya sea en los LCR de enfermos o en los controles, no produce líneas de precipitación, lo que sugiere que el diagnóstico de casos de meningitis producidos por este serogrupo no es factible con esta técnica, al menos utilizando sueros no purificados especialmente. Este inconveniente se acentúa al aplicar la IEF en nuestro país, donde la mayor parte de las meningitis meningocócicas están producidas por el serogrupo B, siendo mucho menos frecuente el A, y raro el C.

La negatividad en la detección del antígeno precipitante del meningococo B quizás pueda ser explicada si tenemos en cuenta que el polisacárido presente en la cápsula es mucho más inestable y degradable que el de los otros serogrupos (4).

En los casos de meningitis por meningococo A, la IEF se muestra

específica, y el diagnóstico con tipificación directa del meningococo puede ser establecido a los 45 min de la extracción del LCR. Debido a la persistencia del antígeno capsular en el LCR se puede hacer el diagnóstico por IEF mucho tiempo después de la toma de la muestra.

La IEF, en definitiva, es recomendable en los laboratorios bacteriológicos de los hospitales, siempre que se combine con las técnicas habituales de diagnóstico bacteriológico.

#### RESUMEN

Se aplica la IEF como técnica diagnóstica a 45 LCR de enfermos sospechosos de meningitis meningocócica, comparando los resultados con los obtenidos por medio de los métodos habituales de diagnóstico de esta enfermedad.

La IEF aparece como un buen método para el diagnóstico de la meningitis producida por meningococo A, y no así cuando el germen productor es el meningococo B, ya que los resultados en este caso fueron negativos. Sin embargo, y debido a la rapidez con que se hace el diagnóstico bacteriológico con determinación del serotipo por IEF, se recomienda realizar esta técnica en las laboratorios hospitalarios como complemento de las técnicas clásicas de aislamiento e identificación de meningococos.

#### SUMMARY

##### *Diagnostic of meningococcal meningitis by immunoelectrophoresis (IEP)*

The IEP was applied to 45 cerebrospinal fluids from patients suspected of meningococcal meningitis. The results were compared with those obtained by conventional methods.

IEP appears a good method for the diagnosis of meningitis produced by meningococcus A, but not when the causal agent is meningococcus B since in these cases the results were negatives. However, and because of the quick diagnostics with determination of serotypes, the IEP is recommended in hospital laboratories as a complement of the classical techniques of isolation and identification of meningococcus.

## BIBLIOGRAFIA

1. CASAL, J.; PÉREZ-BREÑA P., and MARTÍN-BOURGON, C. 1973. A comparative study of precipitating serological techniques for the detection of meningococcal polysaccharide. *Microbiol. Españ.*, 26, 85-97.
2. COONROD, J. D., and RYTEL, M. W. 1972. Determination of aetiology of bacterial meningitis by counterimmunoelectrophoresis. *Lancet*, II, 1154-57.
3. EDWARDS, E. A. 1971. Immunologic investigations of meningococcal disease. 1. Group-specific *Neisseria meningitidis* antigens present in the serum of patients with fulminant meningococemia. *J. Immunol.*, 106, 314-17.
4. GOTSCHLICH, E. C.; LIU, T. Y., and ARTENSTEIN, M. S. 1969. Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and C meningococcal polysaccharides. *J. Exp. Med.*, 129, 1349-65.
5. GREENWOOD, B. M.; WHITTLE, H. C., and DOHINIC-RAJKOVIC, O. 1971. Counter-current immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet*, II, 519-21.

## CONFERENCIA SOBRE COLECCIONES DE CULTIVOS

La III Conferencia Internacional sobre Colecciones de Cultivos se celebrará en la Universidad de Bombay, del 15 al 19 de marzo de 1976. Anteriormente, del 1 al 14 del mismo mes y en el Colegio de Farmacia de Bombay, se desarrollará un curso de adiestramiento acerca de "Técnicas Modernas para la Conservación y Empleo de los Recursos Genéticos Microbianos".

Para más información, los interesados pueden dirigirse al Prof. F. Fernandes, Chairman, Local Organizing Committee, Bombay University Club House, B. Road, Churchgate Reclamation, Bombay 400020 (India).

## SIMPOSIO DE FERMENTACION

El V Simposio Internacional de Fermentación se celebrará en Berlín, del 28 de junio al 3 de julio de 1976. Al mismo tiempo tendrá lugar el IV Simposio Especializado Internacional sobre Levaduras.

Información: The Secretariat of the Fifth International Fermentation Symposium, c/o Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, Sees-  
trasse 13, D-1000 Berlin.

## PREMIO «ALONSO DE HERRERA»

Ha sido concedido el Premio "Alonso de Herrera", del CSIC al Dr. Manuel Santaolalla Cerezo, Investigador Científico, del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, por su trabajo "El Lipopolisacárido de los Microorganismos Gram-negativos".

## CONFERENCIA SOBRE COLECCIONES DE CULTIVOS

La III Conferencia Internacional sobre Colecciones de Cultivos se celebrará en la Universidad de Bombay, del 15 al 19 de marzo de 1976. Anteriormente, del 1 al 14 del mismo mes y en el Colegio de Farmacia de Bombay, se desarrollará un curso de adiestramiento acerca de "Técnicas Modernas para la Conservación y Empleo de los Recursos Genéticos Microbianos".

Para más información, los interesados pueden dirigirse al Prof. F. Fernandes, Chairman, Local Organizing Committee, Bombay University Club House, B. Road, Churchgate Reclamation, Bombay 400020 (India).

## SIMPOSIO DE FERMENTACION

El V Simposio Internacional de Fermentación se celebrará en Berlín, del 28 de junio al 3 de julio de 1976. Al mismo tiempo tendrá lugar el IV Simposio Especializado Internacional sobre Levaduras.

Información: The Secretariat of the Fifth International Fermentation Symposium, c/o Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, Sees-  
trasse 13, D-1000 Berlin.

## PREMIO «ALONSO DE HERRERA»

Ha sido concedido el Premio "Alonso de Herrera", del CSIC al Dr. Manuel Santaolalla Cerezo, Investigador Científico, del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, por su trabajo "El Lipopolisacárido de los Microorganismos Gram-negativos".

## CONFERENCIA SOBRE COLECCIONES DE CULTIVOS

La III Conferencia Internacional sobre Colecciones de Cultivos se celebrará en la Universidad de Bombay, del 15 al 19 de marzo de 1976. Anteriormente, del 1 al 14 del mismo mes y en el Colegio de Farmacia de Bombay, se desarrollará un curso de adiestramiento acerca de "Técnicas Modernas para la Conservación y Empleo de los Recursos Genéticos Microbianos".

Para más información, los interesados pueden dirigirse al Prof. F. Fernandes, Chairman, Local Organizing Committee, Bombay University Club House, B. Road, Churchgate Reclamation, Bombay 400020 (India).

## SIMPOSIO DE FERMENTACION

El V Simposio Internacional de Fermentación se celebrará en Berlín, del 28 de junio al 3 de julio de 1976. Al mismo tiempo tendrá lugar el IV Simposio Especializado Internacional sobre Levaduras.

Información: The Secretariat of the Fifth International Fermentation Symposium, c/o Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, Sees-trasse 13, D-1000 Berlin.

## PREMIO «ALONSO DE HERRERA»

Ha sido concedido el Premio "Alonso de Herrera", del CSIC al Dr. Manuel Santaolalla Cerezo, Investigador Científico, del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, por su trabajo "El Lipopolisacárido de los Microorganismos Gram-negativos".

## BIBLIOGRAFIA

*ASPECTOS ACTUALES EN LA TRANSMISION DE INFORMACION GENETICA DE MICROORGANISMOS.* Directores de edición: *A. Portolés y F. Baquero.* Monografías Básicas de la Sociedad Española de Microbiología, núm. 1. Madrid, 1975. 306 páginas, 72 figuras y 14 encartes. No venal.

Pasando de lo general a lo particular, trataremos de la colección, del libro y de los trabajos que contiene.

Referente a la colección, copio lo que se lee en la solapa de la cubierta:

“Este volumen representa el primer libro de una ‘Colección de Monografías Científicas’ con que la Sociedad Española de Microbiología se propone recopilar investigaciones de interés fundamental para aquellos profesionales que se sienten atraídos por las distintas facetas del mundo microbiano.”

“En la colección se incluirán trabajos y resultados —a ser posible discutidos en reuniones científicas de la Sociedad— en los que se presenta actualizada la problemática de diferentes aspectos científicos y manteniendo estrechamente vinculados entre sí los aspectos conceptuales del tema y los datos que originaron su planteamiento.”

“La Sociedad Española de Microbiología espera con ello contribuir a que la práctica diaria de la Microbiología se pueda apoyar en consideraciones de indudable valor científico y cumplir con lo preceptuado en los Estatutos de la Sociedad en cuanto a difusión.”

Respecto al libro, entresaco del prefacio:

“Este volumen contiene todas las ponencias presentadas en la Mesa Redonda que sobre ‘Aspectos actuales de la transmisión de información

genética en microorganismos' tuvo lugar en Madrid, en el edificio central del CSIC, el día 4 de febrero de 1975."

"De acuerdo con las sesiones científicas celebradas, la presente Monografía tiene dos partes: la primera, con los trabajos que se refieren especialmente a las moléculas base de la información genética, su estructura y sus posibles modificaciones, y la segunda, con los trabajos sobre los sistemas biológicos capaces de transmitir esta información, su funcionamiento y sus posibilidades."

Sobre los trabajos, estimo que lo más interesante para el posible lector del libro es conocer sus títulos, sus autores y el Centro donde se han realizado, por lo que los enumero a continuación.

#### Parte I.

Determinación del mapa físico del DNA con enucleasas de restricción, por *M. Salas, M. R. Inciarte y E. Viñuela*. Instituto "Gregorio Marañón" (CSIC), Madrid.

Alteraciones hereditarias debidas al medio ambiente, por *E. Cerdá y M. C. Pueyo*. Facultad de Ciencias de la Universidad de Sevilla.

Control genético de la duración del ciclo de división celular en *Escherichia coli*, por *J. L. Cánovas, M. E. F. Tresguerres, M. A. de Pedro y J. E. Llamas*. Instituto de Biología Celular (CSIC), Madrid.

Iniciación de la síntesis y mecanismo de crecimiento de la cadena peptídica en levadura, por *A. Toraño, A. Candoval y C. F. Heredia*. Instituto de Enzimología (CSIC), Madrid, y Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Genética de los ribosomas en levadura. Estudios bioquímicos con mutantes resistentes a diversos antibióticos, por *A. Jiménez y D. Vázquez*. Instituto de Biología Celular (CSIC), Madrid.

Desarrollo de los cromosomas gigantes en ciliados hipotricos, por *P. Alonso*. Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología (CSIC), Madrid.

#### Parte II.

Recientes avances en el estudio de la competencia en *Bacillus subtilis*, por *M. Espinosa*. Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología (CSIC), Madrid.

Aportaciones recientes en el sistema de transformación genética de *Diplococcus pneumoniae*, por *R. López*. Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología (CSIC), Madrid.

Factores fágicos que afectan la frecuencia de transducción generalizada en *Salmonella typhimurium*, por R. Guerrero y F. Carretero. Facultad de Ciencias e Instituto de Biología Fundamental de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Estudios genéticos en *Rhizobium*: conjugación y fijación de nitrógeno, por J. Olivares y E. Montoya. Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.

Ecología de la transmisión de resistencias plasmídicas a los antibióticos en el intestino humano, por F. Baquero, M. Martínez Ferrer y A. Carvajal. Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social "La Paz", Madrid.

La aparición de este libro respalda una serie de hechos destacables: la política acertada de la Sociedad Española de Microbiología al convocar una serie de Mesas Redondas especializadas y publicar su material; la existencia de bastantes investigadores de un restringido campo básico, con técnicas de primera línea, cuyos nombres y trabajos habrían pasado desapercibidos a la mayoría de los microbiólogos profesionales españoles; la esperanza de que los investigadores aumenten la eficacia de su labor por el intercambio que debe nacer del conocimiento mutuo que estas reuniones facilitan.

Esperamos mucho de esta orientación y confiamos en que la "Colección" aumente con paso seguro, aunque no puede asegurarse un ritmo periódico. Felicitamos a los directores de edición, Dres. Portolés y Baquero, por la agilidad con que han llevado la pesada carga que esta tarea representa.

El libro no se vende y es distribuido por la Sociedad Española de Microbiología.

L. VILAS

*THE MITOCHONDRIA OF MICROORGANISMS*, por D. Lloyd. 1974. Academic Press, London, New York, San Francisco. XII + 553 páginas.

Este libro nos da una información muy completa de todo lo que se ha hecho y se conoce hasta ahora sobre mitocondrias de levaduras, hongos y algas microscópicas y protozoos, desde la ultraestructura de dichas mitocondrias obtenidas por microscopía electrónica, incluso en mo-

delos tridimensionales realizados por medio del ensamblaje de más de 300 perfiles correspondientes a otras tantas secciones ultrafinas, hasta el análisis por rayos X, etc. La obtención por los diversos métodos conocidos de las mitocondrias de los diferentes microorganismos por fraccionamiento celular, con datos sobre fraccionamiento de las mismas mitocondrias y obtención de sus membranas internas y externas y sus demás componentes, constituye el tema de un capítulo imprescindible.

La fisiología de las mitocondrias es tratada extensamente en varios capítulos; en uno de ellos, la respiración y componentes respiratorios, se describe la organización de los componentes de la cadena respiratoria y las reacciones de fosforilación oxidativa que tienen lugar en la membrana interna, con abundantes diagramas y ejemplos de los diferentes tipos de mitocondrias, especialmente de levaduras y hongos; las variaciones de componentes respiratorios en diferentes condiciones ambientales, se estudian en otro capítulo, de 91 páginas.

Una parte interesantísima del libro es el estudio de los ácidos nucleicos propios de las mitocondrias en tripanosomas, algas y hongos, con los análisis de su replicación a nivel molecular, las mutaciones extracromosómicas en levaduras, hongos y protozoos, y las influencias de los antibióticos sobre las reacciones de conservación de energía, formación de mutantes "Petite" en levaduras y localización de plasmagenes en algas verdes.

Se trata también de las mutaciones cromosómicas que afectan a las funciones mitocondriales, especialmente en levaduras y hongos.

La síntesis de proteínas propias de las mitocondrias, con la formación de los componentes estructurales de las mismas, parece que queda claro que se realiza principalmente fuera de las mismas mitocondrias. Lloyd presenta los últimos experimentos para intentar reconstruir las membranas miocondriales *in vitro*, partiendo de componentes purificados.

Finalmente, un capítulo se ocupa de la evolución de las mitocondrias, con las teorías (algunas se han estado discutiendo durante 80 años) de su formación a partir de bacterias o microorganismos procarióticos, o bien, la última sobre su formación a partir de plasmagenes unidos a complicados mesosomas, con datos muy completos de comparación entre organismos procarióticos y mitocondrias.

En resumen, es un libro de gran interés para todo aquel que se dedique al estudio de los microorganismos y a estudios celulares y para el bioquímico interesado en problemas de respiración. Cabe destacar,

además, que Lloyd señala, no solamente lo que se ha conseguido conocer acerca de las mitocondrias, sino también lo que está dudoso o de lo que no se sabe nada, indicando pasos muy claros para poder seguir investigando en un tema tan interesante.

M. RUBIO-HUERTOS

*ENFERMEDADES INMUNOLOGICAS* (2 tomos). Director: *Max Samter* (versión española: J. R. Laporte). 1974. Ediciones Toray, S. A., Barcelona. XXXVI + 1.570 páginas y numerosas ilustraciones.

Es fácil darse cuenta de que la Inmunología es una de las ciencias que más han avanzado en la última década, y que, de una disciplina auxiliar para el diagnóstico, se ha convertido en una ciencia de carácter básico que permite la explicación de gran número de fenómenos fundamentales en Biología y en Medicina.

No es extraño, por tanto, que se propicie la ocasión de reunir a más de un centenar de conocidos inmunólogos para agrupar y relacionar todos los conocimientos actuales de la Inmunología, cristalizándolos en una exhaustiva obra de más de 1.500 páginas, que obliga a una edición en dos tomos.

La obra, que está perfectamente concebida, trata de crear un cuerpo de doctrina inmunológica en el que se explica magistralmente tanto la vasta problemática de las interacciones huésped-parásito como los síndromes de autoagresión más recientemente descubiertos. Consta de casi una veintena de capítulos, en los que se exponen de manera didáctica hasta las últimas teorías y datos en relación con los mecanismos inmunitarios, la expresión inmunogénica y la naturaleza de los anticuerpos, así como su filogenia e inmunosupresión. Después, en más de sesenta capítulos, agrupados en nueve secciones, se estudian todos aquellos trastornos y enfermedades de carácter inmunológico que presentan problemas en Clínica Humana, acompañándolos de una muy documentada bibliografía.

En cuanto a la versión española, hemos de señalar el gran esfuerzo realizado por el Dr. Laporte Roselló en su afán de poner a disposición de los estudiosos de habla hispana, interesados en esta disciplina, una

obra tan documentada, en la que suponemos ha sido necesario vencer ciertas dificultades relativas a la interpretación idiomática de algunos términos científicos.

Ediciones Toray cumple una vez más con su tarea de presentarnos una edición bien realizada en cuanto a las características tipográficas y de encuadernación, constituyendo una interesante obra de consulta para todos aquellos profesionales de la Biología que se sientan atraídos por las reacciones inmunitarias de defensa orgánica.

A. PORTOLES

Depósito legal: M. 702 - 1958.

---

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15. Madrid