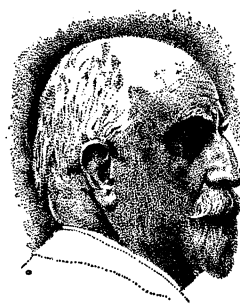

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Editada por el Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán" y la
Sociedad Española de Microbiología

VOLUMEN 35
ENERO-DICIEMBRE, 1982



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director

Dr. Gonzalo Sierra, Director del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Vicedirector

Dr. Rafael Gómez Lus, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Consejo de Redacción

Dra. Ramona Beltrá, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC

Dr. Carlos Hardisson, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Dr. Juan Francisco Martín, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de León.

Dr. César Nombela, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Ciudad Universitaria, Madrid-3.

Dra. Fuensanta Reyes, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Rubio, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Redacción

«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
Madrid-6

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
Madrid-6

NORMAS PARA LOS AUTORES

«Microbiología Española» publicará trabajos y notas de investigación originales dentro del campo de la Microbiología y ocasionalmente artículos de revisión. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquier otra revista. Los artículos publicados en «Microbiología Española» podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, estarán escritos a máquina, a doble espacio, en hojas UNE A-4 por una sola cara, numeradas correlativamente y con márgenes de 2,5 cm como mínimo; no deberán exceder de doce páginas en total, *incluyendo* el espacio necesario para figuras y tablas.

Las fotografías deberán limitarse a las estrictamente necesarias para la comprensión del trabajo, y serán de calidad suficiente para asegurar una buena reproducción. Deberán estar numeradas al dorso, indicando el apellido del primer autor, a lápiz. Los textos de las mismas irán mecanografiados a doble espacio y en hoja aparte.

Los dibujos y gráficas, con tinta china negra y en papel vegetal, o bien fotografías de los mismos. Para su presentación se seguirán las normas dadas para las fotografías. Fotografías, dibujos y gráficas irán numeradas de forma conjunta y correlativamente.

Las tablas se presentarán en hoja aparte, numeradas independientemente de las figuras, con números romanos y el correspondiente título explicativo.

En la cabecera de la primera página se indicará, por este orden: título del trabajo, nombre y apellidos del autor o autores, centro en que se ha realizado el trabajo y dirección completa del mismo.

Los trabajos constarán de: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Resumen, Agradecimientos (en su caso) y Bibliografía.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización, para los textos en español. Los resúmenes en español e inglés, de un máximo de doscientas palabras cada uno, deberán contener un esquema del trabajo y las conclusiones abreviadas, y serán redactados para que sea posible su comprensión sin necesidad de leer total o parcialmente el trabajo. No deberán incluir material o datos no citados en el texto.

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 página 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.

Las notas, que no deberán exceder de cuatro páginas, tienen por objeto la presentación de observaciones experimentales, descripción de técnicas o modificaciones metodológicas de interés. Su redacción se efectuará ateniéndose a las normas previamente descritas para los trabajos, pero suprimiendo las divisiones con encabezamiento, y con resúmenes no superiores a cincuenta palabras. Las ilustraciones y tablas se reducirán a las mínimas indispensables.

Los artículos de revisión versarán sobre temas de Microbiología de amplio interés, y su redacción se solicitará a especialistas. Incluirán, en lugar de resumen, un índice del contenido.

Los autores recibirán en un plazo no superior a tres meses desde la recepción del manuscrito, notificación del Consejo de Redacción sobre la aceptación, rechazo o necesidad de modificación del mismo. En este último caso, el manuscrito modificado deberá devolverse al Consejo de Redacción en un plazo no superior a un mes.

Los autores recibirán pruebas (galeradas) de los trabajos aceptados, que deberán devolver en plazo no superior a una semana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha del envío, se anulará. Las correcciones se limitarán a errores tipográficos, gramaticales o de datos incorrectos. Modificaciones más importantes, que impliquen recomposición del texto, deberán ser abonadas por el autor.

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

Los trabajos se enviarán a «Microbiología Española», Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo de Redacción de la Revista.

I N D I C E

	Página
<i>In Memoriam</i> Dr. Domingo Rodríguez Sánchez (1929-1982), A. Portolés (*)	1
Influencia de la densidad del inóculo y de la concentración de casitone sobre la autó- lisis de <i>Myxococcus coralloides</i> D, J. M. Arias y E. Montoya (*)	5
Influencia de la luz sobre los ciclos de vida de <i>Myxococcus coralloides</i> , J. M. Arias y E. Montoya (*)	13
Clasificación en biotipos de estafilococos de origen animal, I. Menes, L. Gutiérrez, J. J. Francisco, M. L. García y B. Moreno (*)	21
Estudio de la interacción establecida entre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> cuando se cultivan juntos en un medio semisintético, M. T. Blanco, M. A. Falcón y A. Chordí (*)	33
Estudio de la flora bacteriana y levaduras de dos lignitos españoles, P. Chavarria y C. Ruiz-Alares (*)	43
Clonación molecular en <i>Streptomyces</i> , J. E. Suárez (*)	53

(*) En español.

C O N T E N T S

	Page
<i>In Memoriam</i> Dr. Domingo Rodríguez Sánchez (1929-1982), A. Portolés (*)	1
Inoculum density and casitone concentration influence on the autolysis of <i>Myxo-</i> <i>coccus coralloides</i> D, J. M. Arias and E. Montoya (*)	5
Light influence on the life cycles of <i>Myxococcus coralloides</i> , J. M. Arias and E. Montoya (*)	13
Biotyping of coagulase positive staphylococci from animal origin, I. Menes, L. Gu- tiérrez, J. J. Francisco, M. L. García and B. Moreno (*)	21
A study of the interaction between <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeru-</i> <i>ginosa</i> during mixed culture in a semi-synthetic medium, M. T. Blanco, M. A. Falcón and A. Chordí (*)	33
A study about two Spanish coals microflora (bacteria and yeasts), P. Chavarria and C. Ruiz-Alares (*)	43
Molecular cloning in <i>Streptomyces</i> , J. E. Suárez (*)	53

(*) In Spanish.

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

VOLUMEN 35 (1982)

INDICE

	Página
<i>Arias, J. M., y Montoya, E.</i> : Influencia de la densidad del inóculo y de la concentración de casitone sobre la autólisis de <i>Myxococcus coralloides</i> D *	5
<i>Arias, J. M., y Montoya, E.</i> : Influencia de la luz sobre los ciclos de vida de <i>Myxococcus coralloides</i> *	13
<i>Blanco, M. T.; Falcón, M. A., y Chordí, A.</i> : Estudio de la interacción establecida entre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cuando se cultivan juntos en un medio semisintético *	33
<i>Chavarría, P., y Ruiz-Alares, C.</i> : Estudio de la flora bacteriana y levaduras de dos lignitos españoles *	43
<i>Chordí, A.</i> : véase <i>Blanco, M. T.</i>	33
<i>Falcón, M. A.</i> : véase <i>Blanco, M. T.</i>	33
<i>Francisco, J. J.</i> : véase <i>Menes, I.</i>	21
<i>García, M. L.</i> : véase <i>Menes, I.</i>	21
<i>Gutiérrez, L.</i> : véase <i>Menes, I.</i>	21
<i>Menes, I.; Gutiérrez, L.; Francisco, J. J.; García, M. L., y Moreno, B.</i> : Clasificación en biotipos de estafilococos de origen animal *	21
<i>Montoya, E.</i> : véase <i>Arias, J. M.</i>	5
<i>Montoya, E.</i> : véase <i>Arias, J. M.</i>	13
<i>Moreno, B.</i> : véase <i>Menes, I.</i>	21
<i>Portolés, A.</i> : In Memoriam Dr. Domingo Rodríguez Sánchez (1929-1982) *	1
<i>Ruiz-Alares, C.</i> : véase <i>Chavarría, P.</i>	43
<i>Suárez, J. E.</i> : Clonación molecular en <i>Streptomyces</i> *	53

* En español.

CONTENTS

	Page
<i>Arias, J. M., and Montoya, E.</i> : Inoculum density and casitone concentration influence on the autolysis of <i>Myxococcus coralloides</i> D *	5
<i>Arias, J. M., and Montoya, E.</i> : Light influence on the life cycles of <i>Myxococcus coralloides</i> *	13

	Página
<i>Blanco, M. T.; Falcón, M. A., and Chordi, A.: A study of the interaction between Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa during mixed culture in a semi-synthetic medium *</i>	33
<i>Chavarría, P., and Ruiz-Alares, C.: A study about two Spanish coals microflora (bacteria and yeasts) *</i>	43
<i>Chordi, A.: see Blanco, M. T.</i>	33
<i>Falcón, M. A.: see Blanco, M. T.</i>	33
<i>Francisco, J. J.: see Menes, I.</i>	21
<i>García, M. L.: see Menes, I.</i>	21
<i>Gutiérrez, L.: see Menes, I.</i>	21
<i>Menes, I.; Gutiérrez, L.; Francisco, J. J.; García, M. L., and Moreno, B.: Bio-typing of coagulase positive staphylococci from animal origin *</i>	21
<i>Montoya, E.: see Arias, J. M.</i>	5
<i>Montoya, E.: see Arias, J. M.</i>	13
<i>Moreno, B.: see Menes, I.</i>	21
<i>Portolés, A.: In Memoriam Dr. Domingo Rodríguez Sánchez (1929-1982) *</i>	1
<i>Ruiz-Alares, C.: see Chavarría, P.</i>	43
<i>Suárez, J. E.: Molecular cloning in Streptomyces *</i>	53

* In Spanish.

Redacción

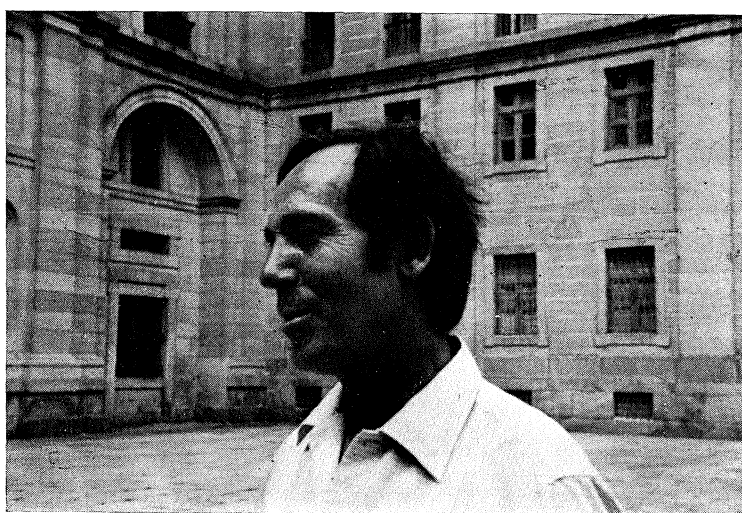
«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
Madrid-6

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
Madrid-6

IN MEMORIAM

DR. DOMINGO RODRIGUEZ SANCHEZ (1929-1982)



Domingo Rodríguez Sánchez nació en San Mateo, pueblecito situado en una ubérrima vega de Gran Canaria. De sus estudios de Bachillerato en Las Palmas pasó a los universitarios en la Complutense madrileña, terminados los cuales e impulsado por su fuerte vocación investigadora, se incorporaba en calidad de Becario al Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología. Su sólida formación en Bioquímica Microbiana se completó en diversos centros extranjeros: estancias de varios años en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Sheffield y en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Bangor (ambos en Gran Bretaña) —donde estuvo pensionado por el CSIC, la Fundación Ramsay y la Fundación March— le permitieron alcanzar una sólida preparación científica básica que le capacitó para dirigir un grupo de investigación. Se doctoró *cum laude* en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, en 1962 y, desde en-

tonces, comenzó su seguro caminar por los senderos de la Bioquímica Bacteriana, consiguiendo una personalidad científica destacada en la resolución de problemas relacionados con el metabolismo microbiano de compuestos orgánicos de naturaleza aromática.

En 1976, pasó a formar parte del entonces recién creado Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, donde —como reconocimiento a su capacidad organizadora— fue designado Secretario de dicho Instituto. Los diversos cargos directivos y comisiones científicas en los que actuó avalaron su bien hacer y profesionalidad. Nombrado Tesorero de la Sociedad Española de Microbiología, en 1971, y reelegido dos años más tarde, tuvo ocasión de colaborar eficazmente en la creación de la Federación Española de Sociedades de Biología Experimental y en la organización de su Primera Reunión Nacional. Participó activamente con ponencias y comunicaciones en medio centenar de reuniones científicas nacionales e internacionales, siendo varias las personas en cuya formación intervino destacadamente, dirigiendo sus Tesis Doctorales y Tesinas.

Sus resultados aparecen publicados en una treintena larga de revistas nacionales y extranjeras. Como anécdota señalaré que, en 1961, sus datos contribuyeron a definir científicamente las milagrosas propiedades del tan famoso «hongo del té» de aquella época. La biosíntesis de ácidos grasos en *Peptostreptococcus elsdenii* (especie anaerobia muy vinculada a las investigaciones de uno de sus profesores ingleses) y diversas actividades enzimáticas de especies microbianas tan distintas como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Candida* y *Debaryomyces* recibieron su personal atención científica durante bastantes años. Cabe destacar su labor en el descubrimiento, purificación y ensayo de un péptido con marcada actividad antimicótica: la *debariocidina*.

Con su equipo de investigación desarrolló una gran labor en el campo de la Ecología Microbiana, particularmente en lo relativo al estudio de biocenosis naturales, llegando a definir —mediante cultivos continuos de poblaciones mixtas— algunas interacciones «depredador-presa» entre bacterias y protozoos. Estudios de este tipo han permitido corregir contaminaciones fluviales y agrícolas ocasionadas por diversos efluentes industriales del sector petroquímico. En los dos últimos años, su preocupación científica se centra muy particularmente en problemas de inmunogénesis bacteriana y sus posibles aplicaciones al campo de la Inmunoterapia.

De su perfil humano destacaba su gesto amable, era cordial y buen compañero de todos. Los que le trataron de cerca saben de su voluntad de trabajo y la ilusión que ponía en que las cosas del Instituto respondieran a lo previsto. Pocas horas antes de su muerte, cuando la noción del calendario

empezaba a desdibujarse en su cerebro, me comunicaba su preocupación por unas facturas *ten cuidado que no se pasen de fecha* Una vez más, de su espíritu afloraba la parábola de los talentos, tan recordada por él como un modelo de entrega al máximo en las situaciones límites.

Domingo Rodríguez vivió la alegría de una labor bien hecha en el Congreso Chileno de Microbiología. El éxito de sus resultados sobre la problemática de contaminaciones microbiológicas del medio hídrico y sus esfuerzos por iniciar una labor conjunta hispano-chilena, en el estudio inmuoquímico de exopolímeros bacterianos de interés ecológico, le animaban y estimulaban a su vuelta de aquella gratificante, pero agotadora, misión de servicio. Estaba seguro de poder realizar aquello que tanto le ilusionaba; su ligera indisposición gástrica de última hora no le afectaba *al igual que mi padre, soy como los relojes antiguos....* decía en el avión de regreso, mientras nos vapuleaba una fuerte tormenta..., *siempre marchó bien y en punto, sin problemas, pero si un día se me estropease la cuerda no tendría arreglo....* ¡Triste profecía la suya!, pocos días más tarde salía de esta vida como había vivido, serenamente, tranquilo, sin querer molestar, ni pedir ayuda, intentando luchar en solitario contra aquella fuerza superior que había estropeado «su cuerda». En la memoria anual de 1982, correspondiente al Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, aparecerá oficialmente una inesperada baja por fallecimiento del Secretario del Instituto, pero los compañeros seguirán recordando su sonriente energía al reclamar puntualmente unos «torturantes papeles» o bromeando con algún justificante de pagaduría.

Domingo Rodríguez Sánchez, Investigador Científico, buen compañero, amigo, se fué hacia la otra vida, sin despedirse, pero llevaba en sus manos toda una labor bien hecha.

A. PORTOLES

INFLUENCIA DE LA DENSIDAD DEL INOCULO Y DE LA CONCENTRACION DE CASITONE SOBRE LA AUTO- LISIS DE *MYXOCOCCUS CORALLOIDES* D

J. M. ARIAS y E. MONTROYA

RESUMEN

Cuando *Myxococcus coralloides* D crece vegetativamente de manera dispersa, tiene lugar una rápida y pronunciada autólisis al final de la fase exponencial de crecimiento. Al aumentar, tanto la concentración de casitone en el medio, como la densidad del inóculo, factores ambos que permiten alcanzar más rápidamente altas densidades celulares, los cultivos entran más tempranamente en fase de autólisis. Se considera que la autólisis es consecuencia de un fenómeno de cooperatividad celular, que sólo se ejerce cuando en los cultivos se supera una concentración crítica de células.

SUMMARY

Inoculum density and casitone concentration influence on the autolysis of Myxococcus coralloides D

The strain *Myxococcus coralloides* D is able to grow vegetatively in a dispersed manner, exhibiting a strong autolytic process at the end of the exponential phase. Higher amounts of casitone in the culture medium, as well as denser inoculum are factors that allow the cultures to reach high cell numbers more quickly and so the time needed to rise the autolytic step is also shortened. It is considered that the autolytic process is a phenomenon of cellular cooperation, which is only exercised when a critical cell number is reached.

INTRODUCCION

Las mixobacterias son bacilos gram-negativos, que se caracterizan por las siguientes propiedades: I) producen gran cantidad de un polisacárido viscoso, en el cual quedan embebidas las células (21); II) muestran un mo-

vimiento deslizante lento sobre las superficies sólidas o en la interfase aire-agua, cuyo mecanismo íntimo no se conoce por el momento (10-11); III) son capaces de hidrolizar macromoléculas variadas y complejas, utilizando los productos para su crecimiento, gracias a la producción de enzimas líticas apropiadas (6-8, 12, 14, 17, 19, 22-23), y IV) exhiben ciclos de vida complejos, únicos entre los procariotas, consistentes en la intercomunicación celular, agregación, fructificación y germinación (4, 18, 24).

De acuerdo con Dworkin (4), estas propiedades están estrechamente relacionadas, y así, el ciclo de vida está dirigido a potenciar la existencia de las agrupaciones celulares con objeto de preservar a la comunidad. La utilización de macromoléculas sólidas, más o menos complejas, que la bacteria ha de buscar, condiciona, de una parte, su alimentación como comunidad, es decir, un mínimo de densidad de población para asegurar una degradación rápida de partículas sólidas (24). Pero esta determinada densidad celular no sólo es necesaria para la formación de cuerpos fructificantes, sino también para cuando crecen vegetativamente (20).

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que cuando *Myxococcus coralloides* D crece de forma dispersa, muestra una intensa actividad autolítica, de manera que, tras la fase de crecimiento exponencial, los cultivos entran en una rápida autólisis, que lleva al aclaramiento de los mismos. La lisis no es debida a un fenómeno osmótico y se descarta la posibilidad de que sea debido a un agotamiento de nutrientes (1).

En este trabajo se estudia la influencia del inóculo y del casitone, como única fuente de C y N, sobre la autólisis, llegándose a la conclusión de que ésta es una consecuencia de un fenómeno de cooperatividad celular, que sólo se ejerce cuando en los cultivos se alcanzan altas densidades celulares.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias y condiciones de cultivo

En todas las experiencias se ha usado *Myxococcus coralloides* D, capaz de crecer de forma dispersa en medio líquido. Esta estirpe fue obtenida en nuestro laboratorio mediante transferencias sucesivas en medio líquido adecuado (1).

El crecimiento vegetativo fue mantenido por transferencias diarias en medio CT de la siguiente composición: casitone (Difco) al 0,5 %, en tampón de fosfato 0,01 M, pH 6,5, con sulfato magnésico 0,1 %. El casitone es un hidrolizado enzimático de la caseína.

Todas las experiencias fueron llevadas a cabo a 28 °C y en agitación (200 rpm).

Determinación del crecimiento

Tanto para el recuento del número de células como para las medidas turbidimétricas, *Myxococcus coralloides* D fue cultivado en matraces de Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 20 ml de medio CT. Estos matraces están provistos de un tubo lateral que puede ser introducido directamente en el espectrofotómetro.

La masa celular fue determinada turbidimétricamente siguiendo los cambios en la absorbancia a 650 nm en un spectronic 20, y el número de células mediante recuento con cámara de Petroff-Hausser.

RESULTADOS

Influencia del casitone como fuente de C y N

Se han empleado concentraciones de casitone comprendidas entre 0,5 y 2 %. Los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 1, indican que

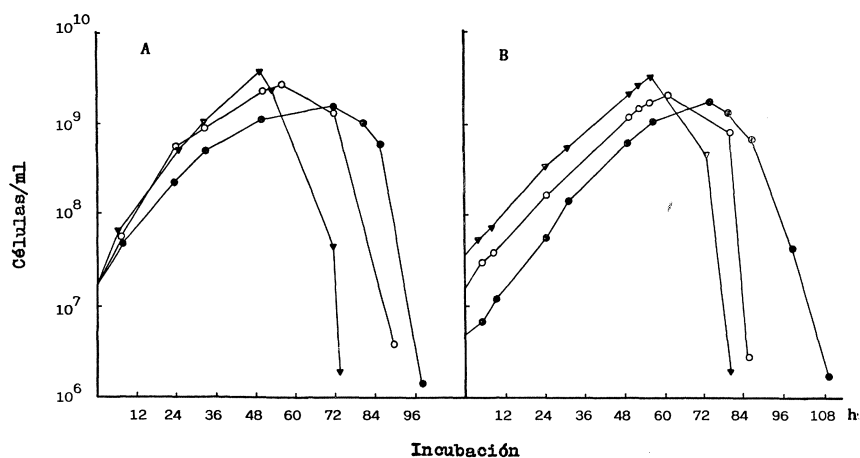


Figura 1. Crecimiento de *M. coralloides* D, referido al número de células/ml. A) en función de la concentración de casitone. ●—●, 0,5 %; ○—○, 1 %; ▲—▲, 2 %. B) en función de la concentración celular inicial. ●—●, 5×10^6 cel./ml; ○—○, $1,5 \times 10^7$ cel./ml; ▲—▲, 3×10^7 cel./ml

al aumentar la concentración del hidrolizado enzimático de la caseína, los valores máximos en el número de células son superiores y se alcanzan más rápidamente y, por tanto, la autólisis de los cultivos es más temprana. Cuando la concentración de casitone es del 0,5 %, la máxima densidad celular (1×10^9 cel./ml) se alcanza sobre las 70 h, mientras que con casitone al 1 %, es sobre las 54 h cuando se alcanza el máximo número de células ($2,7 \times 10^9$ cel./ml). Con casitone al 2 %, el máximo ($3,8 \times 10^9$ cel./ml) se obtiene transcurridas 48 h. Por tanto, al duplicarse y cuatriplicarse la concentración de casitone, se duplica y cuatriplica el número de células. Estos mismos resultados fueron obtenidos por medidas de la densidad óptica.

Influencia del inóculo

Se emplearon distintas concentraciones celulares (5×10^6 , $1,5 \times 10^7$ y 3×10^7 cel./ml), de cultivos en fase exponencial de crecimiento, manteniéndose constante, en estas experiencias, la concentración de casitone (1 %). Los resultados obtenidos se muestran en la *figura 1* y revelan que el proceso autolítico se dispara rápidamente cuando se alcanza un determinado número de células. Así, cuando el cultivo se inicia con 5×10^6 cel./ml, han de transcurrir 72 h para alcanzar una concentración celular máxima (1×10^9 cel./ml); a partir de este momento se dispara la autólisis, que finaliza a las 108 h. Cuando la concentración inicial de células es de $1,5 \times 10^7$ cel./ml, el máximo ($2,5 \times 10^9$ cel./ml) se alcanza a las 60 h; la autólisis, en este caso finaliza a las 84 h. Por último, para inóculos de 3×10^7 cel./ml, la máxima concentración celular ($5,5 \times 10^9$ cel./ml) se alcanza a las 54 h y la autólisis finaliza a las 76 h. De estas experiencias se deduce la existencia de una relación entre la concentración del inóculo y el número de células obtenido. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por lectura de la densidad óptica.

Autólisis y agotamiento de la fuente de C y N

La no dependencia de la autólisis con el agotamiento de nutrientes del medio fue determinada de una forma indirecta. Células procedentes de un cultivo en fase de pre-lisis fueron resuspendidas en igual volumen de solución salina. En estas condiciones de ausencia total de nutrientes no se detectó autólisis, manteniéndose estable la suspensión durante 30 h. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos anteriormente (1) e indican que la

autólisis que tiene lugar en los cultivos de *Myxococcus coralloides* D no es debida a un agotamiento de la fuente de C y N.

Viabilidad de los cultivos autolisados

Para la determinación de la viabilidad de los cultivos autolisados, muestras de los mismos fueron centrifugadas; el sedimento fue resuspendido en 1/10 del volumen inicial de solución salina y con la suspensión se inoculó masivamente medio frasco de CT 1 % líquido y sólido. En ningún caso se obtuvo crecimiento (turbidez o aparición de colonias). Estos resultados indican que las células de los cultivos autolisados no son viables.

DISCUSION

La autólisis observada en los cultivos dispersos de mixobacterias en medio líquido ha sido estudiada únicamente desde un punto de vista descriptivo (3, 13, 15), permaneciendo muy oscuros los pasos implicados en dicho proceso. Nuestros resultados ponen de manifiesto que el momento de aparición y posterior desarrollo del proceso autolítico en *Myxococcus coralloides* D, está influido por la concentración de casitone y la cantidad de inóculo empleado.

En cuanto al inóculo, es conocido desde antiguo la influencia que éste tiene en la evolución de los cultivos, ya que, inóculos en estadios anteriores o posteriores a la fase exponencial de crecimiento, pueden dar lugar a cultivos con fases de latencia de longitud indefinida (16). Además existen muchos ejemplos en los que la cantidad de inóculo está en relación inversa con la extensión de la fase de latencia. En *Pasteurella tularensis* (9) y en varias líneas de cultivos de células de mamíferos (5), es necesario una densidad crítica de células para observar crecimiento. Rosenberg (20) encuentra que el crecimiento de *Myxococcus xanthus* sobre caseína es dependiente de la densidad celular.

En relación con *Myxococcus coralloides* D, en todas las experiencias se emplearon inóculos provenientes de cultivos en fase exponencial de crecimiento; es por ello por lo que en ninguna de las gráficas se observa fase de latencia. Cuanto mayor es el inóculo empleado, los máximos en el número de células /ml son más altos y se alcanzan antes. Una vez alcanzados estos máximos sigue un descenso rápido en la densidad celular.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos para concentraciones crecientes de casitone en el medio y corroboran la hipótesis de un fenómeno de cooperatividad celular en el proceso de autólisis, ya que ambos factores, al permitir que se alcance más pronto un nivel mínimo de densidad celular, hacen que la autólisis se dispare más rápidamente. Por el contrario, aquellos otros que retrasan el crecimiento, como es el caso de la glucosa (2), dan lugar a un retraso en el inicio de la autólisis.

En relación con el papel biológico de la autólisis descrita, es evidente que, contemplado desde el punto de vista del ciclo vegetativo de esta mixobacteria tiene un significado totalmente negativo, ya que ocasiona la muerte y destrucción de todas las células. Muy diferente, sin embargo, sería contemplado desde el punto de vista del ciclo normal de vida que llevan a cabo estas bacterias en la naturaleza, ya que, en este caso, el proceso de autólisis está íntimamente relacionado con los de diferenciación celular, que dan como resultado la formación de cuerpos fructificantes, y que de acuerdo con Wireman y Dworkin (24), representan un fenómeno de cooperatividad celular, en donde una fracción de la población provee mediante lisis: I) algún requerimiento esencial para la supervivencia del resto de la comunidad; II) energía para la formación de mixosporas, y III) una señal química para la inducción de mixosporas.

BIBLIOGRAFIA

1. ARIAS, J. M., and MONTOYA, E. 1978. Dispersed growth and cell lysis in *Mixococcus coralloides*. Microbios Lett., 5, 81-84.
2. BENHAMU, C.; ARIAS, J. M., y MONTOYA, E. 1979. Efecto de la glucosa sobre el crecimiento de *Myxococcus coralloides*. Ars Pharm., 3, 237-46.
3. DWORKIN, M. 1962. Nutritional requeriments for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 84, 250-57.
4. DWORKIN, M. 1972. The myxobacteria: new directions in studies of procariotic development. Crit. Rev. Microbiol., 2, 435-52.
5. EAGLE, H. 1965. Metabolic controls in cultured mammalian cells. Science, 148, 42-47.
6. ENSIGN, J. C., and WOLFE, R. S. 1965. Lysis of bacterial cell walls by an enzyme isolated from a myxobacter. J. Bacteriol., 90, 395-402.
7. ENSIGN, J. C., and WOLFE, R. S. 1966. Characterization of a small proteolytic enzyme which lyses bacterial cell walls. J. Bacteriol., 91, 425-534.
8. GILLESPIE, D. C., and COO, F. D. 1965. Extracellular enzymes from strains of *Sorangium*. Can. J. Microbiol., 11, 109-18.
9. HALMANN, M.; BENEDICT, M., and MAGER, J. 1967. Nutritional requirements of *Pasteurella turalensis* for growth from samll inocula. J. Gen. Microbiol., 49, 451-60.
10. HODGKIN, J., and KAISER, D. 1979 a. Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): genes controlling movement of single cells. Mol. Gen. Genet., 171, 167-76.

11. HODGKIN, J., and KAISER, D. 1979 b. Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.*, 171, 177-91.
12. HART, B. A., and ZAHLER, S. A. 1966. Lytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, 92, 1632-37.
13. HASKÅ, G., and STÅHL, S. 1971. Variants of *Myxococcus virescens* exhibiting dispersed growth. Growth and production of extracellular enzymes and slime. *Physiol. Plant.*, 24, 136-42.
14. HÜTTERMAN, A. 1969. Studies on a bacteriolytic enzyme of *Archangium violaceum* (Myxobacterales). II. Partial purification and properties of the enzyme. *Arch. Mikrobiol.*, 67, 306-17.
15. MASON, D. J., and POWELSON, D. 1958. Lysis in *Myxococcus xanthus*. *J. Gen. Microbiol.*, 19, 65-70.
16. MEYRATH, J., and SUCHANECK, G. 1972. Inoculation techniques: effects due to quality and quantity of inoculum. *Methods Microbiol.*, 7B, 159-205.
17. PÉREZ-LÓPEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, C., and MONTOYA, E. 1978. Repression of proteolytic enzymatic system in *Myxococcus xanthus*. *Microbios Lett.*, 6, 27-31.
18. REINCHENBACH, H., and DWORKIN, M. 1969. Studies on *Stigmatella aurantiaca*. *J. Gen. Microbiol.*, 58, 3-14.
19. RODRÍGUEZ, C.; ARIAS, J. M., and MONTOYA, E. 1979. Demonstration of cell surface enzymes with esterase activity in *Myxococcus xanthus*. *Microbios Lett.*, 8, 129-32.
20. ROSENBERG, E.; KELLER, K. H., and DWORKIN, M. 1977. Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J. Bacteriol.*, 129, 770-77.
21. STÅHL, S. 1973. Slime of *Myxococcus virescens*. *Physiol. Plant.*, 28, 523-29.
22. SUDO, D., and DWORKIN, M. 1972. Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, 110, 236-45.
23. WHITAKER, D. R. 1965. Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Isolation and enzymatic properties of the α - and β -lytic proteases. *Can. J. Biochem.*, 43, 1935-54.
24. WIREMAN, J. W., and DWORKIN, M. 1975. Morphogenesis and developmental interactions in Myxobacteria. *Science*, 189, 516-23.

INFLUENCIA DE LA LUZ SOBRE LOS CICLOS DE VIDA DE *MYXOCOCCUS CORALLOIDES*

J. M. ARIAS y E. MONTOYA

RESUMEN

La luz tiene una marcada influencia sobre los ciclos de vida vegetativo y de desarrollo en *Myxococcus coralloides*. Cuando esta mixobacteria crece vegetativamente en presencia de luz tiende a formar dos tipos de colonias morfológicamente diferentes, hecho que no se observa en los cultivos crecidos en la oscuridad. Durante el ciclo de desarrollo la luz afecta al proceso de diferenciación, de manera que en los cultivos iluminados se detectan muy pocos cuerpos fructificantes, que por el contrario, sí se observan en los cultivos mantenidos en la oscuridad. En ambos ciclos de vida la luz induce la síntesis de pigmentos.

SUMMARY

Light influence on the life cycles of Myxococcus coralloides

Illumination has a marked influence on both vegetative and differentiation cycle of *Myxococcus coralloides*. When this myxobacterium grows vegetatively in the light develops two morphologically distinguishable colonies; on the contrary, only cellular aggregates are formed when the incubation is carried out in darkness. During the developmental cycle, light affects the differentiation process, since very scarce fruiting bodies arise under illumination with respect to cultures grown in the dark. In the two life cycles, light induces pigment production.

INTRODUCCION

La característica más llamativa y diferenciable de las mixobacterias es que exhiben ciclos de vida y modelos de comportamiento únicos entre los procariotas. Así, las mixobacterias presentan dos ciclos de vida fuertemente

entrelazados. De una parte, las células de mixobacterias pueden crecer vegetativamente por sucesivas divisiones binarias, dando lugar al ciclo vegetativo. Pero, además, las mixobacterias, por su propio estímulo, pueden entrar en el ciclo de desarrollo, teniendo lugar una serie de estadios secuenciales que van desde un estado de agregación celular hasta la formación de unas estructuras macroscópicas, de muy diversos colores —dependiendo del tipo de mixobacteria—, conocidas como cuerpos fructificantes, en cuyo interior muchas células se convierten en mixósporas.

La influencia de la luz sobre los procesos de morfogénesis y diferenciación ha sido poco estudiada en mixobacterias: *Sorangium compositum* (7) y *Stigmatella aurantiaca* (10); en ambos casos el efecto de la luz se traduce en una estimulación de la fructificación.

En nuestro laboratorio se aisló una mixobacteria pigmentada, rojo-tostado, a partir de la cual se ha obtenido una raza, referida como *Myxococcus coralloides* D, capaz de crecer de forma dispersa en medio líquido (1). En el presente trabajo se estudia la influencia de la luz sobre los ciclos vegetativo y de desarrollo en *M. coralloides*.

MATERIAL Y METODOS

Bacteria

Myxococcus coralloides D fue obtenida en nuestro laboratorio por sucesivas transferencias en medios líquidos adecuados, capaz de crecer de forma dispersa en medio líquido y que retiene su capacidad de fructificación cuando ocurre un agotamiento de nutrientes en el medio de cultivo (1).

Medios y condiciones de cultivo

Para el mantenimiento y conservación de esta mixobacteria se ha empleado medio CT, con la siguiente composición: casitone (Difco) 0,5 %, en tampón de fosfato 0,01 M, pH 6,5 + sulfato magnésico 0,1 %. Para el análisis de los pigmentos durante el crecimiento vegetativo se ha utilizado medio CTA, de composición idéntica al anterior, pero adicionado de agar 1,8 %. Para los ensayos de fructificación se ha empleado agar-levadura: levadura prensada de panadería 1 %, agar 2 %, pH 7,2.

Temperatura de incubación: 28 °C. Los cultivos líquidos fueron llevados a cabo en agitación continua a 150 rpm.

Formación de cuerpos fructificantes

Cultivos en fase exponencial de crecimiento, a una densidad aproximada de 1×10^8 cel./ml, fueron centrifugados y las células, lavadas en solución salina, resuspendidas en dicha solución a una concentración final de 5×10^9 cel./ml, y mantenidas en baño de hielo. Muestra de 10 μ l fueron depositadas sobre el medio de fructificación y las cajas de Petri se incubaron a 28 °C, en la oscuridad (protegidas con papel de aluminio) o en la luz, siendo ésta suministrada por una batería de tubos fluorescentes con una intensidad de 1 J.s⁻¹ a una distancia de 150 cm.

Actividades bioquímicas

Las pruebas de la oxidasa, amilasa e hidrólisis de la esculina se han realizado de acuerdo con las técnicas usuales, por adición de reactivos específicos o cambio directo de coloración, respectivamente. La producción de antibiótico se ha comprobado adicionando una capa de agar blando previamente inoculado con *Staphylococcus aureus* ATCC 8, a cajas de Petri conteniendo colonias de 4 d de *Myxococcus coralloides* D; el halo de inhibición se midió a las 24 h.

Extracción de los pigmentos

Las células fueron recogidas por raspado de los medios de cultivo y sometidas a tres tratamientos con acetona, con lo que quedaron prácticamente decoloradas. El extracto acetónico fue concentrado en el rotavapor a 40 °C y desecado al vacío. El residuo seco fue finalmente extraído con metanol. Para el análisis y cuantificación de las fracciones mayoritarias se ha empleado la cromatografía en capa fina, en gel de sílice. Como eluyente se ha empleado cloruro de metileno: acetato de etilo (2:1).

RESULTADOS Y DISCUSION

Nuestros resultados indican que la luz tiene una influencia decisiva sobre los ciclos de vida vegetativo y de desarrollo de *Myxococcus coralloides*.

En relación con el primer ciclo, cuando *Myxococcus coralloides* crece vegetativamente en presencia de la luz tiende a formar dos tipos de colonias

morfológicamente diferentes: unas, puntuales, pequeñas y de borde liso, y otras, de mayor tamaño, muy mucosas y de bordes rugosos (*figuras 1-2*). Ambas colonias responden de idéntica manera a diferentes pruebas bioquímicas realizadas: oxidasa, negativo; hidrólisis de la esculina, negativo; hidrólisis del almidón, positivo. Asimismo, la autólisis (1) de los cultivos y la producción de una sustancia química en particular (antibiótico) no reveló diferencia alguna en los dos estados coloniales. Ambas colonias son coloreadas (rojas). Por sucesivos subcultivos, a partir de una sola colonia grande, éstas van desapareciendo, hasta quedar una población residual del 5-10 %, correspondiendo el resto a colonias puntuales. La variación colonial no es exclusiva de *M. coralloides*; así, también ha sido descrita en *M. xanthus* (3-4, 14), en donde aparecen dos tipos de colonias YS (yellow swarmer) y TNS (tan nonswarmer); la conversión de YS en TNS, puede ser inducida por diversos tratamientos (13).

Por el contrario, en la oscuridad, el crecimiento de *Myxococcus coralloides* consiste en la formación de agregados celulares, pero sin llegar a formar colonias típicas.

Por lo que respecta a la pigmentación, por cromatografía en capa fina, se han obtenido cinco fracciones mayoritarias, caracterizadas por el color y el Rf. Aunque la luz no influye sobre el número de fracciones mayoritarias obtenidas, sí tiene un efecto importante en cuanto a su intensidad, de manera que los cultivos que crecen en presencia de la luz presentan una coloración más intensa que los mantenidos en la oscuridad.

Por lo que respecta al ciclo de desarrollo, cuando *Myxococcus coralloides* crece sobre agar-levadura protegido de la luz, a los 2-3 d puede observarse la formación de unos agregados celulares, que posteriormente se desarrollan dando lugar a los correspondientes cuerpos fructificantes (*figura 3*). Por el contrario, los cultivos crecidos en presencia de luz exhiben modelos de comportamiento diferentes: aparecen acúmulos de células, con aspecto de crestas u ondulaciones que se entrelazan unas con otras y muy pocos cuerpos fructificantes (*figura 4*). Cuando los cultivos de *M. coralloides* son sometidos a ciclos alternantes de iluminación y oscuridad se obtienen los mismos resultados que cuando crecen ininterrumpidamente en la oscuridad.

Estos resultados difieren totalmente de los obtenidos en otras mixobacterias, *Sorangium compositum* (7) y *S. aurantiaca* (9, 11-12), en donde la luz favorece la formación de cuerpos fructificantes. Sin embargo, es conocido que en otros casos, las mixobacterias responden de manera diferente a la luz; así, Aschner y Chorin-Kirsk (2) encuentran que *Myxococcus fulvus* y *Nannocystis sp.* responden negativamente a la luz. Sin embargo, hay que

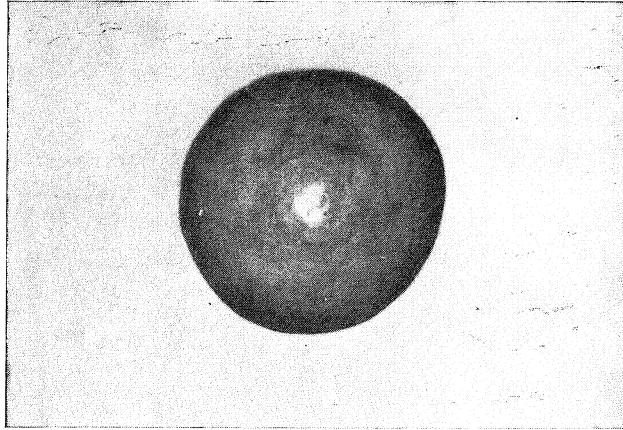


Figura 1. Colonias de M. coralloides desarrolladas en presencia de luz en medio CT. Colonias pequeñas y puntuales. $\times 40$

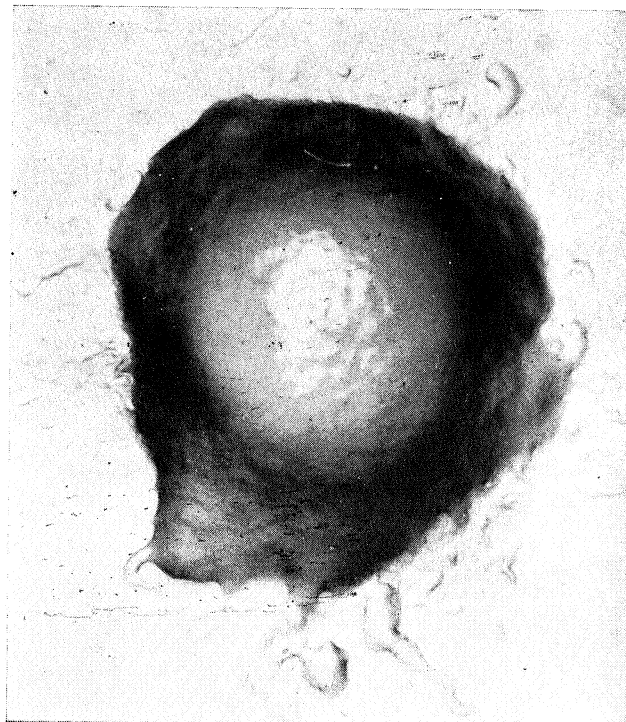


Figura 2. Colonias de M. coralloides desarrolladas en presencia de luz en medio CT. Colonias grandes y mucosas. $\times 40$

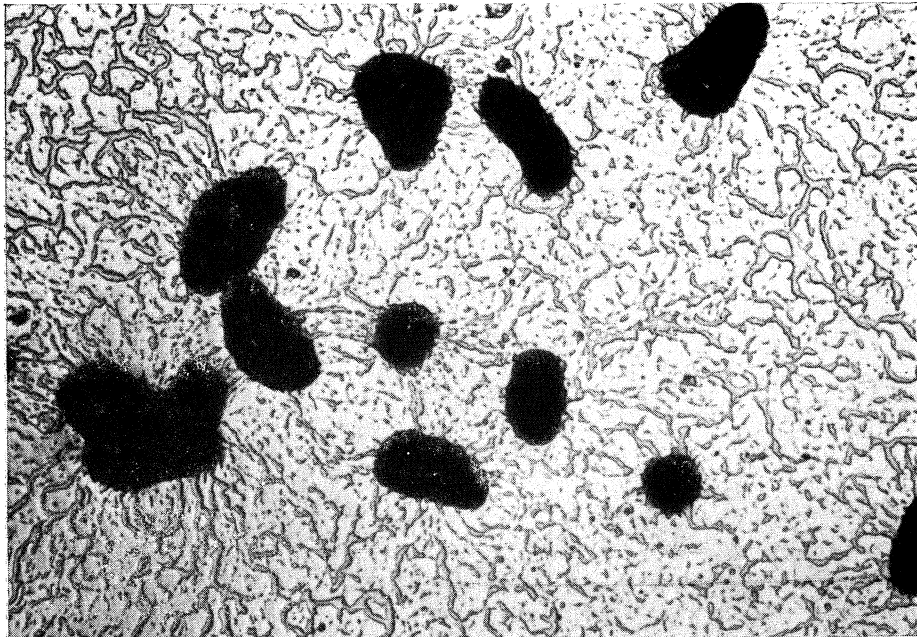


Figura 3. Desarrollo de M. coralloides en la oscuridad. A los 5 d de incubación, en un microscopio Zeiss, de luz reflejada. Cuerpos fructificantes individualizados y una maraña de mucosidad viscosa. Area de $2,3 \times 2,5$ mm

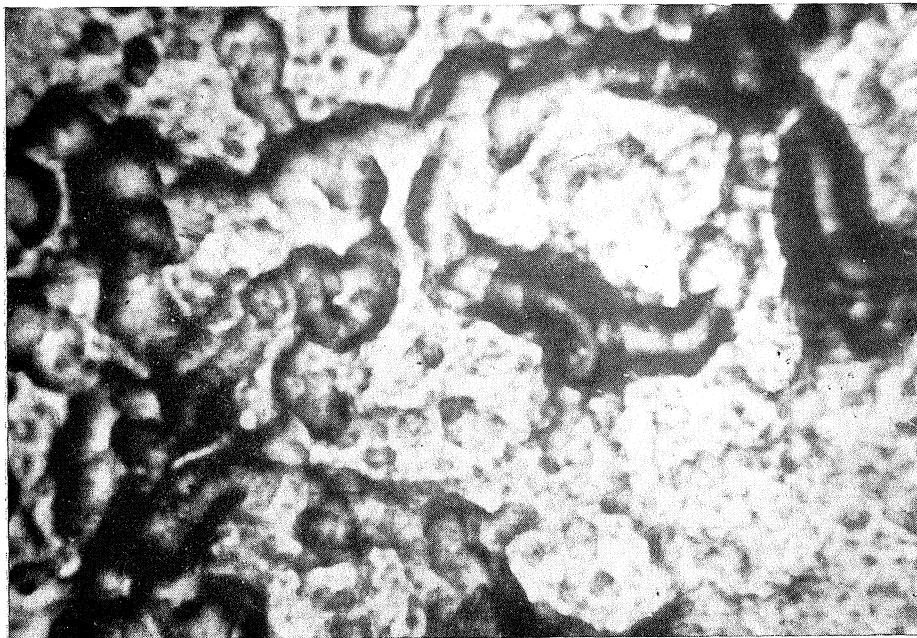


Figura 4. Desarrollo de M. coralloides en la luz. A los 5 d de incubación, en un microscopio Zeiss, de luz reflejada. Acúmulos de agregados celulares embebidos en mucílago, sin diferenciación en cuerpos fructificantes. Area de $2,3 \times 2,5$ mm

hacer la salvedad de que estos estudios estaban orientados al movimiento, bien como simples células, bien como enjambres, y no desde el punto de vista del desarrollo.

Por lo que respecta al análisis de pigmentos durante el ciclo de desarrollo, los resultados obtenidos fueron idénticos a los indicados en el caso del ciclo de vida vegetativo. La luz incrementa notablemente la producción de pigmentos en todas las mixobacterias ensayadas (5-6, 8, 12). Este efecto inductor de la luz sobre la biosíntesis de los pigmentos puede estar relacionado con el papel fotoprotector de los mismos. En ausencia de luz, la célula no necesita protegerse del efecto nocivo de la misma y el nivel de la síntesis de pigmentos es muy bajo. En presencia de luz, la célula dispone de mecanismos que inducen (o desreprimen) la biosíntesis de los pigmentos protectores.

Los resultados obtenidos nos llevan a la conclusión de que la raza de *Myxococcus coralloides* empleada en este trabajo responde negativamente en la formación de cuerpos fructificantes a estímulos luminosos continuados y únicos. Ahora bien, estos resultados distan bastante de lo que debe ocurrir en el hábitat natural de esta mixobacteria, las superficies del suelo y restos vegetales en putrefacción, en donde se desarrollan abundantes cuerpos, siendo ésta una de las maneras de facilitar su diseminación. Sin embargo, como ya se indicó, *M. coralloides* desarrolla cuerpos fructificantes cuando es sometida a ciclos alternantes de luz y oscuridad, que son las condiciones a las que se encuentra sometido en el suelo, y, por tanto, nuestros resultados son congruentes con la realidad.

BIBLIOGRAFIA

1. ARIAS, J. M., and MONTÓYA, E. 1978. Dispersed growth and cell lysis in *Myxococcus coralloides*. *Microbios Lett.*, 5, 81-84.
2. ASCHNER, M., and CHORIN-KIRSK, I. 1969. Light-oriented locomotion in certain *Myxobacter* species. *Arch. Mikrobiol.*, 74, 308-14.
3. BURCHARD, R. P. 1974. Growth of surface colonies of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Arch. Mikrobiol.*, 108, 271-79.
4. BURCHARD, R. P.; BURCHARD, A. C., and PARISH, J. H. 1977. Pigmentation phenotype instability in *Myxococcus xanthus*. *Can. J. Microbiol.*, 23, 1657-62.
5. BURCHARD, R. P., and DWORKIN, M. 1966. Light induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, 91, 535-45.
6. BURCHARD, R. P., and HENDRICKS, S. B. 1969. Action spectrum for carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, 97, 1165-68.
7. COUCKE, P. 1969. Morphology and morphogenesis of *Sorangium compositum*. *J. Appl. Bacteriol.*, 32, 24-29.

8. GRIMM, K. 1967. Klonkulturen von *Archangium violaceum*. Arch. Mikrobiol., 57, 283-84.
9. INOUE, S.; WHITE, D., and INOUE, M. 1980. Development of *Stigmatella aurantiaca*: effects of light and gene expression. J. Bacteriol., 141, 1360-65.
10. QUALLS, G. T.; STEPHENS, K., and WHITE, D. 1978. Light-stimulated morphogenesis in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. Science, 201, 444-45.
11. QUALLS, G. T.; STEPHENS, K., and WHITE, D. 1979. Morphogenetic movements and multicellular development in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. Develop. Biol., 66, 270-74.
12. REICHENBACH, H. 1965. Untersuchungen an *Archangium violaceum*. Ein beitrage zur kenntnis der myxobakterien. Arch. Mikrobiol., 52, 376-403.
13. SUDO, S. Z., and DWORKIN, M. 1969. Resistance of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 98, 883-87.
14. WIREMAN, J. M., and DWORKIN, M. 1975. Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. Science, 189, 516-23.

CLASIFICACION EN BIOTIPOS DE ESTAFILOCOCOS DE ORIGEN ANIMAL

I. MENES, L. GUTIERREZ, J. J. FRANCISCO, M. L. GARCIA y B. MORENO

RESUMEN

En este trabajo se clasifican en biotipos, según el esquema de Hajek y Marsalek, 38 cepas de estafilococos coagulasa-positivas. Estas cepas habían sido aisladas a partir de abscesos observados en el matadero en canales y vísceras de ganado vacuno, ovino y caprino.

De los resultados obtenidos es posible concluir que el esquema utilizado plantea problemas para la adscripción de las cepas del mencionado origen a biotipos concretos. De las 38 cepas estudiadas, sólo 18 pudieron ser clasificadas, mostrando las restantes caracteres intermedios entre dos biotipos o próximos a alguno de ellos.

De las cepas de *Staphylococcus aureus* de origen ovino, en total 25, 16 fueron adscritas al biotipo C, siendo sus caracteres muy uniformes y diferentes de los presentados por las cepas de origen vacuno, incluidas también en este biotipo. Esta uniformidad de caracteres se refiere no sólo a las propiedades constantes o fijas del referido biotipo, sino también a las variables, entre las que destacan la producción de hemolisina alfa por parte de todas las cepas y el tipo negativo de crecimiento en agar-cristal violeta por el 87,5 %.

SUMMARY

Biotyping of coagulase positive staphylococci from animal origin

A total of 38 strains of coagulase positive staphylococci classed as *Staphylococcus aureus* (30), *S. intermedius* (2) and unclassified (6) were biotyped according to the scheme devised by Hajek and Marsalek. These strains were isolated from abscesses in slaughtered animals (cows, ewes and goats).

Of the total number of strains studied, only 18 could be assigned to any of the biotypes described. The remaining 20 strains shared properties of two biotypes (intermediate) or failed one or more characteristics to be included in one biotype. Our findings indicate that the used scheme, although widely

accepted, has a limited value for the biotyping of strains isolated from animals abscesses.

Of the 25 *Staphylococcus aureus* cultures obtained from sheep, 16 were classified as C biotype. These 16 cultures showed to a great extent analogous properties and formed a very homogeneous group different from bovine strains also belonging to biotype C. All our ovine strains classed as C biotype produced alpha haemolysin and 87.5 % gave the negative type of growth on crystal violet agar. These two properties are variable in Hajek and Marsalek's scheme. These results indicate that *S. aureus* from sheeps constitutes an ecological group which can be considered separately within the C biotype.

INTRODUCCION

El estudio detallado de cepas de estafilococos de origen animal realizado en los últimos años, principalmente en cuanto a sus propiedades fisiológicas y bioquímicas, ha llevado al convencimiento de que especies como *Staphylococcus aureus* presentan tal grado de diversificación en sus caracteres que aconsejan su subdivisión.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* de origen humano y animal difieren en ciertas propiedades, al igual que las procedentes de especies animales distintas entre sí, lo que hace pensar que se debe a que desarrollan características que son reflejo de su hábitat particular (1).

La primera propuesta para dividir la especie *Staphylococcus aureus* en las variedades humana, bovina y canina, de Meyer (15), fue seguida por la de Shimizu (21) que hace una división en cinco tipos, y la de Hajek y Marsalek (13), que a su vez establece seis biotipos. Para la realización de estas clasificaciones, los autores mencionados se basaron en el estudio de determinadas propiedades fisiológicas y bioquímicas, como son la capacidad de producción de fibrinolisisina (14), la coagulación de diferentes plasmas animales (15), la producción de hemolisinas alfa y beta (12), la producción de pigmentos y el tipo de crecimiento en agar-cristal violeta (16), junto a otras como son la diferente sensibilidad a los bacteriófagos humanos y bovinos (16) y la distinta estructura antigénica y de la pared celular (18, 20).

De los esquemas hasta el momento propuestos para la división de *Staphylococcus aureus* en biotipos, el más utilizado es el de Hajek y Marsalek (13) que incluía nueve caracteres, junto con la sensibilidad a los bacteriófagos humanos y bovinos, y que en 1976 (11) fue reformado, quedando con siete caracteres fundamentales y la tipificación por bacteriófagos. Los seis bioti-

pos que en él se presentan, A a F, están referidos al hombre y a nueve especies animales que se agrupan en los diferentes biotipos: aves de corral-cerdos, ovejas-vacas, liebres, perros-caballos-visones y palomas-zorros.

Es indudable el valor práctico presentado por la división en biotipos o ecotipos, ya que con frecuencia el microbiólogo de los alimentos está interesado en conocer el origen de una determinada cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de un alimento (1). También es interesante conocer, a nivel epidemiológico, si un determinado proceso ha sido producido por cepas ya adaptadas a la especie animal en la que se encuentran o bien han sido transferidas por el hombre o por otros animales (18). Con vistas a su utilidad epidemiológica en microbiología de los alimentos, en este trabajo se presenta la clasificación en biotipos, según el esquema de Hajek y Marsalek, de 38 cepas de estafilococos coagulasa-positivos de origen animal.

MATERIAL Y METODOS

Cepas

Las cepas de estafilococos estudiadas fueron aisladas por nosotros a partir de abscesos encontrados en inspección de carnes en ganado vacuno, ovino y caprino. De estas cepas, 30 correspondían a *Staphylococcus aureus*, 2 a *S. intermedius* y las 6 cepas restantes no pudieron ser clasificadas.

Esquema de clasificación en biotipos

Para la adscripción de nuestras cepas a biotipos se utilizó el esquema propuesto por Hajek y Harsalek (11), esquema que se recoge en el *cuadro 1*.

Producción de fibrinolisis

La puesta en evidencia de la actividad fibrinolítica se llevó a cabo según el método descrito por Christie y Wilson (3).

Producción de pigmentos

El color de las colonias se estudió en agar BHI (Difco), con incubación durante 5 d, a 35 °C. Se consideraron productoras de pigmento las cepas cuyas colonias mostraban color naranja, amarillo o crema, y no pigmentadas las de color blanco.

Cuadro 1. Esquema utilizado para la subdivisión de *S. aureus* en biotipos (*)

Propiedades	Biotipos					
	A	B	C	D	E	F
Fibrinolisisina	+	--	-	-	-	-
Pigmentos	+	+	+	V	-	-
Coagulación plasma humano	+	+	+	+	-	+
Coagulación plasma bovino	-	-	+	-	+	+
Hemolisina alfa	+	V+	V	-	-	V-
Hemolisina beta	V-	V+	+	+	+	+
Tipo de crecimiento en agar-cristal violeta	-	+	V	-	+	+
Sensibilidad a los bacteriófagos	H	H/B	H/B	H/B	-	-
Hospedador más frecuente	Hombre	Pollos, cerdos	Vacas, ovejas	Liebres	Perros, caballos, visones	Palomas, zorros

(*) Según HAJEK y MARSÁLEK (11).

V = variable (V + y V - indican predominio de las cepas positivas o negativas, respectivamente). H = bacteriófagos del conjunto humano. B = bacteriófagos del conjunto bovino.

Coagulación de los plasmas humano y bovino

La producción de coagulasa se investigó en la forma previamente descrita por nosotros (6), utilizando plasma conteniendo 0,1 % de EDTA. Únicamente las reacciones 2+ y superiores fueron consideradas como evidencia positiva de la producción de la enzima.

Producción de hemolisinas alfa y beta

Para la detección e identificación de las hemolisinas alfa y beta se empleó la técnica en placa, también descrita ya por nosotros (6).

Prueba de crecimiento en agar-cristal violeta

Esta prueba se realizó siguiendo la técnica descrita por Meyer (16). Se consideraron como cristal violeta-positivas las cepas de los tipos A (colonias

amarillas o amarillo-azuladas) y E (blancas), y como negativas las del tipo C (azul-violeta).

Tipificación por bacteriófagos

Se llevó a cabo según el método de Blair y Williams (2), teniendo en cuenta las modificaciones propuestas por Parker (19) y utilizando los conjuntos o juegos básicos de bacteriófagos para la tipificación de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen humano (22) y bovino (24). En los casos en que las cepas no se tipificaban con los bacteriófagos diluidos a su RTD, se repitió el proceso con los bacteriófagos a 100 × RTD.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos al someter las cepas de estafilococos coagulasa-positivas a las ocho pruebas utilizadas para su clasificación en biotipos se presentan en el cuadro 2. El número de cepas con actividad fibrinolítica fue de 12. De ellas, 10 habían sido clasificadas como *Staphylococcus aureus* y 2 como *S. intermedius*. La producción de pigmentos fue un carácter presentado por las 30 cepas de *S. aureus*, por las 2 de *S. intermedius* y por 5 de las 6 no clasificadas. También la totalidad de las cepas de *S. aureus* y *S. intermedius* coagulaban el plasma humano y sólo una de las no clasificadas carecía de esta propiedad. Unicamente 4 de las 38 cepas incluidas en este estudio no presentaban actividad coagulasa en plasma bovino. De ellas, 2 eran *S. intermedius* y 2 no clasificadas. La capacidad de producir hemolisinas alfa y/o beta fue exclusiva de las cepas de *S. aureus*: de las 26 cepas productoras de estas hemolisinas, 24 producían ambas y 2 sólo hemolisina alfa. Por lo que se refiere al tipo de crecimiento en agar-cristal violeta, 25 de las cepas de *S. aureus*, las 2 de *S. intermedius* y 5 de las no clasificadas eran cristal violeta-negativas (tipo C). De las 6 cepas restantes, 5 *S. aureus* eran del tipo A y una no clasificada, del E.

La sensibilidad a los bacteriófagos de las cepas adscritas a la especie *Staphylococcus aureus* muy muy elevada: 10 cepas se tipificaron por bacteriófagos humanos, 16 por bacteriófagos bovinos y una por bacteriófagos de ambos conjuntos. También 3 de las cepas no clasificadas pudieron ser tipificadas: una de ellas por bacteriófagos humanos y 2 por bovinos. Como era de esperar, no fue posible tipificar las 2 cepas de *S. intermedius*.

Las diferentes combinaciones de propiedades encontradas, el número de

Cuadro 2. Resultados de las pruebas utilizadas para clasificar en biotipos 38 cepas de estafilococos coagulasa-positivas (*)

Pruebas	<i>S. aureus</i> (30) (**)		<i>S. intermedius</i> (2) (**)		No clasificadas (6) (**)	
	Número de cepas positivas	Porcentaje	Número de cepas positivas	Porcentaje	Número de cepas positivas	Porcentaje
Fibrinolisisina	10	33,33	2	100		
Pigmentos	30	100,00	2	100	5	83,33
Coagulación plasma humano	30	100,00	2	100	5	83,33
Coagulación plasma bovino	30	100,00			4	66,67
Hemolisina alfa	26	86,67				
Hemolisina beta	24	80,00				
Tipo de crecimiento en agar-cristal violeta:						
Tipo A	5	16,67				
Tipo E					1	16,67
Tipo C	25	83,33	2	100	5	83,33
Tipificación por bacteriófagos:						
conjunto humano	10	33,33			1	16,67
conjunto bovino	16	53,33			2	33,33
ambos conjuntos	1	3,33				

(*) Tres de estas cepas no coagulaban el plasma de conejo, aunque sí el humano (2 cepas) y el bovino (1 cepa).

(**) El número corresponde al de cepas incluidas en la especie.

cepas que las presentaban, el biotipo al que fueron adscritas y la especie animal de la que se habían aislado se dan en los cuadros 3-4.

DISCUSION

De los datos recogidos en el cuadro 3, destaca el que un elevado porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* (43,3 %) no pudieron ser adscritas a ninguno de los biotipos de Hajek y Marsalek (13) y el que la totalidad de las adscritas presentaban caracteres del biotipo C.

La actividad fibrinolítica es una propiedad exclusiva de las cepas de *Staphylococcus aureus* de origen humano, mientras que la capacidad de coagular el plasma bovino lo es de algunas de las de origen animal. Por ser positivas en las dos pruebas y por compartir propiedades de los biotipos A y C, las 7 cepas incluidas en los grupos I y II (cuadro 3) fueron clasificadas como intermedias entre ambos biotipos. La existencia de cepas de estas características ha sido descrita por varios autores (5, 8, 12). La cepa del grupo III era muy semejante a las anteriores, aunque su incapacidad para producir hemolisina beta y el ser sensible sólo a los bacteriófagos humanos la sitúan más próxima al biotipo A. La adscripción al biotipo C de las 17 cepas de los grupos IV, V, VI, VII y VIII no presentó ningún problema, ya que las combinaciones de sus propiedades correspondían a las del mencionado biotipo. Con excepción de la sensibilidad a los bacteriófagos, estas cepas formaban un grupo muy homogéneo: todas ellas eran fibrinolisisina-negativas, producían pigmentos y hemolisinas alfa y beta, coagulaban los plasmas humano y bovino y, excepto 2, eran cristal violeta-negativas. Las cepas incluidas en los grupos IX, X y XI fueron incapaces de producir hemolisina beta, por lo que no fue posible adscribirlas al biotipo C. Finalmente, las propiedades presentadas por las 2 cepas del grupo XII diferían tanto de las de los biotipos propuestos por Hajek y Marsalek (13) que no pudieron ser clasificadas ni siquiera de forma aproximada.

Por lo que se refiere a las 2 cepas de *Staphylococcus intermedius* (cuadro 4) es importante destacar que, en contra de lo que cabría esperar, no pudieron ser incluidas en los biotipos E ni F (9, 11). La combinación de sus propiedades estaba mucho más próxima al biotipo A. La no inclusión en este biotipo se debió a la incapacidad de estas cepas de producir hemolisina alfa.

De las 6 cepas no clasificadas en especie (cuadro 4) 3 (grupos 1 y 2) mostraban gran similitud con el biotipo C, una (grupo 3) fue adscrita al biotipo D, otra (grupo 4) estaba próxima al B y la última (grupo 5) al E. La no

Cuadro 3. Grupos o combinaciones de propiedades establecidos con 30 cepas de *S. aureus*, biotipos a los que se han adscrito y número de cepas incluidas en cada uno

Pruebas	Grupos de <i>S. aureus</i>											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Fibrinolisina	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Pigmentos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulación plasma humano	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulación plasma bovino	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemolisina alfa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
Hemolisina beta	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Tipo de crecimiento en agar-cristal violeta	C	C	C	C	C	C	A	A	A	C	C	A
Bacteriófagos humanos	+	—	+	—	+	—	—	+	+	—	—	—
Bacteriófagos bovinos	—	—	—	+	—	—	+	+	—	+	—	—
Biotipo	Int. A y C		Próx. A	C	C	C	C	C	Próx. C			Nc
Número de cepas	6	1	1	13	1	1	1	1	1	1	1	2
Aisladas de	5 Ov,	2 V	0v	16 Ov,			1 V		1 Ov,	1 V,	1 Ca	0v

C = cristal violeta-negativo. A = cristal violeta-positivo. Nc = no clasificada. Ov = oveja. V = vacuno. Ca = cabra.

producción de hemolisina beta hizo imposible la clasificación de las cepas de los grupos 1 y 2 en el biotipo C. La cepa tipificada como perteneciente al biotipo B mostraba el tipo E de crecimiento en agar-cristal violeta y no el A, como encuentran Hajek y Marsalek para cepas de este biotipo. La única discrepancia entre la cepa del grupo 4 y el biotipo B fue su tipo de crecimiento en agar-cristal violeta. También esta propiedad y la no elaboración de hemolisina beta impidieron que la cepa del grupo 5 se adscribiera al biotipo E.

En los cuadros 3-4 se señala también el origen de las cepas. Como era de esperar, dadas las especies animales de las que se aislaron, la mayoría de ellas presentaban propiedades características del biotipo C o muy próximas. Un hecho destacable es el hallazgo, entre las cepas no clasificadas, de una cepa perteneciente al biotipo B y de otra considerada como próxima al mismo. En este biotipo se incluyen cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de pollos y cerdos, que carecen de algunos de los caracteres propios de esta.

Cuadro 4. Grupos o combinaciones de propiedades establecidos con 2 cepas de *S. intermedius* y 6 no clasificadas, biotipos a los que se han adscrito y números de cepas incluidas en cada uno

Pruebas	<i>S. intermedius</i>	Grupos de cepas no clasificadas				
		1	2	3	4	5
Fibrinolisisina	+	—	—	—	—	—
Pigmentos	+	+	+	+	+	—
Coagulación plasma humano	+	+	+	+	+	—
Coagulación plasma bovino	—	+	+	—	—	+
Hemolisina alfa	—	—	—	—	—	—
Hemolisina beta	—	—	—	—	—	—
Tipo de crecimiento en agar-cristal violeto	C	C	C	E	C	C
Bacteriófagos humanos	—	—	+	—	—	—
Bacteriófagos bovinos	—	+	—	—	—	—
Biotipo	Próx. A	Próx. C		B	Próx. B	Próx. E
Número de cepas	2	2	1	1	1	1
Aisladas de	0v	2 Ov,	1 V	V	0v	0v

C = cristal violeta-negativo. E = cristal violeta-positivo. Ov = oveja. V = vacuno.

especie de estafilococos (4, 7), lo que podría explicar las dificultades halladas para su clasificación a nivel de especie.

Destaca asimismo en el *cuadro 3* la uniformidad de resultados de las 16 cepas de *Staphylococcus aureus* de origen ovino, incluidas en el biotipo C, especialmente en lo que se refiere a la producción de hemolisina alfa y al tipo de crecimiento en agar-cristal violeta, caracteres ambos que se dan como variables en el esquema de Hajek y Marsalek (11). Las 16 cepas producían hemolisina alfa y 14 eran cristal violeta-negativas. Al comparar estos datos con los obtenidos también por nosotros al clasificar en biotipos cepas de *S. aureus* aisladas de leche mamítica de oveja (8), se observa una gran coincidencia, ya que de las 52 cepas del biotipo C estudiadas, el 100 % producía toxina alfa y el 94,2 % mostraba el tipo C de crecimiento en agar-cristal violeta. Este último carácter parece propio de las cepas de origen ovino, incluidas en el biotipo C. Así, el 97,4 % de las 77 cepas de *S. aureus* de este biotipo aisladas de fosas nasales de ovejas sanas y de mamitis purulentas a que se refieren otros trabajos (10-11, 18) eran cristal violeta-negativas. También mostraban esta propiedad las 47 cepas de *S. aureus* agentes de mamitis ovinas estudiadas por Szulga y colaboradores (23) y el 91,9 % de las 37 cepas de esta especie aisladas de quesos elaborados con leche de oveja e incluidas en el biotipo C por Hajek (10). A la luz de la escasa bibliografía sobre estafilococos de origen ovino, resulta más difícil en el momento actual establecer conclusiones sobre la capacidad de las cepas de este origen para producir hemolisina alfa. Es sorprendente constatar el hecho de que todas nuestras cepas del biotipo C producían esta toxina, lo mismo que todas las estudiadas por Gutiérrez (8) en nuestro propio laboratorio, mientras que ninguna de las cepas a las que se refieren los autores antes mencionados presentaba este carácter.

De los resultados obtenidos en este trabajo parece posible concluir que la mayor parte de las cepas de estafilococos coagulasa-positivas aisladas de abscesos en inspección de carnes poseen propiedades características de los biotipos de origen animal y que las obtenidas de ovejas constituyen un grupo homogéneo con caracteres propios. La particularidad de estos caracteres, junto a la sensibilidad al bacteriófago 78 del conjunto bovino y a la producción de enterotoxina C (datos no publicados), son propiedades que presentan de forma mayoritaria las cepas de *Staphylococcus aureus* de origen ovino. Todo ello permite afirmar que estas cepas constituyen un grupo independiente, diferenciable de las aisladas de otras especies animales e incluso de las de ganado vacuno, situadas también en el biotipo C. Esta afirmación coincide con la de Szulga y colaboradores (23), quienes al aplicar la taxonomía numé-

rica a cepas de *S. aureus* de diversos orígenes observan que las de oveja forman un grupo claramente diferenciado.

BIBLIOGRAFIA

1. BAIRD-PARKER, A. C. 1974. The basis for the present classification of staphylococci and micrococci. Ann. N. Y. Acad. Sci., 236, 7-13.
2. BLAIR, J. E., and WILLIAMS, R. E. 1961. Phage typing of staphylococci. Bull. W. H. O., 24, 771-84.
3. CHRISTIE, R., and WILSON, H. 1941. A test of staphylococcal fibrinolysis. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 19, 329-32.
4. DEVRIESE, L. A., and OEDING, P. 1976. Characteristics of *S. aureus* strains isolated from different animal species. Res. Vet. Sci., 21, 284-91.
5. DIMITRACOPOULOS, G.; SAKELLARIOU, C., and PAPAVALASSILOU, J. 1976. Staphylococci from the feces of different animal species: biotypes of *S. aureus* strains of sheep and goat origin. Appl. Environ. Microbiol., 32, 53-55.
6. GARCÍA, M. L.; MORENO, B., and BERGDOLL, M. S. 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. Appl. Environ. Microbiol., 39, 548-53.
7. GIBBS, P. A.; PATTERSON, J. T., and HARVEY, J. 1978. Biochemical characteristics and enterotoxigenicity of *S. aureus* strains isolated from poultry. J. Appl. Bacteriol., 44, 57-74.
8. GUTIÉRREZ, L. M. 1981. Los estafilococos aislados de leche mamítica de oveja: caracterización y estudios epidemiológicos. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, León.
9. HAJEK, V. 1976. *S. intermedius* a new species isolated from animals. Int. J. Syst. Bacteriol., 26, 401-8.
10. HAJEK, V. 1978. Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese. Appl. Environ. Microbiol., 35, 264-68.
11. HAJEK, V., and MARSALEK, E. 1966. Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. En J. JELJASZEWICZ (ed.). Staphylococci and Staphylococcal Diseases, 11-21. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
12. HAJEK, V., and MARSALEK, E. 1969. A study of staphylococci of bovine origin: *S. aureus* var. *bovis*. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig., 209, 154-60.
13. HAJEK, V., and MARSALEK, E. 1971. The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig., 217, 176-82.
14. MARANDON, J. L., and OEDING, P. 1966. Investigation on animal *S. aureus* strains. I. Biochemical characteristics and phage typing. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 67, 149-56.
15. MEYER, W. 1966. Differenzierungsschema für standortvarianten von *S. aureus*. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig., 201, 465-81.
16. MEYER, W. 1967. Über die Brauchbarkeit des Kristallviolett-Testes zur Differenzierung von *S. aureus*-Stämmen. Z. Med. Mikrobiol. Immunol., 153, 158-63.

17. OEDING, P.; HAJEK, V., and MARSALEK, E. 1976. A comparison of antigenic structure and phage pattern with biochemical properties of *S. aureus* strains isolated from sheep. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, **84**, 61-65.
18. OEDING, P.; MARANDON, J. L.; HAJEK, V., and MARSALEK, E. 1971. A comparison of phage pattern and antigenic structure with biochemical properties of *S. aureus* strains isolated from cattle. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, **79**, 357-64.
19. PARKER, M. T. 1972. Phage typing of *S. aureus*. *Methods Microbiol.*, **7B**, 1-28.
20. SCHLEIFER, K. H., and KLOOS, W. E. 1976. Separation of staphylococci and micrococci. En J. JELJASZEWICZ (ed.). *Staphylococci and Staphylococcal Diseases*, 133-36. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
21. SHIMIZU, T. 1968. Hoste-specific parasitism of *S. aureus*. *Mem. Fac. Agr. Univ. Miyazaki*, **5**, 1-55.
22. Subcommittee on Phage Typing of Staphylococci. 1975. Report 1970-74. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **25**, 241-42.
23. SZULGA, T.; MEYER, W.; WITLE, W., and HORN, G. 1976. Numerical taxonomy of *S. aureus*. En J. JELJASZEWICZ (ed.). *Staphylococci and Staphylococcal Diseases*, 101-4. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
24. Working Group on Phage Typing of Bovine Staphylococci. 1971. Minutes of Meeting, 5 August, 1970. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **21**, 171.

ESTUDIO DE LA INTERACCION ESTABLECIDA ENTRE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y *PSEUDOMONAS AERU-*
GINOSA CUANDO SE CULTIVAN JUNTOS EN UN ME-
DIO SEMISINTETICO

M. T. BLANCO, M. A. FALCON y A. CHORDI

RESUMEN

Se cultivan las especies *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* en un medio semisintético. Se estudian diferentes tipos de cultivo mixto en los que las proporciones iniciales de las mencionadas especies varían desde *S. aureus*/*P. aeruginosa* (S/P): 1/8 hasta 4/1. En dichos cultivos *S. aureus* presenta diferentes niveles de inhibición, mientras que el crecimiento de *P. aeruginosa* permanece invariable. Se estudian las inhibiciones observadas en la población de *S. aureus*: se preparan diferentes cultivos de *S. aureus* en los sobrenadantes de *P. aeruginosa*, recuperados en nutrientes. Se encuentra que existe correlación entre los niveles de inhibición de *S. aureus* y el período previo de cultivo de *P. aeruginosa*.

SUMMARY

A study of the interaction between Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa during mixed culture in a semi-synthetic medium

The species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were cultivated in a semisynthetic medium. Different mixed cultures were studied in which the initial proportion of the mentioned species was varied from *S. aureus*/*P. aeruginosa* (S/P): 1/8 to 4/1. Different levels of inhibitions were observed in the populations of *S. aureus* when grown in the sterile supernatant of cultures of *P. aeruginosa* in which nutrients were added. It was noted that a correlation existed between the level of inhibition of *S. aureus* and the previous period of culture of *P. aeruginosa*.

INTRODUCCION

Las interacciones microbianas constituyen un tema al que actualmente se le presta gran atención, pues aunque el estudio de los microorganismos aislados supone la base de la microbiología actual, hoy ésta se enfrenta a la noción de comunidad microbiana natural (1).

Staphylococcus aureus y *Pseudomonas aeruginosa* son dos bacterias piógenas que con frecuencia aparecen asociadas en infecciones. Cuando se las cultiva juntas, se manifiestan interacciones, que han sido estudiadas por diferentes autores.

De Repentigny y colaboradores (5) encontraron que *Staphylococcus aureus* crecía normalmente cuando se cultivaba junto con *Pseudomonas aeruginosa* siendo esta especie la que aparecía perjudicada; por el contrario Light y colaboradores (7) demostraron una relación inversa específica entre *S. aureus* y *P. aeruginosa* en infecciones de recién nacido; Seminiano y Frazier (9) pusieron de manifiesto cómo el crecimiento de *S. aureus* se inhibía cuando crecía en presencia de *P. aeruginosa*.

El objeto de nuestro trabajo ha sido esclarecer el tipo de interacción que se establece entre ambas bacterias cuando crecen juntas y buscar las condiciones óptimas para dicha interacción.

MATERIAL Y METODOS

Cepas

Utilizamos las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14216. Ambas fueron cedidas por la Colección Española de Cultivos Tipo, de la Facultad de Ciencias de Bilbao.

Medios de cultivo

Hemos empleado para el cultivo de las cepas en fermentador, el medio dado por De Repentigny y que se denomina SNI, consta de: PO_4HK_2 , 2 g; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 90 mg; $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 ml; $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; tampón tris (Sigma) pH 7,9, 24,2 g; tiamina, 0,02 mg; ácido nicotínico, 0,02 mg; casamino acids (Difco), 15 g, y H_2O , hasta 1.000 ml. Se ajusta el pH a 7,3 con ClH concentrado. Después de esterilización en autoclave se añade glucosa al 0,5 %.

El recuento de microorganismos en medio sólido se realizó en diferentes medios selectivos y nutritivos. Como medios selectivos, utilizamos mannitol salt agar (M.S.A., de Difco) y *Pseudomonas* isolations agar (P.I.A., de Difco). Los medios nutritivos que empleamos fueron: brain heart agar (B.H.A., de Difco) y nutrient agar (N.A., de Difco).

Técnicas de cultivo

Las especies se cultivaron en un fermentador modelo Ultroferm (60) de L.K.B., con control automático de temperatura, agitación y aireación. Las condiciones de cultivo fueron de 37 °C de temperatura, 200 rpm de agitación y aireación de 2 l/min.

El inóculo se preparaba en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, que contenía 100 ml de medio SNI, en el que se sembraba un asa de masa microbiana obtenida de una placa con 24 h de incubación. Tras 12 h de crecimiento, se tomaba un volumen de dicho matraz y se inoculaba en el fermentador hasta alcanzar una densidad óptica inicial de 0,1.

Los cultivos mixtos se iniciaron utilizando inóculos contenidos en matraces de Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y donde crecían por separado las especies con las que posteriormente se iba a trabajar en el cultivo mixto. A partir de estos matraces, se inoculaban en el fermentador distintos volúmenes, que contenían cada uno de ellos un determinado número de microorganismos, consiguiéndose de esta forma empezar el cultivo mixto con diferentes proporciones, entre las que hemos utilizado: *Staphylococcus aureus*/*Pseudomonas aeruginosa*: S/P: 1/1; S/P: 4/1; y S/P: 1/8.

Realizamos cultivos de cada una de las cepas en el sobrenadante estéril de la otra, utilizando el filtrado obtenido después del crecimiento de cada una de ellas en el medio SNI, hasta fase estacionaria máxima. Después de centrifugarlo a 7.000 g en centrífuga Sorvall SS-3 automática, el sobrenadante se esterilizaba por filtración y se complementaba con las proporciones originales de glucosa y vitaminas. Se realizaba posteriormente la siembra de la otra cepa, estudiándose de nuevo los parámetros que esta especie presentaba: tasa específica de crecimiento, número máximo de células que alcanza el cultivo, tiempo que tarda en alcanzar dicho número de células, etc.

Productos extracelulares

Investigamos la presencia de sustancias estafilolíticas en el sobrenadante, siguiendo la técnica de Zyskind y colaboradores (12): se precipita el sobre-

nadante con acetona gota a gota hasta un 80 %, se resuspende el precipitado en un tampón de acetato 0,01 M, de pH 8,5, enfrentándose a una suspensión de *Staphylococcus aureus*.

RESULTADOS

Realizamos cultivos puros de los microorganismos que nos dieron los valores patrón (figura 1).

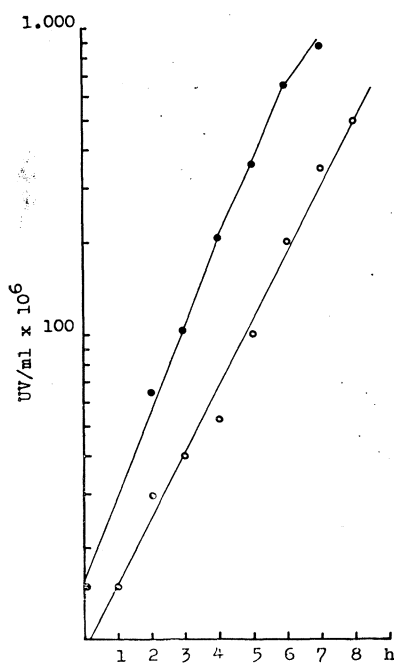


Figura 1. Crecimiento de *S. aureus* (○) y *P. aeruginosa* (●) en el medio SNI, en condiciones óptimas

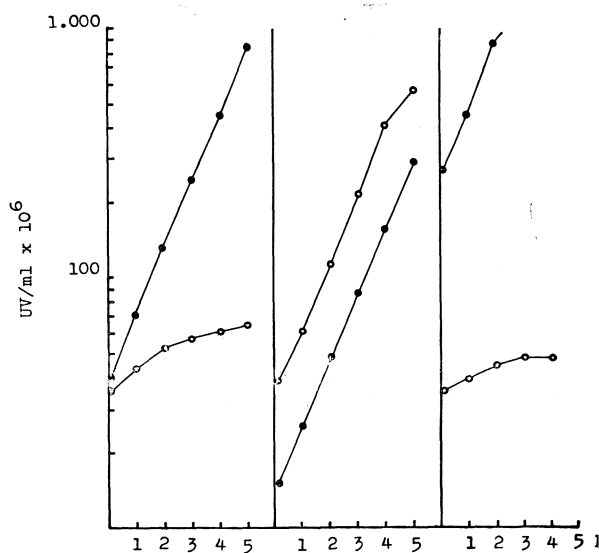


Figura 2. Crecimiento de *S. aureus* (○) y *P. aeruginosa* (●) en cultivo mixto, comenzando con diferentes proporciones: A) *S. aureus*/P. *aeruginosa*, 1/1; B) *S. aureus*/P. *aeruginosa* 4/1; C) *S. aureus*/P. *aeruginosa*, 1/8

Una vez conocidos los parámetros del crecimiento en condiciones óptimas, iniciamos nuestras experiencias con el cultivo mixto, donde observaríamos las posibles variaciones respecto a los valores patrón, en la cinética de crecimiento de ambas poblaciones, cuando crecían juntas en un mismo medio.

Cultivo mixto de los microorganismos

Planificamos tres tipos de cultivo dependiendo del inóculo utilizado (figura 2): cultivo mixto que comenzaba con inóculos idénticos, S/P: 1/1; cultivo mixto que se iniciaba con predominio de la población de *Pseudomonas aeruginosa*, S/P: 1/8; cultivo mixto en el que la población de *Staphylococcus aureus* era la dominante, S/P: 4/1.

El crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* no se alteraba en ninguno de los tres tipos de cultivo mixto. La inhibición que en el crecimiento de esta especie observaban De Repentigny y colaboradores (4) cuando se cultivaba conjuntamente con *Staphylococcus aureus*, era debido a la acidificación del medio por *S. aureus*. Estando nuestro medio fuertemente tamponado, dicho efecto inhibitorio no se manifestó.

Por otra parte, encontramos una inhibición en el crecimiento de la población estafilocócica, que varía según el tipo de inóculo utilizado en cada cultivo.

Cuando dichos inóculos eran idénticos para las dos poblaciones, apareció una fuerte inhibición de *Staphylococcus aureus* desarrollándose sólo desde 36.10^6 hasta 66.10^6 UV (unidad viable)/ml. Esta inhibición que aparece desde los primeros momentos, en los que las concentraciones de nutrientes son las adecuadas para el desarrollo normal de ambas especies, nos induce a pensar que dicho fenómeno no se debe a una competición por los nutrientes del medio, que según algunos autores (10) es una de las causas por las que *S. aureus* ve afectado su crecimiento en presencia de otras bacterias.

Cuando *Pseudomonas aeruginosa* predominaba en el inóculo (S/P: 1/8) aparecía la población estafilocócica fuertemente inhibida, alcanzando solamente un total de 48.10^6 UV/ml. Este valor está muy por debajo del que esta misma población alcanza cuando se cultiva en ausencia de *P. aeruginosa*, que es de 1016.10^6 UV/ml. En el cultivo mixto realizado con inóculos en los que domina la población de *Staphylococcus aureus* (S/P: 4/1) aparece una inhibición en la población estafilocócica que se manifiesta después de 5 h del comienzo del cultivo. Hasta ese momento, *S. aureus* crecía del mismo modo que en un cultivo puro.

Después de estas experiencias realizadas en cultivos mixtos, pensamos que las condiciones del medio juegan un importante papel para que se desarrolle un determinado tipo de interacción entre esa pareja de microorganismos. Asimismo, las concentraciones iniciales de células con las que se inician los cultivos (proporción: microorganismo afectador/microorganismo afectado)

son fundamentales para que dicha interacción se manifieste en mayor o menor grado.

Cultivos en los sobrenadantes estériles

Para eliminar la posibilidad de una competición por los nutrientes y confirmar la hipótesis de un fenómeno de amensalismo, realizamos cultivos en los sobrenadantes obtenidos de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, a los que añadíamos los nutrientes agotados después de esterilizarlos por filtración. Utilizamos tres tipos de sobrenadantes, dependiendo del tiempo de cultivo de *P. aeruginosa*: aquél en que sólo había desarrollado la fase exponencial de crecimiento (cultivo de 6 h de crecimiento); sobrenadante obtenido después de 24 h de cultivo de *P. aeruginosa*, es decir, cuando está en fase estacionaria; sobrenadante obtenido después de 48 h de cultivo de *P. aeruginosa*.

En la figura 3 se expresan los datos obtenidos cuando crece *Staphylococcus aureus* en los diferentes tipos de sobrenadantes.

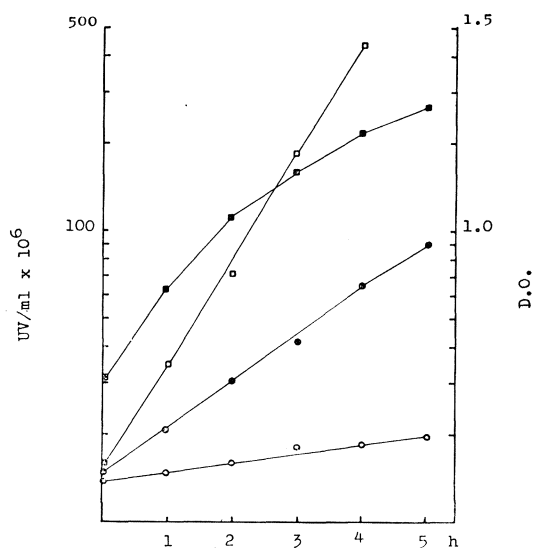


Figura 3 Crecimiento de *S. aureus* (unidades viables) en el sobrenadante de *P. aeruginosa* obtenido después de: 6 h (○), 24 h (●) y 48 h de cultivo (□). Incremento de turbidez del medio en los tres tipos de cultivo (■)

Cuando crece *Staphylococcus aureus* en el filtrado obtenido después de 6 h de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, presenta una tasa de crecimiento de $0,42 \text{ h}^{-1}$, calculada por el incremento de la densidad óptica, idéntica a la del cultivo patrón. El recuento de viables da un resultado de características totalmente diferentes, ya que encontramos inhibición en las células viables desde las primeras horas de cultivo, semejante a la que aparece en los cultivos mixtos. Esta discordancia del crecimiento en medio sólido y medio líquido nos indica que los productos vertidos al medio por *P. aeruginosa* dañan a las células de *S. aureus*, impidiendo su crecimiento en los medios sólidos habituales, confirmando la teoría de Burke y Pattee (2) de que sustancias aisladas de *P. aeruginosa* producirían formas de pared dañada de *S. aureus* en medio líquido.

Un fenómeno similar ha sido descrito por Lorian (8) que define como concentración mínima antibiótica (CMA) a la menor concentración de antibiótico capaz de producir una reducción significativa en las UV/ml de cultivo, aunque en éste aparezca crecimiento. La CMA es siempre menor o igual que la concentración mínima inhibitoria (CMI) y da lugar a alteraciones morfológicas y posiblemente bioquímicas de las células, observadas al microscopio electrónico.

En el sobrenadante obtenido después de cultivar durante 24 h *Pseudomonas aeruginosa*, habiendo añadido los nutrientes agotados, se obtenía un crecimiento en medio líquido idéntico al del cultivo patrón, con una tasa de crecimiento de $0,42 \text{ h}^{-1}$. El crecimiento en medio sólido también presenta una inhibición en los recuentos celulares realizados cada hora, aunque en este caso la inhibición es menor, llegándose a alcanzar hasta $93 \times 10^6 \text{ UV/ml}$ de *Staphylococcus aureus*. Esto nos indica que los productos se han degradado o bien han sido reutilizados.

En el crecimiento logrado cuando se cultiva *Staphylococcus aureus* en el sobrenadante obtenido de un cultivo de 48 h de *Pseudomonas aeruginosa*, podemos observar cómo los recuentos realizados cada hora coinciden con los valores patrón.

El crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el sobrenadante de *Staphylococcus aureus* nos da unos datos idénticos a los del cultivo patrón, confirmándonos que nuestro medio fuertemente tamponado no da lugar a la aparición de los fenómenos inhibitorios que se han mencionado anteriormente.

Productos extracelulares

Cuando a una suspensión de *Staphylococcus aureus* añadimos los productos extracelulares obtenidos del sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* por la técnica de Zyskind, observamos una rápida reducción de la turbidez. Esto confirma que el sobrenadante contiene sustancias con actividad lítica frente a *S. aureus* diferentes de las piocinas, que sólo actúan frente a bacterias relacionadas (6) y de la piocianina que no actúa como factor lítico (3).

DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo aportan una serie de datos para el mejor conocimiento del comportamiento de las poblaciones de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* cuando crecen juntos en un medio de cultivo semisintético.

En el cultivo mixto de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* en medio SNI, se establecen interacciones entre ambos microorganismos, con efectos negativos para *S. aureus* e indiferentes para *P. aeruginosa*. Se demuestra la importancia de la proporción de los inóculos, en la inhibición de *S. aureus* en el cultivo mixto: con inóculos iguales o mayores de *P. aeruginosa* queda totalmente inhibido y sólo cuando las concentraciones son menores se aprecia crecimiento de *S. aureus*. Los recuentos de *P. aeruginosa* en todos los casos de cultivo mixto, independientemente del inóculo, alcanzan valores idénticos a los del cultivo patrón.

La inhibición que aparece en los recuentos celulares de *Staphylococcus aureus* cuando crece en el sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* varía según el tiempo de crecimiento de esta especie, siendo mayor dicha inhibición cuando el sobrenadante procede de un cultivo que sólo se ha desarrollado hasta el comienzo de la fase estacionaria máxima, lo que parece indicar que los productos solubles vertidos al medio por *P. aeruginosa* se producen durante la fase exponencial, siendo posteriormente degradados o reutilizados y actúan sobre *S. aureus*, en mayor o menor grado dependiendo de su concentración, pudiendo llegar a producir la lisis de las células.

BIBLIOGRAFIA

1. ALEXANDER, M. 1971. Microbial Ecology. Part 2: Interspecific Relation Ships. John Wiley & Sons Inc., New York.

2. BURKE, M. E., and PATTEE, P. A. 1967. Purification and characterization of a staphylolytic enzyme from *P. aeruginosa*. J. Bacteriol., 3, 860-65.
3. COLLINS-THOMPSON, D. L.; ARIS, B., and HURST, A. 1973. Growth and enterotoxin B synthesis by *Staphylococcus aureus* S6 in associative growth *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol., 19, 1197-201.
4. DE REPENTIGNY, J. L.; MATHIEU, G., et COALLER-ASCOH, J. 1976. Acroissement par *Staphylococcus aureus* de la resistance de la souris envers l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol., 22, 1024-33.
5. DE REPENTIGNY, J. L.; MATHIEU, G., et GADBOIS, T. 1972. Interactions entre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* dans des cultures *in vitro* et au cours d'infections experimentales. Can. J. Microbiol., 18, 1531-41.
6. JACOB, F. 1954. Biosynthese induite et mode d'action d'une pyocine antibiotique de *Ps. pyocyanea* Ann. Inst. Pasteur. Paris, 86, 149-70.
7. LIGHT, J. Y.; SUTHERLAND, J. M.; COCHRAN, M. L., and SUTORIUS, J. 1968. Ecologic relation between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* in a nursery population. New Engl. J. Med., 278, 1243-47.
8. LORIAN, V. 1975. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. Bull. N. Y. Acad. Med., 51, 1040-55.
9. SEMINIANO, E. N., and FRAZIER, W. C. 1966. Effect of *Pseudomonas* and *Achromobacteriaceae* on the growth of *Staphylococcus aureus*. J. Milk Food Technol., 29, 161-64.
10. TROLLER, J. A., and FRAZIER, W. C. 1963a. Repression of *Staphylococcus aureus* by food bacteria. I. Effect of environmental factors on inhibition. Appl. Microbiol., 11, 11-14.
11. TROLLER, J. A., and FRAZIER, W. C. 1963b. Repression of *Staphylococcus aureus* by food bacteria. II. Cause of inhibition. Appl. Microbiol., 11, 163-65.
12. ZYNSKIND, J. W.; PATTE, P. A., and LACHE, M. 1965. Staphylolytic substance from a species of *Pseudomonas aeruginosa*. Science, 147, 1458-59.

ESTUDIO DE LA FLORA BACTERIANA Y LEVADURAS DE DOS LIGNITOS ESPAÑOLES

P. CHAVARRIA y C. RUIZ-ALARES

RESUMEN

Se aislan e identifican cepas de bacterias y levaduras a partir de dos muestras de carbón de la cuenca de Teruel y de un abono orgánico comercial obtenido a partir de carbón.

SUMMARY

A study about two Spanish coals microflora (bacteria and yeasts)

Pure cultures of yeasts and bacteria were obtained and identified from two coal samples and one humic commercial fertilizer.

INTRODUCCION

Desde finales del siglo pasado (21, 22) se han realizado investigaciones sobre la posibilidad de que determinados microorganismos fuesen capaces de utilizar el carbón como fuente de carbono. Los primeros intentos efectuados en este tema (10, 27), al introducir fuentes de error en los tratamientos, dieron unos resultados positivos que no pudieron considerarse dignos de confianza y fueron rebatidos. De ciertos trabajos de Fischer y Fuchs (8) se pudo deducir con alguna seguridad que existía un crecimiento muy lento de un *Penicillium* a expensas del carbón en presencia de sales minerales. Posteriormente, se llevaron a cabo investigaciones rigurosas (23, 24) y se observaron crecimientos positivos de hongos tipo *Penicillium* y *Trichoderma* y de Actinomicetos en lignitos cuando había sales minerales y fuentes solubles de nitrógeno en el medio.

Asimismo, se han cultivado bacterias tipo *Azotobacter* (28) y de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, entre otros (19), en extractos acuosos de car-

bones (26) y productos de oxidación de los mismos, así como en ácidos húmicos (6, 9), bitúmenes (2, 29), extractos ácidos de nitración de antracitas, turbas (31), etc.

El estudio del ataque o crecimiento de microorganismos en el carbón tiene como fines primordiales los siguientes: obtención de proteína microbiana, aislamiento de sustancias antisépticas, conseguir un mejor conocimiento del origen del carbón, lograr la licuefacción del carbón en condiciones menos drásticas que las empleadas en los procedimientos químicos convencionales (18, 20), etc.

Todavía es dudoso, tanto la existencia de un ataque de los microorganismos a los carbones, quizás por su estructura físico-química, insolubilidad, impedimento estérico, presencia de antibióticos, etc., como el que la microflora encontrada en ellos sea indígena (13).

En el Instituto de Carboquímica se comenzó a trabajar sobre la microflora de carbones españoles con el objetivo final de obtener del carbón por medios microbiológicos proteína celular y/o productos que pudieran aprovecharse como fertilizantes orgánicos. Estos últimos se suponía que podrían obtenerse por oxidación del carbón, actuando como agentes oxidantes microorganismos descritos ya como tales y/o los aislados de los propios carbones. Los productos resultantes de la oxidación serían en gran parte, como ocurre en los procesos de oxidación por vía química, sustancias húmicas, cuya acción beneficiosa como mejoradoras y fertilizantes de suelos es sobradamente conocida (14, 17).

Se comenzó por el aislamiento e identificación de los posibles microorganismos: levaduras y bacterias presentes en lignitos españoles y en un fertilizante orgánico comercial fabricado a partir de carbón. Los mohos no se consideran en principio por presentar su estudio y manipulación problemas difíciles de superar.

Dada la índole de microbiología aplicada del trabajo tampoco se ha entrado en la polémica del posible carácter autóctono de las cepas aisladas.

MATERIAL Y METODOS

Muestras analizadas

Un carbón procedente de la cuenca de Utrillas (Teruel) (II), otro de la de Calanda (Teruel) (I) y un abono orgánico comercial obtenido a partir de carbón (Mo 80). En el *cuadro 1* se expresan sus características principales.

Cuadro 1. Análisis de las muestras utilizadas

Muestra	Humedad	Cenizas	Volátiles	C	H	N	S
H	8,67	33,08	25,39	40,85	4,11	0,79	1,94
I	25,00	12,94	30,29	44,19	5,73	0,57	3,75
M	22,68	10,87	35,63	39,82	3,26	4,30	0,55

Las muestras no fueron tomadas en condiciones estériles y estaban preparadas previamente para efectuar en las mismas los análisis correspondientes ($\varnothing$ part. $< 0,25$ mm y estabilizadas al aire).

Medios de aislamiento

La complejidad del substrato hizo necesario utilizar medios específicos para el aislamiento de los distintos microorganismos existentes en los carbones, adoptándose los a, b, d y e descritos por Jaschhof y Schwartz (12) y el plate count agar (11).

Aislamientos

Se siguieron las técnicas de expansión y agotamiento en placa. Como inóculo se emplearon suspensiones 1/100 de carbón en agua estéril.

Las placas sembradas se incubaron a 28 °C durante 48 h.

Obtención de cultivos puros

Las colonias se seleccionaron, según su morfología, por observación en lupa estereoscópica, de modo que en la colección estuvieran representadas las diferentes especies según su abundancia en las placas.

La conservación de los cultivos se realizó en el mismo medio en que se aislaron. La nomenclatura de las cepas se estableció: la primera letra indica la muestra de carbón de la que proceden y si proviene de una contaminación se utiliza la letra c; la segunda, el medio en que se han aislado, y el dígito, el número de orden que ocupan en la selección proporcional.

ESTUDIO TAXONOMICO

Se realizaron las necesarias pruebas morfológicas y fisiológicas.

En el estudio morfológico se consideraron los caracteres macro y microscópicos (*cuadros 2-3*). Se realizaron tinciones Gram y de esporas.

Cuadro 2

Colonia	Características microscópicas
Ha5	Rosa, brillante, opaca, abultada, puntual
Hb1	
Hb2	Blanco hueso, 2-4 mm ϕ
Hb3	
Hb4	Como corona seca o forma volcánica rugosa, 1 mm ϕ
Ha3	
Ha4	Amarillo pálido, redonda, abultada, brillante, borde liso, 1-1,5 mm ϕ .
Ma6	Amarillenta, irregular, alzada, 1 mm ϕ
A-2*	Amarillenta, irregular, alzada, 2 mm ϕ
Me7	
Me9	Abultada, brillante, transparente, borde liso, convexa, 0,5-2 mm ϕ
Me10	
cd4*	
cd5*	Crema, plana, extendida, brillante, 1-2 mm ϕ
cd6*	
cd7*	
B-1*	
B-2*	Blanco hueso, plana, borde ondulado, 2-3 mm ϕ
C-2*	
D-2*	Hueso, alzada, brillante, redonda, 1,5-2 mm ϕ
Id9	Brillante, plana, rosácea, borde ondulado, 2 mm ϕ
Id10	Brillante, plana, crema, borde ondulado, 2 mm ϕ
Ha11	Rosa, redonda, abombada, borde liso, 1,5 mm ϕ
Ha12	Redonda, blanda, blanca, borde ligeramente lobulado, 2-3 mm ϕ

Las pruebas fisiológicas se llevaron a cabo siguiendo el criterio y especificaciones del Bergey's Manual (3), de Harrigan y McCance (11), Skerman (30) y Difco Manual (7), para las bacterias. Por lo que respecta a las

Levaduras se siguieron las técnicas recomendadas por Lodder (16) y Capriotti (5).

Si en algún momento se reseñan pruebas según otros autores, se da la cita bibliográfica a continuación.

Las cepas marcadas con asterisco han sido aisladas como contaminaciones de cultivos de levaduras del género *Candida* en medio que contenía carbón como principal fuente de carbono. Se aislaron ante la posibilidad de que al crecer en tal medio fuesen capaces de provocar alguna transformación en el carbón o sustancias derivadas.

Al microscopio se pudieron apreciar las características morfológicas que recoge el cuadro 3.

Cuadro 3

Colonia	Características microscópicas
Ha5	Formas bacilares terminadas en forma de porra
Hb1	Formas bacilares gruesas, aisladas o en parejas, con formas triangulares, solas, en parejas y corpúsculos refringentes diminutos
Hb2	
Hb3	
Hb4	Bacilos finos, profusión de esporas sueltas, algunas dentro, centrales, terminales, $1,7 \times 0,6 \mu$
Ha3	Cocos aislados, parejas, cadenas
Ha4	
Ma6	Cocos
Me7	Bacilos esporulados, cadenas, flexuosos, finos, tenues, $4,5 \times 0,8 \mu$
Me9	
Me10	
cd4	Bacilos gruesos, largos, esporulados, aislados, cadenas, $4,6 \times 1,2 \mu$
cd5	
cd6	
cd7	
B-1	Bacilos esporulados, $4 \times 1,2 \mu$
B-2	
C-2	
D-2	Cocobacilos, aislados, parejas
A-2	Cocos, parejas
Id9	Levaduras esféricas, tamaño medio, en parejas o grupos multigemantes, con granulillos de grasa, propio de las rhodotorulas
Ha11	
Id10	Levaduras elípticas, forma de saco, aisladas, alguna pareja
Ha11	

Cuadro 4. Tinciones Gram y de esporas

Tinción	Ha5	Hb1 Hb2 Hb3	Hb4	Ha3 Ha4	Ma6	Me7 Me9 Me10	cd4 cd5 cd6 cd7	B-1 B-2	C-2	A-2
Gram	±	—	+	+	+	—	+	+	+	+
Esporas	Nt	Nt	+	—	—	+	+	+	+	—

Nt = prueba no realizada.

Cuadro 5. Estudio fisiológico de las cepas Ha5, Hb1, Hb2 y Hb3

Prueba	Ha5	Hb1 Hb2 Hb3
Utilización malonato	—	—
Fenilalanina	—	—
Fosfatasa	—	—
NaCl 5 ‰	—	—
Rojo de metilo	—	—
Klieger	SH ₂	—
	glucosa	+
	lactosa	—
	xilosa	+
Fermentación de	sacarosa	—
	lactosa	—
	maltosa	+
	sorbitol	—
	inositol	—
Indol	—	—
Pigmentos	R	—
Movilidad	(+)	+
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	—
Utilización citrato (Kosser)	—	—
Reducción nitratos (Griess)	—	—
Acido de manitol	—	+
Hidrólisis almidón	+	+
Voges-Proskauer (Mod. Barrit)	—	—
65°	—	—
40°	—	+
50°	—	—

W = débil. R = rosa. (+) = dudosa.

Cuadro 6. Pruebas fisiológicas. Bacilos (4)

Prueba	Hb4	Me7	Me9	Me10	cd4	cd5	cd6	cd7	B-1	B-2	C-2
Acido de glucosa	+	+°	+°	+°	+	+	+	+	+	+	+
arabinosa	+	+°	+°	+°	-	-	-	-	-	-	-
xilosa	+	+°	+°	+°	-	-	-	-	-	-	-
manitol	+	+°	+°	+°	-	-	-	-	-	-	-
Acetoina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d
NaCl 7 ‰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sabouraud caldo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
dextrosa agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcali de citratos	+	-	-	-	d	+	d	d	d	+	+
coseína	-	+	+	+			+			+	+
Hidrólisis de gelatina	-	+	+	+							
almidón	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hipurato (25)	+										
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos a nitritos (Griess)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina	-	-	-	-							
Dihidroxiacetona	+	+	+	+							
Esporas forma	E	E	E	E	E	E	E	E		E	E
(según distensión esporangio	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Wirtz) posición	C	C	C	C	C	C	C	C		C	C

° = rotura medio E = elíptica C = central.

Cuadro 7. Pruebas fisiológicas. Cocos

Prueba	Ma6	A-2	Ha3	D-2	Ha4	cd2	cd3
Acido de glucosa (1)							
aerobico (1)	-	-	+	+	+	-	-
anaerobico (1)	-	-	+	+	+	-	-
Fosfatasa (1)	-	-	-	-	-	-	-
Acetoina (1)	-	-	+	+	+	-	-
arabinosa (1)	-	-	-	-	-	-	-
lactosa (1)	-	-	-	+	-	-	-
Acido de maltosa (1)	-	-	-	-	-	-	-
xilosa (1)	+	+	-	+	-	-	-
manitol (1)	-	-	-	-	-	-	-
NH ₃ de arginina	-	-	-	-	+	-	-
Indol (Ehrlich-Böhme's)	-	-	-	-	-	-	-
Nitratos (Griess)	-	+	+	+	+	-	-

Cuadro 8. Pruebas fisiológicas. Levaduras

	Id9	Id10	Ha11	Ha12
Fermentación	—	—	—	—
Escisión de arbutina	+	+	+	+
glucosa	+	+	+	+
galactosa	+	—	+	—
maltosa	+	—	+	—
sacarosa	+	—	+	—
lactosa	—	—	—	—
inositol	—	—	—	—
melibiosa	—	—	—	—
ramnosa	—	—	—	—
Asimilación de trealosa	+	—	+	—
eritritol	—	+	—	+
manitol	—	+	—	+
xilosa	+	—	+	—
celobiosa	+	+	+	+
salicina	+	+	+	+
melecitosa	+	—	—	—
rafinosa	+	—	+	—
nitratos	—	—	—	—
Fluidización de gelatina	—	+	—	+
Hidrólisis del amidón	—	—	—	—

Cuadro 9

Cepa	Especie
Hb4	<i>Bacillus pumilus</i>
Me7	
Me9	<i>B. polymyxa</i>
Me10	
cd4	
cd5	
cd6	
cd7	<i>B. cereus</i>
B—1	
B—2	
C—2	
Ma6	
A—2	<i>Micrococcus Cohn 7</i>
Ha3	
D—2	<i>Staphylococcus</i> Rosenbach VI
Ha4	<i>Staphylococcus</i> Rosenbach IV
Hb1	
Hb2	<i>Metallogenium personatum</i>
Hb3	
Ha5	<i>Corynebacterium</i> no patógeno
Id9	
Ha11	<i>Rhodotorula rubra</i>
Id10	
Ha12	<i>Candida lipolytica</i> var. <i>deformans</i>

Los resultados de las tinciones Gram y de esporas se resumen en el *cuadro 4*.

ESTUDIO FISIOLÓGICO

Tomando como base el estudio morfológico efectuado se verificaron las pruebas fisiológicas indicadas en los *cuadros 5-8*.

Del estudio de las pruebas morfológicas y fisiológicas se han clasificado las cepas aisladas como se indica en el *cuadro 9*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a J. Fernández Somavilla y N. Khayyat, del I. F. I., su asesoramiento en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. BAIRD-PARKER. 1966. Identification Methods for Microbiologists. Part A, 59-63.
2. BROOKS, J. S., and SMITH, J. W. 1966. Microbiological oxidation of a coal tar fraction. Aust. J. Chem., 19, 1987-89.
3. BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. 1974 a. Berbey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
4. BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. 1974 b. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 521-44. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
5. CAPRIOTTI, A. 1955. The sugar assimilation test by yeast. Biochim. Appl., 2, 31-46.
6. DAVIES, C., and SCULLY, D. B. 1974. Aerobic microbiological degradation of coal derived humic acid at 30 °C. Fuel, 53, 282.
7. Difco Manual. 1971. Difco Laboratoires, Detroit.
8. FISCHER, F., und FUCHS, W. 1927. Über das Wachstum von Pilzen auf Kohle. Brennst.-Chem., 8, 293-95.
9. FUCHS, J.; FUCHS, M., and REID, J. J. 1942. Biological decomposition of hidrocarboxylic acids obtained from bituminous coal. Fuel, 21, 96-102.
10. GALLE, E. 1910. Über Selbstentzündung der Steinkohle. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk., 28, 461-73.
11. HARRIGAN, W. F., and MC. CANCE, M. E. 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, London, New York.
12. JASCHHOFF, H., und SCHWARTZ, W. 1969 a. Untersuchungen zur Geomikrobiologie der Braunkohle. I: Die Microben-Assoziationen eines Braunkohlenflözes. Z. Allg. Mikrobiol., 9, 103-19.
13. JASCHHOFF, H., und SCHWARTZ, W. 1969 b. Untersuchungen zur Geomikrobiologie der Braunkohle II: Verhalten von Bakterienstämmen aus Braunkohle gegenüber höheren hydrostatischen Drucken und ihre biochemische Aktivität. Z. Allg. Mikrobiol., 9, 347-61.

14. JUAN-MAINAR, R. 1980. Contribución a la química de los ácidos húmicos. VII: Estudio de la interacción arcilla-ácidos húmicos. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza.
15. LIESKE, R., und HOFFMAN, E. 1928. Untersuchungen über die Mikrobiologie der Kohlen und ihrer natürlichen Lagerstätten, II. Die Mikroflora der Steinkohlengruben. Brennst.-Chem., 9, 282-85.
16. LODDER, J. 1974. The Yeasts. North Holland Publishing Co., Amsterdam, Oxford.
17. MOLINER, R. 1980. Contribución a la química de los ácidos húmicos. VIII: Estudio de los derivados nitrados de los ácidos húmicos. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza.
18. MORRIS, E. O., and OLEJNIK, I. 1968. Preliminary microbiological studies on the utilization of coal or coal products. Int. Conf. Coal Sci. Pap., 7th, Praga, 3 45 1 - 3 45 5.
19. PÁCA, J., and GRÉG, V. 1977. Utilization of coal oxidation products by bacteria. I. Process. Biochem., 12, 14-17.
20. PONSFORD, A. P. 1966. Microbiological activity in relation to coal utilization. II. Coal and hydrocarbons. Brit. Coal Util. Res. Ass. Mon. Bull., XXX, 41-70.
21. POTTER, M. C. 1908. Bacteria as agents in the oxidation of amorphous carbon. Proc. Royal Soc. Ser. B, 80, 239-59.
22. RENAULT, B. 1895. Recherches sur les bactériacées fossiles. Ann. Sci. Natur. Bot., ser. 8, vol. 2.
23. ROGOFF, M. H., and WENDER, I. 1963. Materials in coal inhibitory to the growth of the microorganism. U. S. Bur. Mines. Rep. Invest., 6279.
24. ROGOFF, M. H.; WENDER, I., and ANDERSON, R. B. 1962. Microbiology of coal. U. S. Bur. Mines. Inform. Cir., 8075.
25. ROGOSA, M.; WISEMAN, R. F.; MITCHELL, I. A., and DISRAELI, M. N. 1953. Species differentiation of oral lactobacilli from man including description of *Lactobacillus salivarius* new spec. and *Lactobacillus cellobiosus* new spec. J. Bacteriol., 65, 681-99.
26. ROSE, M. J.; CAROSELLA, J. M.; CORRICK, J. D., and SUTON, J. A. 1970. Protein by growth of microorganisms on a water extracts of coal. U. S. Pat. 35 40 983 (CL. 195-28).
27. SCHROEDER, H. 1924. The bacterial content of coal. Zentralbl. Bakteriell. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1, 41, 460-69.
28. SEVCIK, V. 1952. Growth of *Azotobacter* on a coal dust. Cesk. Biol., 1, 115-18.
29. SILVERMAN, M. P.; GORDON, J. N., and WENDER, I. 1966. Food from coal derived materials by microbial synthesis. Nature, 211, 735-36.
30. SKERMAN, V. B. D. 1967. A Guide for the Identification of the Genera of Bacteria Williams and Wilkins Co., Baltimore.
31. YAKOVLEV, V. I.; BIEKOKRÝLOV, G. A., y PROSKURIAKOV, V. A. 1973. Oxidación microbiana de combustibles sólidos de la minería para biosíntesis. Khim. Tverd. Topl., 2, 3-12.

CLONACION MOLECULAR EN STREPTOMYCES

J. E. SUAREZ

I N D I C E

	Página
<i>Importancia de Streptomyces dentro de los organismos procarióticos</i>	53
<i>Ventajas de un sistema de clonación en Streptomyces</i>	55
<i>Sistemas de transformación-transfección en Streptomyces</i>	56
 <i>Vehículos de clonación en Streptomyces</i>	 58
<i>Vehículos de clonación plasmídicos</i>	59
1) <i>Plásmidos del grupo SLP 1</i>	59
2) <i>SCP 2</i>	62
3) <i>pIJ 101 y vectores derivados de él</i>	64
<i>Vehículos de clonación bacteriofágicos</i>	66
1) <i>Propiedades del bacteriófago ØC 31 relevantes en clonación</i>	66
2) <i>Obtención de mutantes con delecciones</i>	67
3) <i>El híbrido ØC 31::pBR 322</i>	68
4) <i>Vectores derivados de ØC 31::pBR 322</i>	69
5) <i>Vector ØC 31::pBR 322 ΔW 12</i>	70
6) <i>Vector ØC 31::pBR 322 ΔW 17</i>	70
<i>Perspectivas de la clonación en Streptomyces</i>	71
<i>Referencias</i>	73

IMPORTANCIA DE STREPTOMYCES DENTRO DE LOS ORGANISMOS PROCARIOTICOS

Los organismos incluidos dentro del género *Streptomyces* son bacterias que presentan una serie de características notables, como son la de poseer un ciclo de vida en el que existen verdaderos procesos de diferenciación celular, ser productores de, prácticamente, el 60 % de los 5.000 antibióticos conocidos (3) y participar activamente en los ciclos geoquímicos al ser uno de los géneros más directamente implicados en la humificación de la materia orgánica.

El ciclo de vida de un *Streptomyces* tipo comienza con la germinación de una espora, la cual colocada en condiciones adecuadas sufre una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que desembocan en la emisión de un tubo germinativo (21). Este tubo crece y origina hifas septadas que se ramifican y que en el caso de encontrarse sobre un substrato sólido, tienden a introducirse en él, o bien se agregan y forman «bolas» de micelio si el cultivo se hace en medio líquido. Este conjunto de hifas recibe el nombre de micelio vegetativo o substrato y su función es eminentemente asimilatoria, constituyendo una adaptación notable al crecimiento sobre medios sólidos de difícil degradación (18).

En el caso de cultivos creciendo en medio sólido, se van a desarrollar sobre el micelio substrato una serie de hifas perpendiculares a él, cuyo conjunto constituye el micelio aéreo. Sobre éste se formarán esporas en cadenas por septación de las hifas aéreas (20). El micelio aéreo representa una de las adaptaciones a la sequedad más notable de entre los organismos procarióticos y constituye un caso interesante de convergencia evolutiva entre estas bacterias y los mohos, los cuales, al ocupar prácticamente los mismos nichos ecológicos que los *Streptomyces*, han recurrido a soluciones adaptativas semejantes.

El proceso de esporulación o la detención del crecimiento vegetativo en los cultivos crecidos en medio líquido, supone un cambio total de la actividad biosintética de *Streptomyces*, de modo que estas circunstancias parecen actuar como señales activadoras del metabolismo secundario del microorganismo, que empieza a sintetizar, y en muchos casos excretar, metabolitos, de los que algunos presentan interés industrial. La amplitud de su metabolismo secundario se manifiesta no sólo por la enorme cantidad de diferentes antibióticos y otras sustancias de interés que el microorganismo produce como género, sino, sobre todo, por la capacidad de una cepa determinada de producir varios antibióticos no relacionados estructuralmente, así como la de producir una serie de sustancias similares, pero con pequeñas variaciones entre sí, cuyo conjunto constituye una «familia de compuestos».

Con respecto a la importancia ecológica de *Streptomyces* en la degradación de la materia orgánica, ya quedó apuntada su adaptación a la fijación y crecimiento sobre medios sólidos, a la que se une la posibilidad de biosintetizar un impresionante conjunto de exoenzimas hidrolíticas que incluyen proteasas, amilasas, lipasas y nucleasas. Un dato anecdótico sumamente gráfico, relativo a la abundancia de los estreptomicetos en el suelo, es que el olor típico de la tierra húmeda se debe a la excreción por estos microorganismos de una sustancia volátil denominada geosmina (19).

VENTAJAS DE UN SISTEMA DE CLONACION EN *STREPTOMYCES*.

De las características de *Streptomyces* señaladas anteriormente, se deduce la importancia que tiene la manipulación genética de los organismos de este género, ya que puede facilitar una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que conducen a su diferenciación celular y a la vez, permitir el desarrollo de proyectos de mejora de cepas productoras de metabolitos de interés aplicado. Afortunadamente, prácticamente todos los métodos clásicos utilizados en el análisis genético de los procariontes están desarrollados en *Streptomyces*; así, es fácil obtener mutantes por tratamiento de las esporas, que son uninucleadas, con agentes físicos o químicos (26). Por otro lado, el intercambio de ADN entre cepas distintas se puede llevar a cabo mediante varios procesos, como conjugación mediada por plásmidos (26) y transducción mediante bacteriófagos (46). En los últimos años se han desarrollado además métodos de fusión de protoplastos en presencia de polietilenglicol (28) y de transformación de protoplastos con ADN cromosómico incluido en liposomas (36).

Por otra parte, la revolución que para el análisis genético supuso la utilización de la metodología de ADN recombinante, hizo plantearse la posibilidad de desarrollar en *Streptomyces* un sistema similar al introducido inicialmente en *Escherichia coli*. Este sistema podría ofrecer ventajas evidentes, puesto que podría hacer susceptibles de análisis y manipulación a cepas resistentes a los procesos clásicos de intercambio de ADN y a la vez, potencialmente, podría ser un mecanismo de incremento de producción de sustancias de interés, mediante la clonación de genes clave de rutas biosintéticas en plásmidos multicopia o colocando los genes clonados bajo el control de promotores eficientes. Se podría incluso dar origen a la biosíntesis de antibióticos modificados, de forma que adquirieran nuevas propiedades de interés.

Ahora bien, el desarrollo de un sistema de clonación tiene varias exigencias; en primer lugar, requiere de la existencia de replicones autónomos de pequeño tamaño, típicamente plásmidos o bacteriófagos, que actúen como vectores de ADN heterólogo que pretendemos clonar, y que lo perpetúen en la célula receptora como parte de sí mismos. Estos replicones han de cumplir una serie de requisitos, como son poseer lugares de restricción para alguna endonucleasa específica, únicamente en zonas no esenciales para su viabilidad, y codificar alguna propiedad por la que sea posible la selección de las células que los han adquirido. Es, por otra parte, deseable que el vec-

tor tenga lugares únicos de restricción en algún gen con expresión fenotípica evidente, para que la inserción de un fragmento de ADN en ese punto, al interrumpir la continuidad del gen, anule dicha expresión y así podamos seleccionar entre los clones que han adquirido el replicón, aquellos que poseen una inserción de ADN heterólogo.

Otra exigencia de un sistema de clonación es la permeabilización de las células huésped, de modo que el vector pueda ser introducido de forma eficiente en el citoplasma celular mediante un proceso de transformación, que en el caso especializado de un vector bacteriofágico recibe el nombre de transfección.

SISTEMAS DE TRANSFORMACION-TRANSFECCION EN *STREPTOMYCES*

Aunque en algunas especies de *Streptomyces* es posible alcanzar un grado notable de competencia en células en fase exponencial tardía (33, 41), la mayoría de los experimentos de incorporación de ADN se han realizado con protoplastos. Históricamente, el primero en utilizarlos fue Okanishi (36), que empleó *Streptomyces kanamyceticus* como receptor de ADN del bacteriófago PK-66 en un proceso cuya eficiencia no puede ser cuantificada, por haber continuado la incubación en medio líquido de los protoplastos transfectados, durante un período muy largo de tiempo.

Actualmente, los métodos usados en transformación (6) y en transfección (34, 47), permiten la detección individualizada de los protoplastos que han incorporado ADN exógeno, puesto que inmediatamente después de completado el proceso se siembran en medio sólido de regeneración, en el cual aparecerán como colonias que han adquirido las propiedades codificadas por el plásmido en el primer caso, o como placas de lisis en el segundo (en este segundo caso los protoplastos se incluyen en una capa de agar semisólido, según el procedimiento usual de cultivo de virus). Esto implica que en el caso de la transformación es necesaria la regeneración de los protoplastos; sin embargo, la transfección puede ser realizada incluso con cepas incapaces de regenerar, puesto que, a los medios sólidos en que se siembran los protoplastos, pueden añadirse también esporas de una cepa indicadora, sensibles al bacteriófago cuyo ADN se utilizó en la transfección, de manera que la progenie vírica que se origina a partir del protoplasto transfectado pueda seguir su desarrollo y producir placas de lisis visibles.

Los métodos de transformación y transfección son muy similares. En am-

En ambos casos se utiliza polietilenglicol como mediador de la incorporación de ADN a los protoplastos, existiendo proporcionalidad directa entre la cantidad de ADN utilizada y el número de transformantes-transflectantes que se obtienen. Esto indica que, al menos en las cepas ensayadas, las nucleasas intracitoplasmáticas no suponen una barrera efectiva a la penetración de ADN exógeno. Esta proporcionalidad se observa incluso a concentraciones muy altas de ADN en transformación y en algunas combinaciones protoplasto-ADN bacteriofágico en transfección; sin embargo, en otras se alcanza una saturación del sistema, y así el incremento de la concentración de ADN bacteriofágico no se corresponde con un aumento en el número de transflectantes, de modo que parece existir, en estos casos, una subpoblación de protoplastos competentes, mientras el resto sería resistente a la infección por ADN exógeno (figura 1) (47, 49).

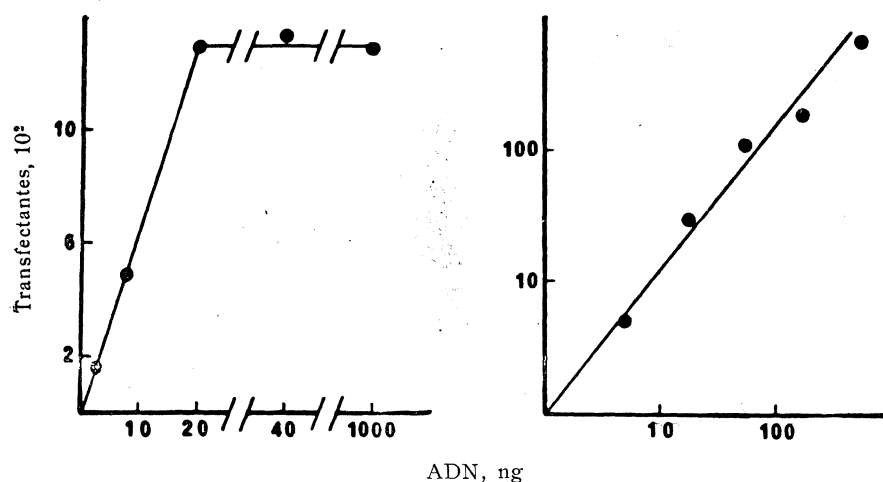


Figura 1. Diferente efecto de la concentración de ADN bacteriofágico sobre la frecuencia de transfección en función del sistema ADN/protoplasto. a) ADN del bacteriófago VP 5 con protoplastos de *S. coelicolor*. b) ADN de ØC 31 con protoplastos de *S. lividans* 66 (49)

La incorporación de ADN por los protoplastos es un proceso muy rápido que se completa en menos de un minuto, existe competencia para la penetración por ADN heterólogo, es dependiente de la concentración de iones divalentes del medio y es efectiva tanto con ADN lineal como con ADN circular abierto o superenrollado (47).

Tanto en la transformación como en la transfección es importante el estado fisiológico de las células de que proceden los protoplastos. Así, hay cepas, como *Streptomyces lividans* 66, cuyos protoplastos son competentes

casi independientemente del estado de las células de que se originaron, aunque parece existir un máximo de competencia si las células están en fase logarítmica tardía (50). En otros casos, como en *S. parvulus*, sólo se observa transfección cuando los protoplastos proceden de cultivos muy jóvenes, y lo mismo ocurre con *S. albus* G, tanto en transfección como en transformación (49).

Las frecuencias típicas son de alrededor de $1,6 \cdot 10^{-4}$ transformantes/molécula de ADN del plásmido SLP 1.2 (véase sección siguiente) y de $2 \cdot 10^{-5}$ transfectantes/molécula de ADN del bacteriófago ØC 31 (sistemas en que no se ha observado saturación por la concentración de ADN) (25, 49). Estas frecuencias, aunque son suficientes para muchos experimentos de clonación, son sin embargo relativamente bajas para experimentos en que se requiera la clonación de genes a partir del ADN total de un organismo (shot-gun cloning), sobre todo en el caso de que el vector sea bacteriofágico. Por ello, se ha desarrollado una técnica en la que se emplean liposomas vacíos de pequeño tamaño como «transportadores» de ADN. De este modo, en condiciones óptimas, utilizando liposomas cargados positivamente con esteárilamina, se obtienen frecuencias de transfección de $2 \cdot 10^{-3}$ transfectantes/molécula de ADN de ØC 31 y de $3 \cdot 10^{-4}$ transformantes/molécula de SLP 1.2. El hecho de que la concentración óptima de polietilenglicol en este proceso (60 %) coincida con la encontrada en la fusión de protoplastos (28) parece indicar que las interacciones membrana-membrana juegan un papel importante en la estimulación (40).

VEHICULOS DE CLONACION EN *STREPTOMYCES*

Como dijimos anteriormente, un vehículo de clonación debe ser una molécula de ADN pequeña, capaz de autorreplicarse autónomamente en el citoplasma de la célula huésped; por tanto, las moléculas utilizables como vectores son plásmidos, bacteriófagos o híbridos de ellos. Así pues, en los siguientes apartados nos referiremos a las características de los plásmidos y los bacteriófagos de *Streptomyces* que han sido, o que pueden ser usados en un futuro próximo como vectores, así como de las modificaciones de su información genética, introducidas habitualmente por manipulación *in vitro*, para ampliar su utilidad.

Vehículos de clonación plasmídicos

En los últimos años han aparecido multitud de artículos comunicando el descubrimiento y caracterización de plásmidos en diferentes especies del género *Streptomyces* (1, 23, 32, 38). Se han adscrito funciones a algunos de estos plásmidos y además se han sugerido como plasmídicas una serie de funciones más o menos inestables, con capacidad de reversión extraordinariamente baja o inexistente, como serían la producción y/o resistencia a algunos antibióticos, la capacidad de producción de pigmentos y enzimas exocelulares y también funciones de diferenciación (11, 24).

Sin embargo, hasta el momento actual, los únicos plásmidos que han sido empleados en clonación o en la construcción de vectores, son los capaces de replicarse en *Streptomyces coelicolor* A 3 (2) o en cepas relacionadas con él, como *S. lividans* 66. Este interés se deriva del hecho de que existe un buen conocimiento de la genética de este organismo (16, 26) y existen multitud de mutantes en propiedades importantes, que podrían ser utilizados como receptores para posibles genes clonados, de modo que fuesen fácilmente identificables y en los que se podrían estudiar sus funciones.

Dentro de estos plásmidos, nos referiremos aquí especialmente a tres, SCP 2, SLP 1.2, pIJ 101 y a sus derivados.

Todos ellos son plásmidos conjugativos que presentan una propiedad común denominada «zigosis letal» (4), por su similaridad con el fenómeno de igual nombre observado en *Escherichia coli* (45). En este proceso, las colonias portadoras de plásmido, crecidas sobre un césped de la misma cepa carente de él, provocan en ésta un retraso en el crecimiento, de modo que alrededor de aquellas colonias aparecen zonas de inhibición, facilitando de este modo la selección de las cepas que contienen el plásmido. Esta propiedad es importante en clonación, puesto que permite seleccionar aquellas células que han adquirido el vector por transformación, del resto del cultivo. Ahora bien, estos plásmidos no poseen ninguna otra propiedad seleccionable, por lo que los primeros experimentos de clonación llevados a cabo con ellos, fueron precisamente para introducirles nuevas marcas seleccionables y así hacerlos más útiles como vectores.

1) Plásmidos del grupo SLP 1

Esta serie de plásmidos fue descubierta como consecuencia de cruces interespecíficos entre *Streptomyces coelicolor* y *S. lividans* 66, al observarse

que las colonias de *S. lividans* de la progenie expresaban el fenotipo zigosis letal cuando crecían sobre *S. lividans* 66. Aunque en un principio se pensó que estos plásmidos eran originarios de *S. lividans* (de ahí su denominación), hoy está claro que su origen es *S. coelicolor*, en el cual están integrados en su cromosoma de forma estable (7). El análisis de clones distintos, que originaban zonas de inhibición distintas entre sí, reveló que existía toda una serie de plásmidos de tamaños diferentes, aunque todos ellos con una porción común, de modo que cada plásmido incluía en su ADN la totalidad del ADN de los plásmidos de tamaño inferior al suyo. A esta «familia» de plásmidos se la denominó SLP 1.1, SLP 1.2, y así sucesivamente. Por obtención de mutantes incapaces de inducir zigosis letal en *S. lividans* 66, se pudo demostrar que SLP 1 está normalmente integrado en el cromosoma de *S. coelicolor*, de donde se puede liberar llevándose porciones variables de las secuencias cromosómicas adyacentes, que por definición son innecesarias para la viabilidad del plásmido, de modo que los lugares de restricción existentes en estos fragmentos podrían ser utilizados en clonación.

Por esta razón, aunque los plásmidos tienen un rango de huésped muy restringido (25), se escogió el miembro mayor de la familia, SLP 1.2 (*figura 2*), como posible vehículo de clonación, puesto que presenta un solo lugar de restricción para Bam HI y tres para Pst I, todos ellos localizados en el fragmento cromosómico. Este plásmido fue usado por Thompson y colaboradores (52) para clonar en él resistencias a neomicina, mediadas por una acetiltransferasa y por una fosfotransferasa presentes en *Streptomyces fradiae* y también la resistencia a la tioestreptona, mediada por una metilasa de las pentonas de ARN ribosómico, procedente de *S. azureus*. Posteriormente, los mismos autores clonaron también la resistencia a viomicina de *S. vinaceus* (50-51, 53). Gracias a estos experimentos fue posible obtener nuevos vectores de clonación, como pIJ 41 (*figura 3*) que además de poseer todas las secuencias de ADN procedentes de SLP 1.2 que codifican para replicación del plásmido, como estabilidad, transmisibilidad y capacidad de originar zigosis letal, lleva los genes de resistencia a neomicina y tioestreptona que pueden ser usados como agentes selectores de las células que han sido transformadas. Por otro lado, este plásmido posee un solo lugar de restricción por Bam HI, que se encuentra en el gen de resistencia a la neomicina, de modo que si se utiliza ese lugar en clonación, es posible seleccionar aquellas células que han adquirido el plásmido (son resistentes a tioestreptona) con una inserción (son sensibles a neomicina, al haberse roto la continuidad del gen responsable de la resistencia al antibiótico). Además, hay multitud de otras enzimas de restricción utilizables para clonación en

pIJ 41; así, Xho I, Sph I, Xba I, Eco R I y Bcl I poseen lugares únicos de corte en lugares no indispensables; Sst I, Pst I y Kpn I eliminan fragmentos no necesarios, produciéndose además sensibilidad a neomicina en el caso de las dos primeras enzimas (17, 25).

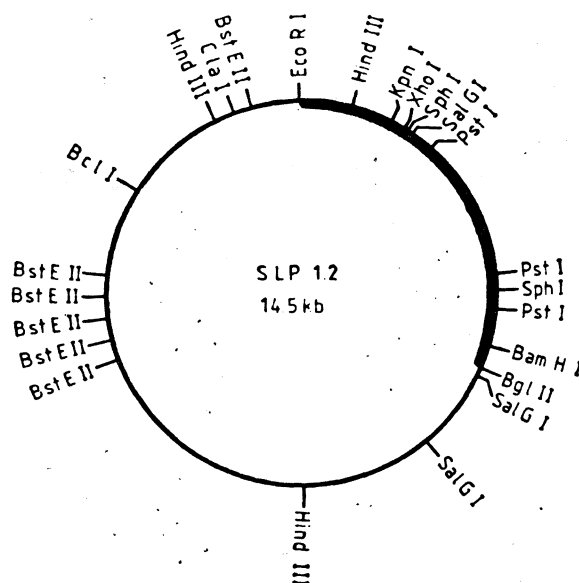


Figura 2. Mapa de restricción del plásmido SLP 1.2. En trazo fino se representa la porción común a todos los plásmidos de la familia SLP 1. En trazo grueso, el segmento cromosómico, producto de su excisión del cromosoma de *S. coelicolor*

Otro vector de clonación, derivado de SLP 1.2 y con un interés especial es pIJ 28, que es bifuncional, en el sentido de que es capaz de replicarse tanto en *Streptomyces* como en *Escherichia coli*. Este vector contiene además de la secuencia de ADN correspondiente a SLP 1.2, el gen fosfotransferasa de resistencia a neomicina de *S. fradiae* (insertado en su lugar Bam HI) y el plásmido pBR 322 fusionado por su lugar Bam HI con el sitio Bcl I del plásmido SLP 1.2 (50). Otros replicones bifuncionales plasmídicos de interés, son los obtenidos por Schottel y colaboradores (42), mediante la utilización del plásmido SLP 111 (5) que contiene, además de secuencias de SLP 1.2, el gen de resistencia a metilenomicina (procedente del plásmido SCP 1 de *S. coelicolor*) (31). En este trabajo se ligó SLP 111 con los plásmidos de *E. coli* pACYC 184, que codifica para resistencia al cloranfenicol,

A circular map of the plasmid pIJ 41, which is 148 kb in size. The map shows various restriction enzyme sites around the circle. Starting from the top and moving clockwise, the sites are: Hind III, EcoRI, ClaI, BstE II, BclI, BamHI, SstI, PstI, SalGI, BglII, XbaI, BamHI/BclI, ClaI, SalGI, Hind III. A neo gene is located between the BamHI and PstI sites, and a thio gene is located between the SalGI and BamHI sites.

tencia a cloranfenicol o kanamicina en *S. lividans*, de modo que así, genes de un organismo gram-negativo son expresados en un gram-positivo.

Estos vectores bifuncionales, que constituyen toda una serie de moléculas capaces de replicarse y mantenerse de forma estable, tanto en *Streptomyces* como en *Escherichia coli* y cuyo primer representante fue el híbrido del bacteriófago ØC 31 con pBR 322 (48, véase más adelante), tienen una serie de aplicaciones posibles, como son el estudio de la expresión genética en sistemas heterólogos, la clonación de genes en un huésped que podrían resultar letales para el otro y la posibilidad de utilizar en ADN de *Streptomyces* la tecnología avanzada existente en *E. coli*, como la mutagénesis por transposones o la fusión de genes (25).

2) SCP 2

SCP 2 es un plásmido de aproximadamente 30 Kb, que fue descubierto por Schrempf (43) en *Streptomyces coelicolor* A 3 (2). Actúa como un fac-

tor sexual y confiere el fenotipo de inducción de zigosis letal a las células que lo poseen (4). El número de copias por genoma es pequeño, entre una y cinco, y su rango de huésped es bastante estrecho, estando restringido por el momento a *S. coelicolor*, *S. lividans* y *S. parvulus* (4, 44). Existe una variante genética de este plásmido, SCP 2*, que a pesar de no ser distinguible del parental por métodos físicos, presenta un mayor grado de fertilidad y tiene mayor expresión del fenotipo zigosis letal (4). Por esta razón se escogió esta variante como posible vehículo de clonación para *S. coelicolor* A 3 (2).

El plásmido (figura 4) posee lugares únicos de restricción para Eco R I y Hind III que pueden ser utilizados en clonación y además cuatro lugares de corte para Pst I y cinco para Bam HI, de modo que el fragmento mayor que se obtiene de la restricción en ambos casos, proporciona, una vez ligado e introducido en la célula, plásmidos funcionales aunque inestables (5).

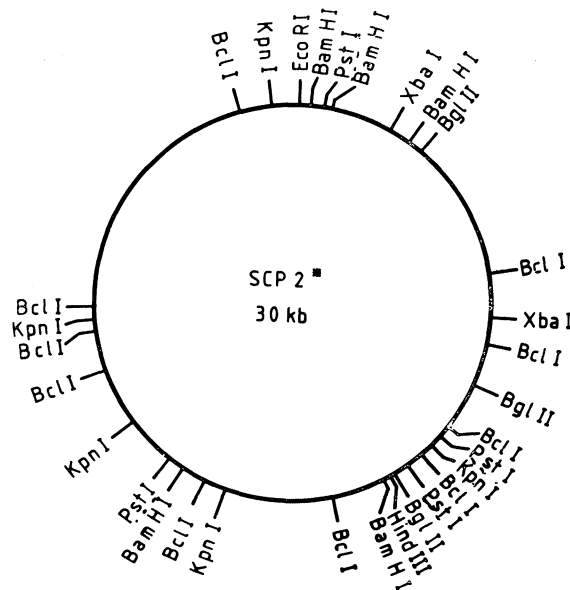


Figura 4. Mapa de restricción del plásmido SCP 2* (16)

Como en el plásmido no se había detectado ninguna marca seleccionable aparte de la zigosis letal, se le introdujo, mediante clonación de genoma total (shot-gun cloning), un gen de resistencia a metilenomicina, que como dijimos antes se encuentra en otro plásmido de *Streptomyces*, que sólo muy recientemente ha podido ser aislado (1). Al ser el sistema homólogo se aseguraba la expresión de dicho gen (5). Los plásmidos híbridos que se obtu-

3) *pIJ 101* y *vectores derivados de él*

midos con un alto número de copias o de amplio rango de huésped en especies del grupo de *S. violaceoruber*, al cual pertenece *S. coelicolor* A 3 (2). Presenta un enorme potencial como vector de clonación, así posee un rango

de huésped extraordinariamente amplio (13 de 18 cepas, muchas de ellas no relacionadas con *S. coelicolor*, son transformadas eficientemente por este plásmido), su número de copias es siempre superior a 50, siendo además un plásmido conjugativo, que confiere el fenotipo zigosis letal y que promueve recombinación cromosómica con alta frecuencia, tanto en *S. lividans* 66 como en *S. coelicolor* A 3 (2).

A partir de él se han construido una serie de vectores, de los que la mayoría son no transmisibles para evitar la superinfección de los clones, conteniendo genes de resistencia a uno, dos o incluso los tres antibióticos tioestreptona, viomicina y neomicina. Estas inserciones han servido además para situar el plásmido en el mapa genético, y así se sabe que los genes responsables de la conjugación ocupan tan sólo 2,1 Kb, siendo probablemente menor aún el tamaño mínimo del replicón plasmídico (30).

También se han construido a partir de él vectores bifuncionales, de los que pIJ 361 es un ejemplo notable (figura 6). Este vector posee la totalidad de pBR 322 clonado en su sitio Bam HI, por lo que conserva el gen de resistencia a la ampicilina para selección en *Escherichia coli*; además posee el gen de resistencia a la tioestreptona de *Streptomyces azureus* para selección

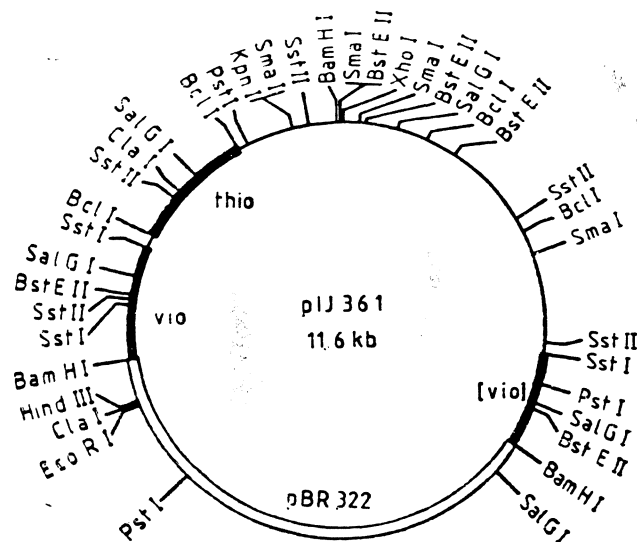


Figura 6. Mapa de restricción del plásmido pIJ 361 (30). Los segmentos correspondientes a las resistencias a tioestreptona y a viomicina se representan con trazo grueso. pBR 322 se insertó en el segmento que lleva la resistencia a la viomicina aunque sin inactivarla

en *Streptomyces* y el de resistencia a viomicina (de *S. vinaceus*) que se expresa en ambos huéspedes (30, 50).

Vehículos de clonación bacteriofágicos

1) Propiedades del bacteriófago ØC 31 relevantes en clonación

En *Streptomyces* existen multitud de bacteriófagos, tanto virulentos como temperados, que podrían ser usados potencialmente en la formación de vectores de clonación.

Sin embargo, prácticamente todo el trabajo realizado en este sentido se ha llevado a cabo con ØC 31, un bacteriófago temperado perteneciente al grupo dos de la clasificación de Bradley (8), que posee una molécula de ADN en cadena doble de 41 Kb y que presenta extremos cohesivos. Muy recientemente (29) se ha descrito la utilización de un segundo bacteriófago, R 4, como receptor de ADN extraño. Las características fundamentales de la fisiología y genética de ØC 31 han sido objeto de una revisión reciente (35). Las razones de la utilización de ØC 31 se basan en que es un bacteriófago con un rango de huésped muy amplio, capaz de lisogenizar muchas cepas, incluyendo ciertos derivados de *Streptomyces coelicolor*, cuya organización génica se conoce bastante bien y sobre todo que es el bacteriófago a partir del cual se obtiene una mayor frecuencia de transfección de protoplastos de diferentes *Streptomyces*.

Ahora bien, aunque el bacteriófago presenta una serie de propiedades que le hacen atractivo como vector de clonación, su mapa de restricción no es ciertamente el más adecuado (figura 7). Así, sólo una enzima, Xba I, lo

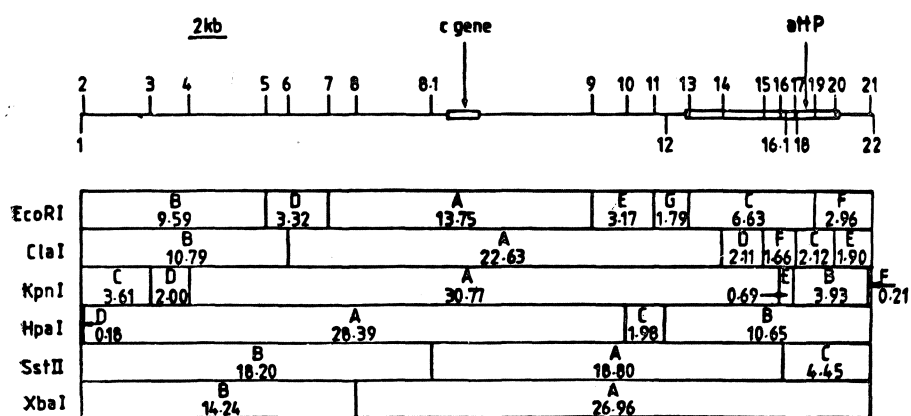


Figura 7. Mapa de restricción de ØC 31 (13). Los segmentos con doble línea no son esenciales para la formación de placas de lisis

corta en un solo lugar y éste se asume que es esencial por su localización para la viabilidad del bacteriófago ; otras enzimas usadas normalmente, como Bam HI, Pst I, Xho I, Bgl II, Sst I y Pvu II no cortan el ADN del bacteriófago, y por último, otra serie de enzimas lo hacen en multitud de lugares (14, 15). Por ello, se pensó en introducir en una zona no esencial de la molécula de ADN de ØC 31, algún segmento de ADN extraño que contuviese secuencias de reconocimiento para algunas de las enzimas que no la cortaban. Así, los únicos lugares de corte de dichas endonucleasas estarían en regiones no necesarias para la viabilidad del bacteriófago y serían por tanto susceptibles de admitir inserciones.

La introducción de un nuevo ADN en una molécula de ADN bacteriofágico, presenta el problema de que existen límites en cuanto a la cantidad que es empaquetable en la cápsida, siendo común además, que el tamaño de la molécula de ADN bacteriofágico esté muy cercana al límite superior de empaquetamiento. En el caso de ØC 31 los límites oscilan entre 36,2 y 42,5 Kb, aunque la información genética esencial para la viabilidad del bacteriófago ocupa sólo 32 Kb, como máximo (13, 22). Como la molécula de ADN de ØC 31 tiene un tamaño de 41,18 Kb, el primer paso para la realización del experimento enunciado anteriormente fue la obtención de mutantes con deleciones, que al poseer menor cantidad de ADN que el tipo silvestre pudiesen admitir fragmentos extraños de tamaño apreciable.

2) *Obtención de mutantes con deleciones*

Como ya dijimos, el ADN de ØC 31 presenta extremos cohesivos, esto significa que ha de existir una enzima que corte la molécula concatémica formada durante la replicación del virus, en un lugar específico y sólo una vez por genoma. En consecuencia, es posible obtener mutantes con deleciones a partir de este bacteriófago. Estos mutantes pueden seleccionarse por su mayor resistencia, respecto al tipo silvestre, a la acción combinada de agentes quelantes y de temperatura (39). Las deleciones que se han obtenido con estos tratamientos están localizadas en dos puntos del genoma de ØC 31 ; bien en el centro de la molécula, implicando el gen C que codifica para el represor y originando por tanto bacteriófagos placa clara (35), o bien en el lado derecho de aquélla (en los fragmentos C o F del mapa de restricción con Eco RI). En este último caso se pierde en algunos mutantes la capacidad de lisogenizar de forma estable, puesto que la deleción comprende secuencias en la región att P (12).

3) El híbrido ØC 31 :: pBR 322

Una vez obtenidos los mutantes con deleciones, el paso siguiente era obtener un ØC 31 cuyo ADN poseyera insertadas las secuencias de corte de algunas enzimas que no afectasen al ADN original del mismo. Se escogió el plásmido de pBR 322 *Escherichia coli*, porque siendo suficientemente pequeño como para ser introducido en el mutante ØC 31 cts $\Delta M \Delta 23$ poseía lugares únicos de corte para Bam HI, Pst I y Pvu II que no cortan el ADN de ØC 31 y, por lo tanto, serían lugares aptos para clonación. Por otro lado, era interesante poder analizar el comportamiento de una molécula híbrida de estas características, fundamentalmente en cuanto a su utilización como vector bifuncional en *E. coli* y *Streptomyces* y también para conocer si los genes procedentes de un huésped se expresaban en el otro.

La inserción de pBR 322 en el ADN de ØC 31 se realizó *in vitro* mediante corte parcial de la molécula bacteriofágica con Eco RI y ligación posterior con el plásmido también restringido por la misma enzima. Después de realizar la transfección de la mezcla de ligación, se determinaron las placas de lisis que contenían pBR 322 mediante hibridación por el método de Benton y Davis (2) con el propio plásmido marcado radiativamente. La inserción se realizó únicamente en el punto de corte para Fco RI que separa los fragmentos C y F (figura 8 a) (48).

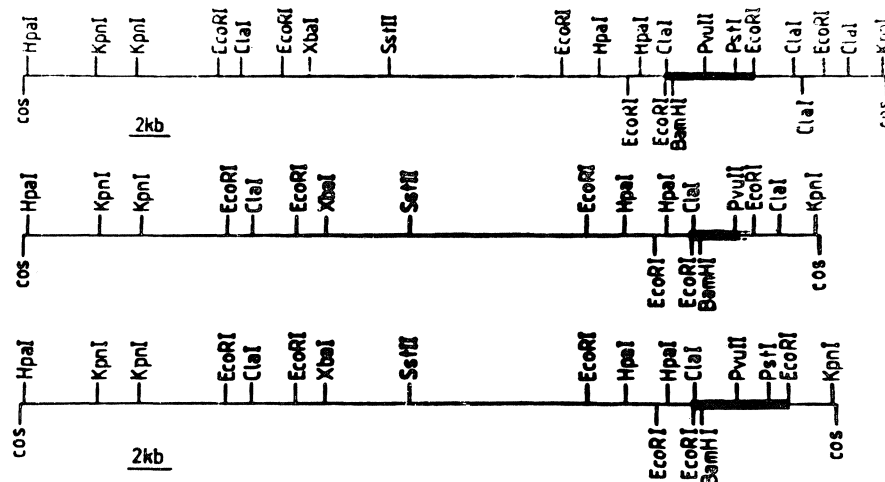


Figura 8. Mapa de restricción de la quimera ØC 31 :: pBR 322 (a) y de sus mutantes con deleciones $\Delta W 12$ (b) y $\Delta W 17$ (c). Los fragmentos correspondientes a pBR 322 se representan en trazo grueso (13-14, 17)

Las propiedades más importantes de esta quimera respecto a su utilización como progenitor de vectores de clonación podríamos resumirlas así:

Posee lugares únicos de corte para Bam HI y Pst I en lugares no necesarios para la viabilidad del bacteriófago o del plásmido.

Puede ser introducida por transformación en *Escherichia coli*, donde se comporta como un plásmido multicopia y expresa normalmente las resistencias a tetraciclina y ampicilina de pBR 322. Este plásmido puede ser extraído de *E. coli* y usado para transfectar *Streptomyces*, en donde se comporta como un bacteriófago temperado, sin que se produzcan en éstos cambios de huésped, delecciones o reordenaciones de ADN (48-49).

El gen de resistencia a tetraciclina, procedente de pBR 322, presenta un bajo nivel de expresión en *Streptomyces*, de modo que se detecta un aumento de la resistencia en aquellos que son muy sensibles (*S. albus* P y *S. albus* G), cuando están lisogenizados por la quimera (12).

La quimera es restringida por *Streptomyces albus* P (49) que posee un sistema de restricción, SaI PI, que es un esquizoisómero de Pst I (9, 10).

ØC 31 cts Δ M Δ 23 :: pBR 322 contiene un 3 % más de ADN que el bacteriófago silvestre, de modo que aunque es estable, fue muy fácil obtener a partir de él mutantes con delecciones por tratamiento con pirofosfato. Las delecciones obtenidas afectaban nuevamente al extremo derecho del mapa físico del bacteriófago, de tal modo que en su conjunto definen un segmento continuo de unas 8 Kb, no esencial para la formación de placas de lisis, que comprende la totalidad del fragmento C y parte del F del mapa de restricción con Eco RI.

4) Vectores derivados de ØC 31 :: pBR 322

Los mutantes obtenidos a partir de nuestra quimera inicial podríamos dividirlos en dos tipos, aquellos cuyas delecciones comprenden parte del plásmido pBR 322, además de genes bacteriofágicos situados a su derecha y que en principio no serían capaces de replicarse en *Escherichia coli* y aquellos otros que únicamente carecen de genes bacteriofágicos situados a la derecha de pBR 322 y por tanto todavía son vectores bifuncionales. Dentro de estos últimos, los que presentan delecciones mayores han perdido el segmento att P (12), por lo cual son incapaces de integrarse de forma estable en el ADN del *Streptomyces* huésped. A continuación veremos las características de un representante de cada uno de estos dos tipos.

5) Vector ØC 31 :: pBR 322 Δ W 12

Este vector posee una delección de 4,8 Kb que abarca parte de pBR 322, incluyendo el gen de la resistencia a la ampicilina y el sitio Pst I, y genes bacteriofágicos situados a su derecha (*figura 8 b*) (13). Este vector aún conserva el sitio att P, por lo que lisogeniza *Streptomyces* de forma efectiva y puede ser usado como vector de inserción para Bam^H HI. En este lugar se clonó el gen de la resistencia a la viomicina, procedente de pIJ 41, de modo que el bacteriófago es capaz de transducir dicha resistencia, siendo así posible aislar los lisógenos simplemente por su capacidad de crecimiento en presencia del antibiótico (12). Esto posee ventajas en aquellos casos en que la capacidad de lisogenización es muy baja, o bien en aquellos otros en que se pretende obtener clones sensibles a bacteriófago a partir de cepas resistentes, ya que gracias a la resistencia a la viomicina tenemos un método de selección positiva, puesto que los únicos organismos lisogénicos y por tanto resistentes al antibiótico, serán los sensibles al bacteriófago.

6) Vector ØC 31 :: pBR 322 Δ W 17

Este bacteriófago posee aún íntegra la porción de ADN correspondiente a pBR 322, pero ha perdido alrededor de 4,2 Kb de ADN bacteriofágico situado a la derecha del mismo, incluyendo el sitio att P (*figura 8 c*). Así pues, el vector es bifuncional (en forma plasmídica, como se mantiene en *Escherichia coli*, se le denomina pIJ 502), pero carece de la facultad de lisogenizar *Streptomyces*, por lo que no es posible obtener clones con inserciones estables (12). Este problema ha sido solventado mediante la replicación de las placas de lisis producto de la transfección a un lisógeno de ØC 31, de tal modo que pueda verificarse una recombinación homóloga entre el vector y el probacteriófago residente. Ahora bien, este proceso es muy ineficiente, por lo cual, en la práctica, la replicación se realiza sobre una mezcla de *Streptomyces* lisógeno y no lisógeno, para que así se produzca una amplificación de los bacteriófagos replicados a expensas del huésped no lisogénico, de modo que así se aumenta la frecuencia de recombinación con los probacteriófagos de los lisógenos y se incrementa la probabilidad de detectar fenotípicamente el ADN clonado (12, 25).

ØC 31 :: pBR 322 Δ W 17 ha sido utilizado como vector de reemplazamiento para las enzimas Bam^H HI y Pst I. El corte del vector (obtenido de *Escherichia coli* de modo que sus extremos cohesivos están unidos de forma

covalente) con estas enzimas origina dos fragmentos, de los cuales el mayor contiene la totalidad de los genes bacteriofágicos, pero es demasiado pequeño para ser empaquetado eficientemente. Por ello, todas las placas de lisis que se obtienen en la transfección después de un experimento de clonación, poseen inserciones de entre 2 y 8 Kb (15).

En el momento actual se está desarrollando toda una serie de vectores a partir de Δ W 17, que presentan ventajas sobre éste, fundamentalmente porque contienen genes de resistencia a viomicina y/o tioestreptona (subclonados a partir de los vectores plasmídicos). Algunos de estos vectores presentan la ventaja adicional de que se han convertido en vectores de reemplazamiento, gracias a lugares de corte que portan los nuevos fragmentos de ADN en conjunción con otros homólogos de la molécula residente. Un ejemplo notable lo constituye el vector KC 400, resultado de insertar el fragmento Bam HI que contiene la resistencia a la viomicina en el lugar correspondiente del pBR 322 presente en Δ W 17. El fragmento insertado contiene un lugar de corte por Pst I fuera del gen de resistencia al antibiótico, de modo que éste en unión con el lugar Pst I de pBR 322, origina un vector de reemplazamiento para dicha enzima, que conserva después del corte la resistencia al antibiótico y que es capaz de acomodar hasta 6 Kb (12). A partir de KC 400 se ha obtenido el vector KC 401, que presenta una pequeña delección respecto al parental, lo cual, aparte de permitir usarlo como vector de reemplazamiento para Pst I, admitiendo hasta 8 Kb de ADN extraño, previene la obtención de transfectantes conteniendo sólo el fragmento mayor de la digestión con Pst I, recircularizado, al ser éste menor que el tamaño mínimo de empaquetamiento de ADN en la cápsida de ϕ C 31 (22).

PERSPECTIVAS DE LA CLONACION EN *STREPTOMYCES*

El desarrollo de los sistemas de clonación en *Streptomyces* hace posible que en el momento actual se pueda clonar cualquier gen con una expresión fenotípica reconocible, incluso mediante la clonación del genoma total.

El desarrollo de nuevos vectores ha sido objeto de un tratamiento exhaustivo en una reciente revisión (25), y previsiblemente irá hacia la obtención de moléculas especializadas en la producción, por ejemplo, de un alto nivel de expresión (sea mediante la utilización de plásmidos multicopia o mediante la colocación del ADN clonado bajo el control de promotores eficientes). También sería conveniente obtener vectores que faculten para la excreción del producto del gen clonado y vectores muy estables cuya curación sea

difícil o imposible, no sólo en condiciones de laboratorio, sino también en las de una fermentación en gran escala.

Evidentemente, en un organismo como *Streptomyces*, es previsible que los mayores esfuerzos en clonación vayan dirigidos hacia la mejora de cepas de interés aplicado o bien hacia el estudio de las características peculiares de este género, como los procesos de diferenciación.

De hecho, ya han sido dados los primeros pasos en este sentido; así, J. A. Gil ha conseguido clonar la sintetasa del ácido p-aminobenzoico de *Streptomyces griseus*, un metabolito fundamental en la biosíntesis de canidicina (comunicación personal). Por otra parte, se han clonado también genes de producción del antibiótico metilenomicina codificado por el plásmido SCP I de *S. coelicolor* (K. Chater, comunicación personal).

La mejora de cepas productoras de metabolitos de interés industrial podría llevarse a cabo fundamentalmente de dos formas: mediante el incremento en la cantidad de producto obtenido, o bien mediante la producción de metabolitos modificados, con propiedades diferentes a las del original, con valor comercial.

Parece claro que un aumento en la producción de un determinado metabolito secundario, fundamentalmente un antibiótico, no se podrá obtener mediante la clonación de toda la ruta biosintética del mismo, puesto que éstas implican varios genes que además no tienen porqué estar agrupados en el genoma del *Streptomyces*. Así, en este punto las previsiones se dirigen hacia la clonación de genes que resultan ser pasos limitantes en una ruta biosintética, de modo que un incremento en el producto de dicho gen debería traducirse en un aumento en la cantidad de producto final.

La obtención de nuevos metabolitos podría lograrse mediante dos protocolos diferentes. El primero se basa en que como es sabido un *Streptomyces* determinado produce habitualmente una serie de metabolitos relacionados estructuralmente que forman una «familia» y de los cuales uno, el que se extrae, es producido en mayor cantidad que el resto. Si fuera posible alterar esta proporción mediante la clonación de un gen que dirigiese la ruta biosintética de forma preferente por uno de los «camino secundarios», estaríamos en disposición de obtener productos nuevos, ya producidos anteriormente por nuestra cepa, pero ahora en cantidades que hicieran posible su explotación a escala industrial.

La segunda aproximación a la obtención de metabolitos modificados estaría en la clonación de genes cuyos productos enzimáticos fueran capaces de llevar a cabo sustituciones en la molécula del tipo, por ejemplo, de los obtenidos actualmente *in vitro* en la fabricación de antibióticos semisintéti-

cos, lo cual evitaría el incremento en los costes producidos por dicha manipulación.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a los Dres. K. F. Chater, C. Hardisson y R. Rodicio la lectura crítica de este manuscrito.

REFERENCIAS

1. AGUILAR, A., and HOPWOOD, D. A. 1982. Determination of methylenomycin synthesis by the pSV 1 plasmid from *Streptomyces violaceus-ruber* SANK 95570. J. Gen. Microbiol., 128, 1893-901.
2. BENTON, W. D., and DAVIS, R. W. 1977. Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. Science, 196, 180-82.
3. BERDY, J. 1980. Recent advances in, and prospects of antibiotic research. Process Biochem, oct.-nov., 28-35.
4. BIBB, M. J.; FREEMAN, R. F., and HOPWOOD, D. A. 1977. Physical and genetical characterization of a second sex factor, SCP 2, for *Streptomyces coelicolor*. Mol. Gen. Genet., 154, 155-66.
5. BIBB, M. J.; SCHOTTEL, J. L., and COHEN, S. N. 1980. A DNA cloning system for interspecies gene transfer in antibiotic producing *Streptomyces*. Nature, 284, 526-31.
6. BIBB, M. J.; WARD, J. M., and HOPWOOD, D. A. 1978. Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. Nature, 274, 398-400.
7. BIBB, M. J.; WARD, J. M.; KIESER, T.; COHEN, S. N., and HOPWOOD, D. A. 1981. Excision of chromosomal DNA sequences for *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. Mol. Gen. Genet., 184, 230-40.
8. BRADLEY, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev., 31, 230-314.
9. CARTER, J. A.; CHATER, K. F.; BRUTON, C. J., and BROWN, N. L. 1980. A comparison of DNA cleavage by the restriction enzymes Sal PI and Pst I. Nucleic Acids Res., 8, 4943-54.
10. CHATER, K. F. 1977. A site specific endodeoxyribonuclease from *Streptomyces albus* CMI 52766 sharing site-specificity with *Providencia stuartii* endonuclease Pst I. Nucleic Acids Res., 4, 1989-98.
11. CHATER, K. F. 1979. Some recent developments in *Streptomyces* genetics. Proc. Int. Symp. Genet. Ind. Microorg. 3rd, 123-33.
12. CHATER, K. F.; BRUTON, C. J.; KING, A. A., and SUÁREZ, J. E. 1982. The expression of *Streptomyces* and *Escherichia coli* drug resistance determinants cloned into the *Streptomyces* phage ϕ C 31. Gene, 19, 21-32.
13. CHATER, K. F.; BRUTON, C. J.; SPRINGER, W., and SUÁREZ, J. E. 1981. Dispensable sequences and packaging constraints of DNA from the *Streptomyces* temperate phage ϕ C 31. Gene, 15, 249-56.

14. CHATER, K. F.; BRUTON, C. J. and SUÁREZ, J. E. 1981. Restriction mapping of the DNA of the *Streptomyces* temperate phage ØC 31 and its derivatives. *Gene*, **14**, 183-94.
15. CHATER, K. F.; BRUTON, C. J.; SUÁREZ, J. E. and SPRINGER, W. 1981. *Streptomyces* phages and their applications in DNA cloning. En D. SCHLESSINGER (ed.), *Microbiology 1981*, 380-83. American Society for Microbiology, Washington.
16. CHATER, K. F., and HOPWOOD, D. A. 1982. *Streptomyces* genetics. En M. GOODFELLOW, M. MODDARSKI and S. T. WILLIAMS (eds.), *The Actinomycetes*. Academic Press, London (en prensa).
17. CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A.; KIESER, T., and THOMPSON, C. J. 1982. Cloning in *Streptomyces*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **96**, 69-95.
18. CHATER, K. F., and MERRICK, M. J. 1979. Streptomycetes. En J. H. PARISH (ed.), *Developmental Biology of Prokaryotes*, 93-114. Blackwell Sci. Publications, Oxford.
19. GERBER, N. N., and LECHEVALIER, H. A. 1965. Geosmin, an earthy smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, **13**, 935-38.
20. HARDISSON, C., and MANZANAL, M. B. 1976. Ultrastructural studies of sporulation in *Streptomyces*. *J. Bacteriol.*, **127**, 1443-54.
21. HARDISSON, C.; MANZANAL, M. B.; SALAS, J. A., and SUÁREZ, J. E. 1978. Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.*, **105**, 203-14.
22. HARRIS, J. E.; CHATER, K. F.; BRUTON, C. J., and PIRET, J. M. 1982. The restriction-mapping and use in cloning vector development of *c* gene deletions of *Streptomyces* phage ØC 31. *Mol. Gen. Genet.*, enviado.
23. HAYAKAWA, T.; OTAKE, N.; YONEHARA, H.; TANAKA, T., and SAKAGUCHI, K. 1979. Isolation and characterization of plasmids from *Streptomyces*. *J. Antibiot.*, **32**, 1348-50.
24. HOPWOOD, D. A. 1978. Extracromosomally determined antibiotic production. *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**, 373-92.
25. HOPWOOD, D. A., and CHATER, K. F. 1982. Cloning in *Streptomyces*. Systems and strategies. En J. SETLOW and A. HOLLAENDER, (eds.), *Genetic Engineering*, vol. 4. Plenum Press, New York (en prensa).
26. HOPWOOD, D. A.; CHATER, K. F.; DOWDING, J. E., and VIVIAN, A. 1973. Advances in *Streptomyces coelicolor* genetics. *Bacteriol. Rev.*, **37**, 371-405.
27. HOPWOOD, D. A.; THOMPSON, C. J.; KIESER, T.; WARD, J. M., and WRIGHT, H. M. 1981. Progress in the development of plasmid cloning vectors for *Streptomyces*. En D. SCHLESSINGER (ed.), *Microbiology 1981*, 376-79. American Society for Microbiology, Washington.
28. HOPWOOD, D. A.; WRIGHT, H. M.; BIBB, M. J., and COHEN, S. N. 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. *Nature*, **268**, 171-73.
29. ISOGAI, T.; TAKAHASHI, H., and SAITO, H. 1981. Actinophage R4 as a DNA cloning vector in *Streptomyces*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **27**, 373-79.
30. KIESER, T.; HOPWOOD, D. A.; WRIGHT, H. M., and THOMPSON, C. J. 1982. pIJ 101, a multicopy broad host range *Streptomyces* plasmid: Functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol. Gen. Genet.*, **185**, 223-38.
31. KIRBY, R., and HOPWOOD, D. A. 1977. Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP 1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Gen. Microbiol.*, **98**, 239-52.

32. KIRBY, R.; LEWIS, E., and BOTHA, C. 1982. A survey of *Streptomyces* species for covalently closed circular DNA using a variety of methods. FEMS Microbiol. Let., 13, 79-82.
33. KONVALINKOVA, V.; ROELANTS, P., and MERGEAY, M. 1977. Transfection in *Streptomyces virginiae*. Biochem. Soc. Trans., 5, 941-43.
34. KRUGEL, H.; FIEDLER, G., and NOACK, D. 1980. Transfection of protoplasts from *Streptomyces lividans* 66 with actinophage SH 10 DNA. Mol. Gen. Genet., 177, 297-300.
35. LOMOVSKAYA, N. D.; CHATER, K. F., and MKRTUMIAN, N. M. 1980. Genetics and Molecular Biology of *Streptomyces* bacteriophages. Microbiol. Rev., 44, 206-29.
36. MAKINS, J. F., and HOLT, G. 1981. Liposome mediated transformation of streptomycetes by chromosomal DNA. Nature, 293, 671-73.
37. OKANISHI, M.; HAMANA, K., and UMEZAWA, H. 1968. Factors affecting infection of protoplasts with DNA of actinophage PK 66. J. Virol., 2, 686-91.
38. OKANISHI, M.; MANOME, T., and UMEZAWA, H. 1980. Isolation and characterization of plasmid DNA in actinomycetes. J. Antibiot., 33, 88-91.
39. PARKINSON, J. S., and HUSKEY, R. J. 1971. Deletion mutants of bacteriophage λ . I. Isolation and initial characterization. J. Mol. Biol., 56, 369-84.
40. RODICIO, R., and CHATER, K. F. 1982. Small DNA free liposomes stimulate transfection of *Streptomyces* protoplasts. J. Bacteriol., 151, 1078-85.
41. ROELANTS, P.; KONVALINKOVA, V.; MERGEAY, M.; LURQUIN, P., and LEDOUX, L. 1976. DNA uptake by *Streptomyces* species. Biochim. Biophys. Acta, 442, 117-22.
42. SCHOTTEL, J. L.; BIBB, M. J., and COHEN, S. N. 1981. Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of antibiotic resistance genes derived from *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 146, 360-68.
43. SCHREMPF, H.; BUJARD, H.; HOPWOOD, D. A., and GOEBEL, W. 1975. Isolation of covalently closed circular deoxyribonucleic acid from *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol., 121, 416-21.
44. SCHREMPF, H., and GOEBEL, W. 1977. Characterization of a plasmid from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). J. Bacteriol., 131, 251-58.
45. SKURRAY, R. A., and REEVES, P. 1973. Characterization of lethal zygotis associated with conjugation in *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol., 113, 58-70.
46. STUTTARD, C. S. 1979. Transduction of auxotrophic markers in a chloramphenicol producing strain of *Streptomyces*. J. Gen. Microbiol., 110, 479-82.
47. SUAREZ, J. E., and CHATER, K. F. 1980a. Polyethylene glycol assisted transfection of *Streptomyces* protoplasts. J. Bacteriol., 142, 8-14.
48. SUAREZ, J. E., and CHATER, K. F. 1980b. DNA cloning in *Streptomyces*: A bifunctional replicon comprising pBR 322 inserted into a *Streptomyces* phage. Nature, 286, 527-29.
49. SUAREZ, J. E., and CHATER, K. F. 1981. Development of a DNA cloning system in *Streptomyces* using phage vectors. Cien. Biol.: Biol. Mol. Cel., 6, 99-110.
50. THOMPSON, C. J.; KIESER, T.; WARD, J. M., and HOPWOOD, D. A. 1982. Physical analysis of antibiotic resistance genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. Gene, en prensa.

-
51. THOMPSON, C. J.; SKINNER, R. H.; THOMPSON, J.; WARD, J. M.; HOPWOOD, D. A., and CUNDLIFFE, E. 1982. Biochemical characterization of resistance determinants cloned from antibiotic producing streptomycetes. *J. Bacteriol.*, 151, 678-85.
 52. THOMPSON, C. J.; WARD, J. M., and HOPWOOD, D. A. 1980. DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic producing species. *Nature*, 286, 525-27.
 53. THOMPSON, C. J.; WARD, J. M., and HOPWOOD, D. A. 1982. Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in *Streptomyces*. *J. Bacteriol.*, 151, 668-77.